

Fachbereich Biologie, Abteilung für Ökologie

**Untersuchungen zur Expression von  
Oberflächenproteinen und induzierter  
Serotyptransformation bei *Paramecium primaurelia***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der  
Technischen Universität Kaiserslautern  
unter Anleitung von Prof. Dr. H.J. Schmidt

Vorgelegt von Diplom Biologin  
Petra Albrecht  
im Juli 2003

Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. J. Cullum

1. Gutachter:

Prof. Dr. H.J. Schmidt

2. Gutachter

Prof. Dr. H. Zankl

**Für Oliver und Jan-Eric**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Oberflächenproteine von <i>Paramecium</i> .....	3
1.2	Serotyptransformation.....	5
1.3	Expression der Oberflächenproteine bei <i>Paramecium</i> .....	7
1.4	Das Serotypsystem von <i>Paramecium primaurelia</i> ...	10
1.5	Die Serotypstrukturgene von <i>Paramecium primaurelia</i>	11
1.6	Mögliche Funktion der Oberflächenproteine bei <i>Paramecium</i> .....	12
1.7	Ziele der Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>15</b>
2.1	Organismen .....	15
2.2	Kulturmedien .....	15
2.2.1	Medien für Paramecien .....	15
2.2.1.1	WGP Medium III.....	15
2.2.1.2	Strohmedium.....	16
2.2.2	Medien für Bakterien.....	16
2.3	Stammlösungen zur Kultivierung.....	16
2.4	Puffer zur Immunofluoreszenzmarkierung und ELISA .....	17
2.5	Lösungen zur Proteinisolation .....	18

<b>2.6 Lösungen zur Klonierung .....</b>	<b>22</b>
<b>2.7 Elektrophoreselösungen .....</b>	<b>23</b>
<b>2.8 Geräte .....</b>	<b>24</b>
2.8.1 Laborgeräte .....	24
2.8.2 Optik .....	25
<b>2.9 Chemikalien und Material .....</b>	<b>25</b>
2.9.1 Glasmaterial.....	25
2.9.2 Verbrauchsmaterial .....	26
2.9.3 Chemikalien .....	26
<b>2.10 Kits und Enzyme für molekularbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>27</b>
<b>2.11 Antiseren .....</b>	<b>27</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1 Kultivierung von Paramecien .....	29
3.2 Isolation der Oberflächenproteine vom Zellcortex ...	31
3.3 Immobilisierungsreaktion .....	32
3.4 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.....	33
3.4.1 Fixierung der Zellen.....	34
3.4.2 Markierung eines Oberflächenproteintyps .....	34
3.4.3 Doppelmarkierung von Oberflächenproteinen .....	35
3.5 ELISA.....	36
3.6 PCR-Techniken .....	37

<b>3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6.2 Standard-PCR.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6.3 Long-Run PCR.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.4 RT-PCR.....</b>	<b>40</b>
3.6.4.1 Isolation von mRNA aus der <i>Paramecium</i> -Zelle .....	41
3.6.4.2 Single Step RT-PCR.....	42
3.6.4.3 Multiplex RT-PCR .....	43
<b>3.7 Elektrophoresetechniken.....</b>	<b>45</b>
3.7.1 Gelelektrophorese .....	45
3.7.2 SDS-PAGE .....	46
<b>3.8 Induzierte Serotyptransformation .....</b>	<b>47</b>
<b>3.9 Freilandversuche.....</b>	<b>47</b>
3.9.1 Ansiedelung von Paramecien in den Versuchsteichen .....	48
3.9.2 Aufbereitung von Freilandproben.....	49
<b>3.10 Klonierung und Sequenzierung von unbekanntem Sequenzen von Oberflächenproteinen .....</b>	<b>51</b>
3.10.1 DNA-Aufreinigung .....	51
3.10.2 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	51
3.10.3 Ligation .....	51
3.10.4 Hitzeschocktransformation.....	52
3.10.5 Selektion der Transformanten und Insertanalyse .....	52

3.10.6 Sequenzierung .....	52
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
4.1 Nachweismethoden zur Identifizierung von Serotypen .....	53
4.1.1 Immobilisierung .....	53
4.1.2 Immunofluoreszenzfärbungen.....	54
4.1.3 RT-PCR.....	58
4.2 Experimente zur Serotyptransformation .....	60
4.2.1 Ablauf eines temperaturinduzierten Serotypwechsels .....	60
4.2.2 Induzierter Serotypwechsel durch Hunger .....	68
4.2.3 Serotyptransformation durch pH-Wert-Veränderung .....	69
4.2.4 Serotyptransformation durch Veränderung des Salzgehaltes .....	79
4.2.5 Wechsel des Serotyps durch Anwesenheit von Prädatoren .....	81
4.3 Koexpression.....	83
4.3.1 Nachweis von Koexpression bei <i>Paramecium primaurelia</i> .....	83
4.3.2 ELISA-Experimente .....	89

4.3.3	Faktoren, die die Expression eines Mischzustandes innerhalb einer Kultur beeinflussen .....	90
4.4	Freilandexperimente .....	94
4.4.1	Kontrollteich .....	94
4.4.2	Beheizbarer Teich.....	98
4.4.3	Kühlteich .....	99
4.5	Wiederaufnahme von Oberflächenproteinen in die Zelle .....	100
4.6	Sequenzanalysen unbekannter Serotypprotein-Gene von <i>Paramecium primaurelia</i> .....	102
4.6.1	Ergebnisse der Long Run PCR.....	102
4.6.2	Sequenzanalysen und Vergleich von Fragmenten der Oberflächenproteine 41G, 60G sowie 41D und 60G .....	104
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
5.1	Nachweismethoden zur Identifizierung von Serotypproteinen.....	106
5.2	Sequenzanalyse unbekannter Serotypproteingene.....	110
5.3	Experimente zur Serotyptransformation .....	115
5.4	Freilandexperimente .....	123
5.5	Wiederaufnahme von Oberflächenproteinen in die Zelle .....	132
5.6	Koexpression von Serotypproteinen.....	134



<b>5.7 Mögliche Rolle der Serotypexpression und Serotyptransformation bei <i>Paramecium primaurelia</i> und Ausblick.....</b>	<b>140</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>144</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>162</b>
<b>11 Danksagung .....</b>	<b>178</b>

# 1 Einleitung

Alle lebenden Zellen sind zur Abgrenzung gegen die Außenwelt durch eine Biomembran abgeschlossen. Diese sogenannte Plasmamembran bildet eine Barriere zwischen cytoplasmatischem Kompartiment und umgebendem extrazellulären Raum und spielt somit durch ihre molekularen Bestandteile eine große Rolle als Vermittler zwischen Zellinnerem und Zelläußerem.

Die Aufgaben der Zellmembran sind deshalb vielgestaltig. So stellt sie zum einen den Schutz der Zelle gegen das umgebende Medium dar und regelt den Transport in und aus der Zelle. Zum anderen trägt sie durch ihr Membranpotential und durch die, in sie eingelagerten Rezeptoren für Signalmoleküle, zur Aufnahme und Weiterleitung von Signalen bei. Auch ist sie für die Funktion der Zell-Zell-Kommunikation unverzichtbar. Der Aufbau der Plasmamembran war lange Zeit ungeklärt, doch konnte mit der Einführung der Elektronenmikroskopie und einer entsprechenden Präparationstechnik ein Modell postuliert werden, das sog. Mosaik-Fluid-Modell (SINGER & NICOLSON, 1972). Dieses besagt, dass das strukturelle Gerüst einer Membran eine flüssig-kristalline Doppelschicht ist, in die integrale, in dieser Doppelschicht frei bewegliche, Membranproteine eingelagert sind. Nach und nach konnten die in der Plasmamembran enthaltenen Moleküle als verschiedene Glykolipide und Glykoproteine identifiziert und ihre Funktion zu einem großen Teil aufgeklärt werden.

So konnte auch gezeigt werden, dass der Zellmembran an ihrer Außenseite immer exponierte Strukturen aufgelagert sind, die man als membranständige Antigene bezeichnet. Diese können in einem Fremdorganismus (z.B. Säugetier) die Bildung spezifischer Antikörper induzieren und werden somit durch das Immunsystem der Wirbeltiere als „fremd“ erkannt.

Dagegen werden körpereigene Zellen nicht angegriffen, was man als Immuntoleranz bezeichnet.

Toxine und Zellparasiten machen sich ebenfalls diese exponierten Strukturen zunutze und finden hier ihren ersten Kontakt zu den Zielzellen. Dringen Zellparasiten, Viren oder Bakterien in einen Organismus ein, werden diese jedoch ebenso an ihren eigenen aufgelagerten, membranständigen Antigenen erkannt und ein komplexer Mechanismus der Immunabwehr wird in Gang gesetzt, was letztendlich zur Vernichtung der Fremdkörper führen kann.

Viele pathogene Mikroorganismen haben jedoch im Laufe der Zeit Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben das Immunsystem ihres Wirtes zu umgehen. Dies trifft zum Teil für Bakterien (z.B. *Salmonella*) oder Retroviren (z.B. *Influenza*) zu, die durch eine hohe Variabilität ihrer Oberflächenantigene das Immunsystem des Wirtsorganismus unterlaufen.

Von Protozoen, zu deren Vertreter einige der gefährlichsten Krankheitserreger zählen, ist das Verhalten, variable Antigene auf ihren Plasmamembranen auszubilden, ebenso bekannt. Zu ihnen zählt z.B. *Trypanosoma brucei*, ein parasitischer Einzeller, der beim Menschen die afrikanische Schlafkrankheit auslöst. Die zugrunde liegende Strategie dieses Parasiten ist die replikative Transposition. Verantwortlich für die Antigen-Variabilität ist hier eine Familie von Glykoproteingenen, die als Basis-Kopien vorliegen (DONELSON & TURNER, 1985). Die Transkription eines variablen Oberflächenproteins erfolgt aus einer definierten Position heraus, die immer in der Nähe der chromosomalen Telomere liegt und als „expression sites“ bezeichnet wird. Nur jeweils ein Oberflächenprotein kann in dieser Position exprimiert werden. In anderen Bereichen der tryposomalen Chromosomen existiert ein Speicher von bis zu 1000 unterschiedlichen variablen Oberflächenproteingenen, die nicht exprimiert werden. Beim Umschalten der Expression von einem zum anderen Gen, wird eine Expressionskopie des neuen variablen Oberflächenproteins hergestellt. Das zuvor an der „expressions site“ liegende Gen wird eliminiert und die neue Kopie einfach dort eingesetzt.

Der einzellige Parasit *Plasmodium* hat als Anpassung an die parasitische Lebensweise eine weitere Möglichkeit entwickelt dem Immunsystem zu entgehen. Dieser löst mit Hilfe einer spezifischen Phospholipase (MCCONKEY ET AL., 1990) die Verbindung der Proteine zur Membran. Als Folge davon schält sich somit nach einem wiederkehrenden Rhythmus die gesamte Oberflächenproteinschicht ab und der Parasit präsentiert dem Wirt einen neuen Proteinmantel. Somit liegt das Immunsystem des Wirtes in der Produktion von spezifischen Antikörpern zeitlich immer versetzt hinter der Antigen-Herstellung des *Plasmodiums*, so dass die Immunabwehr des Wirtes keine Chance hat alle, in den Organismus eingedrungenen, Plasmodien zu vernichten. Die Folge sind periodisch wiederkehrende Fieberschübe des befallenen Organismus.

Neben diesen pathogenen Protozoen verfügen auch zahlreiche freilebende Ciliaten wie *Tetrahymena* oder *Paramecium* über ein großes Repertoire an variablen Ober-

flächenproteinen. Diese werden seit Jahren untersucht, da Ciliaten als einzellige eukaryotische Organismen ein optimales Modellsystem für das Verstehen von cytologischen Vorgängen in und auf der Zelle darstellen.

### 1.1 Die Oberflächenproteine von *Paramecium*

*Paramecium* ist ein holotricher Ciliat, der ganzjährig in Süßgewässern omniglobal vorkommt. Wie alle Ciliaten zeichnet sich auch *Paramecium* durch einen Kern-dualismus mit gleichzeitig vorkommenden somatischen, polyploiden Makronukleus und einem, oder mehrere generative, diploide Mikronuklei aus. Die Vermehrung erfolgt asexuell durch Autogamie oder durch Querteilung, sowie sexuell durch Konjugation, wobei sich zwei Paramecien des gleichen Paarungstyps aneinander lagern und es dabei zum Austausch von chromosomalem Material durch einen Porus kommt.

*Paramecium* gehört zu einem der am weitesten entwickelten Protozoen, das neben einem osmoregulatorischen Drainagesystem mit kontraktilen Vakuolen auch ein komplex aufgebautes Corticalplasma besitzt. Aufgrund seiner guten Kultivierbarkeit wird es in Laborsystemen seit Jahrzehnten als Versuchsorganismus intensiv erforscht. Dabei wurden umfassende Untersuchungen zu *Paramecium* in den Themengebieten der Zellbiologie, Genetik, Zoologie und Populationsökologie erstellt.

Die Erkenntnis, dass auch *Paramecium* ein variables Oberflächenantigenensystem besitzt, gelang schon 1905 Rösle, der folgendes feststellte: Injiziert man abgetötete Paramecien in einen Säugerorganismus, erkennt dessen Immunsystem die Zellen als Fremdorganismen und bildet dagegen Antikörper. Gab Rösle anschließend das aus dem Blut des Tieres gewonnene Antiserum zu lebenden *Paramecium*-Kulturen, führte dies zur Immobilisierung der Cilien und somit zu einem Absterben der Zellen. Aus diesem Grund werden die Oberflächenproteine von *Paramecium* auch als Immobilisierungsantigene oder „i-AGs“ bezeichnet.

*Paramecium* besitzt ein umfangreiches Oberflächenantigenensystem, das aus mehr als zehn serologischen Varianten besteht, die auch als Serotypen bezeichnet werden. Bei allen Schwesternarten des *Paramecium aurelia*-Komplexes, sowie bei *Paramecium caudatum* und *Paramecium multimicronucleatum* konnten variable Oberflächenantigene (Varianzantigene) nachgewiesen werden.

Die Ausbildung eines Serotyps ist abhängig von diversen Umweltfaktoren und wird in der Regel bei allen Zellen einer *Paramecium*-Kultur gleichmäßig und stabil auf dem Zellcortex und den Cilien ausgeprägt. Hierbei sind die Serotypen mit Buchstaben nach der Stammbezeichnung gekennzeichnet, wie z.B. *Paramecium tetraurelia*, Stamm 51, der am besten untersuchte Stamm, bei dem die bekannten Serotypen mit den Buchstaben A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, N und Q bezeichnet werden. Nach Literaturangaben lässt sich ein Wechsel des Serotyps zu einem alternativen Typ durch eine Änderung der Umweltparameter des umgebenden Milieus induzieren (BEALE, 1954).

Die Oberflächenproteine von *Paramecium* bestehen aus einzelnen Polypeptiden mit einer Größe von je 251 -308kDa (HANSMA, 1975). Die Oberflächenantigene bedecken die gesamte Zellmembran, einschließlich der Cilien und bilden eine ca. 17-25nm dicke Schicht (CAPDEVILLE ET AL., 1987; RAMATHAN ET AL., 1981). 30% der Cilienproteine und somit 3,5% des gesamten Proteingehaltes der Zellen entfallen auf diese Proteinschicht, was ihre wichtige Funktion für *Paramecium* unterstreicht (PREER, 1968).

Capdeville konnte 1987 nachweisen, dass die Oberflächenproteine nicht direkt in oder an der Membran lokalisiert sind, sondern, dass sie mit Hilfe eines Glycosylphosphat-inosol-(GPI)-Ankers in der Membran befestigt sind (CAPDEVILLE ET AL., 1987; AZZOUZ & CAPDEVILLE, 1992). Diese Art der Verankerung benutzen ebenso andere Protozoen, wie zum Beispiel der bereits erwähnte Parasit *Trypanosoma brucei* (WEBB ET AL., 1997).

Die Isolation von Oberflächenproteinen durch ethanolische Salzlösungen zeigt, dass sich zwei verschiedene Arten von Proteinen unterscheiden lassen, zum einen die gut löslichen Proteine (soluble surface antigens oder sSAGs) und zum anderen die membrangebundenen Proteine, die sich nur mit Hilfe von Detergenzien von der Zelloberfläche lösen (membranal surface antigens oder mSAGs) (PREER, 1959 a-c). Mit Hilfe von Phospholipase C kann die membrangebundene Form in die gelöste, ungebundene Form überführt werden (CAPDEVILLE ET AL., 1986). Bei einem Serotypwechsel nutzen die *Paramecium*-Zellen diesen Spaltungsmechanismus des GPI-Ankers durch die Phospholipase C und bewirken damit eine Überführung der membrangebundenen in die lösliche Form der Proteine, um das „alte“ Protein schnell von der Oberfläche zu eliminieren.

Eine weitere Klasse von Oberflächenproteinen bei *Paramecium* entdeckte Capdeville 1994 bei *Paramecium primaurelia*, die von ihr benannten „surface GPI proteins“ (SGPs). Diese bestehen aus 3 GPI-verankerten Polypeptiden, deren Größe von 30-35kDa reicht. Sie konnte nachweisen, dass diese Proteine parallel zu den vorher beschriebenen SAGs auf der Zellmembran und den Cilien auftreten und dass deren Expression ebenfalls von der Temperatur abhängig ist. Im Gegensatz zu den SAGs, bei denen die Ausprägung eines einzigen Oberflächenproteins die Regel ist, zeigen die SGPs die gleichzeitige Expression verschiedener Typen (CAPDEVILLE & BENWAKRIM, 1994 ; 1996) auf der Zellmembran.

### 1.2 Serotyptransformation

Jeder Serotyp ist mit bestimmten Umweltfaktoren korreliert (z.B. mit definierten Temperaturbereichen). Ein Serotypwechsel einer *Paramecium*-Kultur lässt sich durch Änderung der Kulturbedingungen gezielt induzieren. Eine Reihe von Umweltsignalen sind bekannt, die einen Wechsel des Serotyps auslösen, dabei ist der best untersuchteste und augenscheinlichst wichtigste Faktor die Temperatur (BEALE, 1954).

So finden sich in einer *Paramecium primaurelia* Kultur bei Raumtemperatur (25°C) Oberflächenproteine des Serotyp G, bei Temperaturen, höher als 33°C, kann der Serotyp D nachwiesen werden. Eine Transformation von G zu D lässt sich durch ein sprunghaftes Erhöhen der Kultivierungstemperatur erreichen.

Die Transformation der Oberflächenproteine erfolgt nach einem bestimmten Schema. Anthony und Capdeville (1989) beschrieben den Verlauf eines Serotypwechsels auf der Zellmembran von *Paramecium primaurelia* durch indirekte Immunofluoreszenzmarkierung. Sie konnten nach sprunghafter Veränderung der Temperatur eine zeitlang noch das alte Protein auf der Oberfläche feststellen. Erst nach mehreren Stunden ließ sich erstmals das neue Protein auf der Zellmembran nachweisen. Dieses wird während einer kurzen Periode zusammen mit dem alten Protein auf der Oberfläche präsentiert. Nach und nach wurde das alte Protein von der Zellmembran abgeschält und durch das neue Protein vollkommen ersetzt. Durch den Nachweis oberflächenspezifischer mRNA über eine RT-PCR Technik (SCHMIDT, BREINER, persönliche Mitteilung), konnte bei *Paramecium tetraurelia* gezeigt werden, dass eine Protein-de-novo-Synthese stattfindet.

Weitere abiotische Umweltfaktoren, die in der Lage sind eine Serotyptransformation hervorzurufen, sind unter anderem der pH-Wert, die Salinität und die Art und Zusammensetzung des Mediums. Durch Bestrahlung mit UV- und Röntgen-Strahlung konnte ebenfalls eine Serotyptransformation hervorgerufen werden (SONNEBORN, 1947, 1951).

Ein Serotypwechsel kann darüber hinaus durch eine Vielzahl bestimmter Agentien ausgelöst werden. Zu ihnen gehören z.B. proteolytische Enzyme (KIMBALL, 1947) antibiotische Wirkstoffe wie Actinomycin, Patulin, Chloramphenicol oder Puromycin (AUSTIN ET AL., 1963, 1967A, B; FINGER ET AL., 1967; 1968), sowie andere Reagentien wie z.B. Fluorophenylalanin (FINGER ET AL., 1968), Colchizin (FINGER, 1974) und Acetamid (AUSTIN ET AL., 1967b).

Durch eine Zugabe von homologem Antiserum lässt sich ebenfalls ein Wechsel des Serotyps induzieren. Jedoch darf die Konzentration des Antiserums nur so gering sein, dass die Zellen nicht vollständig immobilisieren, da sie sonst absterben. Statt dessen muss die Zugabe von homologen Antikörpern so gewählt werden, dass nur einige Cilien verkleben. Dies wird von den Zellen als Reiz angesehen, um einen anderen Serotyp auszubilden.

Die Serotyptransformation lässt sich jedoch auch durch biotische Faktoren beeinflussen. So spielt der Fütterungszustand der Zellen eine entscheidende Rolle beim Wechsel eines Oberflächenproteins. Eine reine Ausprägung des Serotyp S bei *Paramecium primaurelia* lässt sich nur bei hungernden Zellen erreichen, während bei besserer Versorgung mit Futterbakterien sofort ein Serotypwechsel der Kultur zu Serotypprotein G einsetzt (SIMON, 2002).

Als weiterer Hinweis für einen biotischen Faktor, auf den die Zellen mit einer Serotyptransformation reagieren, wird die Anwesenheit von Räubern in der Literatur angeführt (HARUMOTO & MIAKE, 1993).

Da es sich bei der Serotyptransformation bei *Paramecium*, im Gegensatz zu *Trypanosoma brucei*, um einen reversiblen Vorgang handelt, wird ein Serotypwechsel nicht durch eine Genmutation oder DNA-Umlagerung hervorgerufen (SONNEBORN, 1943).

### 1.3 Expression der Oberflächenproteine bei *Paramecium*

Unter konstanten Umweltbedingungen wird der Serotyp einer Kultur in der Regel stabil ausgeprägt, das heißt, dass jede Zelle in der Kultur die selben Oberflächenproteine ausbildet. Dies konnte durch Immobilisierungstests und Immunfluoreszenzfärbungen weitgehend bestätigt werden (BEALE, 1954; SONNEBORN, 1947).

Da aufgrund dieser immunologischen Untersuchungsmethoden bisher die Existenz zweier oder mehrerer Oberflächenantigene, die auf einer Zelle gleichzeitig exprimiert werden, in der Regel nicht nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass die Oberflächenproteine bei *Paramecium* immunodominant ausgeprägt werden und die gleichzeitige Ausprägung verschiedener Oberflächenproteine sich gegenseitig ausschließen.

Dieses Phänomen wurde deshalb als Prinzip der „mutual exclusion expression“ bezeichnet.

Eine sogenannte Koexpression, d.h. es werden zwei oder mehr Proteine auf der Zellmembran detektiert, konnte in der mehr als 50 Jahre andauernden intensiven Erforschung von Oberflächenproteinen bei *Paramecium* nur in drei Fällen nachgewiesen werden.

1. Bei einem Serotypwechsel des Oberflächenproteins auf einer Zelle, wie er durch veränderte Umwelteinflüsse induziert wird (s.o.), befinden sich für eine kurze Zeitperiode gleichzeitig das „neue“ und das „alte“ Protein auf der Zelloberfläche (BEALE, 1948, 1954). Anthony und Capdeville konnten in Untersuchungen zeigen, dass die beiden Oberflächenproteine während eines Serotypwechsels nicht homogen auf der Zellmembran verteilt vorliegen, sondern, dass es zu einer heterogenen, „geklumpten“ Ansammlung der Oberflächenproteine auf dem Zellkortex kommt (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989).
2. Beale kreuzte Zellen der beiden Stämme 60 und 90 von *Paramecium primaurelia*. Das Besondere daran ist, dass die Zellen des Stammes 60 das Serotypprotein D ausprägen, während die Zellen des Stammes 90 im gleichen Temperaturbereich den Serotyp G auf der Zelloberfläche bilden. Nach fünf Zellteilungen konnte Beale bei den F<sub>1</sub>-Klonen Mischzellen beobachten, die sich sowohl mit dem homologen Antiserum für 60D, als auch mit dem 90G-Serum immobilisieren ließen (BEALE, 1954).



3. Zellen des Stammes 172, *Paramecium tetraurelia*, prägen gleichzeitig Serotyp D und M stabil aus. Dies konnte schon 1956 durch serologische Untersuchungen nachgewiesen werden (MARGOLIN, 1956).

Eine weitere Ausnahme zum Prinzip der „mutual exclusion“ beobachteten Smith und Doerder bei dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila*. Hier bildeten Zellen unter Salzstress die Oberflächenproteine S, H und L gleichzeitig aus (SMITH & DOERDER, 1992).

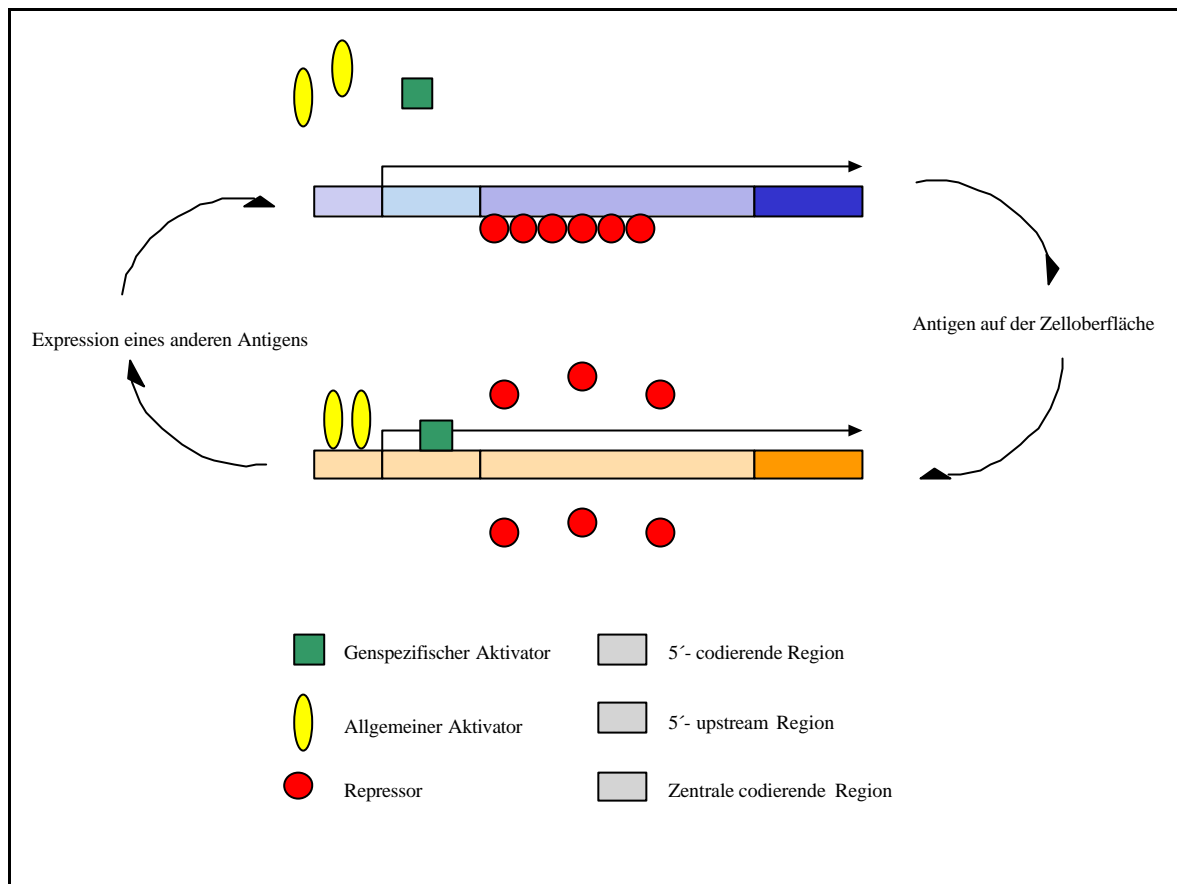
Die Expression der variablen Oberflächenantigene ist im Detail bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt. Doch besteht heute durch die verfügbaren molekurbio-logischen Methoden die Möglichkeit Hypothesen zur Regulation der Oberflächenproteine, sowie zum Prinzip der „mutual exclusion expression“ aufzustellen.

Jedes Oberflächenprotein wird von einem ungekoppelten Gen kodiert. Schon 1947 postulierte Kimbal ein Modell, bei dem die Expression der Oberflächenproteine von *Paramecium* der positiven Selbst-Regulation unterliegt. So sollte die Bildung eines Oberflächenproteins die Expression dieses Proteins stabilisieren, bis andere Umweltfaktoren auf dieses System einwirken (KIMBALL, 1947).

Auch Capdeville vertrat durch ihre Untersuchungen die Hypothese der positiven Selbst-Kontrolle (CAPDEVILLE, 1979).

Neueren Ergebnissen zufolge wurde dieses Modell noch erweitert. So ergänzen Thai und Forney diese These zur Regulation der Oberflächenproteine aufgrund von chimeren Genexperimenten an den Strukturgenen von *Paramecium tetraurelia*, Stamm 51A und 51B. Sie vermuten das Vorhandensein von Repressoren, die an die codierende Region binden um eine Transkription des homologen Gens zu verhindern. Sie postulieren die gleichzeitige Existenz von Aktivatoren, die an der „up-stream“-Region binden, um die Transkription des induzierten Oberflächenproteins zu verstärken. So kontrolliert die Konkurrenz zwischen Repressoren und Aktivatoren die „mutual exclusive“ Transkription und die Expression eines bestimmten Antigens auf der Zellmembran steuert die Freisetzung eines Repressors für alle potentiell alternativen Serotypen (THAI & FORNEY, 1999).

Eine weitere Annahme, dass die GPI-verankerten Oberflächenmoleküle durch eine Signal-Transduktions-Kaskade mit einem Repressormolekül in Interaktion treten, liegt nahe, jedoch konnte ein genauer Mechanismus bisher nicht bestätigt werden.



**Abb.1-1: Modell zur Expression von Serotypgenen (nach FORNEY & THAI, 1999)**

Zusätzlich konnten in den 5' und 3' nicht kodierenden Regionen der Oberflächenproteine konservative Bereiche identifiziert werden (BREUER, SCHULTE, SCHWEGMANN & SCHMIDT, 1996), die sog. Konsensus-Regionen, die sich sowohl in der Isogenfamilie von 51D finden lassen, als auch in den Sequenzen der bekannten Stämme 156G und 156D und 168G (*Paramecium primaurelia*) nachweisbar sind. Diese Bereiche scheinen für die Gene der Oberflächenproteine allgemein charakteristisch zu sein und könnten möglicherweise bei der Expression von Serotypen ebenfalls eine regulatorische Funktion übernehmen. Doch auch diese Überlegungen konnten bislang nicht experimentell bestätigt werden.

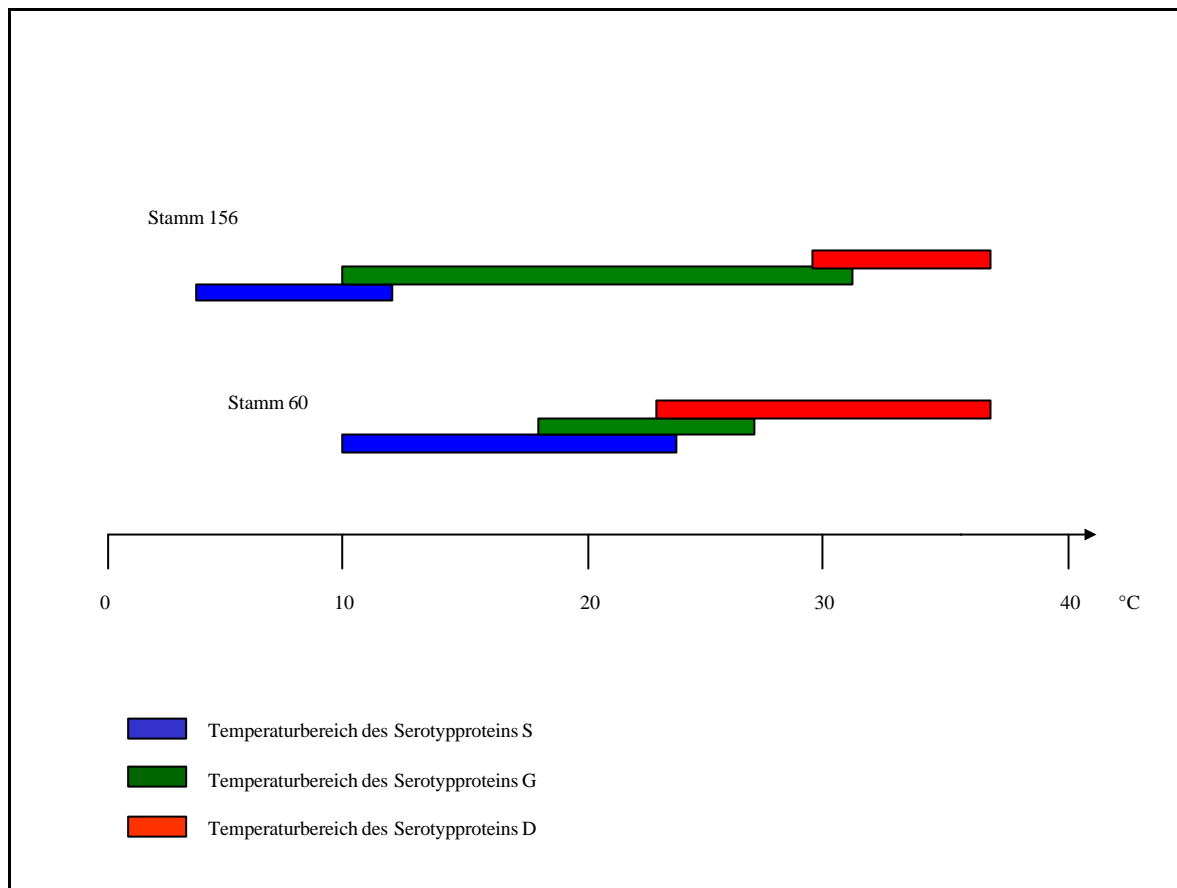
## 1.4 Das Serotypsystem von *Paramecium primaurelia*

Im Gegensatz zu *Paramecium tetraurelia*, bei dem bis zu elf verschiedene Serotypen serologisch unterscheidbar sind, mutet die Anzahl von sieben variablen Oberflächenproteinen bei *Paramecium primaurelia* geradezu bescheiden an. Die meisten Laborstämme können nur einen Teil davon stabil ausprägen, nämlich die Serotypproteine D, G und S. Die Oberflächenproteine untereinander zeichnen sich durch große allelische Unterschiede in den Stämmen aus. So zeigen z.B. die Allele 156G und 168G selbst bei hoher Serumkonzentration keinerlei Kreuzreaktion (BEALE, 1957), was für eine hohe Variabilität in der Abfolge der Aminosäuresequenz der Proteine spricht. Insgesamt konnte Beale innerhalb des *Paramecium primaurelia* Komplexes drei Allele für Serotyp S, sechs für Serotyp G und sieben für Serotyp D unterscheiden.

Stamm	Fundort	S-Typ	G-Typ	D-Typ
41	Atlanta, Georgia	60S	41G	41D
60	Burlington, Virginia	60S	60G	60D
156	New Haven, Connecticut	60S	156G	60D
168	Sendai, Japan	61S	168G	90D

**Tab. 1-1: Tabelle der Serotypen und Stämme**

Eine Induktion der drei Serotypproteine D, G, und S erfolgt relativ leicht, weil jeder Serotyp in einem gut abgegrenzten Temperaturbereich induziert werden kann. Überschneidungen dieser Temperaturgrenzen sind relativ gering, variieren jedoch nach Mediumzusammensetzung etwas zueinander. So lässt sich das am stabilsten ausgeprägte Serotypprotein G von Stamm 156 zwischen 10-32°C ausprägen, der Serotyp S wird unter 10°C ausgeprägt und das Oberflächenprotein D wird dagegen bei einer Temperatur von mehr als 32°C auf dem Zellcortex gebildet (CAPDEVILLE, 1979a, b; BEALE, 1954)



**Abb. 1-2: Temperaturbereiche der verwendeten Stämme 60 und 156 von *Paramecium primaurelia***

## 1.5 Die Serotypstrukturgene von *Paramecium primaurelia*

Bislang wurden für die Gene, die für Oberflächenproteine von *Paramecium primaurelia* codieren, nur wenige Sequenzdaten erstellt.

Es bestehen Sequenzdaten zu den Genen der Serotypen 156G (PRAT & MEYER, 1985), 156D (BOURGAIN-GUGLIELMETTI & CARON, 1996) und 168G (PRATT, 1989). Das Gen für ein weiteres Serotypprotein 156 $\psi$ G (Pseudo-G) wurde erst kürzlich entdeckt und ist in großen Teilen homolog zu dem Serotypstrukturgenen von 156G (DUBRANA & AMAR, 2000, 2001).

Im Vergleich zu den besser untersuchten Genen der Oberflächenproteinfamilie von *Paramecium tetraurelia* stimmen die gefundenen Daten doch in den meisten charakteristischen Eigenschaften überein. So sind die codierenden Bereiche ca. jeweils 8kb groß und besitzen im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Genen keine Introns. Wie bei allen bisher sequenzierten Genen der Oberflächenproteine stimmen auch die Serotypstrukturgene der Stämme 156 und 168 in Bezug auf die Periodizität

der Cystein codierenden Kodons, sowie in der Häufigkeit von Kodons für Serin, Threonin, und Cystein mit allen anderen Varianzantigenen überein.

Obwohl typische Promotoren wie CAT-Boxen oder GC-Boxen fehlen, konnten in den gefundenen Sequenzdaten sogenannte Konsensusregionen in den nichtcodierenden Bereichen identifiziert werden (BREUER, SCHULTE, SCHWEGMANN & SCHMIDT, 1996), die möglicherweise als regulatorische Sequenzen für Oberflächenproteine fungieren (s.o.).

### **1.6 Mögliche Funktion der Oberflächenproteine bei *Paramecium***

Die Tatsache, dass bisher noch keine *Paramecium*-Zelle ohne Oberflächenproteine gefunden wurde und dass der Anteil der Oberflächenproteine am Gesamtprotein-gehalt der Zelle bis zu 3% ausmacht, verdeutlicht, welche wichtige Rolle diese Proteinfamilie für einzellige Organismen spielt.

Zur Funktion des variablen Oberflächenproteinsystems gibt es inzwischen verschiedene Hinweise.

So könnte diese Proteinschicht eine Schutzbarriere gegen äußere Umwelteinflüsse sein, denn die Zelle ist von ihr, wie von einer Art Schutzmantel, vollständig auf Cilien und Cortex bedeckt, worauf der hohe Cystein-Gehalt, der bei ca. 11% liegt, hindeutet (REISNER ET AL., 1969). Da sich Paramecien in ihrer natürlichen Umgebung zur Aufnahme von Bakterien vorwiegend im Sediment aufhalten, sind sie fortwährend dem Angriff von Proteasen ausgesetzt, die von Bakterien und Pilzen ins umgebende Medium abgegeben werden. Die Cystein-Brücken stabilisieren die Tertiärstruktur der Oberflächenproteine und bilden höchstwahrscheinlich einen Schutz vor dem Abbau durch Proteasen (CAPDEVILLE ET AL., 1993).

Eine weitere Hypothese besagt, dass die Oberflächenantigene als eine Art Signalmolekül fungieren oder unmittelbar an der Signalweiterleitung beteiligt sind (CAPDEVILLE, 1979a, b). So könnte durch eine Signalkaskade, bei der der GPI-Anker eine Rolle spielt, ein oder mehrere Signalmoleküle aktiviert werden, was letztendlich im Makronukleus, je nach auslösendem Reiz, zur Translation eines bestimmten Oberflächenproteingens führt.

Ramathan vermutet sogar eine Beeinflussung der integralen Calcium-Kanäle durch den GPI-Anker, wodurch die Durchlässigkeit der Membran beeinflusst werden könnte (RAMATHAN, 1983).

Eine weitere Signalfunktion könnte im Schutz vor Räuberorganismen bestehen. So erkennt z.B. *Didinium nasutum* seine Beute *Paramecium* spezifisch an den Oberflächenproteinen (HARUMOTO & MIAKE, 1992). Als Reaktion darauf könnte *Paramecium* durch das variable Oberflächensystem einen anderen Serotyp auf seiner Membran präsentieren, so dass der Räuber erst einmal getäuscht würde, bevor sich dieser langsam an das neue Oberflächenprotein anpasst.

### 1.7 Ziele der Arbeit

Seit der Entdeckung der Oberflächenproteine bei *Paramecium* ist fast ein ganzes Jahrhundert verstrichen. An ihnen wurden intensive Forschungen betrieben, die sich zunächst auf klassische molekularbiologische Methoden beschränkten, jedoch durch die Entwicklung neuer Techniken auch auf biochemische und molekularbiologische Untersuchungen ausgeweitet wurden. Trotz dieser großen Zeitspanne ist dieses Thema in der Forschung noch interessant und aktuell, denn bis heute ist die Funktion dieser Oberflächenmoleküle ebenso unbekannt wie die Bedeutung ihrer Variation.

Vor allem die Expression der Serotypproteine von *Paramecium* in natürlichen Habitaten ist weitgehend unbekannt. Bis auf wenige Ausnahmen existieren vor allem Daten, die sich auf die artifiziellen, gut kontrollierbaren Bedingungen in Laborexperimenten beziehen.

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Fragen, sollen vor allem das ökologische Verhalten von *Paramecium* auf bestimmte Umweltparameter des sie umgebenden Milieus klären. Hierbei soll unter kontrollierten Laborparametern die Serotypexpression von *Paramecium primaurelia* dokumentiert werden, um diese Beobachtung mit freilandrelevanten Erhebungen zu vergleichen.

Die Frage, welche Serotypexpression bei multifaktorieller Reizeinwirkung resultiert, sowie die Aufklärung des genauen zeitlichen Ablaufes, der am besten untersuchten temperaturinduzierten Serotyptransformation, sollen auf Proteinebene und Translationsebene untersucht werden. Als Weiteres soll geklärt werden, was mit den nicht

mehr benötigten Serotypproteinen geschieht, werden sie in großer Menge während eines Serotypwechsels durch die PLC abgespalten.

Die für diese Experimente benötigten immunologischen und molekularbiologischen Techniken (hauptsächlich Immunofluoreszenzmarkierung, Immobilisierungsreaktion und RT-PCR), sollen etabliert werden. Eine Modifizierung dieser verwendeten Methoden zur Einzelzellanalyse für Labor- und Freilandzellen stellt hierbei ein wichtiger Teil der vorgelegten Arbeit dar.

Als Untersuchungsobjekt wurden Zellen der Art *Paramecium primaurelia* gewählt, deren Serotypgene 156G und 156D bereits gut untersucht sind. Für weitere Stämme der Art *Paramecium primaurelia* (41 und 60) existieren jedoch keinerlei Sequenzdaten. Um in Zukunft die Untersuchungen zur Serotypexpression auch auf diese beiden Stämme auszuweiten, sollen Fragmente aus Serotypproteinen amplifiziert und deren Basenabfolge aufgeklärt werden.

Für freilandrelevante Untersuchungen stehen zudem drei Versuchsteiche vor dem Laborgebäude zur Exposition von Laborkulturen zur Verfügung, von denen zwei temperaturkontrollierbar sind. In diesen Habitaten sollen erste Experimente zur Serotypexpression von *Paramecium primaurelia* unter freilandnahen Bedingungen durchgeführt werden.

Nicht zuletzt erscheint die Frage interessant, welche Rolle Koexpression und „mutual exclusive expression“ bei der Serotypausprägung von *Paramecium primaurelia* spielen, stellt *Paramecium* doch ein Modellorganismus zur Erforschung von zellulären Vorgängen dar.

## 2 Materialien

### 2.1 Organismen

Alle verwendeten Stämme gehörten zur Art *Paramecium primaurelia* und wurden von der Arbeitsgruppe Ökologie zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Stämme **41** (erstmalige Isolation in Atlanta, Georgia), **60** (Burlington, Virginia), **156** (New Haven, Connecticut) und **168** (Sendai, Japan) verwendet. Die Zellen wurden in WGP (wheat-grass-powder)-Medium III kultiviert, da hierbei eine gezielte und stabile Induktion von Serotypen möglich ist.

Als Futterorganismen dienten Bakterien der Art *Enterobacter aerogenes*. Diese wurden auf Schrägagar kultiviert und das sterile *Paramecium*-Medium damit vor dem Füttern beimpft.

Zum besseren Wachstum von Massenkulturen wurde dem Futter gelegentlich eine  $\beta$ -Sitosterol-Lösung beigemischt (1 $\mu$ l/10ml *Paramecium*-Kultur). Die Paramecien wurden dadurch zur höheren Zellwandproduktion angeregt, was zu einer erhöhten Teilungsrate führte.

Für Klonierungen von PCR-Produkten wurden Zellen des *Escherichia coli*-Stammes JM109 „High Efficiency Competent Cells“ (Promega) als kompetente Zellen eingesetzt. Der Genotyp von *E.coli* JM109 ist *recA1*, *endA1*, *gryA96*, *thi*, *hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *relA1*, *supE44*,  $\Delta(lac^- proAB)$ , [ $F'$ , *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15].

### 2.2 Kulturmedien

#### 2.2.1 Medien für Paramecien

##### 2.2.1.1 WGP (wheat grass powder)-Medium III

WGP-Medium III diente bei allen Kulturen, beimpft mit *Enterobacter aerogenes*, als Futtermedium. Für 5l Medium wurden 150ml Stammlösung (siehe unten) mit 150ml eines Na-Phosphatpuffers (100mM), gemischt und mit dest. Wasser auf 5l Lösung aufgefüllt. Dieses Medium wurde vor dem Beimpfen mit den Futterbakterien autoklaviert.



### **2.2.1.2 Strohmedium**

Pro Liter Medium wurden ca. 30g Stroh verwendet und autoklaviert.

### **2.2.2 Medien für Bakterien**

#### **Schrägagarröhrchen**

37g Standard I-Nähragar (Merk) wurden in 1l Aqua dest. aufgelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und danach in Reagenzgläser à 5ml Portionen aufgeteilt. Nach dem Autoklavieren wurden die Röhrchen schräg gestellt bis der Agar erstarrt war. Bis zur Verwendung der Schrägagarröhrchen wurden sie bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

## **2.3 Stammlösungen zur Kultivierung**

#### **Stammlösung WGP:**

Für 4l der Stammlösung wurden 200g WGP („wheat grass powder“) in 4l dest. Wasser 15 Minuten aufgeköcht. Die entstandene Suspension wurde zweimal über Gaze und einen groben Filter filtriert. Feinste Schwebstoffe wurden durch Absaugen über einen Papierrundfilter am Wasserstrahlvakuum aus der Lösung entfernt, die dann insgesamt auf 8l Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt wurde.

Die fertige WGP-Stammlösung wurde autoklaviert um ein Bewachsen durch Bakterien zu verhindern und dann bis zum Gebrauch bei 16 C aufbewahrt.

#### **Na-Phosphatpuffer zum Herstellen des WGP-Mediums III:**

27,8g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$  und 34,38g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden in einem 1l Meßkolben in Aqua dest. vollständig aufgelöst und diese Lösung auf 1l Volumen aufgefüllt.

Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH7 eingestellt.

#### **Ampicillin-Stammlösung:**

Die Ampicillin-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 100mg/ml angesetzt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

**Stammlösung b-Sitosterol:**

80mg  $\beta$ -Sitosterol wurden in 10ml Ethanol <sub>p.a.</sub> gelöst.

Das Steroid wurde den Massenkulturen im Verhältnis 1 $\mu$ l/10ml *Paramecium*-Kultur verabreicht.

**2.4 Puffer zur Immunofluoreszenzmarkierung und ELISA**

**1 x Phosphatpuffer Saline (PBS):**

8g	NaCl
0,2g	KCl
1,44g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,24g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
800ml	H <sub>2</sub> O bidest

Die Lösung wird mit HCl auf pH7,4 eingestellt und danach mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1l aufgefüllt.

**3 x Phosphatpuffer Saline (PBS):**

24g	NaCl
6g	KCl
4,32g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,72g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
800ml	H <sub>2</sub> O bidest

Die Lösung wird mit HCl auf pH 7,4 eingestellt und danach mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1l aufgefüllt.

**4% Paraformaldehydlösung in PBS:**

60ml            H<sub>2</sub>O bidest. [60°C]  
2-3 Tropfen 1N NaOH  
4g PFA

Diese Suspension wird gerührt, bis die Lösung klar erscheint. Danach erfolgt die Zugabe von:

33ml            3 x PBS

Mit HCL auf pH7,2 einstellen, mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 100ml auffüllen. Die Lösung wird zur Abtrennung kolloidaler Teilchen sterilfiltriert.

**50 mM Glycein:**

0,37g            Glycein in 100ml PBS lösen

**3% Rinderserumalbuminlösung (BSA):**

3g                BSA in 100ml 1 x PBS

Die Lösung sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren.

**2.5 Lösungen zur Proteinisolation**

**Dryls Phosphatpuffer:**

239,89mg            NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
283,92mg            Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
960,40mg            Na<sub>3</sub>Citrat x 2H<sub>2</sub>O

Salze in 1,9l H<sub>2</sub>O bidest. lösen, mit konz. HCl auf pH6,8 einstellen und auf 2l auffüllen.

### Extraktionsmedium:

450mg            NaCl

In 880ml H<sub>2</sub>O bidest lösen und mit 120ml Ethanol p.A. auffüllen.

### 2 x Salz-Ethanol-Lösung:

1,8g            NaHPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

100ml          Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7

63ml           Ethanol, 95%

Die Lösung mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 200ml Gesamtvolumen auffüllen.

### 0,02M Na PO<sub>4</sub>:

0,28g          Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 100ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen

0,27g          NaHPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in 100ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen

Beide Komponenten bis zum Einstellen von pH7 mischen.

### 10% SDS:

5g              SDS

In 50ml H<sub>2</sub>O bidest. suspendieren und zum Lösen auf 68°C erwärmen. Mit HCl konz. Auf pH7,2 einstellen.

### 1,88M Tris-HCl:

18,22g        Tris-Cl

In 50 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen und mit HCl konz. auf pH8,8 einstellen. Danach die Lösung auf 80ml auffüllen.

**0,625M Tris-HCL:**

6,06g      Tris-Cl

In 70ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen und mit HCl konz. auf pH6,8 einstellen. Danach die Lösung auf 80ml auffüllen.

**10% Ammonium-peroxidisulfat (frisch angesetzt):**

100mg      (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

in 1ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen

**1% Bromphenolblau:**

20mg      Bromphenolblau

In 2ml Ethanol p.A. lösen und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahren.

**SDS-Probenpuffer:**

2ml      0,625M Tris-Cl, pH6,8

0,2g      SDS

5ml      Glycerin

0,1g      DTT

0,2ml      1% Bromphenolblau

2,4ml      H<sub>2</sub>O bidest.

Lösung bei 4°C aufbewahren.

### Laufpuffer:

6g	Tris
28,8g	Glycin
2g	SDS

Lösung auf 2l auffüllen und auf pH 8,27 einstellen.

### Färbelösung:

2g	Coomassie Brilliant Blau R250
0,5g	Coomassie Brilliant Blau G250
475ml	Ethanol techn.
100ml	Essigsäure konz.
425ml	H <sub>2</sub> O bidest.

Die Lösung wird bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

### Entfärbelösung 1:

450ml	Ethanol techn.
100ml	Essigsäure techn.
450ml	H <sub>2</sub> O bidest.

### Entfärbelösung 2:

70ml	konz. Essigsäure techn.
930ml	H <sub>2</sub> O bidest.

## 2.6 Lösungen zur Klonierung

### 10 x TE-Puffer:

100mM Tris-Cl

5mM EDTA

Lösung auf pH8,0 einstellen.

### 0,1M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)-Stocklösung

1,2g IPTG

Die Lösung auf 50ml auffüllen, sterilfiltrieren und danach bei 4°C aufbewahren.

### LB-Agar:

Dem LB-Medium werden zusätzlich 15g/l Agar zugefügt.

### LB-Medium:

10g Pepton, 5g Hefe-Extrakt und 10g NaCl wurden in 1l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und sofort autoklaviert.

### LB-Platten mit Ampicillin/ IPTG/ X-Gal:

LB-Agar mit Ampicillin (100 $\mu$ g/ml) und 100 $\mu$ l 100mM IPTG und 20 $\mu$ l X-Gal pro Platte.

### 50mg/ml X-Gal:

100mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactose wurden in 2ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte durch Alufolie vor Licht geschützt bei -20°C.

### **SOC-Medium:**

2,0g Trypton und 0,5g Hefe-Extrakt wurden in 97ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst. Die Lösung wurde nach Hinzugeben von 1ml 1M NaCl und 0,25ml 1M KCl autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden folgende sterilfiltrierte Stocklösungen hinzugegeben:

1ml 2M Mg<sup>2+</sup>-Lösung

1ml 2M Glukose

Die Lösung wurde mit Aqua<sub>dest.</sub> auf 100ml aufgefüllt (pH=7,0), sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

## **2.7 Elektrophoreselösungen**

### **Ethidiumbromidlösung:**

10mg/ml Ethidiumbromid (einer 1% Stammlösung) in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst

### **50x TAE-Lösung:**

2M Tris

1M Essigsäure

0,1M EDTA

243g Tris wurden in 800ml Aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von 57,1ml konzentrierter Essigsäure und 3,72g EDTA wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf pH7,5 -7,8 eingestellt.



## 2.8 Geräte

### 2.8.1 Laborgeräte

Autoklav Varioklav Typ E	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Brutschrank	Biometra GmbH (Göttingen)
Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau)
<i>E. coli</i> Pulser™	Bio-Rad (München)
Eismaschine	Brema, Villa Cortese (Italien)
ELISA Spektrometer	Biometra GmbH (Göttingen)
Feinwaage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius (Göttingen)
Gefriertruhe bei -70°C	Heraeus Sepatech (Osterode)
Kläreseperator KA 05-00-105	Westfalia Seperator (Oelde)
Kühlgelkammer	Hofer Scientific Instr. (USA)
Kühlzentrifuge Z233MK	Hermle Labortechnik (Wehingen)
Labor-pH-Meter 632	Methrom (Schweiz)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Magnetrührer (heizbar)	Heidolph Elektro (Kelheim)
Vertical PAGE Slabgel System	Biometra (Göttingen)
Mikrowellengerät R-210A	Sharp Electronics (Hamburg)
Öltestzentrifuge HNS II	Damon/ IEC Division
pH-Meter	Metrohm (Herisau, Schweiz)
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Pipettierhilfen	Gilson (Villiers le bel, Frankreich)
Pipettierhilfen	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsquelle	LKB (Freiburg)
ECPS 3000/150	
Schüttler	IKA-Labortechnik (Staufen)
Sicherheitsbrenner	Schütt Labortechnik (Göttingen)
Sorvall-Kühlzentrifuge RC-5C Plus mit Rotor SS-34/ GSA	Du Pont (Wilmington, USA)
Sterilbank Lamin Air	Holten (Dänemark)
Thermoblock Uno	Biometra (Tampa, USA)
Wärmeschrank GTRO 214	Memmert (Schwabach)

UV-Illuminator UV-FLX-35M	Serva (Heidelberg)
Vortex Reax 2000	Heidolph Elektro (Kehlheim)

### **2.8.2 Optik**

Binokular SZ 60	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop Axioplan II	Zeiss (Oberkochen)
Digitalkamera CoolPix 990	Nikon (Tokio, Japan)
Lichtmikroskop	Olympus (Hamburg)
Sofortbildkamera MP4	Polaroid (Offenbach)

Das Zubehör zum Fluoreszenzmikroskop (Objektive, Zwischenlupen, Fluoreszenzlampe, Fluoreszenzfilter und Immersionsöl) wurde von der Firma Zeiss bezogen. Für Doppelmarkierungen bei Immunofluoreszenzfärbungen wurde zusätzlich ein Dualbandfilter für FITC/TR in das Fluoreszenzmikroskop eingebaut. Der Adapter der Digitalkamera wurde von der Firma Nikon geliefert.

Alle von der Digitalkamera aufgenommenen Bilder wurden sofort in einem Computer gespeichert. Zur Bildbearbeitung wurde das Programm Photoshop 6.0 benutzt.

Die Filme zur Sofortbildkamera (Nr. 667) stammten von der Firma Polaroid.

## **2.9 Chemikalien und Material**

### **2.9.1 Glasmaterial**

Reagenzgläser, Erlenmeyerkolben, Bechergläser und Messzylinder stammten von der Firma Schott (Mainz). Sie wurden vor jedem Gebrauch bei 150°C sterilisiert. Pasteurpipetten der Länge 150 mm bzw. 230 mm stammten von der Firma Fischer (Frankfurt).

Objektträger sowie Deckgläser wurden von der Firma Marienfeld bezogen.

Die Corex-Zentrifugengläser der Größe 30ml für den SS-34 Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge stammten von Du Pont (USA). Bei den verwendeten Dreilochobjektträgern

(DLO) handelte es sich um das Modell der Firma Pyrex (USA) oder um Nachbauten unbekannter Herkunft.

### 2.9.2 Verbrauchsmaterial

Die Eppendorf-Gefäße und Pipettenspitzen stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg). Sie wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die isolierten Zelllinien wurden sowohl in DLOs, als auch in 24-Loch-Plastikkulturschalen der Firma Greiner kultiviert. Petrischalen und Küvetten wurden von der Firma Roth bezogen. Die Sterilfilter der Porengröße 0,2µm und 0,45µm lieferte die Firma Schleicher & Schuell (Dassel).

### 2.9.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Baker	(Deventer, Niederlande)
Biomol/ Feinchemikalien	(Hamburg)
Biozym	(Ohlendorf)
Boehringer	(Mannheim)
Difco	(Detroit, USA)
Fluka Bio-Chemika	(Buchs/ Schweiz)
Gibco	(Paisley, Schottland)
ICN Biomedicals	(Aurora, USA)
Merck	(Darmstadt)
Pharmacia	(Freiburg)
Promega	(Heidelberg)
Riedel de Haen	(Seelze)
Roth	(Karlsruhe)
Serva Feinbiochemika	(Heidelberg)
Sigma	(Deisenhofen)

Falls nicht anders angegeben wurden die Chemikalien in p.A. Qualität verwendet.

## 2.10 Kits und Enzyme für molekularbiologische Untersuchungen

DNA Purification System	Sigma (Deisenhofen)
Eppendorf-RT-Master Plus Kit	Eppendorff (Hamburg)
Expand High Fidelity® PCR-System	Roche (Mannheim)
Gene Elute™ Plasmid-Mini-Prep	Sigma (Deisenhofen)
mRNA-capture Kit®	Roche (Mannheim)
NucleoSpin® Extract 2 in 1	Machery-Nagel GmbH (Düren)
Oligo (dT) <sub>20</sub> Sonde, Biotin gelabelt	Roche (Mannheim)
pGEM-T Vector System II	Promega (Heidelberg)
RNAse-Inhibitor	Roche (Mannheim)
Streptavidin-coated PCR-Tubes	Roche (Mannheim)
Titan One Tube RT-PCR-System®	Roche (Mannheim)
Wizard Plus Minipreps	Promega (Heidelberg)

## 2.11 Antiseren

### Primärer Antikörper:

Anti-*P. primaurelia* 156-G (polyklonales Kaninchen Serum)

Anti-*P. primaurelia* 156-D (polyklonales Kaninchen Serum)

Anti-*P. primaurelia* Y4-Antikörper (monoklonaler Maus Antikörper, G-spezifisch)

Die verwendeten primären Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Lars Czubatinski, Herrn Dr. Massoud Momayesi und Frau Dr. Yvonne Capdeville zur Verfügung gestellt.

### **Sekundärer Antikörper:**

Die folgenden Antikörper-Farbstoff-Konjugate wurden zur sekundären Immunofluoreszenzmarkierung benutzt:

FITC-goat-anti-rabbit-IgG (Sigma, Deisenhofen)  $\lambda$ -Anregung 495nm;

$\lambda$ -Emission 525nm; Zeiss-Filter Nr.09

FITC-goat-anti-mouse-IgG (Sigma, Deisenhofen)  $\lambda$ -Anregung 495nm;

$\lambda$ -Emission 525nm; Zeiss-Filter Nr.09

Texas red-goat-anti-rabbit-IgG (ICN Biomedicals, USA)  $\lambda$ -Anregung 552nm;

$\lambda$ -Emission 568-574nm; Zeiss-Filter Nr.15

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung von Paramecien

#### Stammkulturen

Die für diese Arbeit verwendeten Paramecien stammten alle ausschließlich von der Art *Paramecium primaurelia*. Dies lag vor allem daran, dass sich *Paramecium primaurelia* nicht nur für Experimente im Labor, sondern aufgrund der vorliegenden Untersuchungen auch für Freilandversuche eignete, während sich Zellen der Art *Paramecium tetraurelia* in vorhergehenden Untersuchungen als ungeeignet für Außenversuche herausgestellt hatten. Außerdem sind die drei Serotypen, die von *Paramecium primaurelia* ausgebildet werden können, in ihren Temperaturbereichen relativ gut voneinander abgegrenzt, so dass sie sich deshalb gut induzieren und detektieren lassen. Zudem sind aufgrund von Untersuchungen der französischen Arbeitsgruppe von Frau Yvonne Capdeville die codierenden Gensequenzen der Oberflächenproteine 156G und 156D bereits analysiert. Dieser Umstand erwies sich für die Anwendung nachfolgenden molekularbiologischen Methoden als vorteilhaft.

Es wurden für diese Arbeit pro Stamm mehrere Reagenzglaskulturen à 10ml angelegt. Hierbei wurde speziell auf die verschiedenen Temperaturansprüche der jeweiligen Oberflächenproteintypen geachtet.

Die Stämme 41, 60, 156 und 168 bilden bei Raumtemperatur das Serotypprotein G auf der Zellmembran und den Cilien aus. Die Kultivierung erfolgte recht unproblematisch. Die Kulturen wurden ein bis zweimal wöchentlich mit dem doppelten Volumen an frisch mit *Enterobacter aerogenes* beimpften WGP-Medium III aufgefüllt.

Die Kulturen mit dem erheblich schwieriger auszubildenden Serotypprotein D, den die Stämme von *Paramecium primaurelia* in der Regel bei Temperaturen von über 32°C exprimieren, wurden in einem Wärmeschrank bei 33°C kultiviert. Da sich diese Kulturen besonders empfindlich gegenüber Hungerreiz erwiesen, wurde darauf geachtet, dass die Zellen, die den Serotyp D ausbildeten, regelmäßig jeden 2. Tag mit frischem Futter versorgt wurden.

Sämtliche Stammkulturen wurden regelmäßig unter der Stereolupe auf Zustand und Zelldichte kontrolliert.

### **Daily-Isolation Lines**

Zur gezielten Induktion von Serotyp D, wurde die Technik der „Daily-Isolation Lines“ (SONNEBORN, 1950) benutzt. Hierbei wurden aus den Stammkulturen der Serotypen G (ursprünglicher Serotyp bei Raumtemperatur) Einzelzellen in Dreilochobjektträger isoliert. Diese wurden dann über einen Zeitraum von 24h bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Weiterkultivierung im Wärmeschrank bei 33°C. Dieser große Temperatursprung diente den *Paramecium*-Zellen als Reiz zur Induktion des gewünschten Serotypproteins D auf der Zelloberfläche.

Bis zur stabilen Ausprägung des neuen Serotyps wurden die Zellen täglich in neues Medium (100µl/Dreiloch) isoliert (Einzelzellisolation). Dies garantierte eine gute Versorgung der Paramecien mit Futter, sowie die Möglichkeit die Zelllinien mit Hilfe einer Immobilisierungsreaktion (s.u.) durch homologes Antiserum zu selektieren. Als günstig erwies sich hierbei ein Futterverhältnis von WGP-Medium/Volvic von 1:1. Diese Art der Kultivierung erfolgte über den Zeitraum von einer Woche.

Erst als die Einzelzellen das Serotypprotein D stabil ausprägten, konnte mit dem Anlegen von Zellkulturlinien begonnen werden, die, wie oben beschrieben zu Stammkulturen herangezogen wurden.

### **Massenkulturen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Stamm 156G und D (beide Art *Paramecium primaurelia*) Massenkulturen angelegt. Diese, bis zu einem Volumen von ca. 20 –100l vermehrte Kulturen, mit einer Zelldichte von ca. 1000 Zellen/ml, wurden in erster Linie für die Isolation von Oberflächenproteinen vom Zellcortex benutzt.

Ein weiterer Grund für das Anzüchten solch großer Volumina bestand in deren Exposition in Freilandexperimenten. Die Massenkulturen starteten zunächst von etwa 5ml dicht bewachsener Kultur, die in einem Reagenzglas gehalten wurde. Die Kulturen wurden dreimal in der Woche mit *Enterobacter aerogenes* angeimpftem WGP-Medium gefüttert, damit die Vermehrungsrate der Paramecien exponentiell erfolgte und der erwünschte Serotyp stabil ausgeprägt wurde. Nachdem die Kulturen ein Volumen von ca. 15ml erreicht hatten, wurden sie in Erlenmeyerkolben überführt. Um einen effektiven Sauerstoffaustausch zu gewährleisten wurden die Kolben maximal zu 2/3 des Volumens mit der Kultur gefüllt. Außerdem wurden die Massenkulturen täglich geschüttelt, um das Medium mit Sauerstoff anzureichern und die Zellen somit optimal mit

Sauerstoff zu versorgen. Gelegentlich erfolgte die Zugabe von  $\beta$ -Sitosterol, um das Wachstum noch zu steigern.

In zeitlichen Abständen wurde die Zelldichte folgendermaßen kontrolliert: 100  $\mu$ l einer gut durchmischten Kultur wurden in die Vertiefung eines Dreilochobjektträgers gegeben. Durch Zugabe einiger Tropfen 2,5% Glutaraldehydlösung wurden alle Zellen abgetötet. Die Anzahl der Zellen konnte nun leicht unter der Stereolupe bestimmt werden. Aus den ermittelten Werten wurde ein Mittelwert gebildet und aus ihm die Zelldichte (Zellen/ml) berechnet.

### 3.2 Isolation der Oberflächenproteine vom Zellcortex

Zum Nachweis von Oberflächenproteinen wurden ursprünglich homologe Kaninchenantiseren benutzt, welche ihre Anwendung in immunologischen Methoden, wie z.B. der Immobilisierungsreaktion oder Immunofluoreszenzmarkierung finden. Für die Gewinnung solcher Antiseren gibt es allgemein zwei Wege: Zum einen können Homogenate ganzer Zellen eingesetzt werden (CAPDEVILLE 1971; FINGER 1957), zum anderen lassen sich die Oberflächenproteine ebenfalls leicht vom Zellcortex „abschälen“, um damit in aufgereinigter Form die Immunisierung des Kaninchens vorzunehmen. In dieser Arbeit wurde die letztere Technik verwendet, die in der Arbeitsgruppe Ökologie in dieser Form schon in der Diplomarbeit von Burger (2000) beschrieben wurde und eine Modifizierung der Methode von Flötenmeyer et al. (1998) darstellt.

So wurden je ca. 20l Massenkultur von Stamm 156, Serotyp D und Serotyp G angelegt, mit einer Paramecien-Dichte von ca. 1000 Zellen/ml. Diese wurden zunächst über Gaze filtriert, um Verunreinigungen und Zelldebris zu entfernen und danach mittels einer Durchlaufzentrifuge auf das Volumen von 400ml eingengt. Ein erneutes Einengen der Kultur in einer Öltestzentrifuge bei 2000r/min, führte zu einem Zellpellet von ca. 5-10ml. In den Öltestbechern wurden die Zellen nun noch zweimal mit je 25ml Dryls Phosphatpuffer gewaschen, erneut pelletiert und danach erfolgte die Zugabe von 25ml Extraktionsmedium. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert und in Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 4°C erfolgte die Inkubation des Extraktionsmediums für eine Stunde.



Danach wurden die Zellen bei 4°C fünf Minuten bei 180 x g in einer Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert und der Niederschlag, der die abgeschälten Paramecien-Zellen enthielt, wurde verworfen. Um die Lösung nun vollständig von Zellen zu befreien, wurde der Überstand für zehn Minuten bei 20000 x g erneut zentrifugiert. Um eine temperaturbedingte Zerstörung der Proteine zu vermeiden, wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Unter ständigem Rühren in einem Becherglas wurde nun das gewünschte Protein in einem Zeitraum von ca. drei Stunden mit 278g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gefällt. Dies führte zu einer leicht rötlichbraunen Verfärbung der Flüssigkeit. Danach wurde das Protein erneut in der Sorvall-Zentrifuge bei 10000 x g pelletiert und nach dem Absaugen des Überstandes wurde der Proteinniederschlag in insgesamt 10ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst.

Als nächster Schritt wurde eine Dialyse des Fällungsproduktes gegen  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. vorgenommen, um das aus der Fällung stammende Salz zu entfernen.

Hierzu wurde die Proteinlösung in vorher präparierte Dialysierschläuche gefüllt (Kochen der Schläuche in wässriger 1mM EDTA-Lösung mit 2%  $\text{NaHCO}_3$  und danach zweimaliges Spülen in Aqua dest.), die an beiden Enden verknotet wurden. Für zwei Tage erfolgte die Dialyse unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer im Kühlschrank. Es wurde mehrmals das Wasser erneuert.

Danach wurde die entsalzte Proteinlösung in einen Rundkolben überführt, bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und mit Hilfe einer Gefriertrocknungsanlage in der Abteilung für Lebensmittelchemie im Fachbereich Chemie, wurde das Produkt 24 h gefriergetrocknet. Das nun lyophilisierte Protein wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, die Ausbeute bestimmt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

Die beiden so erhaltenen isolierten Oberflächenproteine D und G von Stamm 156 wurden danach an Herrn Momayesi an die Universität Konstanz gesendet, der sich im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise dazu bereit erklärte, die Immunisierung der Kaninchen zu übernehmen und die für die immunologischen Untersuchungen benötigten Antiseren herzustellen.

### 3.3 Immobilisierungsreaktion

Die Immobilisierungsreaktion wurde schon von Rösle (1905) beobachtet und daraufhin ausgiebig beschrieben. Noch heute basieren auf ihr die modernen immunologischen

Nachweismethoden für Oberflächenproteine und noch immer ist die Immobilisierung von *Paramecium* ein schnelles und einfaches Testverfahren, um *Paramecium*-Kulturen auf den Serotyp zu testen und die Transformation von Serotypproteinen festzustellen.

Die Immobilisierungstests wurden in der Regel mit 100µl der zu testenden Kultur in einem Dreilochobjektträger bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden mit einem Aliquot von homologem Kaninchenantiserum versetzt, wobei die Arbeitskonzentration bei 1:50 lag. Die Reaktion der Zellen wurde nun unter dem Binokular beobachtet. Entsprechend der Serotyp der Kultur dem des verwendeten Antiserums, zeigten die Zellen rasch eine deutliche Reaktion. Statt der gleichmäßigen Schwimmbewegungen begannen die Zellen zu „taumeln“ und sich scheinbar orientierungslos im Kreis zu bewegen. Nach weiteren Minuten sanken sie bewegungslos auf den Boden des Dreilochobjektträgers ab, was letztendlich zum Absterben der Zellen führte.

Als Grund für diese Immobilisierung sind die im homologen Antiserum enthaltenen Immunglobuline anzuführen, die zum großen Teil gegen Epitope der Oberflächenproteine auf der Zellmembran gerichtet sind. Dies führt zu einer Quervernetzung der Oberflächenproteine auf den Cilien, so dass die Zellen in ihrer Schwimmbewegung behindert werden. Nach einiger Zeit agglutinieren die Cilien vollständig, was eine vollkommene Immobilisierung der Zellen zur Folge hat (BEALE, 1954).

### 3.4 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Immunhistochemische Färbemethoden spielen heute in der biologisch–medizinischen Forschung eine wesentliche Rolle. Sie dienen zum Nachweis und Identifikation antigener Komponenten an und in Zellen durch spezifische Antikörper, die z.B. durch Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome), Enzyme oder Goldpartikel markiert sind.

Bei der Färbung von Oberflächenantigenen wurde das Verfahren der sekundären Immunfluoreszenz gewählt. Hierbei wird an das darzustellende Antigen zunächst ein homologer primärer Antikörper gekoppelt. An diesen lagert sich in einer nachfolgenden Reaktion ein sekundäre Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung wird ein Fluoreszenzmikroskop eingesetzt, mit dem, durch Einstrahlung einer bestimmten Wellenlänge, die am zwei-

ten Antikörper gebundene Gruppe zur Anregung gebracht wird. In Folge dessen wird eine charakteristische Wellenlänge emittiert. Das Präparat zeigt somit nur an den Stellen ein Fluoreszenzsignal, an denen eine Antigen-Antikörper-Bindung stattgefunden hat.

### 3.4.1 Fixierung der Zellen

Vor der eigentlichen Färbung mussten die *Paramecium*-Zellen zunächst fixiert werden. Dies garantierte die Erhaltung der Antigenität, die Zugänglichkeit der antigenen Determinante für den Antikörper, sowie die Wahrung struktureller Details, wie die Zellform und Cilien, die ebenfalls von Oberflächenantigenen bedeckt werden und verhindert somit deren mechanische Zerstörung.

200ml einer gut bewachsenen Kultur wurden in der Öltestzentrifuge eingeeengt (1min bei 2000r/min) und danach der Überstand bis auf wenige Milliliter durch Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit Volvic wurde das erhaltene Pellet auf die Temperatur der frisch zubereiteten 4%-igen PFA (Paraformaldehyd) Lösung temperiert. Um ein Abstoßen der Trichozysten zu verhindern, wurden die *Paramecium*-Zellen nun zügig in 8-9ml Fixans pipettiert.

Die Fixierung erfolgte für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem Falcon-Gefäß. Danach wurden die fixierten Zellen zweimal in 1x PBS-Puffer gewaschen um zu gewährleisten, dass das Fixiermittel quantitativ entfernt wurde. Nun konnten die Zellen problemlos für mehrere Wochen bis zur Färbung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### 3.4.2 Markierung eines Oberflächenproteintyps

Das Markieren der Oberflächenproteine erfolgte in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß, wodurch sich die Möglichkeit eröffnete, problemlos eine größere *Paramecium*-Zahl zu färben.

0,5 bis 1ml der fixierten Zellen wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (3000U/min, 2min). Danach wurde das Zellpellet kurz in 50mM Glycein gewaschen und anschließend die unspezifischen Bindungsstellen für 45min in 3% BSA-Lösung

blockiert. BSA bindet hierbei an freie reaktive Gruppen, die IgG unspezifisch binden und verhindert damit ein falsches positives Fluoreszenzsignal.

Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS (-und zentrifugieren) wurde der primäre Antikörper in der Arbeitsverdünnung 1:700 in 1ml 1x PBS dazugegeben. Dieser wirkte 45 min ein und wurde mit einem erneuten Waschschrift mit 1x PBS aus dem Färbegefäß entfernt.

Danach wurde der Fluoreszenzfarbstoff in einer Arbeitsverdünnung von 1:50 zugefügt. Da die chromophore Gruppe des sekundären Antikörpers lichtempfindlich ist, wurde das Einwirken des sekundären Antikörpers für 45min unter Lichtausschluss vorgenommen. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS wurden 10µl der markierten Zellen mit 5µl Vectashield® auf einen Superfrost Objektträger pipettiert und nach dem Auflegen eines Deckglases mit Nagellack versiegelt. Obwohl das Vectashield® als ein Elektronendonator für die chromophore Fluoreszenzgruppe dient und somit ein Ausbleichen des Präparates verhindert, wurde sicherheitshalber auf die Handhabung der Zellen beim Mikroskopieren im Dunklen geachtet.

### 3.4.3 Doppelmarkierung von Oberflächenproteinen

Bei einigen Proben von Stamm 156 wurde eine Doppelmarkierung vorgenommen, um die Serotypproteine G und D an einer Zelle simultan darzustellen. Die Abfolge der Färbeschritte war hierbei wie zuvor beschrieben. Die Doppelmarkierung unterschied sich nur in der Zugabe des primären Antikörpers. Es wurde neben dem polyklonalem Kaninchenantiserum für 156D in gleicher Menge der monoklonale Antikörper Y4 eingesetzt (CAPDEVILLE, 1989), der spezifisch an Serotypproteine G der Art *Paramecium primaurelia* bindet. Da dieser monoklonale Antikörper aus Mauszellen stammt, erfolgte die Markierung mit einem mausspezifischen sekundären Antikörper, der als chromophore Gruppe FITC (grünes Fluoreszenzsignal) trug. Zur besseren Unterscheidung wurde der Antikörper des anti-156D polyklonalen Serums in Kaninchen entwickelt. Der spezifische sekundäre Antikörper trug als chromophore Gruppe eine Texas-Red Farbstoffgruppe (rotes Fluoreszenzsignal), die kovalent gebunden war.

### **3.5 ELISA**

Der sogenannte „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) beruht auf den gleichen prinzipiellen immunologischen Grundlagen, wie die Immunomarkierung. Mit dieser Technik lässt sich der Antikörpertiter im wässrigen Milieu detektieren. ELISA wurde zum Nachweis der von den *Paramecium*-Zellen abgespaltenen Oberflächenproteine in der Kulturflüssigkeit verwendet.

Ca. 100ml *Paramecium*-Kultur wurden aus einer Stammkultur verwendet um die Zellen in der Öltestzentrifuge bei 2000U/min zu pelletieren. Dem Überstand wurden einige Milliliter entnommen, auf Eppendorf-Gefäße verteilt und in einer Tischzentrifuge bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Pellet mit den sedimentierten Futterbakterien wurde verworfen und der Überstand wurde in die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben.

Das Prinzip des ELISA beruht darauf, dass die Plastikoberfläche die im Medium vorhandenen Proteine kovalent bindet. Somit werden auch die Oberflächenproteine an das Plastik adsorbiert und man kann die Signalintensität nach entsprechender Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff spektrometrisch bestimmen.

Die Methode wurde anlehnd an die Immunofluoreszenzfärbung folgendermaßen durchgeführt:

Die Oberflächenproteine wurden 1,5h an die Plastikoberfläche gebunden.

Dann erfolgte ein zweimaliger Waschschrirt mit je 300µl 1x PBS um Verunreinigungen aus der Vertiefung herauszuwaschen.

Danach wurde zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen 45min mit 3% BSA-Lösung behandelt,.

Der 1µl primärer Antikörper wurde mit 300µl 1x PBS in jedes Loch der Platte pipettiert und ca. 45min einwirken gelassen. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit je 300µl 1x PBS.

5µl des sekundären Antikörpers wurden mit 250µl 1x PBS im Dunkeln für 45min einwirken gelassen.

Zuletzt wurde noch zweimal mit je 300µl 1x PBS gewaschen.

Die so aufbereitete Mikrotiterplatte konnte nun im Fachbereich Chemie in der Abteilung für Toxikologie im Photometer bei 492nm vermessen werden.

## **3.6 PCR-Techniken**

### **3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR), eine Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren, ist eine der sensitivsten Analyseverfahren, die in den letzten Jahren entwickelt wurden. Theoretisch ist man damit in der Lage aus einem einzelnen Nucleinsäureabschnitt unter optimalen Bedingungen innerhalb weniger Stunden *in vitro* bis zu  $10^{12}$  identische Moleküle zu erzeugen. Bei der PCR macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, DNA zu duplizieren. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH Ende, an den die DNA-Polymerase binden kann und der dann dementsprechend durch das Enzym verlängert wird. Dieser kurze Abschnitt doppelsträngiger DNA kann künstlich durch Zugabe von „passenden“ komplementären Oligonukleotiden ins Reaktionsgemisch, sogenannten Primern, geschaffen werden. Diese binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang und können nun von der Polymerase verlängert werden. Denaturiert man anschließend die neusynthetisierte doppelsträngige DNA durch Temperaturerhöhung bis zur Schmelztemperatur auf über 92°C in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Gibt man in jeden PCR-Ansatz zwei solcher Primer, einen, der am „sense“-Strang und einen, der am Gegenstrang (dem antisense-Strang) bindet, so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnittes. Die PCR führt also zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch jeweils neu gebildete Stränge als Matrize zur Verfügung stehen.

Da es bei der Denaturierung der DNA bei 90°C jedoch ebenfalls zu einer Denaturierung der Polymerase kommen würde und man deshalb gezwungen wäre, bei jedem Zyklus neue Polymerase dazuzugeben, verwendet man bei der PCR eine temperaturstabile DNA-Polymerase. Diese Taq-Polymerase, die aus den in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, ermöglicht es, dass die Reaktion ohne Unterbrechung ablaufen kann.

### 3.6.2 Standard-PCR

Vor der eigentlichen PCR-Reaktion musste noch eine Zell-Lyse vorgeschaltet werden, die die freie Exonukleasen inaktivierte, die zum Abbau der DNA führen würden. Nach der Lyse liegt die DNA frei, d.h. z.B. ohne gebundene Kernproteine (Histone) vor.

Für den Lysis-Ansatz wurden *Paramecium*-Zellen isoliert, zweimal mit Volvic gewaschen und somit von eventuell vorhandenen Verunreinigungen wie z.B. Futterbakterien gesäubert. In einem Volumen von 2,5µl wurden 2-3 dieser so gereinigten Paramecien in ein 0,1ml Eppendorf-Tube überführt und mit 22,5µl Lysis-Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde 90min bei 56°C lysiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Proteinase K durch 10minütiges Erhitzen bei 94°C.

Nach dem Abkühlen auf 4°C konnte mit dem Zusammenpipettieren des PCR-Ansatzes begonnen werden. Da die PCR ein äußerst sensitives Verfahren ist, genügen schon sehr geringe Verunreinigungen um falsche Ergebnisse zu bekommen. Zur Vermeidung von Kontaminationen waren deshalb eine Reihe von Sicherheitsvorkehrungen zu beachten. Alle Reagenzien wurden bei -20°C gelagert und erst kurz vor dem Gebrauch aufgetaut. Auch während der Verwendung wurden sie auf Eis gelagert. Sämtliche Pipettiervorgänge mit PCR-Reagenzien fanden in einem Sterilkabinett statt. Ebenso befanden sich alle benutzten Pipettierhilfen, sowie die Einwegspitzen unter der Sterilbank.

Der PCR-Ansatz unter Standardbedingungen wurde folgendermaßen pipettiert:

25µl Lysis Ansatz  
5µl 10x Reaktion Buffer (MgCl<sub>2</sub> free)  
3µl MgCl<sub>2</sub>  
13,5µl Aqua bidest (autoklaviert)  
1µl dNTP-Mix  
1µl Primer forward  
1µl Primer reward  
0,5µl Taq-Polymerase

---

50µl Gesamtvolumen

---

Die *Taq-Polymerase* wurde immer zuletzt zugegeben. Die Ansätze gut durchmischt und dann in den Thermo-Cycler gestellt. Es kam folgendes PCR-Programm zur Anwendung:

Denaturierung: 4min, 94°C

**30 Zyklen:**

Denaturierung: 45sec, 94°C

Primer-Annealing: 45sec, 45°C

Primer-Extension: 1min, 72°C

Nach dem letzten Zyklusdurchlauf erfolgte eine erneute Primer-„Extension“ für 5min. bei 72°C.

Die Anlagerungs-Temperatur bzw. Annealing-Temperatur errechnete sich aus den beiden Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) wie folgt:

$$T_A (\text{°C}) = (T_{m \text{ forw.}} + T_{m \text{ rew.}}) / 2$$

$T_A$  = Annealing-Temperatur

$T_{m \text{ forw.}}$  = Schmelztemperatur des „Vorwärtsprimers“

$T_{m \text{ rew.}}$  = Schmelztemperatur des „Rückwärtsprimers“

Nach Ablauf der Reaktionen wurden die PCR-Proben bei 4°C gelagert.

### 3.6.3 Long-Run PCR

Um DNA-Sequenzen zu amplifizieren, die größer als 2kb waren, wurde das Expand High Fidelity PCR-System<sup>®</sup> der Firma Roche verwendet. Dieses enthält eine *Taq-Polymerase*, die lange DNA-Fragmente vervielfältigen kann, sowie eine *Proofreading-Polymerase*, die eine Fehlerkorrekturfunktion besitzt.

Die Template DNA stammte aus einer Zell-Lyse, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

Es wurden zwei Master-Mixe hergestellt:

**Master-Mix 1:**      1µl    dATP (10mM)  
                          1µl    dCTP (10mM)



1µl	dGTP (10mM)
1µl	dTTP (10mM)
1µl	Primer forward
1µl	Primer reverse
3µl	Template DNA (isolierte genomische DNA)
16µl	Aqua bidest.

<b>Master-Mix 2:</b>	5µl	10x Expand HF Puffer
	0,75µl	Expand HF Enzym Mix
	19,25µl	Aqua bidest.

Das PCR-Programm wurde folgendermaßen gewählt:

Denaturierung: 2min, 94°C

**10 Zyklen:**

Denaturierung: 20sec, 94°C

Primer-Annealing: 30sec, 45°C

**20 Zyklen:**

Denaturierung: 20sec, 94°C

Primer-Annealing: 30sec, 45°C

Primer-Extension: 8min + 5sec/Zyklus, 72°C

**1 Zyklus:**

Primer-Extension: 7min, 68°C

### 3.6.4 RT-PCR

Mit der Standard PCR-Methode ist es nicht möglich mRNA nachzuweisen, da durch diese Technik nur DNA vervielfältigt werden kann, weil die *Taq-Polymerase* keine RNA als Matrize zur Amplifikation verwendet. Somit ist ein direkter Nachweis der momentan in der *Paramecium*-Zelle gebildeten Oberflächenproteine mit der herkömmlichen PCR-Methodik nicht möglich.

Die moderne Molekularbiologie macht sich jedoch ein anderes Enzym für diese Anwendung zunutze, nämlich eine RNA-abhängige DNA Polymerase, die sog. *Reverse*

*Transkriptase* (RT), die aus RNA-Tumoviren isoliert wird. Die von der *Reversen Transkriptase* katalysierten Reaktion verläuft analog zu der normalen *DNA-Polymerase*-Reaktion und es wird ebenfalls ein Primer benötigt. Zunächst dient als RNA-Matrize einzelsträngige RNA, zu der das Enzym einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Es entsteht hierbei ein RNA-DNA-Hybrid, also eine DNA-Kopie, die man auch als cDNA bezeichnet. In einer nachgeschalteten PCR-Reaktion wird diese cDNA durch eine herkömmliche *Taq-Polymerase* vervielfältigt. Somit ist es möglich eine diagnostische Bande durch Umschreiben der RNA in cDNA und nachgeschalteter Amplifikation zu erhalten.

### 3.6.4.1 Isolation von mRNA aus der Paramecium-Zelle

Zunächst benötigte man zur Durchführung der RT-PCR freie mRNA. Diese sollte möglichst ohne genomische DNA oder Proteine vorliegen, da die *Reverse Transkriptase* auch DNA als Vorlage zur Synthese eines neuen Stranges verwendet. Aus diesem Grund könnten besonders DNA-Verunreinigungen in der späteren Polymerase-Reaktion zu einem verfälschten Ergebnis führen. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde ein sogenanntes mRNA-capturing mit dem mRNA-capture Kit<sup>®</sup> der Firma Roche durchgeführt.

Um einen unnötigen Abbau von mRNA durch RNAsen zu vermeiden, wurden nur RNase freie Materialien (z.B. Pipettenspitzen und Lösungen) verwendet. Die benötigten Glasgeräte wie Dreilochobjektträger wurden vor Gebrauch mit Chloroform ausgespült und über Nacht bei 180°C inkubiert. Außerdem wurden für alle Arbeiten mit RNA grundsätzlich sterile Einweghandschuhe benutzt.

Aus einer Kultur wurden Zellen isoliert und dreimal in sterilem Volvic gewaschen. Es wurden 1-5 Zellen in einem Volumen von 10µl in die Vertiefung eines RNase freien Dreilochobjektträger pipettiert und diese wurden zusammen mit 0,5µl RNase Inhibitor und Lysis-Puffer etwa 5min lysiert. Es wurden zusätzlich wurden 0,5µl DTT zugefügt. Das Zell-Lysat wurde in einer Pipettenspitze zügig auf- und abpipettiert, um die RNA zu scheren. Nun wurden dem Lysis-Produkt 0,4µl Biotin-markierte Oligo dT-Sonde (20x) zugegeben und alles zusammen für 10min bei 37°C inkubiert.

Die Sonde besitzt hierbei die Funktion, an das mRNA-spezifische adeninhaltige Ende der RNA, den Poly-A-Schwanz zu binden und somit nur mRNA zu markieren.

Als nächstes wurde das gesamte Lysis-Produkt in ein Streptavidin beschichtetes Tube überführt und erneut für 10min bei 37°C inkubiert. Die Beschichtung des Reaktionsgefäßes mit Streptavidin bildet mit der Sonde einen Komplex, was zur Folge hat, dass sich damit die zuvor gebundene mRNA an der Innenwand des Reaktionsgefäßes heftet.

Nach zweimaligem vorsichtigem Spülen des Streptavidin-Tubes zum Entfernen von Proteinen und genomischer DNA mit je 100µl Waschpuffer, konnte die nun isolierte mRNA in der anschließenden RT-PCR verwendet werden.

### 3.6.4.2 Single Step RT-PCR

Es wurde das Titan One Tube RT-PCR-System® der Firma Roche verwendet. Dieses bietet gegenüber anderen RT-Kits den Vorteil, dass die nachfolgenden Reaktionen, die reverse Transkription und die PCR im Streptavidin-beschichteten Tube stattfinden. Es wurden zwei Master-Mixe folgendermaßen hergestellt:

**Master-Mix 1:**

1µl	dATP (10mM)
1µl	dCTP (10mM)
1µl	dGTP (10mM)
1µl	dTTP (10mM)
1µl	Primer forward (100mM)
1µl	Primer reverse (100mM)
2,5µl	DTT (100mM)
0,5µl	RNAse Inhibitor (human placenta)
16µl	Aqua bidest.

**Master-Mix 2:**

10µl	5x RT-PCR Puffer
1µl	Enzym Mix
19,25µl	Aqua bidest

Das PCR-Programm wurde folgendermaßen gewählt:

Reverse Transkription 30min, 50°C

Denaturierung: 2min, 94°C

**10 Zyklen:**

Denaturierung: 10sec, 94°C

Primer-Annealing: 30sec, 45°C

Primer-Extension 45sec, 68°C

**25 Zyklen:**

Denaturierung: 10sec, 94°C

Primer-Annealing: 30sec, 45°C

Primer-Extension: 45sec + 5sec/Zyklus, 68°C

**1 Zyklus:**

Primer-Extension: 7min, 68°C

Anschließend wurde das RT-PCR-Produkt mittels einer Agarose Gel-Elektrophorese visualisiert.

### **3.6.4.3 Multiplex RT-PCR**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Multiplex Anwendung der RT-PCR Reaktion auf Basis einer Two-Step Variante etabliert. Dies ermöglichte den gleichzeitigen Nachweis der Expression mehrerer Oberflächenproteine an einer einzelnen *Paramecium*-Zelle. Hierfür erwies sich jedoch das RT-Enzym der Firma Roche als wenig geeignet. Da für eine Multiplex Reaktion weniger Template zur Verfügung stand, wurde das von der Firma Eppendorf (Hamburg) neu entwickelte cMaster RT Enzym eingesetzt. Diese, aus einem Virus isolierte modifizierte Reverse Transkriptase, ermöglichte zum einen erstmals die Amplifikation von Sequenzen bis zu 12,5kb. Zudem erlaubte dieses neue Enzym den Einsatz von weniger Template, da es mehrere cDNA Stränge produziert, die in der späteren PCR-Reaktion amplifiziert werden. Somit besaß das cMaster RT Enzym eine wesentlich höhere Sensitivität, was sich in der Produktmenge widerspiegelte.

Die Multiplex RT-PCR wurde in einer Two-Step Reaktion mit dem cMaster™ RTplusPCR System der Firma Eppendorf durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente die, wie oben beschrieben isolierte und an die Streptavidin-Schicht gebundene mRNA. In einem ersten Schritt wurde zunächst die Reaktion der Reversen Transkription im Streptavidin-Tube durchgeführt. Hierfür wurden zwei Master-Mixe angesetzt:

**Master-Mix 1:**     2µl   dNTP mix (je 10mM)  
                  1µl   Primer G reverse (100mM)  
                  1µl   Primer D reverse (100mM)  
                  17µl  Aqua bidest.

**Master-Mix 2:**     4µl   RT+PCR Puffer mit 25mM Mg<sup>2+</sup>  
                  0,5µl  RNAse Inhibitor  
                  2µl   cMaster RT Enzym  
                  3,5µl  Aqua bidest.

Die Programm-Parameter der Zyklusabfolge lauteten folgendermaßen:

Denaturieren der RNA:  5min, 65°C

Fixieren der RNA        5min, 0°C

→ Zugabe von Master-Mix 2 (10µl)

Primer-Annealing:     10min, 45°C

cDNA Synthese         50min, 50°C

Danach wurde die PCR angesetzt:

**Master-Mix 3:**     2µl   dNTP mix (je 10mM)  
                  0,5µl  Primer G forward (100mM)  
                  0,5µl  Primer G reverse (100mM)  
                  0,5µl  Primer D forward (100mM)  
                  0,5µl  Primer D reverse (100mM)  
                  6µl   Erststrang cDNA

**Master-Mix 4:**     5µl   RT+PCR Puffer mit 25mM Mg<sup>2+</sup>  
                  0,5µl  cMaster PCR Enzym Mix  
                  33,5µl  Aqua bidest.

Das PCR Programm wurde wie folgt ausgewählt:

Denaturierung:         2min, 94°C

**35 Zyklen:**

Denaturierung:	20sec, 94°C
Primer-Annealing:	20sec, 45°C
Primer-Extension:	30sec, 68°C

Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf 4°C abgekühlt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

## 3.7 Elektrophoresetechniken

### 3.7.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der fertigen PCR-Produkte der PCR und RT-PCR Experimente wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese gewählt. Hierbei wird die negative Ladung der DNA genutzt, um Fragmente mit Hilfe eines elektrischen Feldes in einer Agarosematrix nach der Größe aufzutrennen. Große Fragmente wandern dabei langsamer als kleine Fragmente. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA ist dabei abhängig von der Konzentration des Gels, von der Größe und Sekundärstruktur der DNA und der Stärke der angelegten Spannung.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Gel verwendet (bei Long-Run PCR-Produkten: 0,5%) um eine gute Auftrennung und klare Bandenschärfe zu gewährleisten. Für das Beladen der Slots wurden 15µl des PCR-Produktes mit 2µl Blue Loading Dye gemischt und vorsichtig in die Tasche pipettiert. Als Größenmarker diente 100bp DNA-Marker, der ebenfalls mit 2µl Loading Dye und zusätzlich 13µl TAE-Puffer versetzt wurde.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120V Gleichspannung für ca.1h in der Kühlgelkammer. Zur Visualisierung der Banden wurde das fertige Gel dann im Ethidiumbromid-Bad angefärbt.

### 3.7.2 SDS-PAGE

Die Technik der SDS-Page wird im allgemeinen für die Auftrennung von Proteingemischen verwendet. Dieses besteht aus einer Polyacrylamid-Matrix, das als SDS-PAGE bezeichnet wird, wobei SDS für „sodium dodecyl sulfat“ steht, worin die Proteine vor der Auftrennung im Gel gekocht werden. Dabei hat SDS die Funktion die Proteine durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zu linearisieren. Die noch existierenden Schwefelbrücken werden durch die Zugabe von DTT und Mercaptoethanol ebenfalls gespalten, so dass die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur vollkommen verlieren und man sie nun aufgrund ihrer Größenverhältnisse im Gel auftrennen kann.

#### Vorbereitung der Proben:

Es wurden 0,1mg der lyophilisierten Oberflächenproteine in einem Eppendorf-Gefäß abgewogen, in Wasser gelöst und für 2min in 20µl 10% SDS und 40µl Probenpuffer gekocht.

#### Pipettierschema für die SDS-PAGE:

	10%iges Trenngel	6%iges Sammelgel
40%ige Polyacrylamidlösung	7,5ml	0,75ml
1,88M Tris/HCl (pH 8,8)	6ml	
0,625M Tris/HCl (pH 6,8)		1,2ml
10%iges SDS	300µl	60µl
TEMED	25µl	6µl
10%iges Ammoniumperoxodisulfat	150µl	30µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	16,2ml	4ml

Der Gelelektrophoreselauf erfolgte in der Maxigelkammer von Biometra bei 25mV, bis die Bromphenolblaulinie die Grenze Sammel-/Trenngel erreicht hat, dann wurde die Spannung auf 5mV verringert und das Gel über Nacht weiterlaufen gelassen.

Das Färben des fertigen Gels erfolgte in einer Comassie Blau Lösung.

### **3.8 Induzierte Serotyptransformation**

Um die Auswirkung von Umwelteinflüssen auf die Ausprägung von Serotypen besser zu verstehen, wurden Kulturen von Stamm 156 über mehrere Wochen verschiedenen veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt. Die auf ihre serotypveränderte Wirkungen getesteten Faktoren waren:

- ® Temperatur
- ® pH-Wert
- ® Salzgehalt
- ® Verschiedene Kultivierungsflüssigkeiten
- ® Anwesenheit von Prädatoren
- ® Nahrungsangebot

Während der Versuchsdauer wurden in den Kulturen regelmäßig die Zelldichten bestimmt. Am Ende des Experimentes wurden durch Stichproben der ausgeprägte Serotyp durch die Methoden der Immunofluoreszenz, der Immobilisierungsreaktion, oder der RT-PCR ermittelt. Bei längeren Untersuchungen erfolgte die Kontrolle des Serotyps auch während des Experimentes.

### **3.9 Freilandversuche**

Obwohl die Forschung an *Paramecium* im Labor schon mehr als 50 Jahre intensiv betrieben wird, gibt es bis heute wenige Untersuchungen zum Freilandverhalten dieser Einzeller. Vor allem die Ausprägung von Serotypproteinen konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein erster Versuch unternommen werden die Expression von Serotypen von *Paramecium* unter kontrollierbaren Freilandbedingungen zu dokumentieren.



Vor den Laborräumen wurden deshalb durch die Universität Kaiserslautern drei Versuchsteiche errichtet, bei denen Laborkulturen der Art *Paramecium primaurelia* Stamm 156 erstmals wieder ausgesiedelt werden sollten.

Einer dieser Teiche bildete den Kontrollteich, zwei weitere wurden mit Hilfe des Fachbereiches ARUBI so ausgerüstet, dass ihre jeweiligen Wassertemperaturen regulierbar sind. So wurde an einem Teich ein Kühlsystem installiert, durch das sich die Temperatur zwischen 8°C und 15°C frei einstellen lässt. Ein zweiter Teich wurde an eine Solaranlage angeschlossen, so dass hier die Temperatur zwischen 20°C und 40°C frei gewählt werden kann. Der unter Laborbedingungen besonders gut untersuchte Faktor der Temperatur konnte somit im Freilandexperiment in zwei Teichen kontrolliert werden.

### 3.9.1 Ansiedelung von Paramecien in den Versuchsteichen

Vor dem Ausbringen der Laborkulturen wurden die Freilandteiche vorbereitet. Alle drei Teiche wurden zunächst mit Leitungswasser befüllt. Der Kontrollteich, sowie der Wärmeteich wurden in den randnahen Zonen zur besseren Sauerstoffversorgung mit Wasserpflanzen (Teichlilien und Binsen) bepflanzt. Im Wurzelbereich der Pflanzen wurde ebenfalls Sediment in die Teiche eingebracht. Im Kühlteich war eine Bepflanzung aufgrund der Anbringung der Kühlschlange nicht möglich.

Danach wurden in alle drei Teiche 100l eines zuvor mit *Enterobacter aerogenes* angeimpften WGP Medium III gefüllt, um eine erste Versorgung mit organischem Material und Futterbakterien zu gewährleisten. Erst danach erfolgte die Exposition von je 15l Massenkultur/Teich des Stammes 156G, bzw. 156G/D im Verhältnis 1:1. Um einen Temperaturschock der ausgesetzten Zellen zu vermeiden, wurden diese zwei Tage vor dem Ausbringen ins Freiland an die Teichtemperatur adaptiert.

Durch die Anwesenheit von Produzenten, Konsumenten und Destruenten sollten sich in den Laborteichen ein stabiles Gleichgewicht etablieren, welches sich dann zu einem längerfristigen, sich selbst regulierenden Ökosystemen entwickeln sollte.

Die Parameciendichte wurde während der Versuchsdauer bei der Probenahme durch Auszählen der Zellen/ml unter dem Binokular bestimmt.

### **3.9.2 Aufbereitung von Freilandproben**

Pro Teich wurden 10l Wasser entnommen, zum Befreien von groben Verunreinigungen, wie Blätter, über 8-lagige Gaze filtriert und das gesamte Volumen mittels einer Durchlaufzentrifuge auf 400ml eingeeengt.

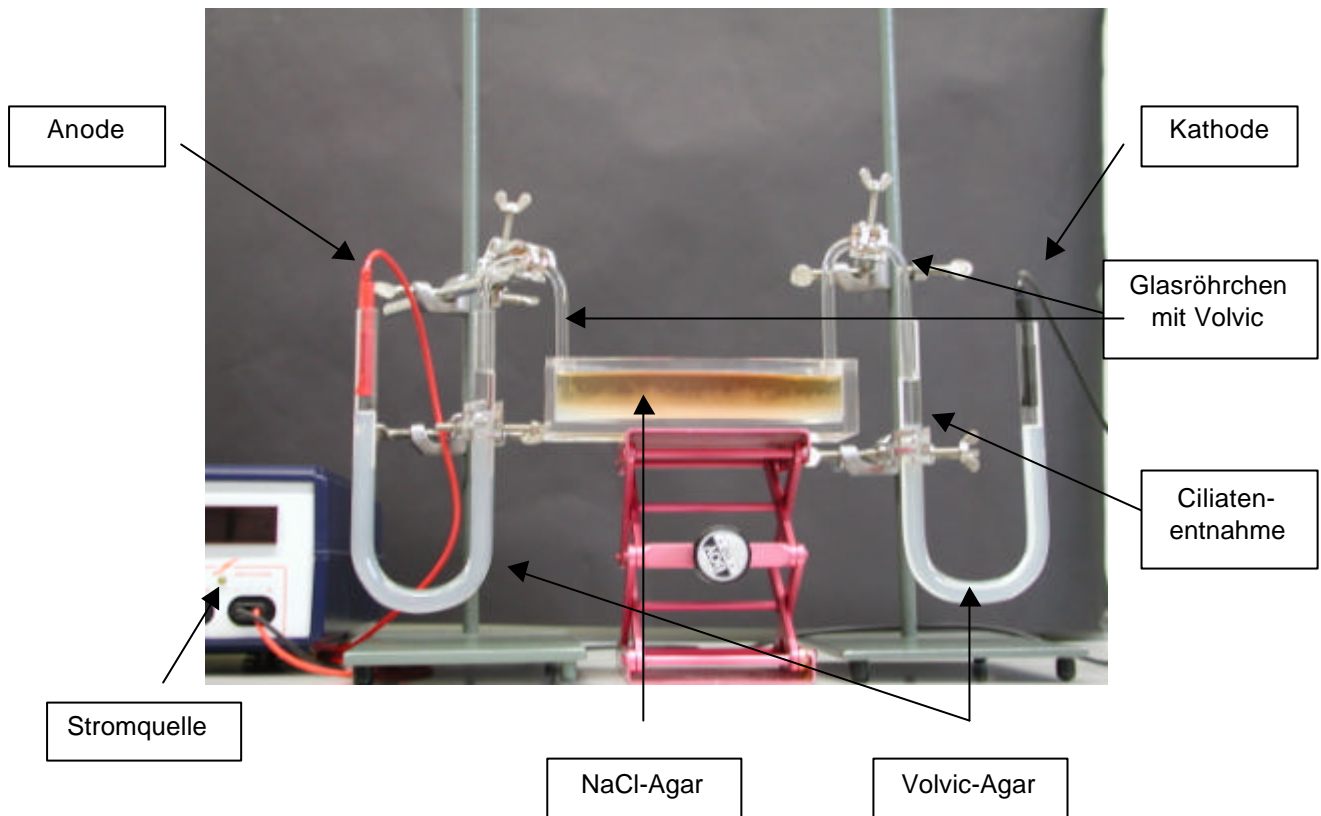
Dieses Konzentrat wurde in die Apparatur der Elektromigration gefüllt. Diese wurde bei 220V und 0,1mA für 75min durchgeführt.

#### **Methode der Elektromigration nach Hairston:**

Die Methode der Elektromigration in der Apparatur von Hairston (verändert von Schweikert, 1999) beruht auf den verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten von Ciliaten im elektrischen Feld. Diese wandern nach Anlegen einer Spannung anhand der gebildeten Feldlinien zur Kathode. Ein in der Probewanne gegossener NaCl-Agar unterstützt die Wanderungsrichtung der Ciliaten (Abb. 3-1).

Nach dem Einfüllen der Probelösung diffundieren nämlich die Salzionen in die darüber stehende Flüssigkeit und es kommt zur Ausbildung eines Salzgradienten, auf den die Ciliaten negativ-chemotaktisch reagieren. Sie schwimmen zur Oberfläche der Probelösung, wo die Salzkonzentration geringer ist als am Boden der Wanne. Sie sammeln sich am spitz zulaufenden Ende der Glaswanne und wandern letztendlich in die, mit Volvic befüllten Glasröhrchen. Alle störenden Verunreinigungen und der größte Teil anderer Organismen (z.B. *Daphnia pulex*) bleiben in der Probewanne zurück.

Somit ist die Elektromigration eine selektive Methode zur Isolation und Aufkonzentration von Ciliaten aus Freilandproben.



**Abb. 3-1: Elektromigration (Apparatur nach Hairston)**

Nach der Elektromigration erfolgte die Entnahme der isolierten Ciliaten am Volvic-Überstand der Kathodenseite. Aus der aufgereinigten Probe wurden die Paramecien isoliert und unter dem Binokular optisch nach Zugehörigkeit zum Artkomplex sortiert (*P. aurelia*; *P. caudatum*; *P. bursaria*).

## 3.10 Klonierung und Sequenzierung von unbekanntem Sequenzen von Oberflächenproteinen

### 3.10.1 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus den PCR-Ansätzen erfolgte mit dem „Nucleo Spin Extract 2 in 1“ (Macherey-Nagel) nach Arbeitsvorschrift. Der „Kit“ enthielt alle benötigten Pufferlösungen sowie die Anionenaustauschersäulen („Nucleo Spin-Säule“).

Pufferlösungen: NT1, NT2, NT3 und NE-Puffer (5mM Tris/HCl, pH8,5)

### 3.10.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Messungen der DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgte spektralphotometrisch mit dem „Gene Quant II“ (Pharmacia, Freiburg). Hierbei wurde die Absorption einer Lösung mit unbekannter DNA-Konzentration bei 260nm gemessen. Die DNA-Konzentration kann bei dieser Wellenlänge ermittelt werden, da bei Verwendung einer Küvette mit der Weglänge von 1cm die  $OD_{260}$  von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA entspricht (MANIATIS ET AL., 1989). Zudem wurde das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$ , als ein Maß für die Reinheit der Probe ermittelt und der Proteingehalt angezeigt.

Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten der Weglänge 5mm. Als Referenzwert diente die Absorption des reinen Lösungsmittels.

### 3.10.3 Ligation

Für Klonierungen von PCR-Produkten wurde das „pGEM-T-Vektor-System“ (Promega) verwendet. Die Ligation wurde nach Herstellerprotokoll pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### **3.10.4 Hitzeschocktransformation**

Bei der Transformation wurden als kompetente Zellen der *E. coli*-Stamm JM109 „High Efficiency Competent Cells“ (Promega) verwendet. Bei den kompetenten Zellen wurden durch Hitzeschock bei 42°C, Zellwandbrüche erzeugt. Hiermit wird die DNA-Aufnahme erleichtert. Die Durchführung der Transformation erfolgte nach Herstellerangaben des „pGEM-T-Vektor-Systems“.

### **3.10.5 Selektion der Transformanten und Insertanalyse**

Der pGEM-T-Vektor ist ein „Bluescript“-Vektor, der für eine Ampicillinresistenz (*amp<sup>r</sup>*) codiert und zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht. Die Durchführung erfolgte wiederum nach den Angaben im „pGEM-T-Vektor-System“. Potentiell positive Klone wurden über Nacht in Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37°C kultiviert und ihre Plasmid-DNA isoliert.

Der Inserteinbau wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft. Von Klonen, die das entsprechende Insert enthielten wurden Glycerin-Kulturen bei –70°C angelegt.

### **3.10.6 Sequenzierung**

Zur Sequenzanalyse der einklonierten Fragmente wurde die Desoxymethode nach Sanger verwendet. Hierbei führt man vier separate Replikationsreaktionen durch. Durch die Zugabe von Desoxyribonucleosidtriphosphaten, die beim Einbau durch das Fehlen der 3´Hydroxylgruppe eine Kettenverlängerung verhindern, kommt es zum Abbruch der Reaktion. Es entsteht somit eine Reihe von Fragmenten als Produkt, die nach dem Auftragen auf ein SDS-Gel Aufschluss über die Sequenz des einklonierten Inserts geben.

Die Sequenzierreaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit™.

Die eigentliche Sequenzierung wurde mit Hilfe des LI-COR 4200 DNA-Sequencer in der Abteilung für Genetik durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweismethoden zur Identifizierung von Serotypen

#### 4.1.1 Immobilisierung

Zum schnellen spezifischen Nachweis der Oberflächenantigene 156D und 156G wurden die von Czubatinski und Momayezi hergestellten homologen Antiseren in einer Immobilisierungsreaktion wie unter 3.3 beschrieben, verwendet. Hierbei musste zunächst die Arbeitsverdünnung der Seren in einem Titerstest ermittelt werden. Dazu wurden je 100 Paramecien-Zellen eines Serotyps dem homologen Serum ausgesetzt. Wichtige Parameter waren dabei die Reaktionszeit, sowie die Quantität der immobilisierenden Zellen.

Titerstests:

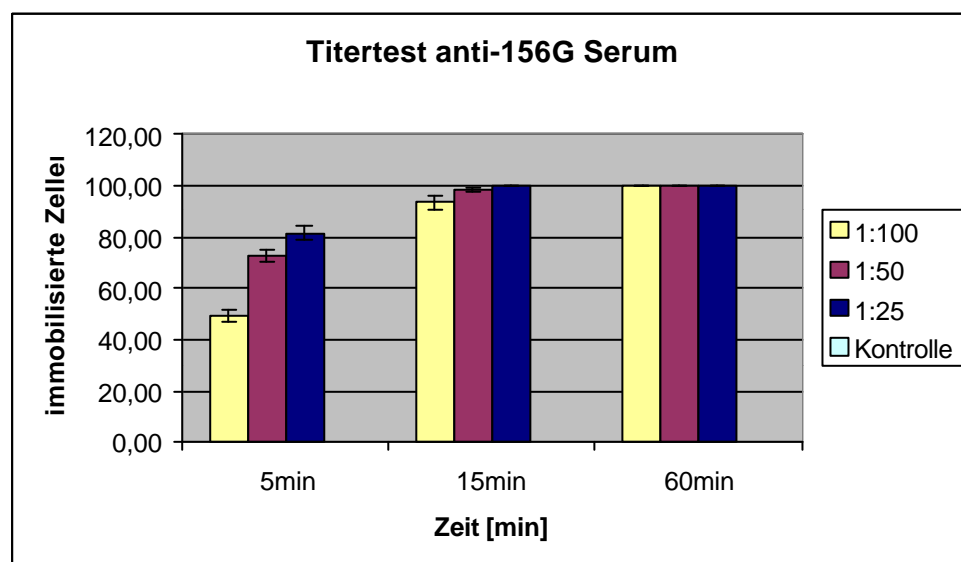
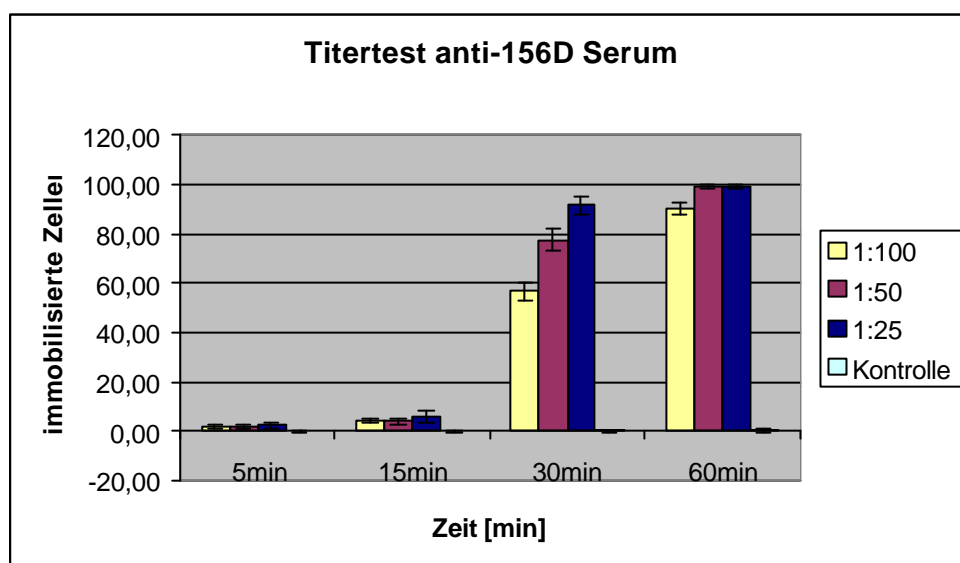


Abb. 4.1: Titerstest des anti-156G Serums

Abbildung 4-1 zeigt, dass die Antikörperkonzentration gegen die 156G-Epitope im anti-156G Serum sehr hoch ist. Schon bei geringer Konzentration des Serums,

zeigen die Zellen nach nur 15min eine fast vollständige Immobilisierungsreaktion. Da bei den Kontrollreaktionen mit Zellen des Serotyps 156D keine immobilisierten Zellen zu beobachten sind, kann man Kreuzreaktionen mit dem Oberflächenprotein 156D weitestgehend ausschließen.

Dahingegen ist die Konzentration der Antikörper gegen 156D-Epitope im anti-156D Serum niedriger. Nach 15min zeigen die Zellen zwar erste Reaktionen, indem sie scheinbar orientierungslos die Schwimmrichtung ändern oder sich im Kreis bewegen. Ein Absinken der Zellen und somit eine vollständige Immobilisierung der Cilien, lässt sich jedoch erst nach einer Stunde beobachten (Abb. 4-2).



**Abb. 4-2: Titertest des anti-156D Serums**

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde die Verdünnung der Seren bei 1:50 gewählt, denn diese ermöglichte eine vollständige Immobilisierung der Zellen innerhalb einer halben bzw. ganzen Stunde.

#### 4.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen

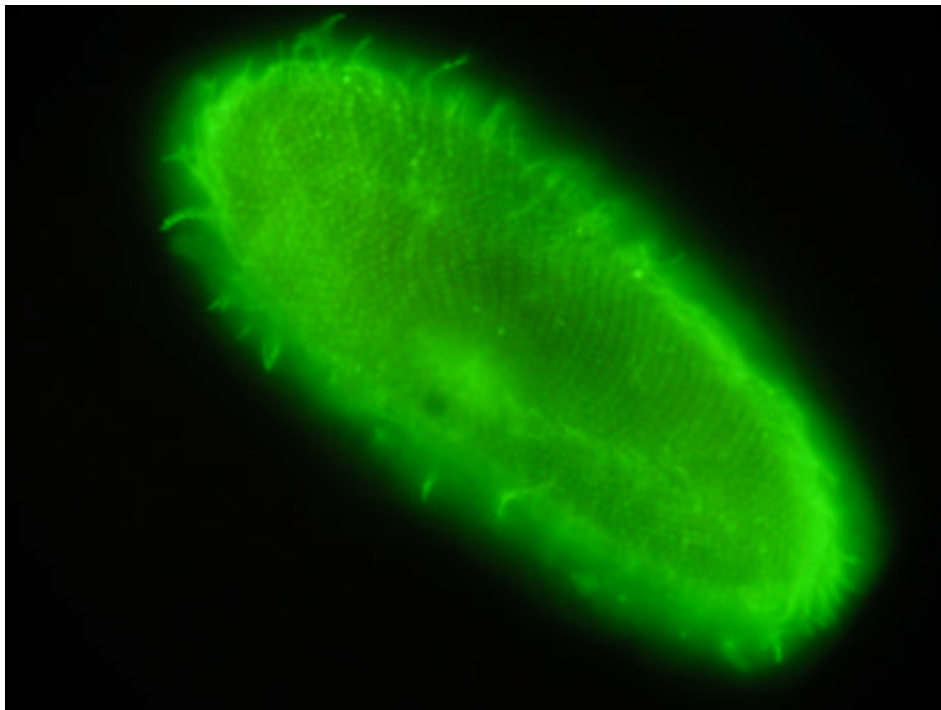
Ein weiterer, auf dem Prinzip der Immunologie beruhender Nachweis für Oberflächenantigene von *Paramecium* stellt die Immunfluoreszenzmarkierung dar. Hierbei werden die Oberflächenproteine auf den Cilien und dem Zellcortex durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung im Auflichtfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

In grundlegenden Experimenten wurden zunächst temperaturinduzierte serologisch reine Stammkulturen zur Färbung verwendet.

Abb. 4-3 zeigt eine *Paramecium primaurelia*-Zelle des Stammes 156. Da sie bei Raumtemperatur kultiviert wurde, zeigt sie auf den Cilien und dem Cortex die Ausprägung des Serotyps 156G.

Im Bild lässt sich gut das grüne Fluoreszenzsignal erkennen. Dieses entsteht an den Stellen, an denen die Anbindung des primären Antikörpers an die Epitope des 156G-Oberflächenproteins erfolgt. Das charakteristische grünliche Leuchtsignal rührt von der chromophoren Gruppe, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist.

Deutlich lässt sich eine homogene Verteilung des Fluoreszenzsignals über die gesamte Zelloberfläche beobachten. Sowohl Cilien, als auch Cortex weisen das Fluoreszenzsignal in vergleichbarer Intensität auf. Dies bedeutet, dass alle auf der Membran präsentierten Oberflächenproteine den Serotyp 156G besitzen. Die Zelle kann deshalb als serotyprein bezeichnet werden.

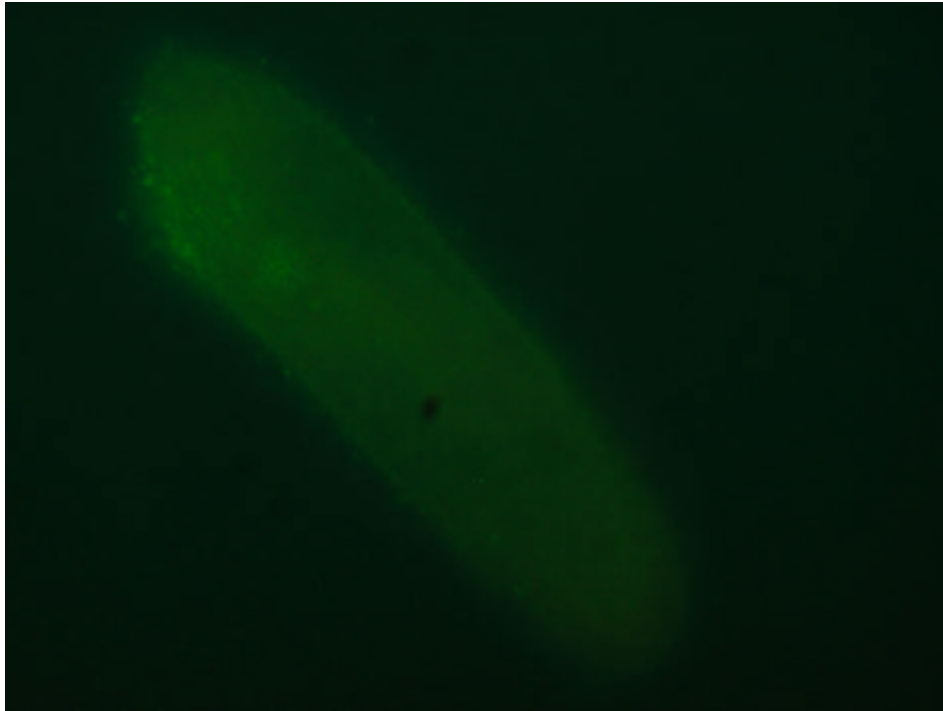


**Abb. 4-3: serotypreine 156G-Zelle durch anti-156G Serum markiert**

Im Gegensatz dazu weisen Zellen des gleichen Stammes, die jedoch das Serotypprotein D (bei 33°C) ausprägen, keine Markierung der Oberflächenproteine auf (Abb. 4-4). Es handelt sich hierbei lediglich um durch Autofluoreszenz verursachtes Leuchten. Die Zelle lässt sich nur durch langes Belichten (4s) sichtbar

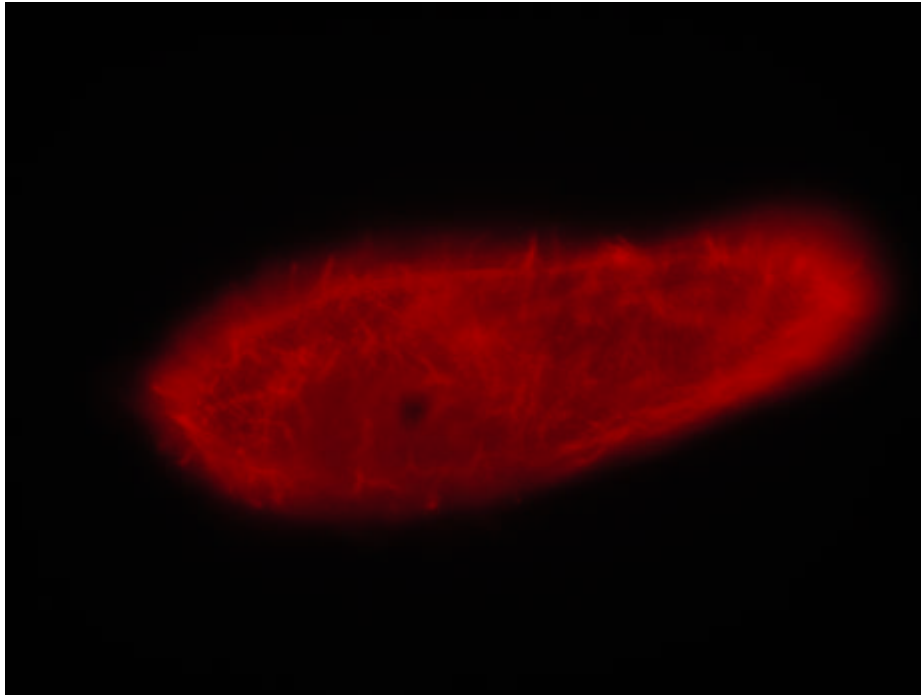


machen. Eine Kreuzreaktion des anti-156G Serums mit dem Oberflächenprotein 156D kann somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 4-4: Markierung einer 156D Zelle mit anti-156G Serum  
(Negativkontrolle)**

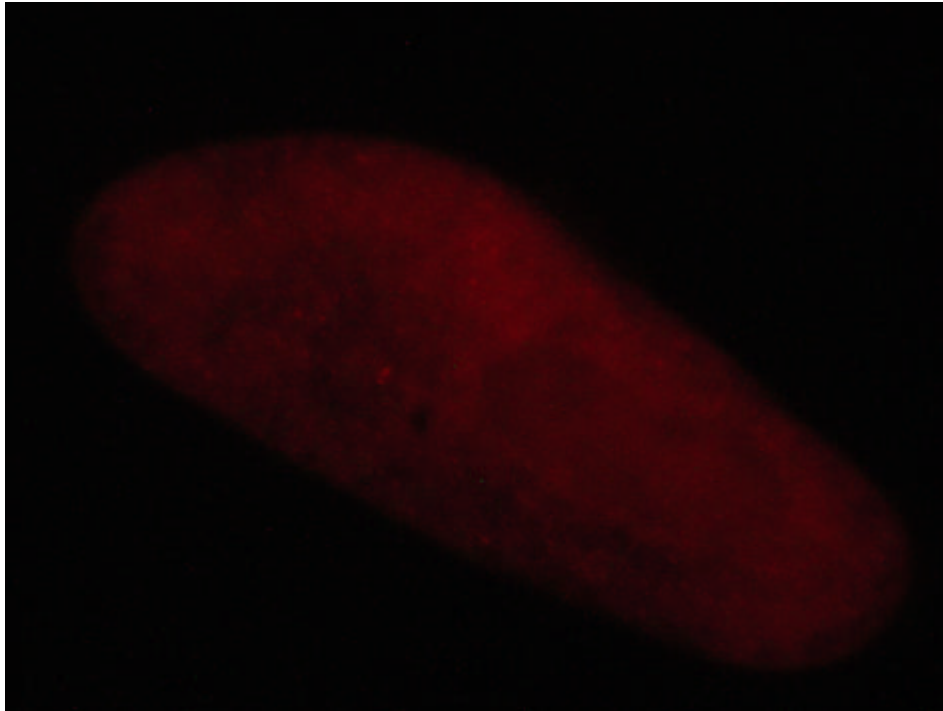
Analog zu diesen Versuchen erfolgte die Markierung von Zellen des Stammes 156, die Serotypprotein D auf der Oberfläche ausprägen, mit anti-156D Serum. Zur besseren Unterscheidung wurden alle Zellen, die den Serotyp D auf der Membran präsentieren mit dem sekundären Antikörper Texas-Red-anti-rabbit IgG gefärbt, was zu einem roten Fluoreszenzsignal führt (Abb. 4-5).



**Abb. 4-5: Immunofluoreszenzmarkierung einer 156D Zelle mit anti-156D Serum**

Auch hier zeigen die Zellen ein deutliches Signal auf dem gesamten Zellcortex und den Cilien. Somit kann auch für diese Markierung angenommen werden, dass es sich um eine Zelle handelt, die das Serotypprotein 156D auf der Membran serotyprein ausprägt.

Kontrollzellen, die Serotypprotein 156G ausprägen zeigen ebenfalls keine rote Fluoreszenz im Mikroskop (Abb. 4-6). Wie in den vorgegangenen Immobilisierungsversuchen kann man davon ausgehen, dass bei beiden Seren keine Kreuzreaktionen auftreten, weswegen die Methode der Immunofluoreszenzmarkierung als eindeutige Technik zur Serotypidentifizierung verwendet werden kann.



**Abb. 4-6: Markierung einer 156G Zelle mit anti-156D Serum (Negativkontrolle)**

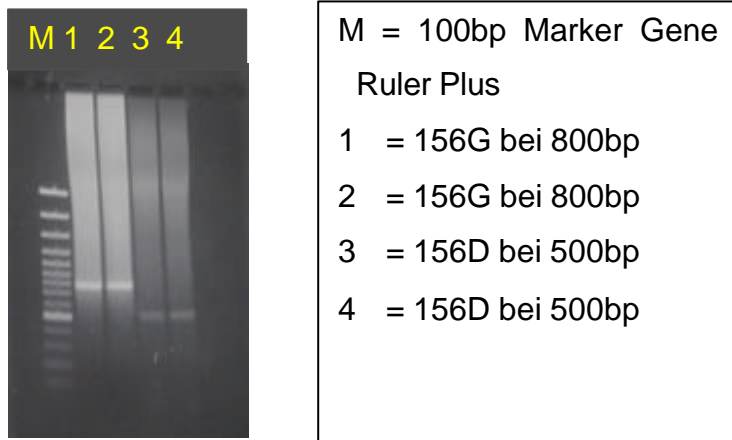
### 4.1.3 RT-PCR

Im Gegensatz zu den immunologischen Methoden wird bei der RT-PCR der Versuch unternommen, die Genexpression auf der Ebene der Translation nachzuweisen. Hierbei werden aus isolierter mRNA, die durch enzymatische Reaktion in eine cDNA umgewandelt wurde, gezielt spezifische Fragmente aus Oberflächenproteingenen amplifiziert. Diese dienen dann als Hinweis darauf, welchen Serotyp die Zelle im Moment der Zellyse ausprägte.

Zum Nachweis des Gens des Oberflächenproteins 156G wurde ein 800bp langes Stück aus der bekannten Gensequenz ausgewählt. Für das Oberflächenprotein 156D diente zunächst ein 1200bp großer Bereich zur Amplifikation. Für spätere Multiplexexperimente wurde schließlich ein ca. 500bp großes Stück aus dem Gen zum Nachweis der Expression ausgewählt.

Das Gel Abb. 4-7 zeigt in der Gelspur 1 den aufgetragenen 100bp Marker Gene Ruler Plus der Firma MWG. Die weiteren Gelspuren zeigen das RT-PCR Produkt das sich durch Amplifikation des Ausgewählten Bereiches durch den Einsatz von 156G-Zellen (Spur 1 und 2) ergibt. Daneben sieht man das RT-PCR-Produkt, das sich durch die Verwendung von 156D Zellen in der RT-PCR ergibt (Spur 3 und 4). Die

beiden Banden bei 800bp zeigen die Expression des Serotypproteins G, die Banden in Line 3 und 4 weisen die Ausprägung des Serotypproteins 156D nach.



**Abb. 4-7: Gelbild mit diagnostischen Banden aus der RT-PCR**

Auffallend ist bei Gelbildern, mit denen RT-PCR Produkte dokumentiert werden ein unspezifischer „Grundschiemer“. Dieser variiert zum Teil sehr erheblich und ist erklärbar durch unspezifische cDNA und mRNA-Verunreinigungen, die sich im aufgetragenen PCR Produkt befinden. Je nach Fütterungszustand variiert diese Hintergrundfärbung in ihrer Intensität. Da diese Verunreinigungen wenig Auswirkung auf das Ergebnis der RT-PCR haben und zudem bei jeder durchgeführten Reaktion auftreten, ist dies wohl methodisch bedingt.

## **4.2 Experimente zur Serotyptransformation**

In den folgenden Untersuchungen wurden verschiedene Umweltfaktoren auf ihre serotyptransformierende Wirkung getestet, sowie Experimente zum temperaturinduzierten Serotypwechsel genauestens beobachtet.

### **4.2.1 Ablauf eines temperaturinduzierten Serotypwechsels**

Schon 1989 veröffentlichte Capdeville einen Artikel, in dem sie einen temperaturabhängigen Serotypwechsel anhand von Immunfluoreszenzmarkierungen an Stamm 156 zeigte und das Auftreten des neuen Proteins mittels Immuno-Gold Labeling dokumentierte (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen orientieren sich an denen von Capdeville vorgestellten Ergebnissen. Sie ergänzen ihre Untersuchungen jedoch um RT-PCR Experimente, was erstmalig neben der Beobachtung der Vorgänge auf der Zelloberfläche, nun auch Einblicke in die vorhergeschaltete Gentranskription erlaubt.

Untersucht wurden sowohl der temperaturinduzierte Serotypwechsel von 156G nach 156D als auch der umgekehrte „shift“.

#### Der Serotypwechsel von 156G nach 156D:

Die Serotyptransformation von Serotypprotein 156G nach 156D wird durch einen schnellen Temperaturwechsel induziert. Dabei hatte es sich in Experimenten von Capdeville bewährt, die Zellen über Nacht bei 4°C zu inkubieren, bevor sie dann auf 33°C kultiviert werden. Der durch die hohe Temperaturdifferenz ausgelöste Temperaturschock führt bei den Zellen zu einer besonders schnellen Umstellung des Oberflächenproteins. Der Zeitpunkt 0 der Experimente markiert hierbei der Punkt, an dem die Zellen erstmalig der hohen Temperatur (33°C) ausgesetzt werden.

Die Zellen wurden hierbei sowohl hinsichtlich des ausgeprägten Serotyps auf der Oberfläche, durch die Methode der Immunfluoreszenzmarkierung, als auch in ihrer Expression der korrespondierenden Gene, mit Hilfe der RT-PCR, untersucht.

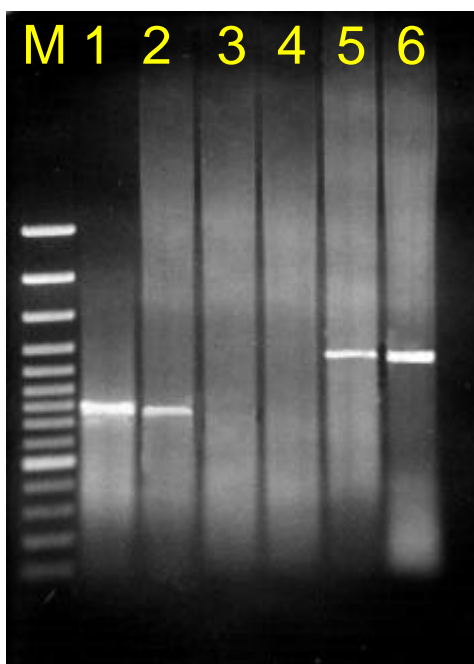
Hierbei ergaben sich folgende Resultate:

Da es sich bei einer Serotyptransformation um eine de Novo Synthese eines Proteins handelt, findet zuerst ein Wechsel in der Expression des Oberflächen-

proteins auf Ebene der Translation statt. Erst zu einem viel späteren Zeitpunkt lässt sich das neue Protein auf der Zellmembran nachweisen. Im Falle des Wechsels von 156G nach 156D kann hierbei beobachtet werden, dass zwischen dem ersten Auftauchen des „neuen“ Proteins auf der Zelloberfläche und dem Nachweis der neu gebildeten, korrespondierenden mRNA große zeitliche Differenzen liegen. Diese variieren von Zelle zu Zelle etwas und scheinen abhängig vom jeweiligen physiologischen Zustand und Zellzyklus zu sein.

So lässt sich für die Expression von 156D die neue mRNA, die für das Serotypprotein 156D codiert, 45h nach der Serotypinduktion, d.h. nach der Temperaturumstellung von 4°C auf 33°C, nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch noch ein Expressionssignal für das alte Protein 156G vorhanden. Die Zelle befindet sich während einer Serotyptransformation im Stadium einer Koexpression (Abb. 4-8). Dies wird in der Literatur auch von Capdeville beschrieben.

Erst drei Stunden später stoppt die Bildung der ursprünglichen Serotypprotein mRNA. Statt dessen wird nur noch die mRNA für das neue Protein 156D produziert.



M: Marker DNA-Ladder Plus (MBI)  
1 : 800bp Bande für 156G (42h)  
2 : 800bp Bande für 156G (45h)  
3 : keine Bande für 156G (48h)  
4 : keine Bande für 156D (42h)  
5 : 1200bp Bande für 156D (45h)  
6 : 1200bp Bande für 156D (48h)

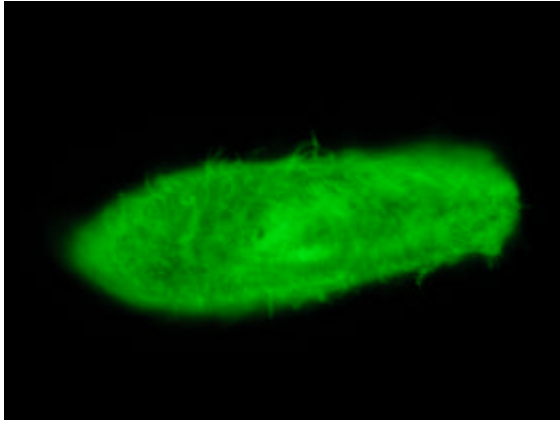
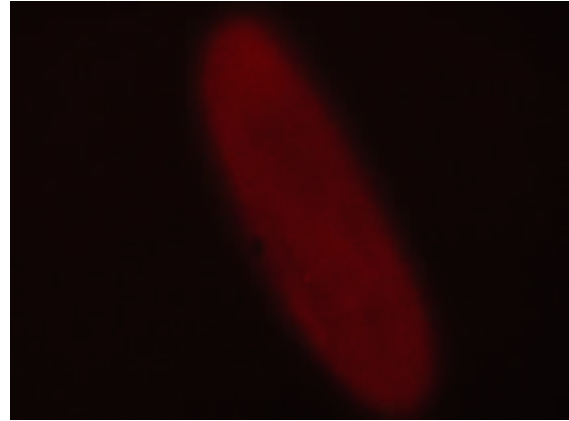
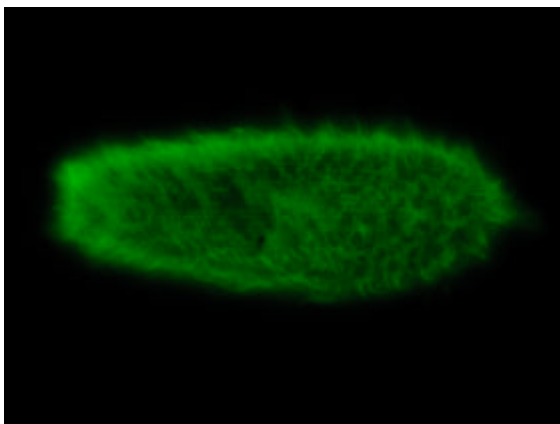
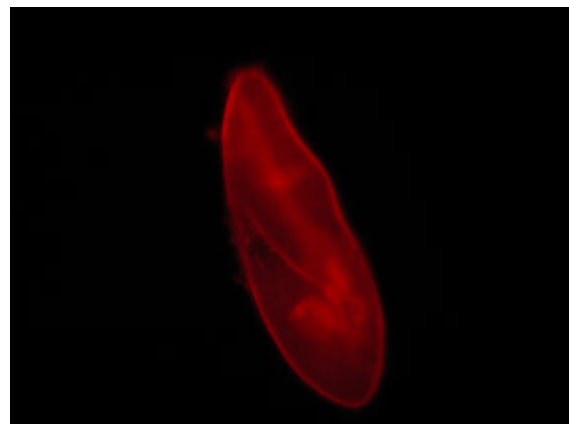
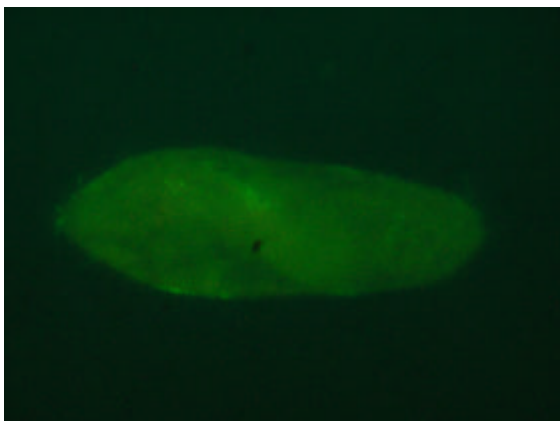
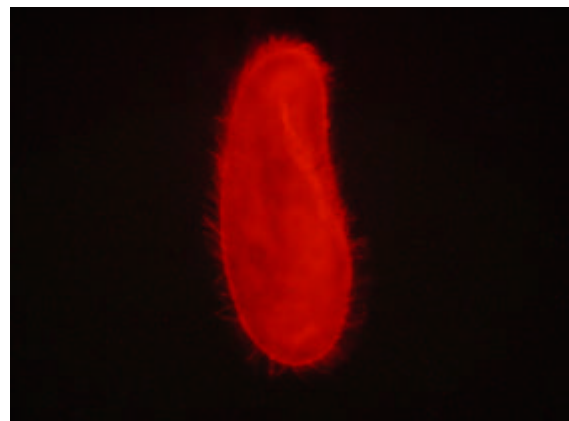
**Abb. 4-8: RT-PCR Gel für die Serotyptransformation von 156G ® 156D**

Betrachtet man dahingegen die Situation auf der Membranoberfläche der *Paramecium*-Zellen, so findet man 46h nach Zeitpunkt 0 des Experimentes zunächst nur Proteine des alten Serotyps 156G (Abb. 4-9, Abb. 4-12). Erst 72 Stunden nach der Induktion des neuen Serotyps lässt sich das neue Protein 156D auf der

*Paramecium*-Oberfläche nachweisen (Abb. 4-13). Ein kompletter Wechsel des Serotyps hat bis dahin jedoch noch nicht stattgefunden. Es befinden sich immer noch die Proteinmoleküle des alten Serotyps 156G auf der Membran (vgl. Abb. 4-10), die erst langsam von der GPI-abhängigen Phospholipase C am GPI-Anker abgespalten werden. Der Prozess der vollständigen Eliminierung des ursprünglichen Proteins endet erst 96h nach Versuchsbeginn. Erst zu diesem Zeitpunkt bedecken die neu induzierten Proteinmoleküle 156D vollständig die gesamte Zellemban (Abb. 4-14). Eine Koexpression ist für den Vorgang der Serotyptransformation zeitlich begrenzt und endet, wenn die Zelle alle „alten“ Serotypproteine von der Membran eliminiert hat.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 4-9 – Abb. 4-14) verdeutlichen den zeitlichen Ablauf eines temperaturinduzierten Wechsels von 156G nach 156D.

Zur besseren Veranschaulichung wurden zur Darstellung des neuen Proteintyps Texas Rot als chromophore Gruppe des sekundären Antikörpers gewählt. Alle Signale des Oberflächenproteins 156D erscheinen deshalb rot, wohingegen Markierungen der Moleküle von Serotypprotein 156G mit einem fluoresceingekoppelten sekundären Antikörper durchgeführt wurde, was in einer Grünfärbung der korrespondierenden Signale resultierte.

**Abb. 4-9: 156G Mark. nach 48h****Abb. 4-12: 156D Mark. nach 48h****Abb. 4-10: 156G Mark. nach 72h****Abb. 4-13: 156D Mark. nach 72h****Abb. 4-11: 156G Mark. nach 96h****Abb. 4-14: 156D Mark. nach 96h**

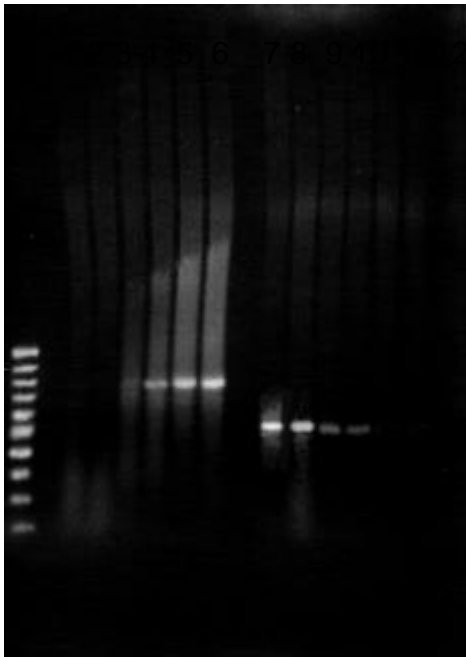
Deutlich erkennt man in den Abbildungen Abb. 4-9 – Abb. 4-11 eine Abnahme der grünen Fluoreszenzsignale mit der Zeit. Besonders deutlich ist das zum Zeitpunkt 96h nach der Temperaturumstellung, wohingegen das neue Oberflächenprotein 156D erstmalig bei 72h auftaucht (Abb. 4-13). Nach 96h ist die Serotyptransformation vollkommen abgeschlossen, auf der gesamten Membranfläche lässt sich nur noch



das Serotypprotein 156D (rotes Fluoreszenzsignal) nachweisen, während das Serotypprotein 156G gänzlich von der Oberfläche eliminiert wurde.

### Der Serotypwechsel von 156D nach 156G:

Senkt man dahingegen die Kultivierungstemperatur von 33°C zur Raumtemperatur, reagieren die *Paramecium*-Zellen wiederum mit einem Wechsel des Oberflächenproteins, diesmal jedoch von 156D nach 156G. Dieser „Shift“ verläuft prinzipiell analog zu der oben beschriebenen Reaktion, d.h. vor dem eigentlichen Nachweis der Proteine auf der Membran lässt sich die entsprechende mRNA für das neu induzierte Immobilisierungsantigen schon zeigen. Im Unterschied zu der zuvor beschriebenen Reaktion, vollzieht sich der Wechsel von 156D nach 156G jedoch wesentlich schneller. So beginnt bereits 8h nach dem Senken der Umgebungstemperatur die Produktion der mRNA für das Protein 156G. Zu diesem Zeitpunkt wird jedoch noch das alte Oberflächenprotein 156D produziert. Auch hierbei lässt sich wiederum eine Koexistenz beider Oberflächenantigen mRNA beobachten (siehe Abb. 4-15). Schon nach zwölf Stunden wird das alte Protein jedoch nicht mehr exprimiert. Damit verläuft diese Reaktion mehr als dreimal so schnell wie der konträre Wechsel. Abbildung Abb. 4-15 zeigt den genauen zeitlichen Ablauf des temperaturinduzierten Serotypwechsels von Oberflächenprotein 156D nach 156G auf Translationsebene.



- M : Marker 100bp-ladder (Promega)
- 1 : keine Bande für 156G (0h)
- 2 : keine Bande für 156G (4h)
- 3 : keine Bande für 156G (6h)
- 4 : 800bp Bande für 156G (8h)
- 5 : 800bp Bande für 156G (12h)
- 6 : 800bp Bande für 156G (24h)
- 7 : 500bp Bande für 156D (0h)
- 8 : 500bp Bande für 156D (4h)
- 9 : 500bp Bande für 156D (6h)
- 10 : 500bp Bande für 156D (8h)
- 11 : keine Bande für 156D (12h)
- 12 : keine Bande für 156D (24h)

**Abb. 4-15: RT-PCR Gel für die Serotyptransformation von 156D ® 156G**

Ebenso schnell wird das neu synthetisierte Protein 156G auf der Membranoberfläche der Zellen präsentiert. Hier kann man schon 48h nach der Temperaturumstellung einen neuen Serotyp beobachten Abb. 4-17. Ebenso hat die Ausprägung des „alten“ Oberflächenproteins bereits nach 24h merklich nachgelassen. Nach 48h lässt sich das „alte“ Protein 156D nicht mehr auf der Oberfläche durch Immunofluoreszenzmarkierung nachweisen. Der genaue Ablauf des induzierten Wechsel lässt sich anhand der Abbildungen Abb. 4-16 – Abb. 4-21 nachvollziehen, wobei hier zur Visualisierung der Oberflächenproteine die analogen chromophoren Gruppen am sekundären Antikörper gewählt wurden.

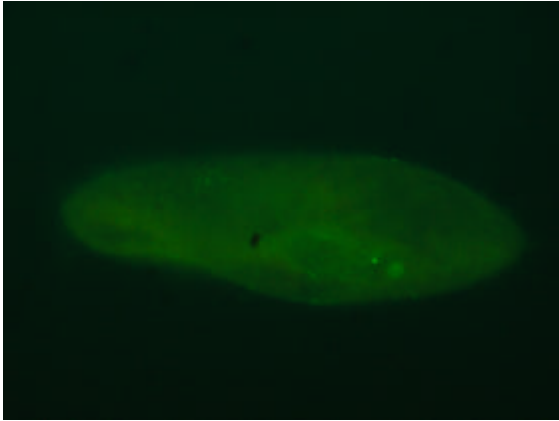


Abb. 4-16: 156G Mark. nach 6h

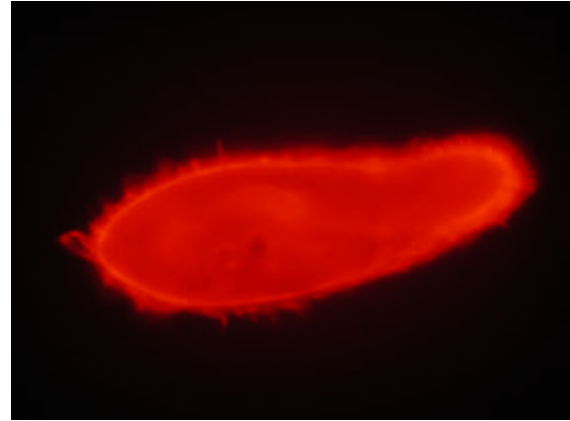


Abb. 4-19: 156D Mark. nach 6h



Abb. 4-17: 156G Mark. nach 24h

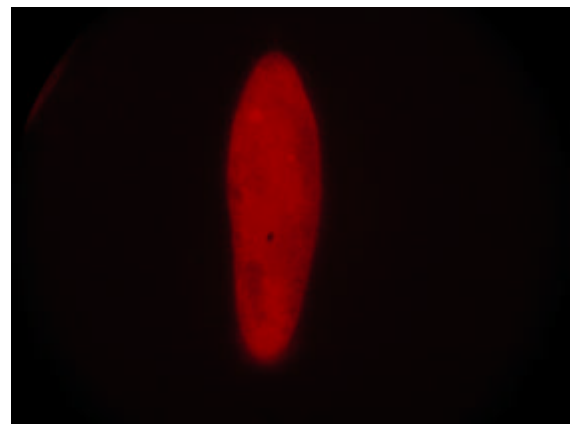


Abb. 4-20: 156D Mark. nach 24h

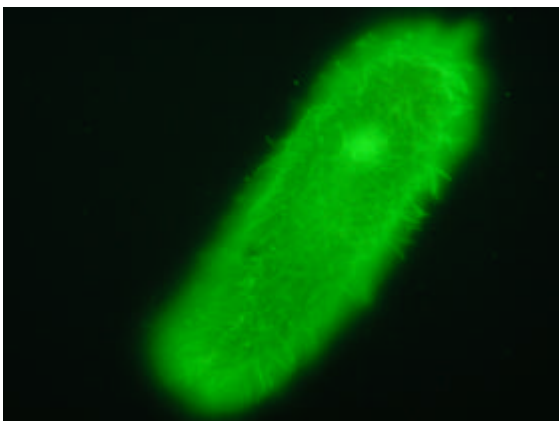


Abb. 4-18: 156G Mark. nach 48h

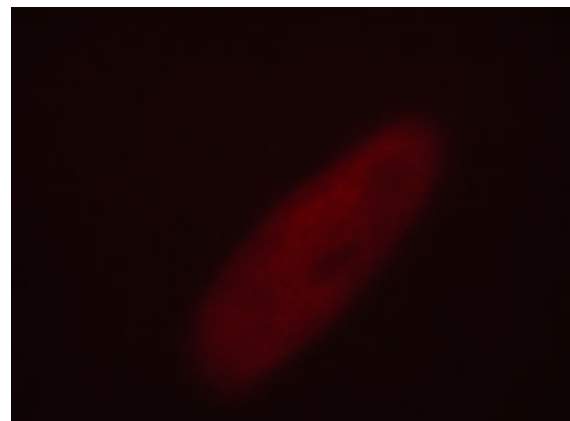
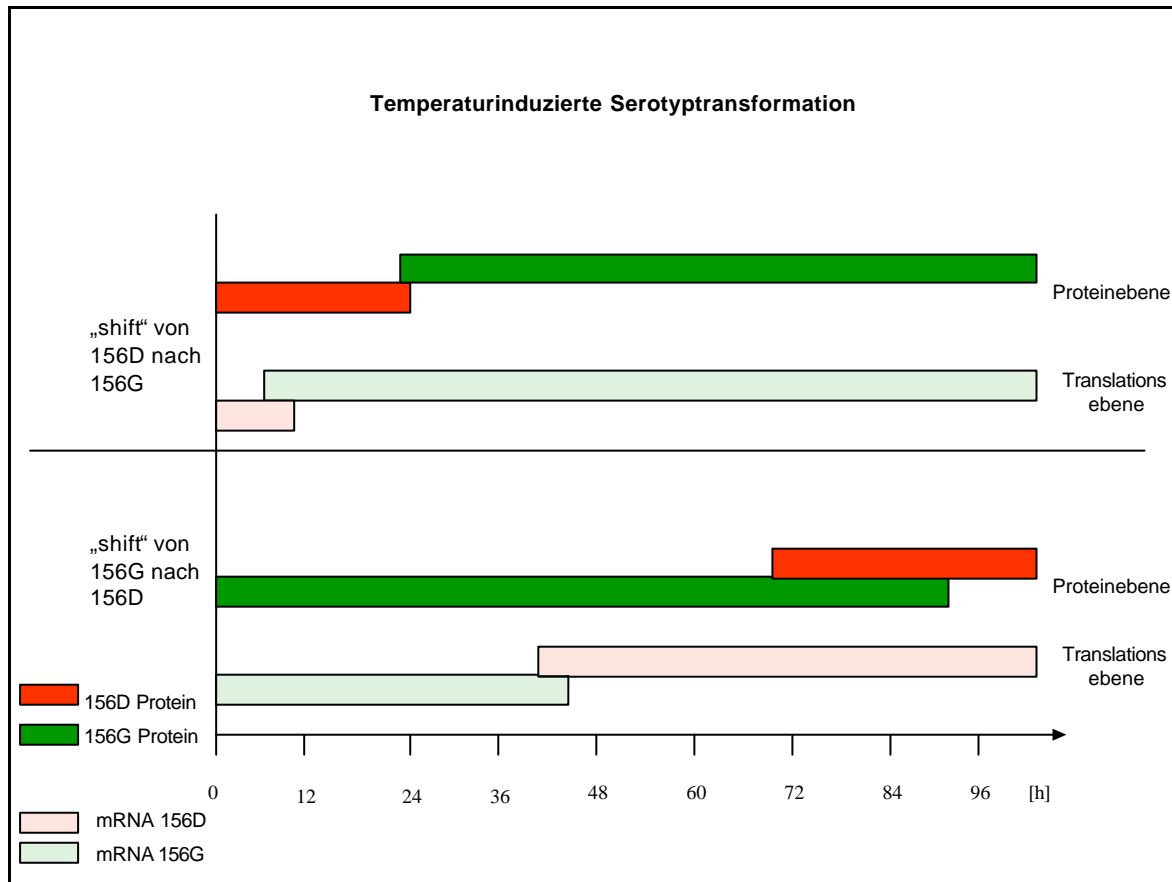


Abb. 4-21: 156D Mark. nach 48h

Auch hier lässt sich analog zu den Ergebnissen der RT-PCR Versuche ein schnellerer Ablauf des Wechsels zum Oberflächenprotein 156G beobachten. Bis das alte Protein 156D vollständig von der Oberfläche durch die PLC eliminiert ist, findet eine

Koexpression statt. Schon 48h nach der Temperaturumstellung wurde die Serotyptransformation komplett von den Zellen durchlaufen.

Das folgende Schema gibt die zeitlichen Zusammenhänge zwischen mRNA Produktion und Proteinpräsentation während temperaturinduzierten Serotypwechsels im Überblick wieder.



**Abb. 4-22: Zeitlicher Ablauf bei temperaturinduzierter Serotyptransformation**

### **4.2.2 Induzierter Serotypwechsel durch Hunger**

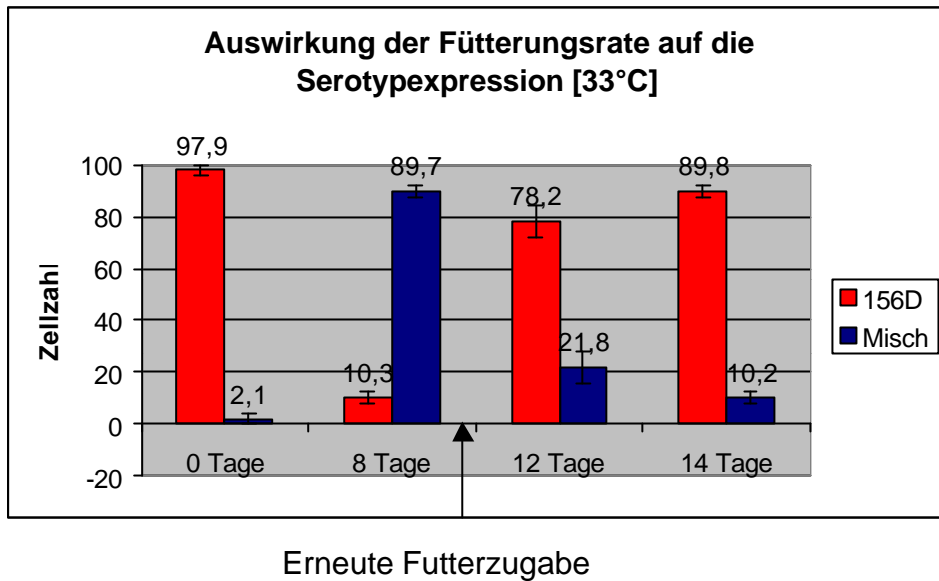
Neben dem serotyptransformierenden Faktor der Temperatur wurden noch andere Umweltreize getestet, die einen Serotypwechsel zur Folge haben können. So zeigte sich im Laufe der Experimente ein weiterer, transformationswirksamer Faktor, der wesentlich auf die Ausprägung des Oberflächenproteinmantels Einfluss nimmt.

Je nach Fütterungszustand der Zellen bildeten die Kulturen unabhängig von der Kultivierungstemperatur gleichzeitig verschiedene Serotypen aus.

So konnte bei serotypreinen 156D Zellen durch Einstellen der Futtergabe ein starker Abfall der Anzahl 156D Zellen festgestellt werden, obwohl keine Änderung der Kultivierungstemperatur erfolgte. Statt dessen stieg die Zahl der Zellen, die sich weder eindeutig durch das anti-156D Serum, noch durch anti-156G Serum immobilisieren ließen, an. Nur die Kombination beider Seren (anti-156D und anti-156G) führte zu einer Immobilisierung aller Zellen, weshalb auf das Vorhandensein von coexpressiven Zellen geschlossen werden kann.

Schon während eines achttägigen Hungerns der Kulturen fällt die Anzahl der 156D Zellen auf 10%, während der Anteil der Mischzellen auf nahezu 90% ansteigt (Abb. 4-23). Füttert man zu diesem Zeitpunkt jedoch wieder die Kulturen, verschiebt sich das Verhältnis von Zellen, die 156D ausprägen, und den mutmaßlichen Mischzellen zum ursprünglichen Wert (14 Tage).

Folgender Graph veranschaulicht den Einfluss von geringem Nahrungsangebot auf die Ausprägung des Serotyps bei *Paramecium primaurelia* Stamm 156.



**Abb. 4-23: Auswirkung des Nahrungsangebots auf die Serotypexpression**

Ganz anders verhalten sich Kulturen, die bei Raumtemperatur gehalten wurden und somit den Serotyp 156G ausprägen. Diese konnten selbst durch vierwöchiges Hungern nicht zu einem Serotypwechsel bewegt werden, sondern prägten vielmehr den 156G Proteintyp unbeeinflusst von der Fütterungsrate aus.

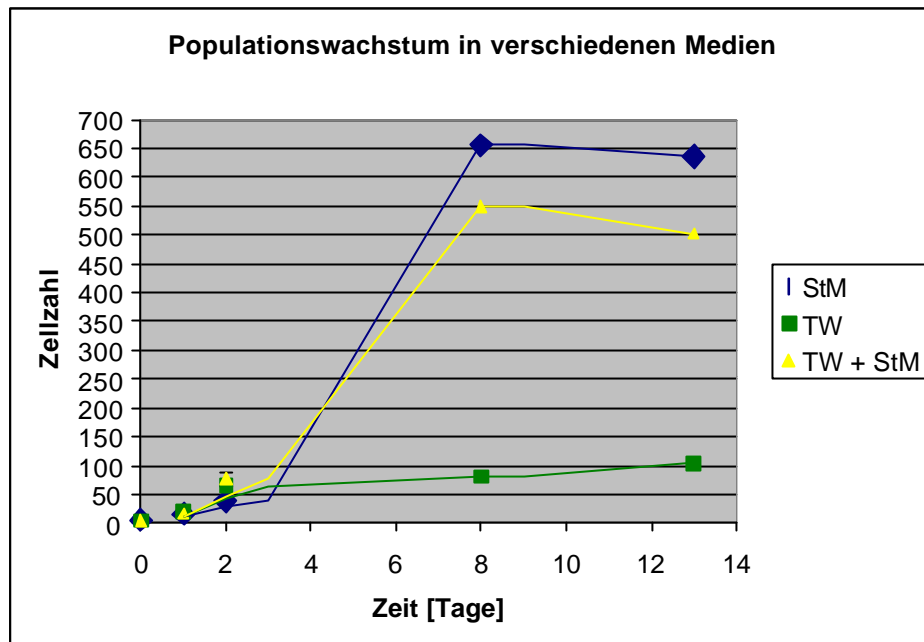
#### 4.2.3 Serotyptransformation durch pH-Wert-Veränderung

Als weitere serotyptransformierend wirksame Faktoren wurden der pH-Wert und das verwendete Kulturmedium experimentell untersucht. Hierbei schien die Frage interessant, wie die Zellantwort der Paramecien durch die bifaktorielle Einwirkung von Medium und Teichwasser gestaltet ist. Auf die Einbeziehung eines dritten Parameters (Temperatur) wurde zugunsten weniger untersuchter Umweltreize verzichtet, weshalb alle Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

##### Versuch1:

Untersucht wurden Wachstumsrate und die Ausprägung des Serotyps von *P. primaurelia*- Zellen bei Verwendung der Kulturmedien Strohmedium, Teichwasser, Teichwasser + Strohmedium. Als Ausgangskonzentration wurden je 5 Zellen/ml im Experiment eingesetzt. Die Fütterung erfolgte jeden zweiten Tag mit frischer Bakterienlösung.

Die Wachstumsrate verhält sich folgendermaßen:



**Abb. 4-24: Auswirkung verschiedener Medien auf die Populationsgröße**

Alle Versuche wurden mit einer Zellzahl von 5/ml Medium gestartet.

Ein exponentielles Populationswachstum fand vor allem im verwendeten Strohmedium (StM) und in der Kombination von Strohmedium und Teichwasser (TW+ StM) statt, wobei bei beiden nach einer maximalen Zellzahl nach 8 Tagen die Zelldichte leicht sinkt. Die alleinige Verwendung von Teichwasser wirkte auf die Zellen weniger wachstumsfördernd, was darauf schließen lässt, dass im Teichwasser wichtige Nahrungsstoffe fehlen, die sich während des Kochens anderer Medien aus dem Stroh herauslösen lassen.

Eine Untersuchung der chemischen Parameter der beiden extrem unterschiedlichen Medien Teichwasser und Strohmedium, zeigt folgende Parameter (Tab. 4-1). Die chemischen Wasseranalysen beruhen auf spektrometrische Verfahren im Rundküvettestest.

Parameter	Teichwasser	Strohmedium	Richtwert für Fischereigewässer
<b>Ges. Phosphat</b>	1,42	1,31	0,03
<b>ortho -Phosphat</b>	0,184	6,07	
<b>Ges. Stickstoff</b>	< 1	3,89	
<b>Ammonium</b>	0,403	0,079	0,04
<b>Nitrit</b>	n.w.	0,078	0,03
<b>Nitrat</b>	2,21	14,8	
<b>Wasserhärte ges.</b>	7,06	0,5	
<b>Mg</b>	n.w.	n.w.	
<b>pH</b>	8,4	6,4	6-9

**Tab. 4-1: Tabelle der chemischen Parameter für verschiedene Medien**

Die chemische Wasseranalyse zeigt deutliche Unterschiede der beiden Medien. Vor allem die Konzentration von Nitrat, ortho-Phosphat (= gelöstes Phosphat) und des Gesamtstickstoffes ist im Strohmedium erhöht.

Weiterhin unterscheiden sich die beiden Medien in Wasserhärte und pH-Wert. Der erhöhte Gehalt an Nährstoffen im Strohmedium erklärt somit die Tatsache, dass die Paramecienzahl exponentiell zunimmt, während sie im Teichwasser nur geringfügig steigt. Der erhöhte Verfügbarkeit an Nährstoffen führt zur einer höheren Bakteriendichte, die wiederum die Nahrungsgrundlage der Paramecien darstellt (s. Diskussion).

Ein Vergleich der wichtigsten ermittelten Parameter mit den Richtwerten für Fischereigewässer zeigt jedoch, dass die Konzentrationen von Nährstoffen (Phosphat und Stickstoff) selbst im verwendeten Teichwasser stark erhöht sind, weshalb man hierbei von einem eutrophierten Gewässer der Güteklasse II sprechen kann. Dieses eignet sich somit zwar nicht zur Fischzucht; zur Kultivierung von Paramecien, die in der litoralen Zone von oligosaprobien Gewässern leben, ist es jedoch ausreichend. Lediglich der pH-Wert, der im Teichwasser um 8,4 liegt, ist für die Kultivierung für *Paramecium* nur suboptimal geeignet. Der beste pH-Wert für Ciliaten liegt im neutralen Bereich (pH7).

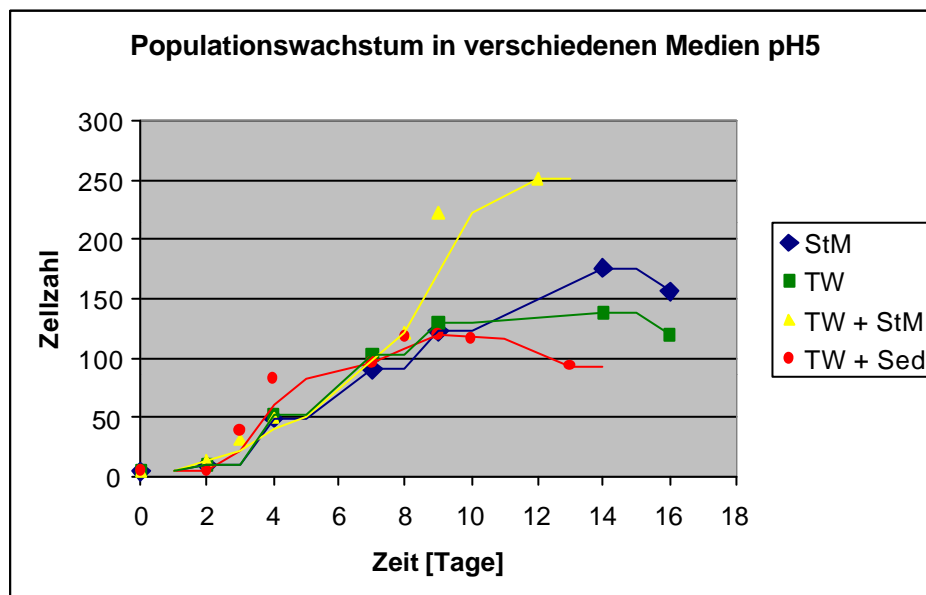
Neben der wachstumsfördernden Wirkung der Medien wurde nun ihr Einfluss auf die Ausprägung des Serotyps untersucht. Hierbei fanden sich interessanterweise unterschiedliche und unerwartete Ergebnisse.



Versuch 2:

Nun wurden bei unterschiedlicher Protonenkonzentrationen (pH5, pH6, pH7, pH8 und pH9) das Populationswachstum in verschiedenen Medien (Strohmedium, Teichwasser, Teichwasser + Strohmedium, Teichwasser + Sediment) untersucht. Zur besseren Veranschaulichung der punktuell erhaltenen Daten wurden den errechneten Mittelwerten eine Trendlinie hinzugefügt, die den gleitenden Durchschnitt durch die Messwerte darstellt. Es wurden bei jeder Überprüfung der Zelldichte auch ein Test des Serotyps durch homologes Kaninchenantiserum durchgeführt. Zusätzlich wurden nach 14 Tagen Einzelzellen entnommen, die in RT-PCR Experimenten auf ihre Serotypexpression überprüft wurden.

Allgemein kann festgestellt werden, dass nach einem anfänglichen, mehr oder weniger starkem Wachstum, meist nach 10-14 Tagen ein Maximum in der Zelldichte erfolgt und danach ein leichter Abfall, bzw. eine Stagnation der Wachstumskurve verzeichnet werden kann.

PH5:

**Abb. 4-25: Populationswachstum bei pH5 in verschiedenen Medien**

Der pH-Wert 5 zeichnet sich hierbei nur durch einen geringen Zellzuwachs aus (Abb. 4-25). Ein Maximum von ca. 250 Zellen/ml wird nur im Strohmedium erreicht, während die Zellen, die in den anderen Medien kultiviert wurden, nach 10 - 14 Tagen eine maximale Zellpopulation von nur 100 bis 170 Zellen aufweisen. In serotypolo-

gischen Untersuchungen zeigt sich keine veränderte Situation bei den kultivierten Zellen. Alle Zellen, die in einer RT-PCR zum Nachweis von Oberflächen mRNA unterzogen wurden, zeigen nur diagnostische Banden von 156G. Es lassen sich ebenfalls alle Zellen durch homologes 156G Antiserum immobilisieren. Das bedeutet, dass alle untersuchten Zellen dem Serotypprotein 156G angehören.

#### PH6:

Eine andere Situation eröffnet sich bei Untersuchungen der Oberflächenproteinausprägung bei Zellen, die bei pH6 gehalten wurden. Zellen, die in der Kombination Teichwasser/Strohmedium (TW + StM) kultiviert wurden, oder ausschließlich im Strohmedium, präsentierten einen abweichenden Serotyp auf der Membran, während die beiden anderen Medien keinen Serotypwechsel zu induzieren schienen. Auch die Wachstumsraten unterscheiden sich von denen der Versuchsreihe zu pH5. Drei Tage nach Versuchsbeginn steigen die Zellzahlen im Strohmedium bei pH-Wert 6 exponentiell an (mehr als 650 Zellen/ml nach 8 Tagen). Alle Zellen der übrigen Medien verhalten sich ähnlich wie in den Versuchen zu pH5. Ein Zellwachstum konnte nur bis etwa 250 Zellen/ml beobachtet werden.

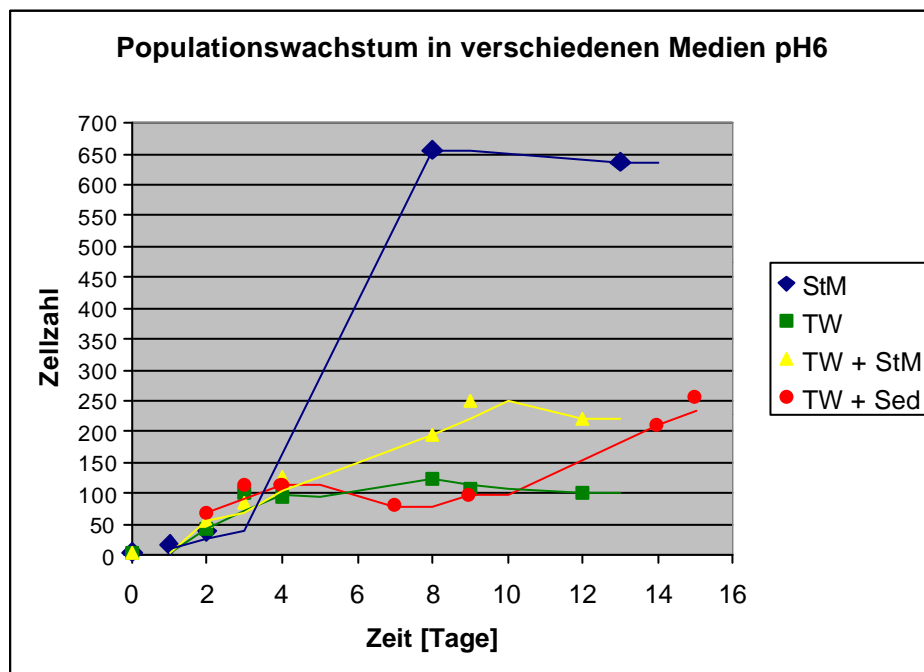
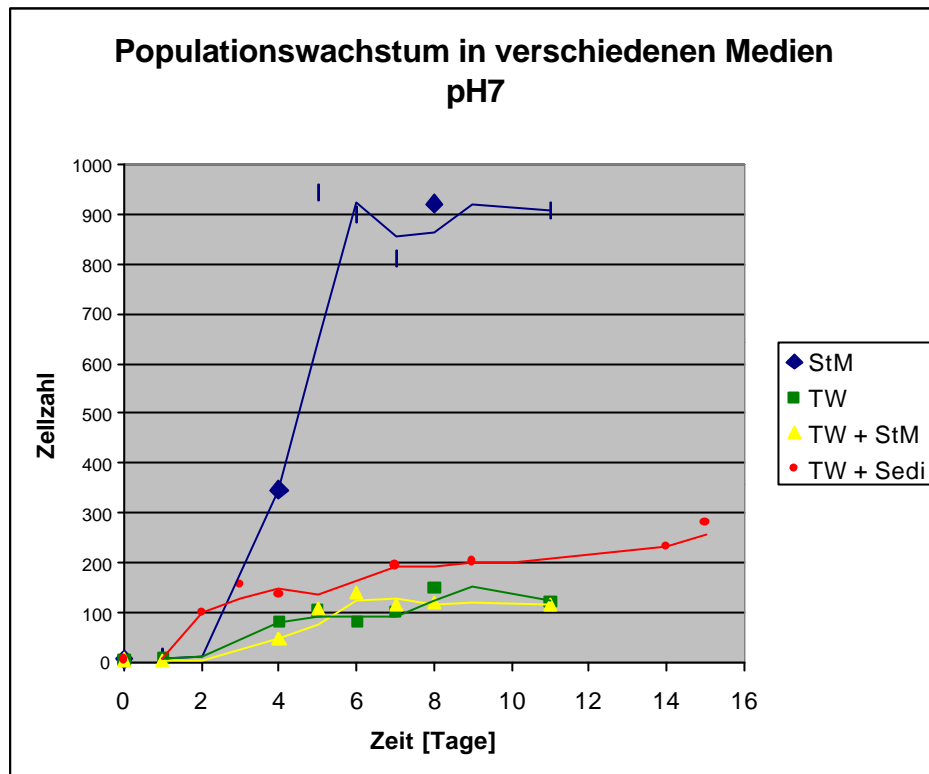


Abb. 4-26: Populationsentwicklung in verschiedenen Medien bei pH6

PH 7:**Abb. 4-27: Populationsentwicklung bei pH7**

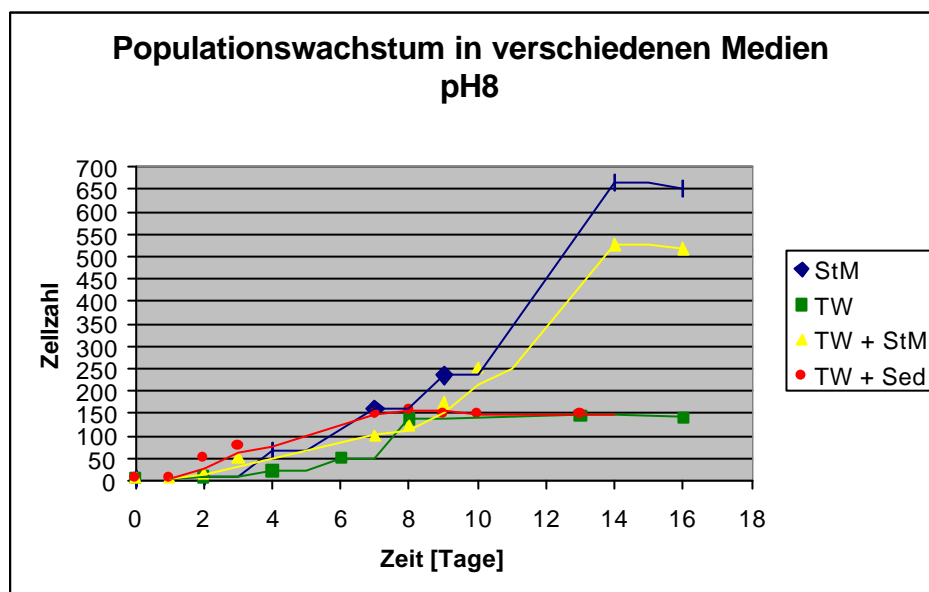
Die im Experiment bei pH7eingesetzten Kulturen verhielten sich in hohem Maß analog zu den Zellen aus den Versuchen zu pH-Stufe6. Während alle anderen Zellen die Populationsdichte von 300 Zellen/ml nicht überschreiten, erreichten die im Strohmedium kultivierten Zellen maximale Dichten von bis zu 950 Zellen/ ml.

Die Kombination von pH7 und Strohmedium scheint für die Kultivierung von *Paramecium primaurelia* ein Optimum darzustellen, da eine solch hohe *Paramecium*-Dichte in keiner weiteren Versuchsreihe registriert werden konnte. Trotz der hohen Zellzahlen und somit scheinbar guten Wachstumsbedingungen konnte für pH7 in keinem der Experimente ein Serotypwechsel nachgewiesen werden. Alle untersuchten Paramecien zeigen sowohl in RT-PCR Experimenten, als auch in Immobilisierungsreaktionen die Serotypausprägung 156G.

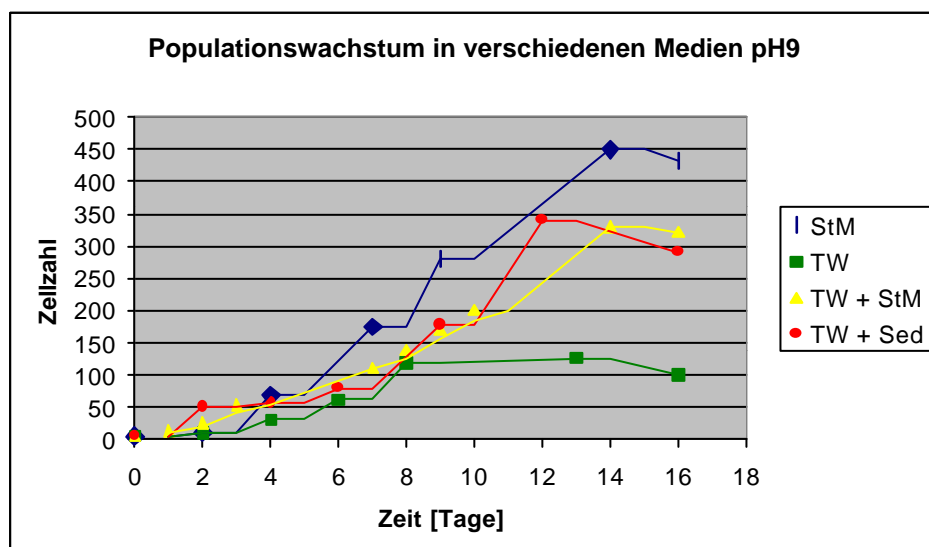
PH8:

Auch unter Kultivierungsbedingungen bei pH8 erweist sich das Strohmedium als das Medium mit dem stärksten Populationszuwachs. Es können Zelldichten von über 650 Zellen/ml nachgewiesen werden. Weiterhin führt eine Kombination von Teichwasser und Strohmedium zu einem hohen *Paramecium*-Zuwachs. Dahingegen erreicht man

durch die Kombination von Teichwasser mit Sediment bzw. die Verwendung von reinem Teichwasser keine starke Vermehrung der Zellzahl bei pH-Wert 8. Außerdem konnte bis auf die Kulturen, die in einer Kombination von Strohmedium und Teichwasser gehalten wurden, in allen anderen Kulturen bei pH8 ein veränderter Serotyp nachgewiesen werden. Es gab Zellen, die sich nicht mehr eindeutig durch 156G Antiserum immobilisieren ließen. Die Annahme, dass es sich hierbei um eine Mischkultur handelt liegt nahe. Zusätzlich werden Zellen gefunden, die die mRNA des Serotypproteins 156D ausprägen.



**Abb. 4-28: Populationsentwicklung bei pH8**

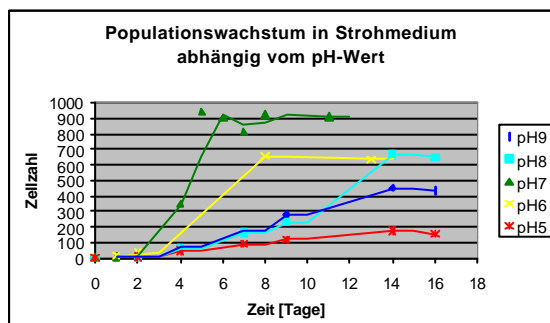


**Abb. 4-29: Populationsentwicklung bei pH9**

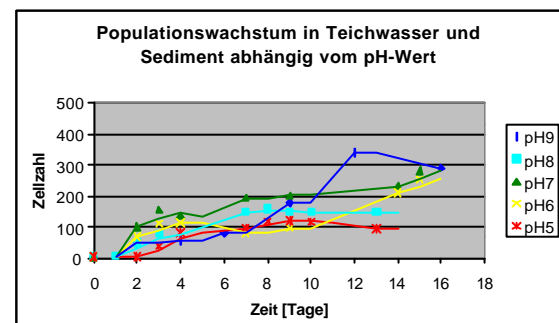
PH9:

Die Verwendung der Medien, die auf pH-Wert 9 eingestellt wurden Abb. 4-29, zeigt wiederum einen starken Zuwachs der Zellen bei Kultivierung in Stroh. Ebenfalls positiv wirkt sich die Kombination von Teichwasser und Strohmedium auf das Zellwachstum aus. Unter Verwendung des Teichwassers mit Sediment, oder nur des Teichwassers, lässt sich dahingegen eine nur geringfügige positive Populationsentwicklung dokumentieren. Analog zu den anderen Versuchsreihen führt das Kultivieren der Zellen in Strohmedium zu einem neuen Serotyp. Wiederum konnten durch Immobilisierungsreaktionen Zellen des Serotyps 156D nachgewiesen werden. Eine Immobilisierung der Zellen mit anti-156G Serum zeigte, dass nur ca.90% der Zellen immobilisieren.

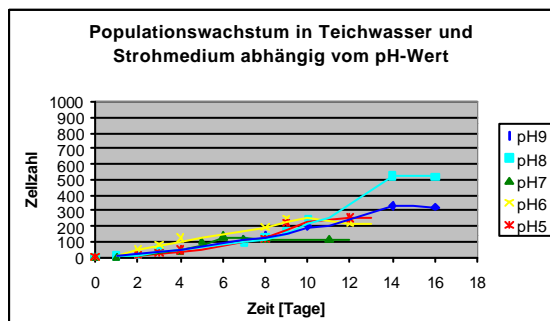
Eine anders geordnete graphische Darstellung der Messdaten verdeutlicht das Populationswachstum in den verwendeten Medien abhängig vom pH-Wert:



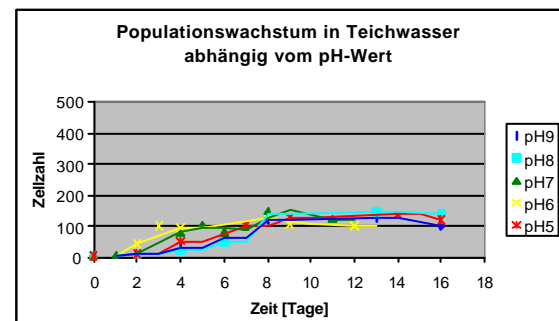
**Abb. 4-30: Populationsentw. in Strohmedium**



**Abb. 4-32: Populationsentw. in Teichwasser/ Sediment**



**Abb. 4-31: Populationsentw. in Teichwasser/Stroh**



**Abb. 4-33: Populationsentw. in Teichwasser**

Im Vergleich aller vier Graphen fällt das erhöhte Zellwachstum im Strohmedium, aber auch in der Kombination Teichwasser/Strohmedium auf. Im Strohmedium erfahren die Zellen bei pH7, pH6 und pH8 ein stark exponentiell gerichtetes Wachstum, während im sauren (pH5) und im alkalischen Bereich (pH9) eine geringere Zelldichte resultiert.

Im Gegensatz dazu führt die Kombination von Teichwasser/Stroh bei pH7 nur zu einem geringen Populationszuwachs. Die höchste Zelldichte lässt sich in diesem Medium bei pH-Wert 8 und 9 nachweisen. Im neutralen bzw. leicht saurem Bereich findet man dagegen nur Zellzahlen zwischen 100 und 250 Zellen/ml.

In den Medien, in denen nur Teichwasser bzw. Teichwasser mit Sediment verwendet wird, liegen die Zellzahlen deutlich niedriger. Dies ist besonders in den Experimenten offensichtlich, in denen nur Teichwasser als Medium verwendet wird. Der Kurvenverlauf der Zelldichte ist nahezu identisch bei allen getesteten Protonenkonzentrationen und erreicht nie Werte über 200 Zellen/ml.

In den Experimenten zur *Paramecium*-Dichte, die mit Teichwasser und Sediment durchgeführt werden zeigt sich als Maximalwert bei pH9 ca. 350 Zellen/ml. Auch die Werte für pH7 liegen nach 14 Tagen bei 300/ml, während wiederum die Zellvermehrung im sauren Bereich bei pH5 gerade mal 100 Zellen/ml erreicht.

### Versuch 3:

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen verwendeten Medien innerhalb einer pH-Stufe, wurde eine neue Versuchsreihe ohne eventuell störende *Paramecium*-Zellen durchgeführt, bei denen eine Veränderung des pH-Wertes mit der Zeit gemessen wurde. Die ermittelten pH-Werte nach 7 Tagen sehen folgendermaßen aus:

	StM	TW	TW + StM	TW + Sed
pH5	5,4	5,8	5,2	5,9
pH6	6,0	7,0	6,1	7,2
pH7	6,9	8,0	6,9	8,3
pH8	7,8	8,2	6,9	8,2
pH9	8,5	8,4	7,3	8,4

**Tab. 4-2: zeitlich abhängige pH-Entwicklung der verwendeten Medien**

Hierbei zeigt sich, dass die pH-Werte teilweise erheblich von den eingesetzten Werten differieren. Das Strohmedium z.B. zeigt innerhalb einer Woche fast keinerlei Schwankungen in der Protonenkonzentration, während dessen insbesondere das Medium, das aus einer Kombination von Teichwasser und Sediment besteht, sowie das Teichwasser einer fortwährenden pH-Wert Veränderung unterliegen (vgl. Tab. 4-2).

Somit scheint die Vermutung nahe, dass Teichwasser Ionen enthält, die eine puffernde Wirkung besitzen. Denkbar ist, dass diese im Laufe der Zeit von den Sandkörnern abgegeben werden, und somit bewirken, dass sich immer wieder der ursprüngliche pH-Wert des Teichwassers (8,4) einstellt.

Die Wirkung eines solchen Puffersystems beeinflusst in den Versuchsreihen ebenso die darin lebenden Organismen, wie in natürlichen Habitaten. Diese Beobachtung kann möglicherweise erklären, weshalb es in den Laborkulturen zur differentiellen Expression von Serotypen kommt.

Zusammenfassend werden hier nochmals alle Ergebnisse zur serotyptransformierenden Wirkung und Populationswachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert und den Kulturmedien in einer Tabelle gegenübergestellt. Das obere schwarze Symbol gibt hierbei die serotypverändernde Wirkung an, während mit dem unteren roten Symbol die Auswirkung auf die Wachstumsrate notiert wird.

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<b>Stroh</b>	-	+	-	+	+
	-	+	++	+	+
<b>TW</b>	-	-	-	+	-
	-	-	-	-	-
<b>TW +Stroh</b>	-	+	-	-	-
	+	+	-	++	+
<b>TW + Sedi.</b>	-	-	-	+	-
	-	+	+	-	+

■ : keine Auswirkungen auf Serotypwechsel    + : begünstigt Serotypwechsel

- : schlechte Populationsvermehrung    + : gutes Populationswachstum

**Tab. 4-3: Tabelle zur Auswirkung von Medium und pH-Wert auf die Serotypexpression**

#### 4.2.4. Serotyptransformation durch Veränderung des Salzgehaltes

Die Veränderung des Salzgehaltes von ca. 1% des Mediums soll Angaben von Beale zufolge bei *P. primaurelia* Stamm 60 einen Serotypwechsel zu dem, von ihm benannten salzabhängigen Serotyp L induzieren (BEALE, 1954).

Da bei Stamm 156 dieser Serotyp bisher nicht in der Literatur beschrieben ist, wurde aufgrund dieser Angaben verschiedene Versuche unternommen bei *Paramecium primaurelia* Stamm 156 ein Serotypprotein L zu induzieren. Dies wäre damit gleichbedeutend mit der Entdeckung eines neuen Serotyps.

In einem ersten Versuch wurden Zellen des Stammes 156, die Serotypprotein G ausprägten in ein neues Kulturmedium überführt, dem additiv 50mM NaCl zugesetzt wurde.



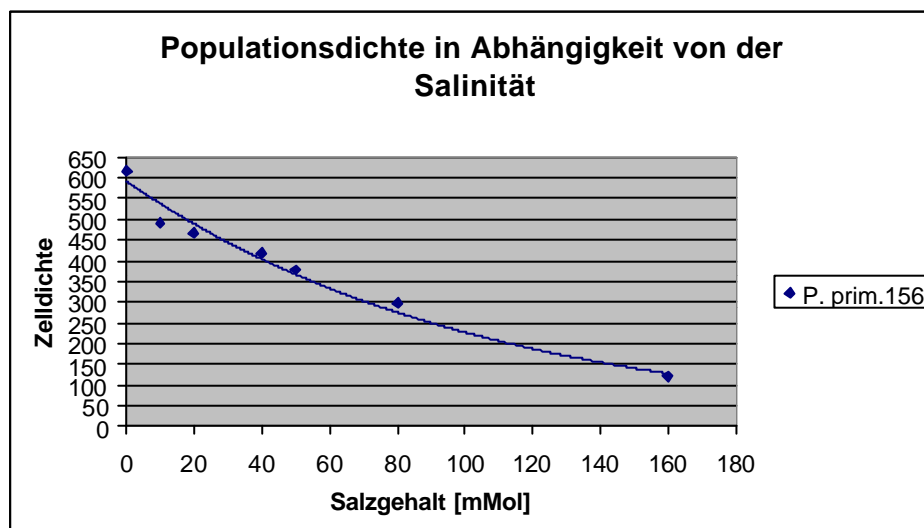
Da nach einem Tag sämtliche Zellen abgestorben waren, stellte sich durch diesen Vorversuch heraus, dass die Zellen nicht direkt mit der erhöhten Salzkonzentration konfrontiert werden können, sondern eine Adaptation an die erhöhte Salinität erforderlich ist.

Im Folgenden wurden die Zellen jeweils eine Woche im Medium belassen und danach in ein Medium mit erhöhter Salzkonzentration [10mMol; 20mMol; 50mMol; 80mMol; 160mMol] überführt.

Aus dieser langsamen Adaptation an die hohe Salzkonzentration, resultierte eine höhere Lebenserwartung der Zellen. Im Gegensatz zu den vorherig durchgeführten Experimenten konnten die Paramecien weiterkultiviert werden.

Nach einer Woche wurden die Zelldichte, sowie der exprimierte Serotyp an der Zelloberfläche durch Immobilisierungsreaktionen ermittelt.

Für die Zelldichte der Kulturen ergab sich folgende Abhängigkeit von der Salinität:



**Abb. 4-34: Populationsveränderung einer 156G-Kultur in Abhängigkeit von der Salinität**

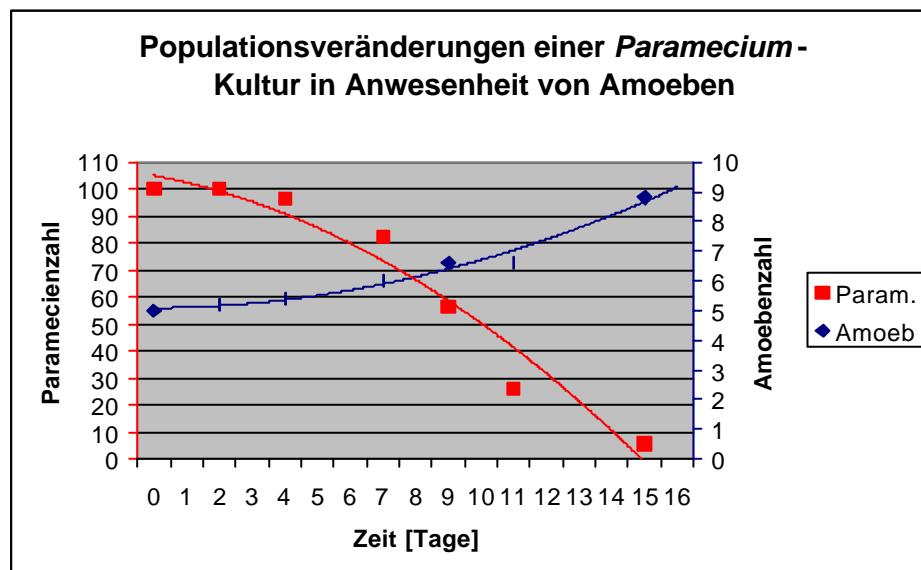
Steigt die Salzkonzentration im Medium an, so verringert sich die Populationsdichte. Die eingezeichnete Trendlinie zeigt eine exponentielle Abnahme der Zelldichte, die von der verwendeten Salzkonzentration abhängig ist.

Alle nach einer Woche getesteten Zellen konnten durch Immobilisierungstests eindeutig dem Serotyp 156G zugeordnet werden. Selbst nach mehrwöchiger Kultivierung unter Salzstress konnte keine Serotyptransformation nachgewiesen

werden. Der Schluss liegt nahe, dass die Induktion des Serotypproteins L bei Stamm 156G nicht machbar ist.

#### 4.2.5 Wechsel des Serotyps durch Anwesenheit von Prädatoren

Ein weiterer, in der Literatur erwähnter Faktor mit serotyptransformierender Wirkung, soll die Anwesenheit von räuberischen Organismen sein (HARUMOTO & MIAKE, 1993). In den folgenden Experimenten wurde das Populationswachstum einer *Paramecium primaurelia* Kultur in Anwesenheit der räuberischen Organismen *Amoeba proteus* und *Didinium nasutum* ermittelt, als Maß des Stressfaktors, unter dem sich die Zellen befinden. Die Paramecien wurden während der gesamten Versuchsdauer durch Immobilisierungstests mit homologem anti-156G und anti-156D Kaninchenserum auf die Ausprägung des Serotyps auf der Zelloberfläche getestet. Nach 14 Tagen wurde eine RT-PCR mit den noch vorhandenen Zellen durchgeführt.

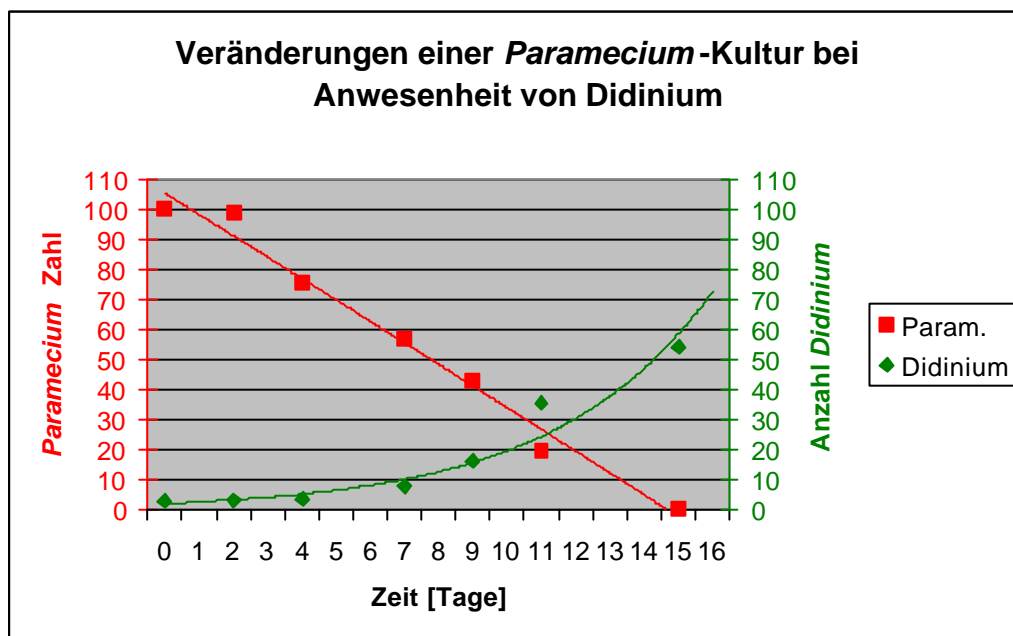


**Abb. 4-35: Populationsveränderung einer 156G Kultur in Anwesenheit von *Amoeba proteus***

In den Versuchsansätzen lässt sich klar eine Räuber-Beute Beziehung erkennen. Die zu Versuchsbeginn eingesetzten 100 *Paramecium*-Zellen/ml Ansatz nehmen durch den Einfluss der Amoeben bis auf unter 10 Zellen nach 15 Tagen ab, währenddessen die Amoebenzahl von ursprünglich 5/ml auf 9/ml ansteigt. Die Trendlinie zeigt deutlich einen sigmoidalen Verlauf beider Populationskurven.

Die nach 14 Tagen im Versuchsansatz verbliebenen *Paramecium*-Zellen wurden nun auf die Ausprägung ihres Serotyps getestet. Allerdings zeigten keine untersuchten Zellen eine durch den Prädationsdruck induzierte Serotyptransformation.

Ein weiterer Versuch, in dem *Didinium nasutum* als Räuber eingesetzt wurde, zeigt ebenso, eine sigmoidale Zuwachsrate der *Didinium*-Population. Diese ist mit einem linearen Abfall der Paramecienzahl korreliert, die durch die Anwesenheit der Prädatoren unter hohem Fraßdruck stehen. Ebenso wie bei Verwendung von *Amoeba* im Versuch, konnte jedoch keine serotypverändernde Wirkung durch *Didinium nasutum* bei den getesteten Paramecien festgestellt werden.



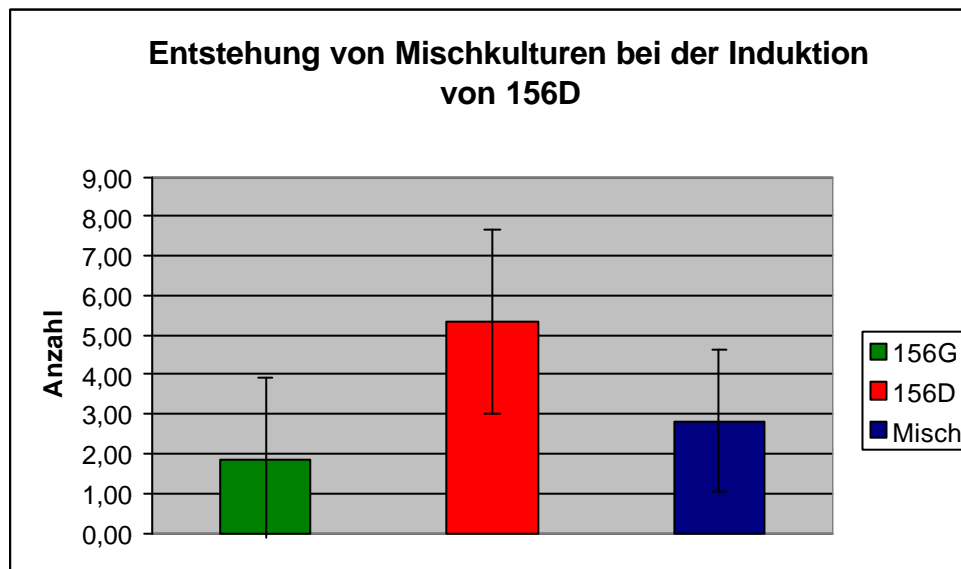
**Abb. 4-36: Populationsveränderung einer 156G Kultur in Anwesenheit von *Didinium nasutum***

Zusammenfassend lässt sich vermerken, dass weder durch den Einfluss von *Amoeba proteus*, noch durch *Didinium nasutum* eine Serotyptransformation bei *Paramecium primaurelia*, Stamm 156, beobachtet werden konnte.

## 4.3 Koexpression

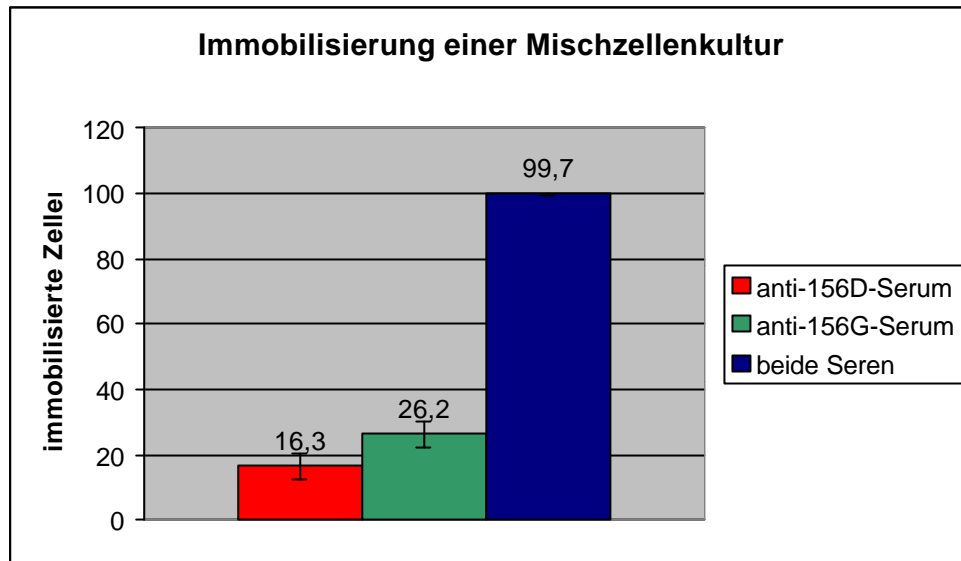
### 4.3.1 Nachweis von Koexpression bei *Paramecium primaurelia*

Bereits in frühen Experimenten, so zum Beispiel bei der Induktion des Serotypprotein D in einer Zellkultur bei 33°C, fielen kontinuierlich „Daily-Isolation Lines“ auf, die sich weder dem neu induzierten Oberflächenproteintyp zuordnen ließen, noch eindeutig dem alten Serotyp angehörten.



**Abb 4-37: Entstehung von Mischkulturen bei der Induktion von Serotypprotein 156D**

Die Kulturen verhielten sich vielmehr in Immobilisierungsversuchen indifferent, das heißt, viele Klone dieser Paramecien-Kulturen ließen sich weder durch anti-156D Serums, noch durch anti-156G Serum immobilisieren. Die Zellen wurden zwar in ihrer Bewegung beeinträchtigt und zeigten unkontrollierte und verlangsamte Schwimmbewegungen, eine vollständige Verklebung der Cilien und somit ein Absinken der Zellen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Erst eine Kombination beider Seren in einem Versuchsansatz führte zur gänzlichen Immobilisierung aller Zellen im Experiment.



**Abb. 4-38: Immobilisierung einer Mischzellkultur durch unterschiedliche Antiseren**

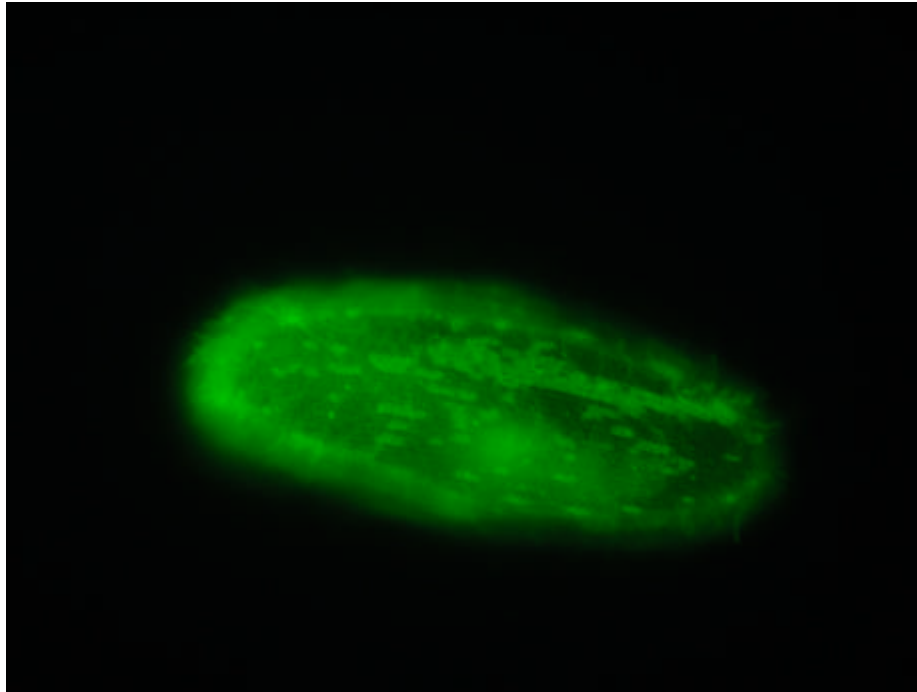
Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass es bei Zellen in solchen Kulturen zur gleichzeitigen Expression der Oberflächenproteine 156G und D kommt. Dieses Phänomen wird auch als Koexpression bezeichnet. Charakteristisch ist hierbei, dass neben dem ursprünglichen Oberflächenprotein ein zweites Serotypprotein auf der Membran präsentiert wird.

Dieses Verhalten der Zellen würde jedoch in keinsten Weise dem Prinzip der „mutual exclusion expression“ entsprechen (vgl. Kap1). Bei dieser von Beale (1954) veröffentlichten Theorie wird die „mutual exclusive expression“ nur während einer Serotyptransformation außer Kraft gesetzt. Koexpressive Zellen wurden in der Literatur nur für zwei Ausnahmen beschrieben (MARGOLIN, 1956; BEALE, 1954).

Unter „mutual exclusive“ Bedingungen prägen die *Paramecium*-Zellen bei 33°C den Serotyp D aus. Nicht so im oben aufgeführten Beispiel. Hier existieren offensichtlich Zellen, die eine Koexpression der beiden Serotypproteine 156G und 156D bei 33°C aufweisen.

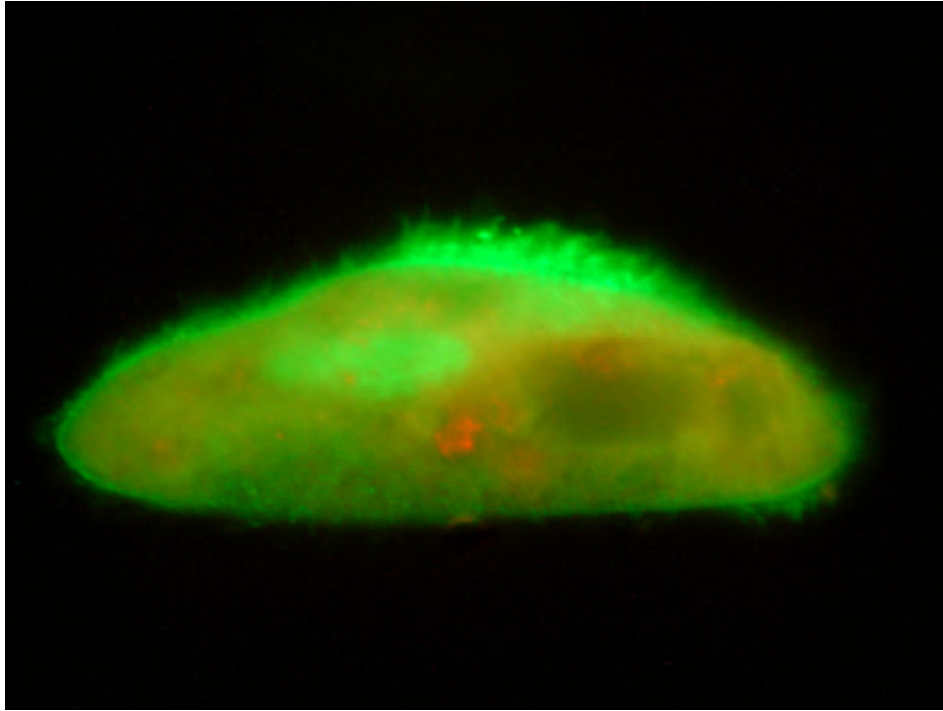
Erste Bestätigungen, dass es sich um einen Mischzustand handeln könnte, ergaben sich aus Färbungen dieser „Mischzellen“. Sie zeigen im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine vollständig andere Markierung als entsprechende serotypreine Zellen (Abb. 4-39). Das Fluoreszenzsignal ist nicht homogen auf der Zellmembran und den Cilien verteilt, sondern zeigt eine Zentrierung der Signale auf dem Zellcortex der markierten

Zellen, während die Cilien fast nicht gefärbt sind. Zudem lässt sich eine heterogene Verteilung der Signale auf der Zelloberfläche beobachten.



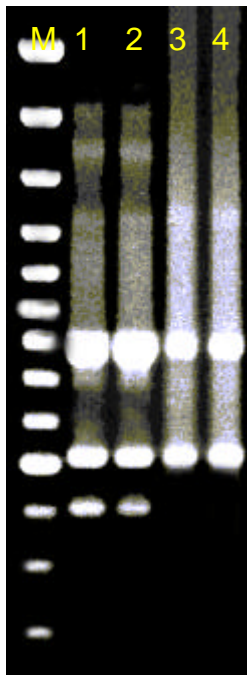
**Abb. 4-39: Immunofluoreszenzmarkierung einer koexpressiven Zelle mit anti-156G Serum**

Zum tatsächlichen Nachweis zweier vorhandener Oberflächenproteine wurde eine Doppelmarkierung der „Mischzellen“ mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Y4-IgG von Capdeville (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989) (spezifische Markierung der Serotypproteine G bei *Paramecium primaurelia*) und dem anti-156D Serum vorgenommen (Abb. 4-40). Anhand dieser Färbungen ließen sich die Oberflächenproteine 156D und 156G erstmals parallel auf der Zellmembran nachweisen. Die roten Signale zeigen die Ausprägung der 156D Proteine auf der Zellmembran, während die gelbgrüne Färbung den Stellen entspricht, an denen das Serotypprotein 156G ausgeprägt ist.



**Abb. 4-40: Doppelmarkierung einer koexpressiven Zelle**

Eine weitere, speziell zum Nachweis dieser Koexpression an *Paramecium primaurelia* neu entwickelte Methode, die Multiplex-RT-PCR (vgl. 3.6) ermöglicht gleichzeitig erstmals einen Blick auf die zellulären Vorgänge der Paramecien. Anhand einer einzigen Zelle lässt sich nun die Expression zweier Oberflächenproteingene auf der Ebene der Translation zeigen.



M: Marker 100bp Ladder Plus (MBI)  
 1 u. 2: Kontrollversuche unter Zusatz von genom. DNA: 800bp Bande für 156G, 500bp Bande für 156D und Kontrollbande bei 400bp.  
 3 u. 4: Multiplex Versuche: 800bp Bande für 156G, 500bp Bande für 156D.

**Abb. 4-41: Gel einer Multiplex RT-PCR**

Abb. 4-41 zeigt hierbei in den Spuren 3 und 4 das aufgetragene Produkt der Multiplex-RT-PCR. Die Bande bei 800bp entspricht dem ausgewählten Fragment zum Nachweis der Expression von 156G. Gleichzeitig findet man in den aufgetragenen Produkten eine weitere Bande bei 500bp, die den Nachweis der Expression von Serotypprotein 156D darstellt.

Zur Kontrolle wurde in die Geltaschen 1 und 2 ein RT-PCR-Produkt aufgetragen, das künstlich mit isolierter genomischer DNA verunreinigt wurde. In beiden Lines wurde jeweils eine zusätzliche Bande durch Zugabe passender Primer amplifiziert. Diese Kontrollbande wurde in den entsprechenden Ansätzen 3 und 4 trotz vorhandener Primer in der RT-PCR nicht amplifiziert, was ausschließt, dass die Banden G und D auf Verunreinigungen durch genomische DNA zurückzuführen sind. Vielmehr bestätigten die beiden Banden eine gleichzeitige Expression der Oberflächenproteingene 156G und 156D.

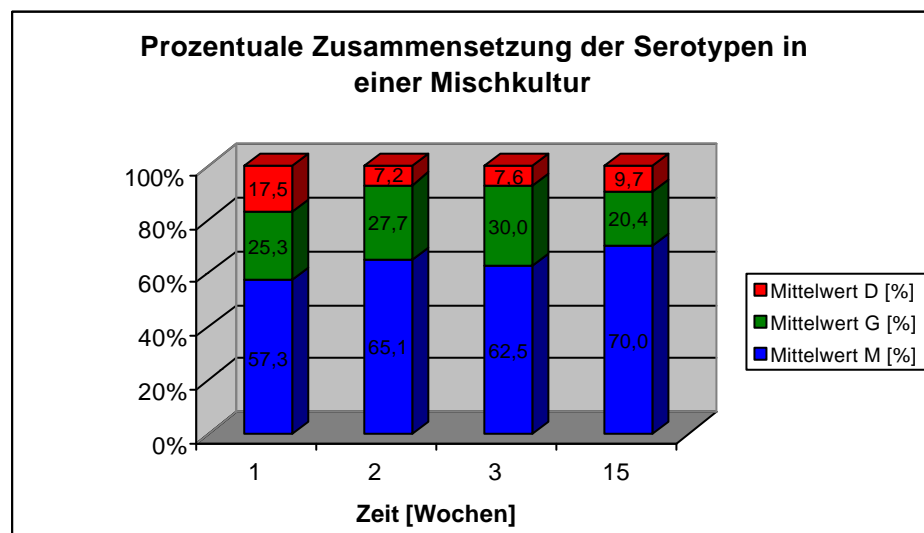
Weiterführende Beobachtungen solcher Zelllinien sollten die Frage klären, ob es sich bei der Koexpression von 156D und 156G um einen zeitlich limitierten Zustand auf der Zelloberfläche handelt, ähnlich einer induzierten Serotyptransformation, bei denen die Zellen während des Serotypwechsels ebenfalls zwei verschiedene Serotypen auf der Membran aufweisen.



So wurden die Zellen bei 33°C weiterkultiviert und allmählich zu Massenkulturen von 2 Litern herangezogen. Während dieser Zeit wurden Aliquots aus den Kulturen entnommen, an denen Immunfluoreszenzmarkierungen durchgeführt wurden. Die Zellen eines Aliquots wurden nach der Zugehörigkeit zu den Serotypen ausgewertet.

Es zeigte sich, dass sich in einer Kultur sowohl Zellen nachweisen ließen, die den Serotyp 156G oder 156D ausprägen, sowie Zellen, die einen Mischzustand auf der Zellmembran aufweisen.

Bei den beobachteten „Mischkulturen“ konnte jedoch ein Gleichgewicht zwischen den Serotypproteinen G, D und solchen Zellen beobachtet werden, die beide Oberflächenproteine gleichzeitig ausprägen. Dieses Verhältnis blieb auch nach mehreren Wochen oder Monaten konstant. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass bei den untersuchten Kulturen ein stabiler Mischzustand exprimiert wurde.



**Abb. 4-42: Prozentuale Zusammensetzung einer Mischzellenkultur in Abhängigkeit von der Zeit**

### **4.3.2 ELISA-Experimente**

Ein wichtiger Anhaltspunkt zur Unterscheidung der Mischzellkulturen, in denen „shiftende“ Zellen einem temporär begrenzten Zeitraum der Koexpression unterliegen, von den Zellkulturen, bei denen eine „echte“ zeitlich nicht limitierte Koexpression beobachtet werden kann, ist die Konzentration des abgespaltenen Oberflächenproteins in der Kulturflüssigkeit.

In Kulturen mit stabil ausgeprägtem Oberflächenproteintyp unterliegt das Turnover zwischen gebundenem Oberflächenprotein und von der PLC abgespaltenem Oberflächenprotein einem konstanten Verhältnis. Dieses ändert sich nur, wenn die Zellen in einen instabilen Zustand übergehen, wenn sie zum Beispiel einen durch Temperatur verursachten Serotypwechsel durchlaufen. Durch die erhöhte Aktivität des integralen Membranproteins PLC, das den GPI-Anker der Oberflächenproteine spaltet und somit für eine Ablösung der Proteine von der Membran verantwortlich ist (CAPDEVILLE ET AL., 1986), steigt die Konzentration von abgespaltenem Oberflächenprotein im Kulturmedium an.

Würde es sich bei dem oben beschriebenen Mischzustand um einen stabilen Zustand handeln, müsste der spektroskopisch gemessene Wert für die Konzentration der Oberflächenproteine in der gleichen Größenordnung liegen wie in stabilen 156G oder 156D Kulturen. Wäre der gemessene Wert entsprechend höher, könnte es sich eventuell um einen instabilen Zustand handeln, dem eines induzierten Serotypwechsels ähnlich und die Zellen würden sich in einem Stadium befinden, in dem sie von einem Serotyp zum anderen „shiften“, also einer ständigen Serotyptransformation unterliegen.

Eine experimentelle Untersuchung dieser Theorie wurde folgendermaßen durchgeführt: Verschiedene Medien wurden sowohl von den Paramecien, als auch von allen Futterbakterien befreit. Ein Aliquot der entsprechenden Kulturflüssigkeit des jeweiligen Mediums wurde einer ELISA Untersuchung zum Nachweis von abgespaltenen Oberflächenproteinen im Kulturmedium unterzogen.

	Abs.
Kontr.	0,0083
156G	0,0901
156D	0,0898
Shiftk.	0,1058
Mischk.	0,0888

**Tab. 4-4: Tabelle der Extinktionswerte (ELISA-Methode)**

Anhand dieser errechneten Mittelwerte erkennt man deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Medien. Es lassen sich drei Gruppen in der Konzentration unterscheiden. Die Kontrolle lag erwartungsgemäß mit dem Wert 0,0083 eine Zehnerpotenz unter allen anderen Werten. Eine zweite Gruppe bildeten die beiden Kulturen 156G und 156D, die mit Absorptionswerten um 0,09 stabil einen Serotyp exprimierten. Einen deutlich höheren Wert für die abgespaltenen Oberflächenproteine erhielt man bei der Untersuchung von der Kulturflüssigkeit „shiftende“ Zellen. Diese lag mit dem Absorptionswert von 0,106 höher als die beiden Proben der stabilen Kulturen.

Die Probe aus der Mischkultur lässt sich aufgrund ihres Wertes 0,088 eher der Gruppe mit den beiden stabileren Kulturen zuordnen. Folglich könnte man sagen, dass es sich bei diesem Ergebnis eher um einen stabilen Serotyp handelt und folglich nicht um eine Kultur, in der die Zellen dem ständigen Reiz unterliegen zu „shiften“.

### **4.3.3 Faktoren, die die Expression eines Mischzustandes innerhalb einer Kultur beeinflussen**

Handelt es sich bei dem gefundenen Zustand wirklich um eine stabile Koexpression beider Serotypen nebeneinander, sollte sich das Verhältnis durch serotyptransformierende Faktoren wie Hunger oder pH-Wert-Änderung beeinflussen lassen.

In den folgenden Experimenten wurden die Zellen einer Mischkultur bei gleichbleibenden Temperaturbedingungen (33°C) verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt und durch Anwendung von Immunofluoreszenzfärbungen und

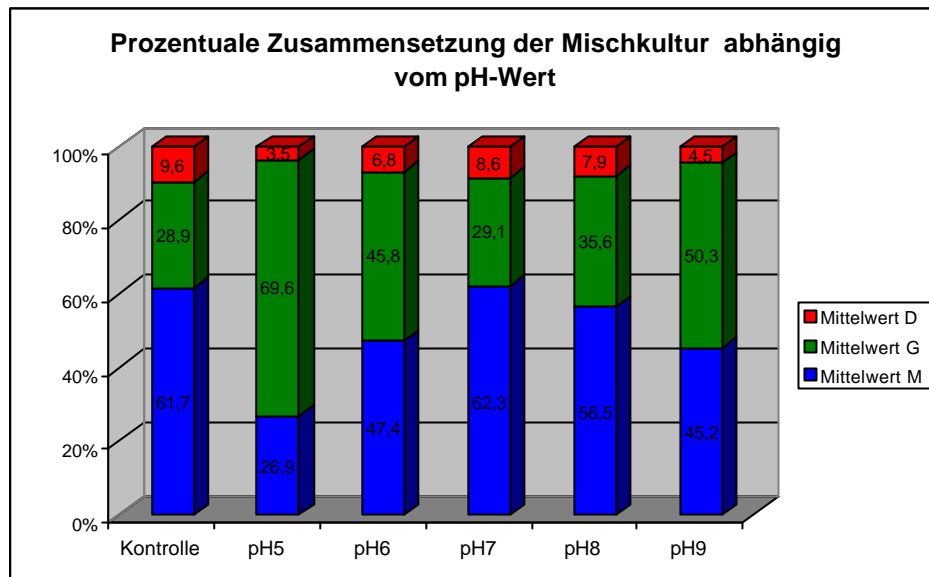
anschließender Zuordnung der Zellen zum entsprechenden Serotyp (156G, 156D und 156Misch) ausgewertet.

Die folgende Auswertung gibt die prozentuelle Zusammensetzung der untersuchten Mischkulturen nach dem Einfluss der oben schon beschriebenen serotyptransformierenden Faktoren des pH-Wertes und des Hungers an. Der potentiell transformierend wirksame Umweltparameter „Prädationsdruck“ wurde nicht berücksichtigt, weil er sich in den vorangegangenen Experimenten als unwirksam zur Induktion eines neuen Serotyps herausgestellt hatte.

### Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Koexpression

In gleicher Weise, wie stabile Kulturen, wurde auch der Serotyp von Mischkulturen durch verschiedene pH-Werte beeinflusst.

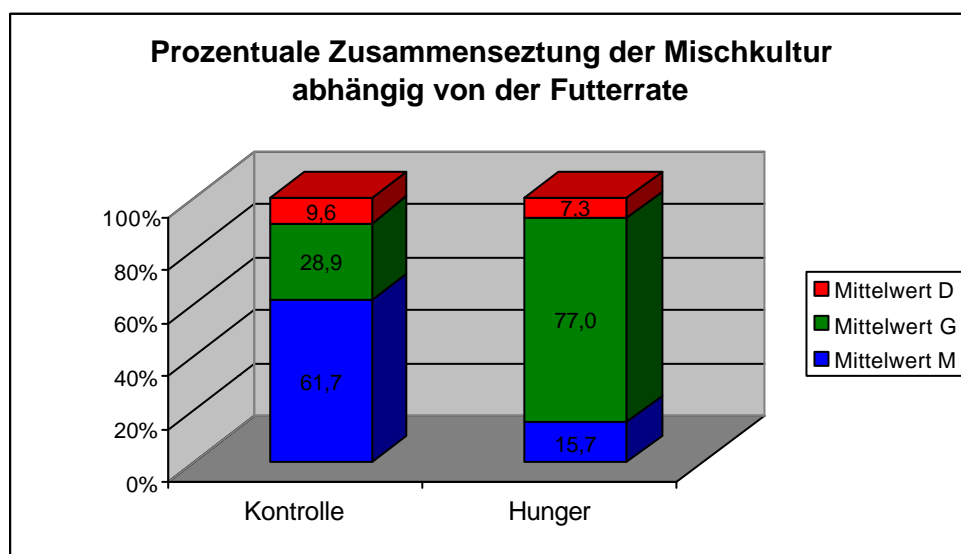
Hierbei bewirkte vor allem eine starke pH-Wert Veränderung eine große Veränderung in der Zusammensetzung der Serotypen. Deutlich sichtbar ist dies bei pH-Stufe 5 oder pH-Stufe 9. Im Gegensatz zur Kontrolle, bei der die Zellen, die in einem Mischzustand vorlagen, mehr als 60% der Kultur ausmachten, prägten bei pH9 nur noch 45% einen Mischtyp aus, bei pH5 lag der Anteil der koexpremierenden Zellen sogar nur noch bei knapp 27%. Statt dessen erhöhte sich der Anteil an Zellen, die Serotypprotein G ausprägen bis auf fast 70%. Bei pH7 entstand keinerlei Beeinträchtigung. Da die Kontrolle ebenfalls bei pH7 kultiviert wurde, war die Verteilung der unterschiedlichen Serotypen hierbei nahezu gleich. Sowohl bei pH6, als auch pH8 waren nur ein leichter Anstieg des Anteils an 156G Zellen zu verzeichnen, während der Anteil von Mischzellen etwas sank. Der Anteil der D Zellen nahm im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls etwas ab.



**Abb. 4-43: Auswirkung des pH-Wertes auf die Zusammensetzung der Mischkultur**

- Einfluss von Hunger auf die Koexpression

Wiederum ließ sich eine direkte Korrelation der Futterrate und der Zusammensetzung der Serotypen feststellen. Zum einen wirkte sich ein vermindertes Nahrungsangebot direkt auf die Zelldichte in der Kultur aus. Sie sank nach 14 Tagen von 640Zellen/ml auf 30Zellen/ml. Zum anderen wurde die Expression des Serotyps ebenfalls durch die Futterkonzentration gesteuert.



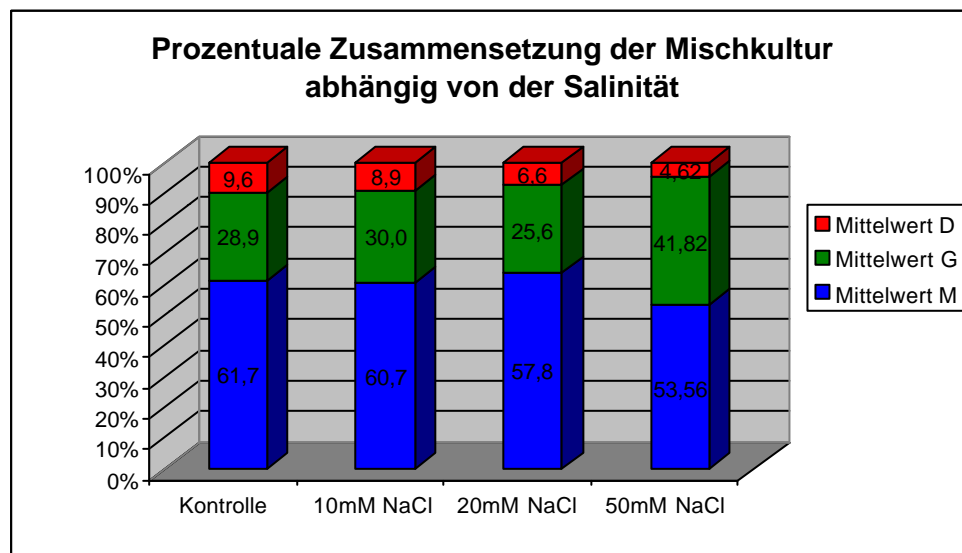
**Abb.4-44: Einfluss des Nahrungsangebotes auf die Expression des Mischzustandes**

In Abb. 4-44 sieht man deutlich den Einfluss, den eine verminderte Futtergabe auf die Serotypausprägung innerhalb der Mischkultur hatte. Liegt der Anteil von 156G-Zellen bei der Kontrolle bei knapp 30%, so steigt er durch eine Hungerperiode auf 77% an. In gleicher Weise sinkt die Zelldichte der Mischzellen von über 60% auf nur noch 15,7%.

Deutlich lässt sich der Einfluss der Fütterungsrate auf die Ausprägung von Koexpression durch dieses Experiment zeigen. Bei mangelndem Nahrungsangebot scheinen die Zellen jedoch den stabilen Zustand 156G vermehrt auszuprägen.

- Einfluss des NaCl-Gehaltes auf die Koexpression

Im Gegensatz zu der fehlenden serotyptransformierenden Wirkung des Salzgehaltes beeinflusste die Anwesenheit von NaCl [50mMol] die Zusammensetzung der Mischkultur erheblich, wohingehend sich bei niedrigeren Salzkonzentrationen (10mMol und 20mMol) fast keine Wirkung auf die Serotypausprägung der Zellen feststellen ließ (vgl. Abb. 4-45). Eine Erhöhung der Salzkonzentration führte zu einer Verringerung der koexpressiven Zellen um mehr als 10%. Dahingegen wuchs der Anteil der 156G Zellen um etwa diese Größenordnung an. Die Ausprägung des Serotyps 156D sank im Gegensatz dazu fast unmerklich.



**Abb. 4-45: Auswirkung der Salinität auf die Serotypexpression**

## **4.4 Freilandexperimente**

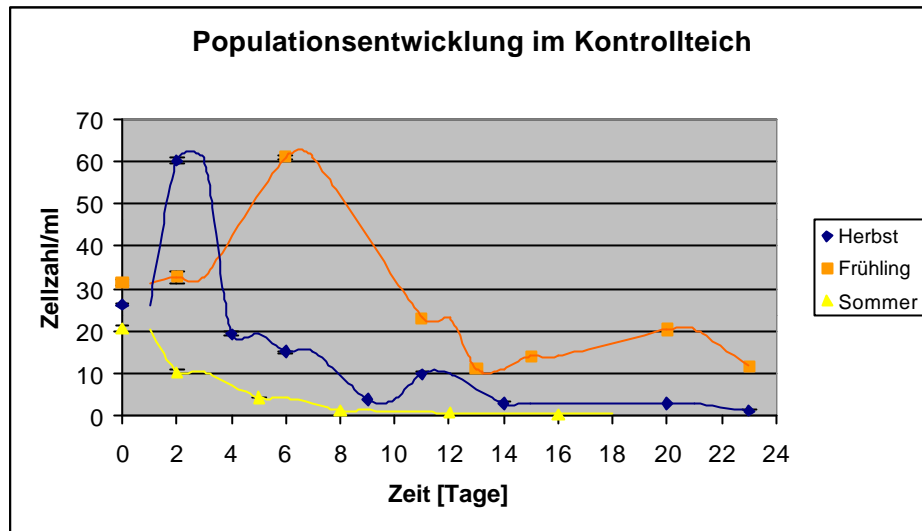
### **4.4.1 Kontrollteich**

Im Kontrollteich, der über keine Temperaturregelung verfügte, wurden insgesamt drei Experimente hintereinander durchgeführt. Dieser Teich unterlag den saisonal bedingten Temperaturschwankungen und stellte somit ein naturnahes Habitat für die Exposition der Paramecien dar.

Versuch 1 erfolgte in reinem Teichwasser, das zuvor mit Futterbakterien angeimpft wurde. Die Paramecienzahl wurde mit 25 Zellen/ml relativ gering gewählt, damit die Möglichkeit eines experimentelles Wachstum unter natürlichen Bedingungen gegeben war. Es wurde eine, zuvor untersuchte serotypeine 156G Kultur in den Teich ausgesetzt, wobei die Wassertemperatur zwischen 7 und 10°C lag, da das Experiment zwischen Oktober und Ende November stattfand. Danach war aufgrund der Witterungsverhältnisse eine Weiterverfolgung der Populationsveränderungen nicht möglich, da der Kontrollteich zugefroren war.

Versuch 2 wurde im Frühjahr durchgeführt. Hierbei lag die Wassertemperatur um 14°C; als Medium wurde zuvor mit Futterorganismen angeimpftes Strohmedium verwendet (Dieses hatte sich in vorangegangenen Untersuchungen besonders positiv auf das Populationswachstum ausgewirkt). Um eine dynamische Populationsentwicklung zu gewährleisten, wurde dieses Mal eine Kultur ausgesetzt, die zur Hälfte aus serotypreinen 156G-Zellen und zur anderen Hälfte aus 156D-Zellen bestand. Auch hierbei wurde die Ausgangsdichte der *Paramecium*-Zellen mit 30/ml relativ gering gewählt.

Versuch 3 startete im Sommer, bei Wassertemperaturen, die sich zwischen 18 und 26°C befanden. Auch hierbei wurde wiederum Strohmedium verwendet, weil es sich in Versuch 2 als stabilisierend auf die Wachstumsrate herausgestellt hatte.



**Abb. 4-46: Populationsentwicklung der exponierten Kulturen im Kontrollteich**

Abb. 4-46 zeigt die Populationsentwicklung der ausgesetzten Kulturen im Kontrollteich. Dieser ist in seiner Temperatur nicht regulierbar und unterliegt somit, wie ein natürliches Habitat, den saisonalen Temperaturschwankungen. Die drei Versuche wurden deshalb zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt, um die Populationsentwicklung bei unterschiedlichen Temperaturen miteinander vergleichen zu können. Es liegen somit Daten für den Herbst (Vers.1, blaue Kurve), für das Frühjahr (Vers.2, orangene Kurve) und für den Sommer (Vers.3, gelbe Kurve) vor. Da im Winter aufgrund der niedrigen Temperatur der Teich schnell und fast durchgehend zugefroren war, konnten keine Messungen für diesen Zeitraum erhoben werden.

Versuch 1 zeigt, dass sich die ausgesetzte Kultur exponentiell vermehrte, die Zelldichte jedoch aufgrund der limitierten Nahrungsverhältnisse auch ebenso schnell wieder abfiel. Danach ließ sich ein langsames Abnehmen der Zelldichte innerhalb von 20 Tagen beobachten, bis sich die Population auf 1-2 Zellen/ml eingependelt hatte. Als Grund hierfür mag zum einen die absinkende Temperatur verantwortlich gewesen sein, zum anderen das limitierte Nahrungsangebot.

Versuch 2, der im Frühjahr durchgeführt wurde (orangene Kurve), zeigte einen ähnlichen Verlauf. Es ließ sich ein exponentieller Anstieg der Population auf zunächst 60 Zellen/ml beobachten und danach einen langsamen Abfall der Zelldichte auf 20 Zel-



len/ml registrieren. Danach schien sich die Zelldichte zu stabilisieren und pendelte dann zwischen 10 und 20 Zellen/ml.

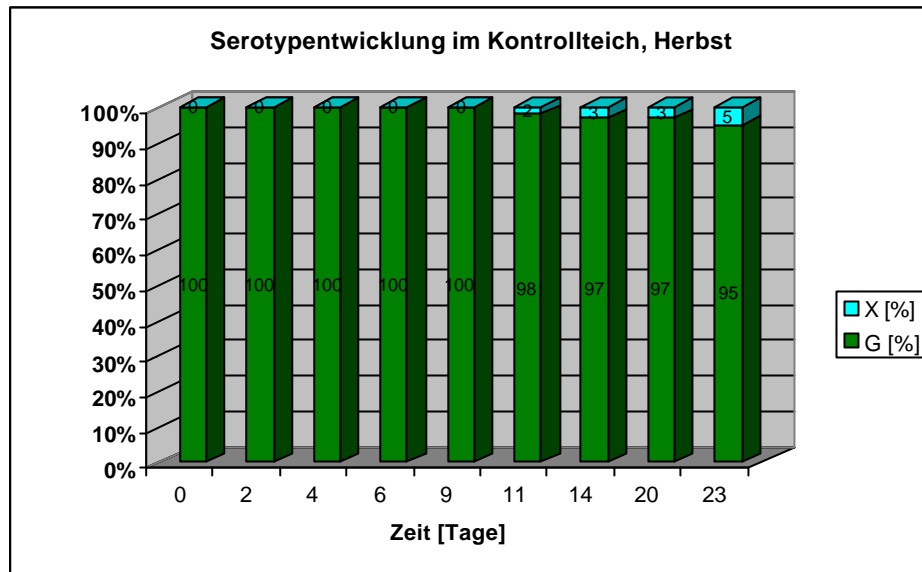
Versuch 3, der im Sommer durchgeführt wurde, zeigte im Gegensatz zu Versuch 1 und 2 einen gänzlich anderen Verlauf. Es fand kein primäres exponentielles Wachstum der Zellen statt, sondern statt dessen erfolgte eine fast lineare Reduzierung der Zelldichte auf unter 1 Zelle/ml.

Erklärbar ist dies durch den hohen Prädationsdruck, der im Sommer auch in natürlichen Gewässern herrschte (siehe Diskussion).

Im Hinblick auf die Serotypveränderungen unterschieden sich die drei Versuche ebenfalls untereinander:

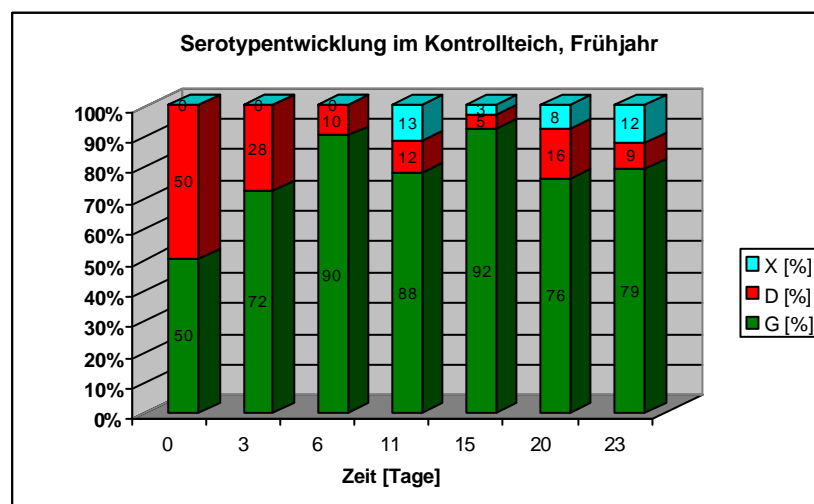
Versuch 1 (Abb. 4-47) zeigt eine fast stabile Ausprägung des Serotypproteins 156G auf der Zelloberfläche der aus dem Teich isolierten *Paramecien*. Erst nach 11 Tagen lassen sich Zellen eines anderen Serotyps reisolieren, die weder mit anti-156D oder mit anti-156G Serum immobilisieren und somit der Einfachheit halber mit X bezeichnet wurden. Mit dem Fortschreiten des Experimentes steigt der Prozentsatz dieses Serotyps zum Ende hin nur um 3% an, wodurch man annehmen kann, dass es sich bei diesem Serotyp um das Oberflächenprotein 156S handeln könnte, dessen Induzierung durch den im Teich herrschenden Nahrungsmangel ausgelöst worden sein könnte.

Da dieser Versuch unter niedrigen Temperaturen stattfand, ist es durchaus signifikant, dass sich hauptsächlich Zellen des Serotyps 156G aus dem Versuchsgewässer isolieren ließen, da dieser Serotyp sehr stabil ausgeprägt wird (BEALE 1954).



**Abb. 4-47: Serotypentwicklung im Kontrollteich im Herbst**

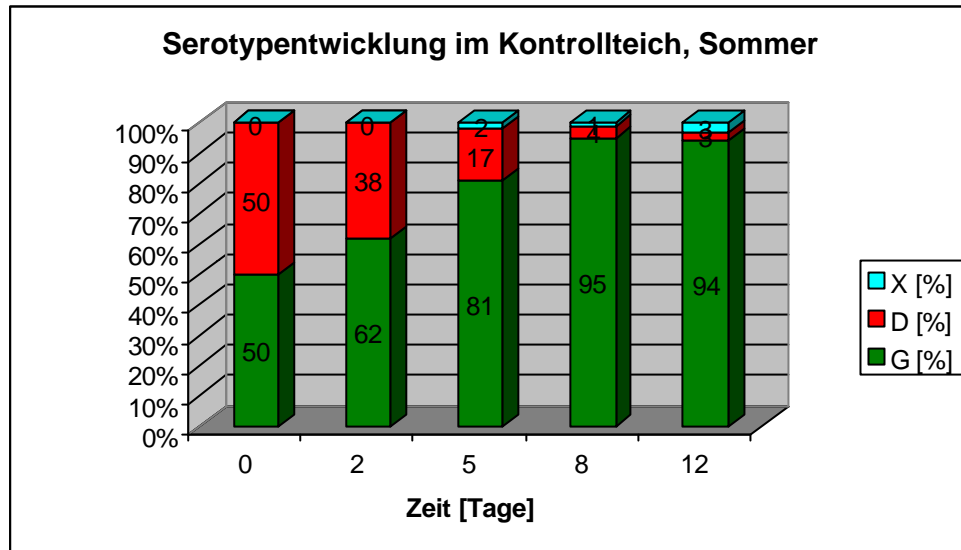
Versuch 2 (Abb. 4-48) erweist sich hinsichtlich der Serotypveränderung wesentlich indifferent. Dies mag vor allem an den anders gewählten Startbedingungen liegen. Da in Versuch 2 ein 1:1 Verhältnis von Zellen mit Serotypprotein 156G und 156D gewählt wurde, ließen sich deshalb Zellen des Serotyps 156D finden. Allerdings sinkt deren Anteil rasch auf um 10%, währenddessen der Anteil von 156G Zellen stark zunehmen. Nach 11 Tagen lassen sich ebenfalls wieder Zellen eines dritten Serotyps finden, deren Anteil jedoch nicht über 15% ansteigt.



**Abb. 4-48: Serotypentwicklung im Kontrollteich im Frühjahr**

Bei Versuch 3 (Abb. 4-49), der im Sommer durchgeführt wurde und ebenfalls mit einer Verteilung der Serotypen D und G von 1:1 startete, entwickelte sich die

Serotypverteilung ähnlich dem, des Versuchs 2. Hierbei stieg der Anteil der Zellen, die Serotypprotein 156G ausbilden, innerhalb von nur einer Woche auf 95% an, während Zellen mit Serotypprotein 156D immer seltener aus dem Teich isoliert werden konnten. Nach 5 Tagen trat erstmals der Serotyp X auf.



**Abb. 4-49: Serotypentwicklung im Kontrollteich im Sommer**

#### 4.4.2 Beheizbarer Teich

Die im beheizbaren Teich durchgeführten Untersuchungen erwiesen sich als recht schwierig. Dies begann schon mit der Einstellung der Wassertemperatur, da die Heizung erst nach mehreren Reparaturversuchen und letztendlich durch das Austauschen der Heizanlage, zuverlässig die Temperatur auf den Sollwert regulierte.

Ausgesetzt wurden dennoch *Paramecium*-Kulturen, die zu 50% aus serotypreinen 156G Zellen und zu 50% aus 156D Zellen bestanden. Die Teichtemperatur wurde auf 33°C einreguliert, welche der im Labor üblichen Kultivierungstemperatur für Zellen des Serotypproteins D entsprechen.

Alle Experimente scheiterten an dem hohen Prädationsdruck, der in dem beheizbaren Teich herrschte. Die *Paramecium*-Dichte sank in allen Versuchen exponentiell innerhalb von zwei bis drei Tagen auf Null, so dass es unmöglich war eine Serotyptransformation der exponierten Zellen zu dokumentieren.

Statt dessen traten räuberische Organismen wie *Daphnia pulex*, *Didinium nasutum* oder *Vorticella*, die sich allesamt von Paramecien ernähren und somit zum Einbruch der Population führten, massenhaft auf.

Aufgrund dessen wurde von weiteren Untersuchungen im beheizbaren Teich zunächst abgesehen.

### 4.4.3 Kühlteich

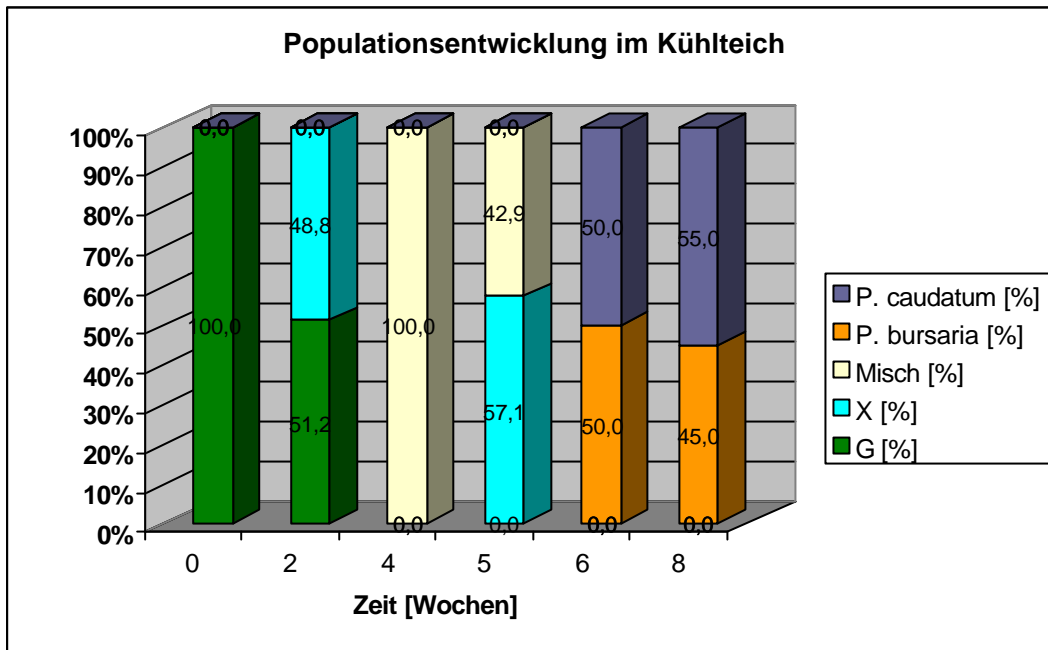
In dem kühlbaren Teich wurden als Startkultur serotypreine 156G *Paramecium*-Zellen in einer Konzentration von 20 Zellen/ml exponiert. Die Regulation der Teichtemperatur erfolgte auf 10°C. Nach mehreren Wochen wurde die Serotypverteilung der reisolierten Paramecien bestimmt.

So zeigte sich nach 2 Wochen, dass die Zellen einer 100% reinen 156G-Kultur zu 50% einen anderen Serotyp ausprägten als das Serotypprotein 156G. Da diese Zellen sich durch serologische Untersuchungen mit anti-156D Serum nicht immobilisieren ließen, wird auf der Zelloberfläche folglich nicht das Serotypprotein 156D präsentiert. Die Annahme, es handele sich bei dem, zunächst als Serotyp X bezeichneten, um das, nur in der tieferen Temperaturskala ausgeprägte Serotypprotein 156S, liegt nahe.

Doch dies konnte, aufgrund fehlender homologer Antiseren gegen das Oberflächenprotein S, letztlich nicht geklärt werden.

Nach weiteren 2 Wochen (4 Wochen nach Versuchsbeginn) ließen sich nur noch Zellen finden, die einen Mischtyp aus 156G und dem Serotyp X ausprägten. Dies konnte durch Immunofluoreszenzfärbungen mit anti-156G Serum nachgewiesen werden, da diese untersuchten Zellen das typische heterogene Verteilungsmuster von koexpressiven Zellen zeigten. Nach einer weiteren Woche lag das Verhältnis zwischen dem Mischtyp und dem reinen X-Typ wiederum bei 43:57; serotypreine Zellen, die nur das Oberflächenprotein 156G exprimieren, ließen sich nun nicht mehr nachweisen. Die Zahl der reisolierten *Paramecium aurelia* wurde im Laufe des Experimentes immer geringer. Statt dessen stieg die Zahl anderer *Paramecium*-Arten an. So ließen sich 6 Wochen und 8 Wochen nach Versuchsbeginn keinerlei *Paramecium primaurelia* aus dem Teichwasser isolieren. Statt dessen konnte eine Etablierung von *P. bursaria* und *P. caudatum* als omniglobale Organismen im Teich dokumentiert werden. Es kann somit als wahrscheinlich angenommen werden, dass *Paramecium*

*primaurelia* durch die Konkurrenz der beiden anderen kosmopolitisch verbreiteten Arten verdrängt wurde.



**Abb. 4-50: Serotypentwicklung im Kühlteich**

## 4.5 Wiederaufnahme von Oberflächenproteinen in die Zelle

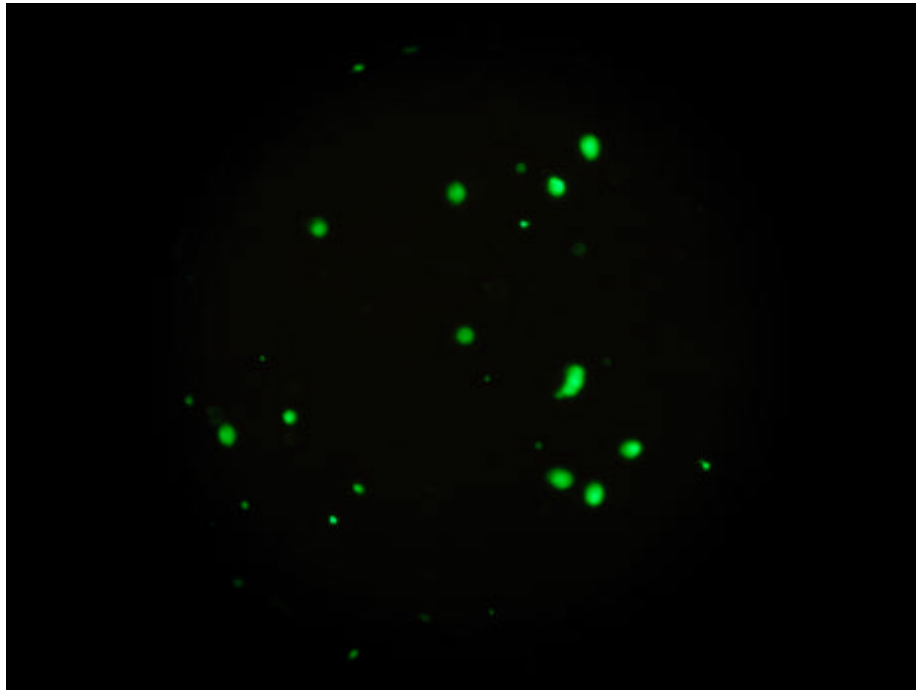
Ein interessanter Aspekt in der Thematik der Oberflächenproteine stellt nicht nur die Frage dar, wie die einzelligen Organismen auf verschiedene Umwelteinflüsse reagieren, sondern auch, wie die synthetisierten Serotypproteine auf die Oberfläche gelangen und was nach dem Abspalten mit ihnen geschieht. Ein Teil dieser Arbeit versucht auf diese Fragen Antworten zu geben. So konnte der zeitliche Ablauf eines Serotypwechsels nicht nur auf der Oberfläche geklärt werden, sondern auch auf mRNA Ebene (s. 4.2). Nach dem Abspalten der Serotypproteine lassen sie sich im Kulturmedium durch ELISA-Methodik nachweisen (s. 4.3.2). In der freien Natur könnte das Abspalten der Oberflächenproteine für die Zellen ein extremer Energieverlust, verbunden mit einem Konkurrenznachteil, bedeuten, da zum Synthetisieren der extrem großen Oberflächenproteinmoleküle auch viel Energie benötigt wird. Flötenmeyer und Plattner stellten schon 1999 ein Modell zum Recycling von abgespaltenen Oberflächenproteinen auf, bei dem diese durch

Vakuolen wieder aufgenommen werden und somit der Zelle durch eine Art Recycling wieder zur Verfügung stehen.

In Zusammenarbeit mit Dr. Momayezi, der shiftende Zellen parallel zu den in der Abteilung für Ökologie durchgeführten Shiftexperimente untersuchte, stellte sich heraus, dass alle Bakterien, die sich zum Zeitpunkt der Zellfixierung mit PFA in der Nahrungsvakuole befanden, mit einer Schicht von Oberflächenproteinen überzogen sind.

Aus diesen Beobachtungen resultierend wurden die im Medium befindlichen Bakterien isoliert, fixiert und durch eine Immunofluoreszenzmarkierung gefärbt.

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Immunofluoreszenzmarkierung.



**Abb. 4-51: Immunofluoreszenzmarkierung der Futterbakterien**

Die Bakterien sind augenscheinlich rundherum mit den abgespaltenen Oberflächenproteinen umgeben und erscheinen nach der Markierung grün, während eine Kontrollfärbung mit frischen, also noch nicht den *Paramecium*-Medium ausgesetzten Futterbakterien derselben Art, nicht im Fluoreszenzlicht leuchten.

Ein weiterer Kontrollversuch wird durchgeführt, bei dem die Bakterienmarkierung ohne primären Antikörper erfolgt. Da sich auch in diesem Experiment die markierten Bakterien nicht grün färben, beweist das Fehlen der Markierung, dass das erhaltene Fluoreszenzsignal in den Positivversuchen nicht auf unspezifische Anheftung des

sekundären Antikörpers, bzw. der chromophoren Gruppe an Oberflächenstrukturen auf der Bakterienmembran zurückzuführen ist. Das beobachtete Fluoreszenzsignal resultiert somit tatsächlich aus der Markierung der abgespaltenen Oberflächenproteine im Medium, die die Bakterienmembran ähnlich einer Hülle umgeben.

Ein weiteres Experiment soll klären, ob diese mit Oberflächenprotein ummantelten Bakterien in die Futtervakuolen wiederaufgenommen werden. Hierfür werden *Paramecium*-Zellen der Art 156G von Futterbakterien befreit und mehrere Tage hungern gelassen, damit alle Futterbakterien aus den Vakuolen verdaut sind. Zuvor gefärbte Bakterien werden für zwei Stunden den hungernden lebenden, nicht gefärbten Paramecien ausgesetzt und danach erfolgt eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *Paramecium*-Zellen unter Fluoreszenzlicht.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten nach zwei Stunden deutlich die Futtervakuolen grün auf, was eine Aufnahme der Futterbakterien, sowie deren Ansammlung in den Vakuolen bedeutet. Nach einer weiteren Stunde werden die Zellen wieder examiniert, doch nun ist die Grünfärbung der Vakuolen deutlich schwächer, was auf einen Verdau der aufgenommen Bakterien schließen lässt.

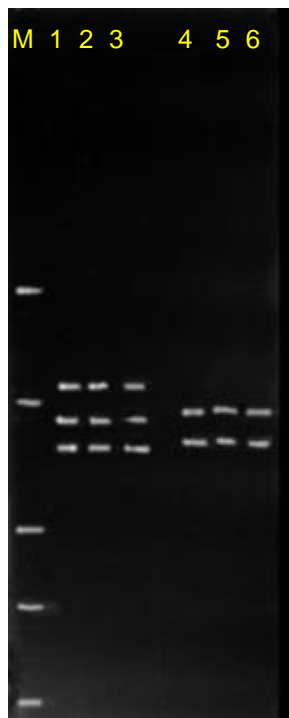
## **4.6 Sequenzanalysen unbekannter Serotypprotein-Gene von *Paramecium primaurelia***

### **4.6.1 Ergebnisse der Long Run PCR**

Nach der Lyse von Zellen der Stämme 41 und 60, wurde deren genomischer DNA, zu denen bisher keinerlei Sequenzdaten für Oberflächenproteine existieren in Long Run PCR Experimenten verwendet. Durch Verwendung von sogenannten Konsensusprimern ließen sich je drei Fragmente für Stamm 40 und zwei Fragmente für Stamm 60 im Größenbereich von 7,1 bis 8,1kb amplifizieren. Hierbei binden die ausgewählten Oligonukleotidprimer an sogenannte Konsensusregionen, die sich im 5'-nichtkodierenden Bereich der Oberflächenproteingene, sowie am 3'-Ende befinden. Da diese Bereiche bisher für alle Oberflächenproteingene Gene von Stämmen von *Paramecium tetraurelia* bekannt sind, sowie bei Stamm 156 und 168 bei *Paramecium primaurelia*, scheinen diese Regionen oberflächenspezifisch zu sein

und erbrachten somit auch ein erwartetes Ergebnis für die beiden Stämme 41 und 60.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Long Run PCR-Produkte sind für den Stamm 41 drei Banden zu erkennen, bei Stamm 60 jedoch nur zwei (Abb. 5-52).



M : 1kbp-Marker (MBI)  
1, 2 u. 3: 3 Banden für die Long-  
Run PCR, Stamm 41  
4, 5 u. 6: 2 Banden für die Long-  
Run PCR, Stamm 60

**Abb. 4-52: Gel der Long Run PCR**

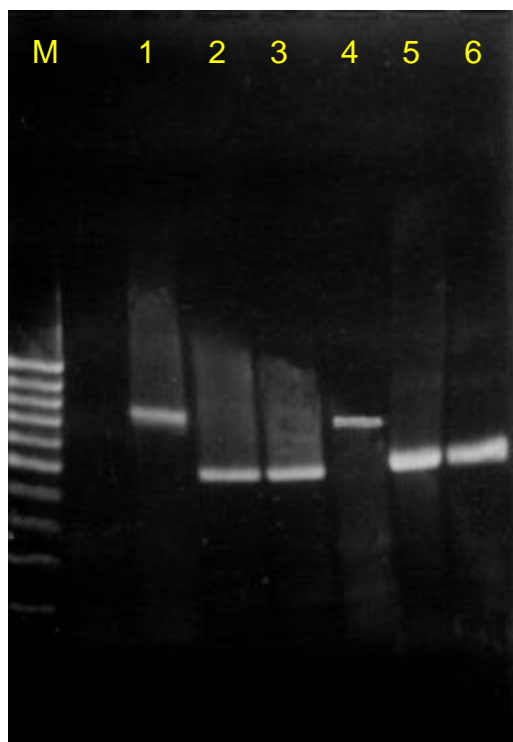
Von einer Aufarbeitung der ausgeschnittenen Banden in einer Subclonierung und anschließenden Sequenzierung wurde jedoch abgesehen, weil eine Elution solch großer Fragmente von einer handelsüblichen Silica-Matrix aufgrund der hohen Bindungsaffinität nicht möglich ist. Zudem wäre die vollständige Sequenzierung solch großen Fragmente extrem teuer, weshalb darauf verzichtet wurde.

Um jedoch wenigstens ein Teilstück dieser bisher unbekanntes Oberflächenproteingensequenzen zu erhalten, wurden, in der Annahme, dass sich die Oberflächenproteine von *P. primaurelia* untereinander ebenso ähnlich sind, wie die oberflächenspezifischen Gene bei *P. tetraurelia*, die für Stamm 156 ausgewählten Primer für die Oberflächenproteingene 156G und 156D in einer PCR auch auf die Gene der beiden bisher unsequenzierten Stämme 41 und 60 verwendet.



#### 4.6.2 Sequenzanalysen und Vergleich von Fragmenten der Oberflächenproteine 41G, 60G sowie 41D und 60D

Wie schon vermutet, lassen sich durch die verwendeten Primer für 156G und 156D auch Teilstücke aus den Genen der beiden Stämme 41 und 60 amplifizieren. Man erhält für die Proteine des Serotyps D wie erwartet eine etwa 500bp große Bande und für die Proteine des Serotyps G ein 800bp großes Fragment.



M: 100bp Marker (MBI)  
 1 : 800bp Bande für Serotyp 41G  
 2 : 400bp Bande für Serotyp 41D  
 3 : 400bp Bande für Serotyp 41D  
 4 : 800bp Bande für Serotyp 60G  
 5 : 400bp Bande für Serotyp 60D  
 6 : 400bp Bande für Serotyp 60D

**Abb. 4-53: Gel der amplifizierten Fragmente der Stämme 41 und 60**

Die entsprechenden Fragmente wurden aus dem aufgereinigten PCR-Produkt subkloniert und danach einer Sequenzanalyse unterzogen.

Die Sequenzierung führte bei allen Fragmenten zur Verifizierung, dass es sich hierbei tatsächlich um Teilstücke aus oberflächenspezifischen Genen handelt.

Es lassen sich innerhalb der analogen Oberflächenproteine 156G, 41G und 60G, sowie 156D, 41D und 60D eine große Sequenzhomologie feststellen. Von jedem Fragment wurden zwei Inserts (a und b) der erhaltenen Klone sequenziert (Abb. 10-1 bis Abb. 10-4 im Anhang). Jedoch sind untereinander Unterschiede vorhanden, die folgendermaßen aussehen:

### 41D (Abb. 10-1):

Beide untersuchte Inserts sind zueinander homolog. Nur an Position 182 befindet sich bei 41Da eine Adenin-Base, während bei Fragment 41Db an dieser Stelle ein Guanin in der Sequenz vorhanden ist.

### 41G (Abb. 10-2):

Die beiden Fragmente für das Oberflächenprotein 41G (a und b) unterscheiden sich jedoch erheblich. Von 774 analysierten Basen weisen existieren 97 Unterschiede zwischen den beiden Inserts auf, was einer Sequenzhomologie von nur 87,5% entspricht.

### 60D (Abb. 10-3):

Auch hier zeigen die beiden Fragmente zwar eine hohe Ähnlichkeit, jedoch sind wiederum signifikante Unterschiede in der Basenabfolge festzustellen. 4,7% der Basen stimmen bei den untersuchten Inserts nicht überein. Dies entspricht einer Sequenzhomologie von 95,3%.

### 60G (Abb. 10-4):

Ähnlich wie beide Fragmente für das Oberflächenprotein 60D liegt die Homologie für die Fragmente 60Ga und 60Gb bei 95,1%. Dies bedeutet, dass von den 774 untersuchten Basen in beiden Fragmenten, nur 736 gleich sind.

Auf die möglichen Gründe für solch große Sequenzunterschiede wird in der Diskussion noch ausführlich eingegangen (5.2).

## 5 Diskussion

### 5.1 Nachweismethoden zur Identifizierung von Serotypproteinen

Bei Arbeiten an Oberflächenproteinen ist man in erheblicher Weise auf die Genauigkeit der Nachweismethoden zur direkten oder indirekten Identifizierung der Serotypproteine auf der Zellmembran oder deren zugehörigen exprimierten Proteingene angewiesen.

Die in dieser Arbeit angewandten Techniken unterscheiden sich nicht nur in der Methodik, sondern auch auf der Ebene, auf der die Expression der Serotypproteine nachgewiesen werden.

So identifiziert man den Serotyp einer Zelle bei der Immobilisierungsreaktion und der Immunofluoreszenzfärbung anhand von homologen spezifischen Antiseren gegen die als Antigene fungierenden Oberflächenproteine, wohingegen die Translation durch die RT-PCR Reaktion eine Ebene tiefer, nämlich auf der Stufe der mRNA-Synthese, nachgewiesen wird. Entsprechend unterschiedlich sind auch die Anwendungsgebiete der entsprechenden Techniken, sowie deren Vor- und Nachteile, die im folgenden näher erörtert werden sollen.

Die Immobilisierungsreaktion ist eine schnell durchzuführende, einfache Technik, die schon innerhalb weniger Minuten Aufschluss über den exprimierten Serotyp gibt. Sie wird in ihrem Prinzip schon seit der Entdeckung der Oberflächenproteine durchgeführt (RÖSLE, 1905) und diente schon in der frühen Phase zur Erforschung der Serotypproteine. Die aus dem Freiland isolierten Zellen wurden den entsprechenden Arten zugeordnet und anhand der Immobilisierungsreaktion zu verschiedenen Serotypen sortiert (BEALE, 1954; PREER, 1947; SONNEBORN, 1943). Auch heute ist die Immobilisierungsreaktion immer noch eine zuverlässige Methode, um auf der Zellmembran präsentierte Serotypproteine schnell einzuordnen. In den durchgeführten Experimenten zur Konzentrationsbestimmung der benutzten Antikörper (Abb. 4-1 und 4-2) zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit, gekoppelt mit einem nur sehr geringen Fehler bei den einzelnen Messungen.

Zudem lassen die durchgeführten Kontrollen erkennen, dass es zu keinen, oder nur zu vernachlässigbar geringen Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Antisera kommt.

Allerdings lässt sich durch diese Methode keine Aussage über die Quantität der gebildeten Oberflächenproteine oder deren Verteilung auf der Zellmembran machen, da sie eine Alles-oder-Nichts Reaktion darstellt (KELLER ET. AL., 1992).

Eine weitaus sensiblere Technik, ist die Immunofluoreszenzmarkierung von Serotypproteinen. Durch sie lassen sich die Immunoantigene wesentlich genauer auf der Zelloberfläche der Paramecien lokalisieren. Weil diese Methode eine Verstärkungskaskade vom ersten zum zweiten Antikörper erfährt, ist die detektierte Reaktion (das Leuchten der markierten Proteine) wesentlich stärker als bei der Immobilisierungsreaktion. So zeigen Zellen im mikroskopischen Bild zwar Immunofluoreszenzsignale, zur vollständigen Immobilisierung würde die Anzahl der vorhandenen Serotypproteine jedoch nicht ausreichen.

Zudem ist eine Verteilung der Oberflächenproteine leicht festzustellen. Selbst ein ungeübter Betrachter kann leicht zwischen einer „geklumpten“ oder homogenen Verteilung auf der Membran unterscheiden (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989).

Somit lässt sich zum Beispiel ein Serotypwechsel auf der Zelloberfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachten (Abb. 4-9 – 4-14 und 4-16 – 4-21) oder aber durch eine Doppelmarkierung das Vorhandensein zweier Proteintypen auf dem Zellcortex nachweisen (Abb. 4-40). Das Anfertigen von Negativkontrollen mit kreuzweise verwendeten Antisera konnte zeigen, dass diese Zellen keine leuchtenden Signale lieferten, was einerseits für die Genauigkeit der Reaktion spricht, andererseits aber auch die Serotypreinheit, der für die Experimente benutzten Zellen (vgl. Abb. 4-4 und Abb. 4-6) bestätigt.

Bei beiden Methoden stellt die Verfügbarkeit von homologen, spezifischen Antikörpern ein Nachteil dar, weil diese arbeitsaufwendig herzustellen sind.

Bei einer weiteren verwendeten Methode, der RT-PCR (KUSCH & SCHMIDT, 2000) ist man von der Gewinnung spezifischer Antikörper unabhängig. Zur Durchführung dieser Technik ist lediglich die Sequenz des nachzuweisenden Oberflächenproteingens nötig, die als Teilstück mit Hilfe eines spezifischen Primerpaars durch das Enzym *Reverse Transkriptase* und danach in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert wird.

Diese molekularbiologische Methode zum spezifischen Nachweis von oberflächenspezifischer mRNA liegt in ihrer Nachweisgrenze noch niedriger als die beiden immunologischen Techniken. Für die RT-PCR genügt zum Nachweis von Oberflächenproteinen eine geringe Anzahl mRNA-Moleküle. Zudem gelingt die Detektion der oberflächenspezifischen mRNA. So ist es möglich z.B. bei einer induzierten Serotyptransformation in einem wesentlich früheren Stadium der Proteinsynthese (auf der Ebene der Transkription) den Wechsel eines Serotypproteins nachzuweisen, als bei den beiden zuvor erwähnten herkömmlichen Methoden (s.o.), bei denen der Nachweis des Proteins erst gelingt, wenn es vollkommen synthetisiert wurde, oder auf der Membran präsentiert wird. Dass dies ein Zeitunterschied bis zu mehreren Tagen sein kann, verdeutlichen die Ergebnisse der temperaturinduzierten Shiftversuche. Lässt sich das hergestellte Protein z.B. erst nach 96h auf der Membran detektieren, erhält man einen Hinweis zur Serotypexpression durch die RT-PCR schon zum Zeitpunkt von 45h nach dem Einwirken des serotypinduzierenden Reizes.

Kontrollversuche zeigten, wenn das entsprechende Gen nicht transkribiert wurde, und folglich dafür keine mRNA existierte, wurde keine Bande amplifiziert. Dies beweist die hohe Reproduzierbarkeit der RT-PCR Methode.

Eindeutige Nachteile dieser Technik liegen im hohen Kostenaufwand, da das Verwenden der Enzyme Reverse Transkriptase, sowie der *Taq-Polymerase* relativ teuer ist. Zudem ist die RT-PCR gerätetechnisch aufwendiger als die benutzten immunologischen Methoden, da man einen PCR Thermo-Cycler benötigt. Alle verwendeten Reagentien und Versuchsgeräte müssen durch Erhitzen bei 180°C oder Behandlung mit Chloroform von RNAsen befreit werden, da die Anwesenheit von RNAsen zu einem Verfälschen der Versuchsergebnisse, durch Abbau der RNA, führen würde.

Ein weiterer Nachteil der RT-PCR ist die Abhängigkeit der Reaktion von der Fütterungsrate. Da die Anwendung der Technik auf dem Vorhandensein der mRNA beruht, diese jedoch im schlechten Zustand der Zelle (z.B. bei schlechter Nahrungssituation) kaum gebildet wird, kann dies zu falschen Ergebnissen führen. Für Freilandproben, die nicht immer optimal gefüttert sind, wäre diese Methode deshalb ebenso ungeeignet.

Dieses Problem wurde im Laufe der Arbeit jedoch durch die Etablierung einer Multiplex RT-PCR Reaktion der Firma Eppendorf gelöst (SIMON, ALBRECHT & SCHMIDT, 2002). Hierbei liegt die Nachweisgrenze für Oberflächenproteine bei einem einzigem

Strang mRNA. Diese geringe Menge an Template genügt schon, um zuverlässig Ergebnisse zu erhalten. Die hohe Sensivität der Two Step RT-PCR wird durch die Anwendung eines anderen Enzyms, des sogenannten cMaster RT-Enzyms der Firma Eppendorf erreicht (vgl. Diskussion später).

Die Basenabfolgen vieler Oberflächenproteingene wurden schon analysiert, wie dies für die bereits sequenzierten Oberflächenproteingene von *Paramecium primaurelia*, wie z.B. 156G (PRAT, 1986) und 156D (BOURGAIN-GUGLIEMMETTI, 1996) oder 168G der Fall ist. Diese Gene sind bereits seit langer Zeit sequenziert und ihre Basenabfolgen lassen sich aus diversen Sequenz-Datenbanken abrufen. Will man jedoch einen neuen Serotyp durch RT-PCR nachweisen, der bisher nicht in seiner Basenabfolge analysiert wurde, muss man wenigstens ein Fragment des Genes kennen, das man später amplifizieren möchte. Dies ist durch „Ansequenzieren“ der entsprechenden, zuvor einclonierten Sequenz eines Oberflächenproteins möglich. Da diese Arbeit jedoch zeitaufwendig und ebenso kostenintensiv ist, wurde in den dargelegten Experimenten hauptsächlich mit dem Stamm 156 gearbeitet, dessen Gene 156D und 156G in ihrer Basenabfolge bereits vollständig bekannt sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verwendung aller drei Methoden eine umfassende Aussage über die Serotypexpression von *Paramecium*-Zellen erlaubt, da nicht nur die, auf der Zelle bereits vorhandenen Oberflächenmoleküle registriert werden, sondern ebenfalls der momentane Zustand der Translation untersucht werden kann.

Für die Untersuchung spezieller Vorgänge im Zellinneren, bei denen man sich für temporäre Abläufe interessiert, ist im Besonderen die RT-PCR geeignet, während man für massenhafte Untersuchungen von *Paramecium*-Kulturen oder für Freilandisolate besser immunologische Techniken, wie die Immunofluoreszenzmarkierung oder Immobilisierungsreaktion auswählt.

Die drei etablierten Methoden ergänzen sich in ihrer Aussagekraft optimal, so dass für die Erforschung der Serotypproteine und deren Gene eine optimale Grundlage in der Abteilung für Ökologie geschaffen wurde.

## 5.2 Sequenzanalyse unbekannter Serotypproteingene

Wie bereits oben erwähnt, lässt sich eine genaue Aussage über die Expression von Serotypgenen mit Hilfe der RT-PCR nur erstellen, wenn ein Teil des Genes bereits bekannt ist. Nur dann ist die Auswahl von spezifischen Primern möglich.

Für die Oberflächenproteine von *Paramecium tetraurelia* wurden im Laufe der Forschung fast alle Serotypgene auf ihre Basenabfolge hin sequenziert (z.B. FORNEY, 1983; GODISKA, 1987; PREER ET AL., 1985; SCOTT, 1993; MEYER ET AL., 1998). Dahingegen sind die SAg-Gene von *Paramecium primaurelia* wesentlich weniger untersucht. Sequenzdaten existieren von Stamm 156 für die Serotypstrukturgene D (PRAT, 1986) und G (BOURGAIN-GUGLIELMETTI, 1996), sowie von 168 für das Gen des Serotypproteins G (PRAT, 1990). Die Sequenzen von Pseudogenen der Stämme 156 und 168, die mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch beide nicht exprimiert werden, wurden erst kürzlich von Dubrana & Amar (2000 und 2001) entdeckt.

Um die Methode der RT-PCR auf weitere Stämme der Art *Paramecium primaurelia* zu etablieren, war es hierbei vor allem wichtig einen Ansatzpunkt für die Sequenzierung unbekannter Serotypproteingene zu erhalten. Es wurden dafür zunächst zwei Lösungsansätze besprochen.

Zum einen sind bei einer großen Zahl von *Paramecium*-Stämmen sogenannte Konsensus-Regionen bekannt (BREUER, SCHULTE, SCHWEGMANN & SCHMIDT, 1996). Diese liegen im nichtkodierenden Bereich vor und nach den Oberflächenstrukturgenen. Es wird angenommen, dass diese Sequenzen nicht nur regulatorische Aufgaben erfüllen, sondern darüber hinaus auch für alle Oberflächenproteingene existieren (BREUER, SCHULTE, SCHWEGMANN & SCHMIDT, 1996). Da dieses Vorhandensein solcher Konsensusregionen, die sich zudem untereinander sehr ähnlich sind, eine Möglichkeit darstellt, um ein unbekanntes Gen über die gesamte Länge zu amplifizieren, wurde mit Hilfe sog. Konsensusprimern eine Long Run PCR mit zuvor isolierter genomischer DNA der Stämme 41 und 60 (Spezies *Paramecium primaurelia*) durchgeführt.

Erwartungsgemäß ließen sich auf dem resultierenden Gel des PCR-Produkts verschiedene Banden in der gewünschten Größe diagnostizieren (vgl. Abb. 4-52). Diese entsprechen in etwa der Größe von Oberflächenproteingenen. Das Annealen der Konsensus-Primer deutet darauf hin, dass auch für die Gene der Oberflächenproteine 41 und 60 diese sogenannten Konsensus-Regionen existieren.

Auf das Modell (s. Abb. 1-1) übertragen, das Thai und Forney (1999) zum besseren Verständnis der Serotypexpression erstellten, würden diese nichtcodierenden Konsensus-Regionen den Bereichen entsprechen, an denen der allgemeine Aktivator anbindet. Da diese Sequenz bei der mRNA-Synthese nicht mittranskribiert wird, könnte die Funktion dieses Bereiches ähnlich der einer Promotorregion entsprechen, die das Ablesen des sich dahinter befindenden Oberflächenproteingenes ermöglicht. Erst dadurch wäre die Anlagerung eines genspezifischen Aktivators zu Beginn der codierenden Region möglich.

Die Existenz der Konsensus-Regionen bei den Stämmen 41 und 60 erhärtet nun die Vermutung von Breuer, Schulte, Schwegmann & Schmidt (1996), dass es sich bei diesen um regulatorische Sequenzen handelt.

Unterzieht man das erhaltene Long Run PCR-Gel einer genaueren Betrachtung, fällt auf, dass für den Stamm 41 drei Banden amplifiziert werden konnten, für Stamm 60 jedoch lediglich zwei.

Simon, (unveröffentlichte Daten), erhielt in einem analog durchgeführten Experiment mit den Stämmen 168 und 156 (*P. primaurelia*) je drei Banden. Er konnte durch Hybridisierung mit oberflächenspezifischen RT-PCR Produkten zeigen, dass es sich bei der größten Bande um die Gene des Serotyps G (156G, 168G) handelt und bei der mittleren Bande um das Gen des Oberflächenproteintyps D (156D, 168D). Schließlich konnte er die kleinste Bande als den Serotyp S (156S, 168S) verifizieren. Da für Stamm 41 alle drei Banden deutlich sichtbar sind, lässt sich mit ziemlicher Bestimmtheit vermuten, dass die Banden aus der Amplifikation der entsprechenden Serotyppgene 41G, 41D und 41S resultieren.

Dahingegen treten bei Stamm 60 nur zwei Banden auf; die oberste, bei der es sich vermutlich um 60G handelt, fehlt.

Als Grund hierfür könnte angeführt werden, dass für den Serotyp G bei Stamm 60 eine andere Konsensus-Region codiert und deshalb die verwendeten Konsensus-Primer nicht anbinden.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse für Stamm 60, mit den dazugehörigen Temperaturbereichen, in denen die Serotypen ausgeprägt werden (BEALE, 1954), fällt gegenüber Stamm 156 auf, dass das Serotypprotein 60G nur in dem eng begrenzten Temperaturbereich von ca. 18°C - 24°C ausgeprägt wird (Abb. 1-2). Dies steht im Ge-



gensatz zu dem sehr stabil ausgeprägten Serotypprotein G, das zwischen 10°C und 32°C exprimiert wird.

Die geringere Temperaturtoleranz des Serotypproteins 60G könnte einhergehen mit der anders kodierten Konsensus-Region. Der Schluss liegt nahe, dass die Konsensus-Region von 60G aufgrund der anderen Sequenz, eine geringere Affinität zum Aktivatormolekül besitzt, als die beiden Konsensusregionen der Gene 60D und 60S. Als Folge davon würde das Gen für 60G weniger exprimiert und es ließe sich vermuten, dass aus dieser Tatsache heraus das Oberflächenprotein 60G weniger stabil ausgeprägt wird, als die beiden anderen Serotypgene 60D und 60S.

Um zu verifizieren, ob es sich bei den gefundenen Banden tatsächlich um Gene für Serotypproteine handelt, sollten die Banden subkloniert und anschließend das erhaltene Plasmid sequenziert werden. Aufgrund der heutigen Technik ist es bisher jedoch nicht möglich ein 8kb großes Fragment von einer Silica-Matrix zu eluieren, da die Bindungsaffinität zwischen der handelsüblichen Matrix und dem äußerst großen Fragment zu hoch ist. Aufgrund dessen konnte mit den erhaltenen Fragmenten keine Sequenzanalyse durchgeführt werden.

Folglich wurde nach einem zweiten Lösungsansatz gesucht, um wenigstens kleinere Fragmentbereiche der Serotypproteingene von 41 und 60 in ihrer Basenabfolge aufzuklären.

Tatsächlich zeigte ein Alignment der beiden Sequenzdaten für 156G (BOURGAIN-GUGLIELMETTI, 1996) und 168G (PRAT, 1990), dass große Sequenzhomologien bestehen.

Deshalb wurde der Versuch unternommen, die bereits für die RT-PCR verwendeten Primerpaare (Abb. 4-7) auch auf die beiden bisher nicht untersuchten Oberflächen-gene der Stämme 41 und 60 anzuwenden.

Tatsächlich resultierte durch das Benutzen der Primerpaare der diagnostischen Banden von 156G und 156D Banden in gleicher Größe für die Stämme 41 und 60.

Für Stamm 41 wurden diese Banden entsprechend als 41G und 41D und für Stamm 60 als 60G und 60D bezeichnet.

Diese erhaltenen Banden wurden nun aus dem PCR-Produkt aufgereinigt, in den Blue White Skript Vektor pGEMT inkloniert und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen.

Aufgrund der erhaltenen Sequenzdaten, sowie des serotypgenspezifischen G/C-Gehaltes der untersuchten Fragmente, lässt dies den Schluss zu, dass es sich hierbei um Teilstücke aus oberflächenproteincodierenden Genen handelt. Zudem sind die verschiedenen untersuchten Fragmente zu 85-95% in ihrer Basenabfolge homolog. Unterschiede waren vor allen Dingen für die beiden Fragmente für 60G, 60D, sowie 41G zu verzeichnen.

Da für alle untersuchten einklonierten Fragmente Unterschiede von bis über 40 ausgetauschter Basen auftraten, kann angenommen werden, dass es sich hierbei nicht um Fehler, der in der PCR oder anschließenden Sequenzierungsreaktion verwendeten Polymerasen, handelt. Nach Herstellerangaben (Promega) liegt die Fehlerrate bei einer *Taq-Polymerase* bei 1:1000. Das heißt es dürfte im schlechtesten Fall nur jede 1000. Base aufgrund eines Enzymfehlers falsch in den synthetisierten Strang eingebaut werden. Somit ist ein Enzymfehler auszuschließen.

Da die Sequenzhomologie der beiden untersuchten homologen Fragmente bis zu 85-95% übereinstimmt, ist es ebenso unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Gene handelt. Doch wie lassen sich die unterschiedlichen Formen dieser offensichtlich so ähnlichen Fragmente erklären?

Ein Hinweis zur Lösung dieser Frage findet man in einem 2001 veröffentlichten Artikel (DUBRANA & AMAR, 2001). Darin wird ein erst kürzlich gefundenes Pseudo-G Gen ( $\psi$ G) für Stamm 156 beschrieben. Dieses ist in großen Teilen homolog zu dem bekannten 156G Serotypgen, jedoch kürzer. Zudem wird dieses gefundene  $\psi$ G Gen, wie bisher alle dokumentierten Pseudo-Gene nicht exprimiert.

Sollte es sich bei einem der in dieser Arbeit gefundenen Fragmente um Teile aus einem Pseudo-Gen für 60G, 60D und 41G handeln, so würde dies die vorhandenen Sequenzunterschiede erklären.

Experimentell lässt sich diese Frage sehr einfach klären. Man müsste statt der vorher verwendeten genomischen DNA aus einer, das Serotypprotein 60G ausprägenden Zelle die mRNA isolieren und anhand der vorhandenen Primer eine RT-PCR durchführen. Das erhaltene Produkt könnte man subklonieren und wiederum in einer Sequenzierungsreaktion einer Sequenzanalyse unterziehen. Die ermittelte Basenabfolge müsste mit der in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen verglichen werden. Erhält man nur ein Fragment von dem aus der RT-PCR gewonnene Produkt, würde dies bedeuten, dass die Sequenz des anderen Fragmentes nicht exprimiert wird.

Somit könnte es sich hierbei bei dem gefundenen , nicht exprimierten Fragment, wie bei Stamm 156 um ein Pseudo-Gen handeln. Analoge Untersuchungen könnten das Vorhandensein von Pseudo-Genen bei den beiden anderen Serotypgenen 41G und 60D aufklären.

Anhand der erfolgten Untersuchungen lässt sich die bisher nur auf den sequenzierten Stamm 156 erfolgreich verwendete RT-PCR Methode auch auf die Stämme 41 und 60 anwenden. Dies ist vor allem bei Stamm 60 günstig, da dieser über ein besonders gut zu induzierendes Serotypprotein S verfügt (BEALE, 1954). Die Suche nach Serotypprotein S bereitete bei Stamm 156 bisher Schwierigkeiten (SIMON, 2002), weil dieser nur in der Kälte und unter Hungerbedingungen induzierbar ist. Ebenso war es für Stamm 60 schwierig das Serotypprotein S rein zu induzieren, weil für keines der vermutlich drei stabil ausgeprägten Serotypproteine (G, D und S) Antiseren im Labor existieren. So war es bisher nicht möglich die verschiedenen Serotypen des Stammes 60 auseinander zu halten.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann man nun mittels RT-PCR sowohl bei Stamm 41, als auch bei Stamm 60 leicht die Expression der beiden Serotypproteine G und D unterscheiden und ist nunmehr unabhängig von der Herstellung polyklonaler Antiseren. Dies erleichtert die Identifizierung des Serotypproteins S und trägt damit zur Aufklärung der Serotypexpression unter niedrigen Temperaturen oder unter Nahrungsmangel bei, was auch für die Erforschung des Freilandverhaltens von Paramecien wichtig ist.

Ein anderer wichtiger Punkt ist, dass nun erstmals Teilstücke von Serotypgenen der Stämme 41 und 60 untersucht wurden. Diese Teilstücke können wiederum als Ausgangspunkt für die Sequenzaufklärung angrenzender Genbereiche dienen, so dass man letztendlich durch diese Methodik in der Lage ist, die gesamte Basenabfolge der Gene 41D, 41G sowie 60D und 60G zu entschlüsseln. Wie bereits oben erwähnt lassen sich dadurch bei beiden Stämmen eventuell vorhandene Pseudo-Gene ermitteln.

### 5.3 Experimente zur Serotyptransformation

Nach Literaturangaben ist bekannt, dass Zellen durch gezielte Induktion mittels Veränderung von Umweltreizen mit einer Serotyptransformation reagieren (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989; BEALE, 1954). Als best untersuchtester Faktor gilt dabei immer noch die Temperatur, da sie unter Laborbedingungen gut kontrollierbar ist (AUSTIN, 1963a; BEALE, 1957). Jedoch sind auch andere abiotische Umweltreize bekannt, wie etwa pH-Wert oder der Salzgehalt des Mediums oder das Medium selbst (BEALE, 1954). Auch biotische Faktoren, wie die Anwesenheit von Räuberorganismen scheinen eine Wirkung auf die Ausprägung des Serotyps zu besitzen (HARUMOTO & MIAKE, 1992).

Doch erfolgten viele dieser Untersuchungen bei *Paramecium tetraurelia*, das über ein wesentlich größeres Repertoire von Serotypproteinen verfügt als *Paramecium primaurelia*.

Da *Paramecium primaurelia* nur drei stabil ausprägbare Oberflächenproteine besitzt und zudem bei allen diesen erwähnten Faktoren bisher nicht untersucht ist, ob Schwellenwerte zur Serotyptransformation existieren, ergab sich die Frage, wie *Paramecium primaurelia* auf die Veränderung unterschiedlicher Umweltreize reagiert.

Im Laufe dieser Experimente wurde deshalb die Auswirkung von veränderten Umweltbedingungen auf den Serotyp von Zellen des Stammes 156 getestet. Zusätzlich wurde während dieser Untersuchungen die Populationsdichten der Paramecien ermittelt, um Aussagen über den Zustand der Zellen machen zu können. Unterliegen die Zellen nämlich Stress verursachenden Umweltparametern, so lässt sich das anhand der Wachstumsrate der Population dokumentieren.

Da dieser Arbeit unter anderem freilandrelevante Fragen zugrunde liegen, wurden vor allem diese Faktoren getestet, die auch unter freilandnahen Bedingungen in natürlichen Habitaten eine Rolle spielen. Zu ihnen zählen die Temperatur, der pH-Wert, das Nahrungsangebot, das umgebende Medium, die Salinität, sowie die Anwesenheit von Räuberorganismen. Andere transformierend wirkende Umweltreize wie etwa die Aussetzung der Zellen chemischer Agentien (BEALE, 1954; AUSTIN, 1963b) wurden außen vor gelassen, weil sie in verschmutzten Gewässern zwar vorkommen, jedoch die Reaktionen der Zellen unter „natürlichen“, schadstofffreien Bedingungen getestet werden sollten.

Zunächst wurde der Ablauf eines temperaturinduzierten Serotypwechsels bei Stamm 156 von Oberflächenprotein 156G zu 156D, sowie umgekehrt beobachtet (vgl. Kap.4.2.1).

Im Verlauf der beiden Experimente zeigte sich jedoch, dass der Wechsel von 156G nach 156D relativ langsam von statten geht (nach 45h Stunden erster Nachweis der neu induzierten mRNA, nach 4 Tagen der Nachweis des ersten Proteins auf der Membran), während der umgekehrte Wechsel von 156D nach 156G sehr schnell verläuft (Auftreten der neuen mRNA schon nach 6 Stunden, Proteinnachweis nach zwei Tagen).

Dies könnte man damit erklären, dass für den Wechsel von Serotypprotein G zum Serotypprotein D ein nochmaliges Absenken der Temperatur auf 4°C erfolgte. Das ist nötig um einen vollständigen Wechsel der gesamten Kultur zu Serotyp 156D zu erreichen. Erfolgt die Inkubation über Nacht bei 4°C nicht, reagiert die zu transformierende Kultur indifferent und es kommt bei einem großen Anteil der Zellen zur Ausprägung eines Mischzustandes 156G/D. Mit der Abkühlung der Zellen korreliert automatisch ein erniedrigter Stoffwechselumsatz (RGT-Regel). Mit dieser Minimierung einhergehend wird wahrscheinlich der Promotor für das 156G-Gen ausgeschaltet. Dies hätte dann zur Folge, dass das Serotypprotein G nicht oder nur noch geringfügig exprimiert würde. Werden die Zellen dann der höheren Temperatur ausgesetzt (Zeitpunkt 0 des Versuches), muss der Stoffwechsel erst wieder aktiviert werden. Es wird jedoch aufgrund der hohen Temperatur nur der Promotor für den entsprechenden Serotyp D aktiviert, was wiederum in einer reinen Expression des Oberflächenproteins 156G resultiert.

Wird in den Versuchen jedoch auf das Abkühlen der Zellen verzichtet, führt dies zu einer Koexpression von 156D/G. In diesem Falle wäre der 156G-Promotor nicht deaktiviert worden und würde weiterhin das „ursprünglichen“ Oberflächenproteingens veranlassen.

Im Gegensatz dazu funktioniert der umgekehrte Wechsel von der höheren Kultivierungstemperatur zur niedrigeren problemlos auch ohne Abkühlung der Zellen, da der Promotor für 156G vermutlich stärker ist, als der entsprechende Promotor des 156D Gens. Somit lässt sich das unterschiedliche Verhalten der Zellen während einer temperaturinduzierten Serotyptransformation erklären.

Ein weiterer Punkt zur kontroversen Diskussion ergibt sich durch Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Beobachtungen, die von Capdeville (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989) publiziert wurden. Hierbei beschreibt sie den Ablauf eines serotyp-induzierten Wechsels auf der Zellmembran durch Immuno-Gold-Markierung und Immunofluoreszenzfärbungen. Obwohl die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sich genau an den beschriebenen Untersuchungen von Capdeville orientieren, konnte Capdeville die Oberflächenproteine viel früher auf der Membran, als in den von mir durchgeführten Versuchen, nachweisen. So zeigte sich bei ihr das neue Protein schon nach 12h, in denen hier aufgeführten Versuchen gelingt der erste Nachweis der neu synthetisierten Proteine auf der Membran erst nach mehreren Tagen. Diese Beobachtungen wurden von Herrn Momayezi bestätigt (persönliche Mitteilung).

Der Grund für die weniger schnelle Antwort der Zellen auf den veränderten Temperaturreiz, könnte in der Zusammensetzung des verwendeten Mediums liegen. So ist das für das Kultivierungsmedium benutzte WGP ein Naturstoff und schwankt in Zusammensetzung und Nährstoffgehalt enorm. Ein höherer Nitrat und Phosphat-Gehalt des WGP-Mediums bei Capdeville könnte zu einer stärkeren Vermehrung der Futterbakterien geführt haben, wodurch die Paramecien mit einem besseren Wachstum und damit einer schnelleren Synthese von Oberflächenproteinen geantwortet hätten.

Ergänzend zu den Ergebnissen von Capdeville konnte durch die etablierte Methode der RT-PCR ein Einblick auf die Abfolge eines Serotypwechsels erlangt werden. Durch den Nachweis von oberflächenspezifischer mRNA konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Neuinduktion eines Serotyps um eine de Novo Synthese handelt, die mit einer vorangeschalteten mRNA-Bildung gekoppelt ist (AUSTIN, PASTERNAK & RUDMAN, 1967a). Hierbei dauert es eine gewisse Zeit, bis die Synthese der mRNA beginnt. In der Zwischenzeit wird von der Zelle weiterhin die mRNA für das ursprüngliche Serotypprotein gebildet.

Dieses Ergebnis würde die Theorie stützen, dass bei der Serotyptransformation der auslösende Reiz eine Signaltransduktionskaskade (CAPDEVILLE, 1979a, b) in Gang setzt, die einige Zeit benötigt, bis das Gen für das neue Protein aktiviert und danach abgelesen wird.

Zusätzlich würde die Zeitverzögerung für das von Forney und Thai (1999) entwickelte Schema mit Aktivator- und Repressormolekülen sprechen (s. Abb.1-1). Um ein neues Gen zu aktivieren, müsste die Bildung entsprechender spezifischer Aktivator- und Repressormoleküle, ausgelöst durch einen veränderten Umweltreiz, angeregt werden. Diese binden an die nichtkodierenden Regionen des neu abzulesenden Gens, und bewirken damit ein Ablösen der Repressormoleküle an der zentralen kodierenden Region des Gens. Für diesen Serotyp wird nun die neue mRNA gebildet. Mit dieser mRNA-Synthese korreliert, könnte die Bildung der Repressormoleküle einhergehen, die dann durch Anbindung an das immer noch aktive Gen für das alte Serotypprotein das Ablesen des „alten“ Serotypproteingens durch ein Ablösen der alten Aktivator- und Repressormoleküle (evtl. durch Konformationsänderung) bewirken würde. So wäre das exprimierte Gen gleichzeitig für das „Abschalten“ der Transkription des alten Proteingens verantwortlich.

Aufgrund dieser Theorie wäre nun auch die Tatsache erklärbar, weshalb es für einen kurzen Zeitraum während der Serotyptransformation zur gleichzeitigen Expression des alten und des neuen Oberflächenproteins kommt.

In weiterführenden Experimenten wurde untersucht, welche Faktoren zu einer Serotyptransformation führen können. Als Schwerpunkt wurde die Ermittlung von Schwellenwerten gesetzt, sowie die Auswirkung eines multifaktoriellen Einflusses der Umweltreize auf die Ausprägung des Serotyps der untersuchten Zellen dokumentiert.

Im Nachhinein zeigte sich, dass Faktoren existieren, die einen sehr großen Einfluss auf die Ausprägung des Serotyps haben, währenddessen andere keinerlei oder nur geringfügig serotyptransformierende Wirkung erkennen lassen, obwohl dies in der Literatur generell für alle *Paramecium*-Arten angenommen wird (BEALE, 1954,). Auch hier könnte der Grund für das allgemeine Abweichen gegenüber der „normalen“ Verhaltensweise liegen. Fast alle Untersuchungen zur Signalverarbeitung von Umweltparametern fanden an *Paramecium tetraurelia* statt (z.B. PAQUETTE ET AL., 2001). *Paramecium primaurelia* hingegen, mit seinem limitierten Repertoire an Serotypgenen, antwortet unter Umständen ganz anders auf Umwelteinflüsse. Dies zeigt wiederum, wie wichtig es ist, die Erforschung der Serotypexpression auf die Art *Paramecium primaurelia* auszuweiten.

Als nicht wirksame Umweltreize hatte sich die Anwesenheit von räuberischen Organismen sowie eine erhöhte Salinität herausgestellt. Beide Faktoren wirken zwar limitierend auf die Zelldichte der untersuchten Kulturen, was bedeutet, dass die Zellen einem enormen Stress ausgesetzt sind. Ähnliches ist von Zellen des Stammes 156 unter Hungerstress bekannt. Bei geringem Nahrungsangebot ist eine Induktion des Serotyps 156D nicht durchführbar (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989; CZUBATINSKI, 1998). Statt wie angenommen einen Serotypwechsel durch den Einfluss dieser Stressfaktoren zu durchlaufen, reagieren die getesteten Zellen nicht mit einer Änderung des Serotyps. Vielmehr scheint die Anwesenheit dieser Faktoren die Ausprägung des 156G Proteins zu stabilisieren.

Erklärbar wäre diese Reaktion vielleicht damit, dass durch den Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind, zu viel Energie aufgewendet werden muss, um zu überleben. Dass eine Serotyptransformation von der Verfügbarkeit von Energie und Metaboliten für die RNA- und Proteinsynthese abhängt, äußerten schon Austin et al. (1967a).

Bei erhöhter Salinität muss das komplexe System der kontraktilen Vakuolen wesentlich mehr leisten, um im Zellinnern eine gleichbleibende Konzentration der Salzverteilung sicherzustellen. Durchläuft die Zelle keine Serotyptransformation, können zumindest die Kosten der Signaltransduktionskaskade eingespart werden, die bei einem Serotypwechsel anfallen würden.

Die Signalweiterleitungskette ist vermutlich durch den Inositol-Phospholipid-Signalweg des GPI-Ankers an ein „second messenger“-System gekoppelt (KOVACS & CSABA, 1995; KOVACS, 1996), das zur Aktivierung verschiedener Enzyme (z.B. Proteinkinase C) Energie durch die Abspaltung von Phosphatgruppen benötigt. Zusätzliche Energiekosten würden der *Paramecium*-Zelle durch die Neusynthese von Repressormolekülen und Aktivatoren entstehen. Ist es der Zelle aufgrund der Stresssituation nicht möglich diese Energie zur Verfügung zu stellen, resultiert dies in der fehlenden Bereitschaft eine Serotyptransformation zu durchlaufen.

Andererseits ist die Ausprägung eines salzabhängigen Serotyps, ausgehend vom Serotyp S bei Stamm 60 (persönliche Mitteilung), von Beale dokumentiert worden. Auch für andere Ciliaten z.B. *Tetrahymena pyriformis* wurde ein Serotypprotein „St“ beschrieben, das nur durch eine erhöhte Salzkonzentration induzierbar ist (GRASS, 1972).



Auch im zweiten Fall, der Anwesenheit von Räubern, wurde eine Serotyptransformation, ausgelöst durch Fressfeinde, schon dokumentiert (HARUMOTO & MIAKE, 1992). Sundermann et al. (1986) konnten ebenso einen Zusammenhang zwischen der erfolgreichen Fangrate des Räubers *Discophrya collini* und der Anwesenheit von frei zugänglichen Oberflächenstrukturen der Beute *Tetrahymena pyriformis* feststellen. Wurden die *Tetrahymena*-Zellen mit ciliärem Antiserum behandelt, was zum Verkleben der Cilienspitzen führte, sank die Fangrate der Räuber von über 90% auf etwa 10%. Eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Räubern und einer Induktion eines Serotypwechsels zum Schutz seitens der Beute konnte nicht nachgewiesen werden.

Vielmehr ist denkbar, dass durch die Anwesenheit räuberischer Organismen die Zellen ebenfalls einem hohen Stressfaktor unterliegen. Sie müssen durch Ausweichen reagieren, um nicht gefressen zu werden.

Beide Situationen (Prädationsdruck und Salzstress) könnten so energieaufwendig für die Zelle sein, dass sich die Neusynthese von anderen Serotypproteinen nicht lohnt (s.o.). Statt dessen wird das Serotypprotein 156G einfach auf der Zellmembran belassen.

Interessant wäre im Hinblick auf diese Vermutungen eine quantitative Untersuchung der gebildeten mRNA für das Serotypprotein 156G. Würde diese bei Anwesenheit von Räubern oder extremer Salzkonzentration abfallen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Zelle versucht Energie durch die verringerte Synthese von Oberflächenproteinen einzusparen.

Andere getesteten Faktoren zeigten eine positive Wirkung im Hinblick auf eine Serotyptransformation:

Als wichtig, und in der Literatur noch nicht besonders erwähnt, erwies sich der Einfluss des Nahrungsangebotes auf die Expression von Serotypproteinen. In den durchgeführten Experimenten sank die Zahl von serotypreinen 156D Zellen bei der Kultivierungstemperatur von 33°C auf bis zu 10% ab, während die Anzahl der Mischzellen D/G auf fast 90% anstieg. Bei erneuter Futterzugabe wurde der Effekt jedoch wieder umgekehrt (s. Abb. 4-23). Auch in diesem Fall scheint sich ein Stresszustand, nämlich die hohe Kultivierungstemperatur stabilisierend auf das Serotypprotein G auszuwirken.

Dahingegen ließen sich Zellen bei Temperaturen um 10°C unter guten Futterbedingungen nicht zu einem Serotypwechsel zu dem Oberflächenprotein S bewegen

(SIMON, 2002). Erst bei langanhaltendem Nahrungsmangel erfolgte eine Umstellung der Serotypproteine auf 156S. Hier scheint eine Stabilisierung des Serotypproteins G nicht zu erfolgen. Die Gründe hierfür konnten jedoch bislang nicht geklärt werden.

Weitere Experimente sollten die Frage klären, welche Wirkung eine Kombination von pH-Wert und Medium auf den Serotyp einer Kultur hat.

Es zeigte sich, dass die Zellen mit einem veränderten Serotyp reagieren, wenn der pH-Wert besonders sprunghaft und nachhaltig anstieg. Eine langsame Adaptation an eine veränderte Protonenkonzentration wirkte sich nicht auf die Serotypausprägung der Zellen aus. Dies kann vor allen Dingen dadurch erklärt werden, dass die Zellen erst mit einem veränderten Serotyp reagieren, wenn ein Schwellenwert erreicht ist. Beim Faktor des pH-Wertes genügte die Erhöhung oder Erniedrigung um eine pH-Stufe, damit bei den Zellen ein anderer Serotyp induziert wurde. Dahingegen führte ein nur langsames Erhöhen der Protonenkonzentration (z.B. aufgrund der Pufferwirkung vom benutzten Medium) nicht zu einer Serotyptransformation.

Das Phänomen der Adaptation, von Zigmond & Sullivan (1979) definiert als eine reversible Gewöhnung an chemische Agentien des umgebenden Milieus der Zellen, führt zu einem Ausfall der Zellantwort auf den Reiz. Bei vielen Protozoen ist diese Gewöhnung an chemische Substanzen bekannt. *Paramecium* reagiert, wird es hohen Konzentrationen an Kalium-Ionen ausgesetzt, normalerweise mit einer rückwärts gerichteten Schwimmbewegung. Werden die Zellen jedoch langsam an die erhöhte Ionenkonzentration gewöhnt, erfolgt eine Adaptation an die veränderte Umweltsituation und die negativ-chemotaktische Reaktion bleibt aus (KAMADA & KINOSITA, 1940). Dass eine Reizgewöhnung auch für eine Zellantwort, in der Serotypproteine involviert sind, erfolgt, ist sehr wahrscheinlich.

Dieses Verhalten ist im Hinblick auf die Freilandsituation, der die Zellen normalerweise ausgesetzt sind auch erklärbar. Für *Paramecium*-Zellen, die nicht nur in großen Gewässern vorkommen, sondern mitunter auch in kleinen Habitaten wie z.B. „Pfützen“ leben, würde ein ständiger Wechsel des Oberflächenproteins, ausgelöst durch geringfügige pH-Wert Änderungen, ein erheblicher Energieaufwand bedeuten. Solche pH-Wert Änderungen können in Mikrohabitaten schon durch einen kräftigen Regen ausgelöst werden.

Die Beobachtung, dass ein Serotypwechsel mit einem stark veränderten Umweltreiz korreliert, würde ebenso mit der bereits erwähnten Tatsache übereinstimmen, dass

ein temperaturinduzierter Wechsel nur durch einen starken Temperaturunterschied induzierbar ist (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989).

Andererseits führte eine extrem starke Erniedrigung bzw. Erhöhung des pH-Wertes zu keinerlei Serotypwechsel der getesteten Kulturen. Auch diese Ergebnisse lassen sich wiederum durch den Stress erklären, dem die Zellen unterliegen, wenn sie zum Beispiel bei pH5 kultiviert werden. Dass diese Situationen Stress für die Paramecien bedeutet, zeigen die geringen Zellzahlen und minimalen Zuwachsraten während dieser Experimente.

Das verwendete Kulturmedium zeigte nur indirekt Einfluss auf die Induktion eines alternativen Serotyps. Vielmehr gewinnt man den Eindruck, dass das verwendete Medium sich stärker auf die Vermehrungsrate der Futterbakterien auswirkt, was wiederum positiv die Parameciendichte beeinflusst. Und da vermehrt nur bei gutem Nahrungsangebot ein Serotypwechsel der Zellen stattfindet (eine Ausnahme bildet nur der Serotyp S), erleichtert zum Beispiel die Verwendung von Strohmedium die Serotyptransformation, während das Kultivieren der Zellen in reinem Teichwasser kaum zu einer Veränderung der Oberflächenproteine führt.

Die durchgeführten Experimente zur Serotyptransformation bei *Paramecium primaurelia* zeigen, wie unterschiedlich die Zellen auf einzelne veränderte Umweltreize reagieren. Schon die Kombination zweier Parameter führte bei den Zellen zu komplexen Antworten hinsichtlich ihrer Serotypausprägung. Im Hinblick auf die Freilandsituation, bei denen die Zellen unter multifaktoriellem Einfluss stehen, zeigt, wie schwierig eine Voraussage über die Serotypantwort auf mehrere gleichzeitig einwirkende Faktoren sein kann.

Auffallend ist jedoch jetzt schon, dass im Freiland nicht nur die Temperatur, sondern im speziellen auch das Nahrungsangebot als limitierender Faktor eine große Rolle für die Serotypausprägung von *Paramecium primaurelia* spielen wird.

## 5.4 Freilandexperimente

Über 50 Jahre fand intensive Serotypproteinforschung an dem Modellorganismus *Paramecium* hauptsächlich unter Laborbedingungen statt. Der Hauptgrund hierfür ist einfach: Es lassen sich, im Gegensatz zu Freilandversuchen, im Labor alle Umweltbedingungen bestens kontrollieren und zudem ist das Versuchsobjekt so klein, dass man es gut in Gefäßen kultivieren und über Generationen hinweg beobachten kann. Erst seit etwa 20 Jahren ist man sich der Bedeutung von Protozoen in aquatischen Ökosystemen bewusst (LANDIS, 1982). Hierbei stellt *Paramecium* einen dominierenden Anteil der in Gewässern vorgefundenen Ciliaten dar. Jedoch beschränkten sich Freilandversuche vorwiegend auf die Feststellung von Abundanzen und das Sammeln neuer Stämme, die dann im Labor nach einer Anzucht zu Kleinkulturen den Serotypgruppen zugeordnet wurden (BEALE, 1947; 1954).

Gleichwohl wurden Freilandarbeiten zur Populationsbiologie durchgeführt (u.a. HAIRSTON, 1967).

Serotypuntersuchungen unter Freilandbedingungen stellten die Wissenschaftler jedoch vor große Probleme. Zur Serotypbestimmung der im Freiland gesammelten Paramecien, die zuerst nach ihrer Artzugehörigkeit eingeordnet werden müssen, sind große Zellzahlen nötig. Diese Einordnung stellt bei *Paramecium caudatum* aufgrund seiner Größe und Zellform und im Falle von *Paramecium bursaria* aufgrund der photoautotroph lebenden Endosymbionten, kein Problem dar. Die Schwesternarten des *Paramecium aurelia* Komplexes ähneln sich jedoch so sehr untereinander, dass deren Artzugehörigkeit nur aufgrund von Paarungstypreaktionen zu bestimmen war. Die Zeit, die bis zur eindeutigen Identifizierung der Zellen verging, genügte, um eventuell einen Serotypwechsel, der ursprünglich im Freiland ausgebildeten Oberflächenproteine durch die im Labor vorhandenen Umweltparameter auszulösen. Aufgrund dessen war die Serotypbestimmung von Freilandzellen experimentell nicht durchführbar.

Dies änderte sich erst durch die Etablierung einer RAPD-Fingerprint-Methode, die eine eindeutige Artbestimmung innerhalb kürzester Zeit durch ein diagnostisches DNA-Fingerprint-Muster ermöglichte (Stoeck & Schmidt, 1998).

In jüngerer Zeit wurden auf Grund dieser Methode von Czubatinski im Rahmen seiner Diplomarbeit erste Experimente zur Serotypexpression im Freiland in der Abteilung für Ökologie der Universität Kaiserslautern (1998) durchgeführt. Er untersuchte vor allen Dingen die Serotypausprägung an einem Schönungsteich der Kläranlage in Weilerbach mit Hilfe des von Capdeville hergestellten monoklonalen Antikörpers Y4-IgG (CAPDEVILLE ET AL., 1987b). Dieser besitzt die Besonderheit, dass er stammübergreifend spezifisch an Oberflächenproteine des Serotyps G der Art *Paramecium primaurelia* bindet und somit ein artspezifischer Marker für die Serotypproteine G darstellt. Da dieser monoklonale Antikörper jedoch nur sehr begrenzt in der Arbeitsgruppe zur Verfügung steht, sollte auf seine Verwendung weitestgehend verzichtet werden.

Statt dessen wurden anhand der vorangegangenen Untersuchungen Experimente geplant, die unter freilandnahen Umweltparametern durchgeführt wurden, jedoch unabhängig von der Anwendung des monoklonalen Antikörpers waren.

Für diese Zwecke wurden zwei von drei Teichen vor dem Laborgebäude so umgebaut, dass sie in ihrer Temperatur regulierbar waren.

Es wurden ein Wärmeteich (33°C), sowie ein kühlbarer Teich (10°C) installiert und durch Animpfen mit *Paramecium*-Kulturen, sowie Futterbakterien wurden freilandnahe Experimente durchgeführt. Die beobachteten Ergebnisse wurden dann mit den zuvor unter Laborbedingungen erhaltenen Ergebnissen verglichen.

Für alle Untersuchungen zur Serotypexpression unter naturnahen Konditionen wurden ausschließlich immunologische Methoden (Immobilisierungsreaktion und Immunofluoreszenzmarkierung) verwendet, da sich herausstellte, dass die Menge an mRNA, die die ausgesetzten Zellen produzierten, nicht genügte um mit der herkömmlichen RT-PCR Methode einen spezifischen Nachweis zur Expression der Serotypproteingene zu erbringen.

Der beheizbare Teich:

Die Versuchsdurchführung im Wärmeteich zeigte sich als besonders schwierig. Durch die hohen Temperaturen trat eine Massenentwicklung räuberischer Organismen wie *Didinium nasutum*, *Daphnia pulex* und *Vorticella spec.* auf, so dass eine Beobachtung der Serotypentwicklung der ausgesetzten Paramecien aufgrund des Räuberdrucks unmöglich war.

Ein hoher Prädationsdruck ist in der Literatur vor allem in den Sommermonaten erwähnt, wo aufgrund der Räuberdichte nur sehr geringe Abundanzen von *Paramecium*-Zellen dokumentiert werden können. Dies stellte auch Groß im Rahmen ihrer Diplomarbeit (1997) fest. Bei Untersuchungen von ca. 40 Gewässern konnte sie insbesondere dort, wo ein hoher Prädationsdruck durch hohe Dichten an Rotatorien und Copepoden herrschte, keine *Paramecium*-Zellen nachweisen.

Weitere Studien zeigen ebenso die große Rolle auf, die Räuberpopulationen gegenüber Ciliatengemeinschaften besitzen. Die Ciliaten dienen den Prädatoren als bedeutende Nahrungsressource (PORTER ET AL., 1985). Dies bestätigten ebenfalls Jürgens et al. (1985), die dokumentierten, dass Ciliaten durch den von Copepoden ausgeübten Fraßdruck zu über 50% reduziert werden können.

Auch Stoeck beobachtete bei Untersuchungen zur Populationsdynamik der *Paramecium*-Arten an der Lauter einen Dichteeinbruch der *Paramecium*-Population während der Monate Mai - Juli, resultierend aus der erhöhten Crustaceen-Dichte (STOECK, 1998).

Untersuchungen von Landis (1981) zeigten zudem, dass die Verbreitung von Paramecien unter Umständen starken Schwankungen unterliegen. So konnte er während der Beprobung eines Gewässers in einem Jahr während der Sommermonate keine *Paramecium*-Zellen nachweisen, während er im folgenden Sommer hohe Abundanzen feststellen konnte.

Der Wärmeteich entspricht einem Freilandgewässer unter sommerlichen Bedingungen. Im Gegensatz zum realen Freilandgewässer sind die hohen Temperaturen jedoch durchgehend über das ganze Jahr vorhanden und nicht saisonalen Schwankungen unterworfen. Die Erwärmung auf diese extremen Temperaturen (33°C) erfolgte konstant, so dass in Folge dessen die Teichtemperatur innerhalb der verschiedenen litoralen Zonen homogen verteilt war. Zudem wurde er nicht nur tagsüber, sondern auch nachts auf die hohe Temperatur einreguliert.

In „echten“ Freilandgewässern sieht die Situation jedoch anders aus. So kommt es bei kleineren Gewässern durch die Einstrahlung der Sonne zwar zur Erwärmung der oberen Schicht der Wassersäule auf extrem hohe Temperaturen. Doch nachts kühlt der Teich automatisch durch die fehlende Sonneneinstrahlung ab, da das geringe Wasservolumen auch nur eine geringe Wärmekapazität besitzt und die Wassermenge nicht zu speichern vermag.

Im Bereich eines größeren Gewässers gibt es dahingegen immer verschiedene Wasserzonen. Man unterscheidet hierbei Pelagial, Benthos und Litoral. Aufgrund der bakterivoren Lebensweise der meisten *Paramecium*-Arten (WAGTENDONK, 1974; WICHTERMAN, 1986), lassen sich die *Paramecium*-Zellen hauptsächlich in der litoralen Zone nachweisen. Das große Wasservolumen eines größeren Gewässers stellt jedoch eine große Wärmekapazität dar, so dass sich die gesamte Erwärmung eines großen Teiches eher langsam und inhomogen, im Sommer meistens auch in Sprungschichten vollzieht.

Vor allem das Wasser der Litoralzone wird sich aufgrund der geringen Wassertiefe jedoch stark aufheizen, wo es dann auch zu einer massenhaften Entwicklung von litoralen Organismen kommen kann. Dass diese Bedingungen nicht nur optimale Wachstumsbedingungen für die Paramecien, sondern ebenfalls für die räuberischen Organismen darstellt, ist logisch.

Dahingegen erwärmt sich das Pelagial weniger schnell und ist deshalb eher nicht von massenhafter Räuberichte gekennzeichnet. Da ein natürliches Gewässer zudem im Gegensatz zum beheizbarem Versuchsteich den üblichen saisonalen Temperaturschwankungen unterliegt, kommt es darin zur Etablierung eines stabilen Gleichgewichtssystems zwischen Räuber und Beute.

Diese Möglichkeit war im beheizbarem Versuchsteich aufgrund der konstanten Temperaturregulation auf 33°C offensichtlich nicht gegeben. Ein Gleichgewicht zwischen Räuber und Beute konnte sich nicht einstellen, so dass es automatisch zum Einbruch der *Paramecium*-Population aufgrund des hohen Prädationsdruckes kam.

Die Frage, woher die Räuber im Wärmeteich eigentlich kommen, scheint relevant. Auch dies lässt sich leicht erklären. Die meisten räuberischen Organismen überdauern Hungerperioden mit Hilfe von Dauerstadien wie Zysten im Schlamm von Gewässern (FOISSNER ET AL., 1991-1995). Beim Installieren der Teiche wurden zur besseren Sauerstoffversorgung Pflanzen in den Flachwasserbereich der Teiche eingesetzt. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass damit räuberische Organismen eingetragen wurden, die sich in den Wurzelbereichen der eingesetzten Pflanzen befanden. Zudem könnte es zu Einwanderungen durch Einschleppung aus anderen Habitaten durch Vögel gekommen sein. Da Räuber jedoch einen besonders wichtigen Anteil in dem Biosystem Teich innehaben, trägt das Vorhandensein dieser Organismen zur weiteren Erhöhung des „Freilandfaktors“ in allen drei Teichen bei.

Im Gegensatz zum Wärmeteich wirkte sich die Räuberpopulation in den beiden anderen Versuchsgewässern weniger extrem auf die Populationsverteilung der Paramecien aus.

Im Kühlteich, als auch im Kontrollteich, konnte über eine Versuchsdauer von mehreren Wochen die Serotypverteilung der reisolierten *Paramecium primaurelia*-Zellen dokumentiert werden.

Der kühlbare Teich:

Im kühlbaren Teich konnte ein weiteres ökologisches Prinzip dokumentiert werden, nämlich die außerartliche Konkurrenz. Neben den Prädatoren lassen sich auch andere *Paramecium*-Arten nachweisen, die wahrscheinlich ähnlich wie die Räuberpopulation durch Teichpflanzen eingebracht wurden. Bei diesen handelt es sich im hauptsächlichlichen um *Paramecium bursaria* und *Paramecium caudatum*.

Im Gegensatz zu den Schwesternarten des *Paramecium aurelia*-Komplexes, die auf spezielle Umweltparameter spezialisiert oder an spezielle Habitate gebunden sind (GILL & HAIRSTON, 1972; RAFALCO & SONNEBORN, 1959), sind diese beiden Arten kosmopolit verbreitet (VIVIER, 1974). Beide Arten lassen sich leicht von *Paramecium primaurelia* aufgrund ihrer morphologischen Besonderheiten unterscheiden. *Paramecium bursaria* besitzt intrazelluläre autotrophe Algen (*Chlorella spec.*) und *Paramecium caudatum* ist aufgrund seiner Gestalt und Größe gut von *Paramecium primaurelia* zu unterscheiden.

Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass die herrschenden kühlen Temperaturen im Teich für *Paramecium primaurelia* nicht optimal sind. Die Vermehrungsrate ist gering und statt dessen findet man sechs Wochen nach Experimentbeginn eine Verdrängung von *Paramecium primaurelia* durch die beiden Spezies *Paramecium caudatum* und *Paramecium bursaria*.

Diese Arten sind als globale Vertreter aufgrund ihrer hohen Toleranz gegenüber einem höheren Spektrum an Umweltfaktoren fähig, eine größere Anzahl von Habitaten in relativ geringem Zeitraum zu besiedeln (LANDIS, 1981). So ist z.B. *Paramecium bursaria* nicht auf das Nahrungsangebot im Teich angewiesen, sondern kann sich auf die Versorgung mit Nährstoffen durch die Photosynthese betreibenden Chlorellen verlassen. Besonders in den Sommermonaten Mai - Juli lässt sich eine



große Abundanz von *Paramecium bursaria* nachweisen (KOSAKA, 1991 ;LANDIS, 1991).

Das Temperaturoptimum könnte bei *Paramecium caudatum* eventuell tiefer als bei *Paramecium primaurelia* liegen, so dass Zellen dieser Art sich besser vermehren können. Dafür spricht, dass *Paramecium caudatum* in fast allen heimischen Gewässern in großen Abundanzen vorkommen (GROß, 1997; STOECK, 1998; SCHWEIKERT, 1999). So gelang Stoeck bei seinen Untersuchungen der Erstdnachweis für *Paramecium primaurelia* in Deutschland nur im Schönungsteich 1 in Kaiserslautern (STOECK, 1998).

Die beobachtete Populationsdynamik im kühlbaren Versuchsteich deutet darauf hin, dass die Regulation der Zelldichte nicht nur durch Umweltparameter erfolgt, sondern dass selbst in diesem überschaubarem Areal ein kompliziertes Netzwerk zwischen intra- und interspezifischen Interaktionen, sowie die Habitatheterogenität verantwortlich ist für die Regulation der Populationsdichte der ausgesetzten *Paramecium primaurelia* Zellen.

Anzunehmen ist jedoch, dass *Paramecium primaurelia* nicht durch die anderen Arten gänzlich verdrängt wird, sondern zur Koexistenz fähig ist. Somit wäre es denkbar, dass *Paramecium primaurelia* lediglich in so geringen Abundanzen vorkommt, dass eine Reisolation selbst mit der Methode der Elektromigration sich als schwierig erweist.

Des weiteren wäre denkbar, dass durch die niedrig gewählte Temperatur (10°C) dieses kühlbaren Teiches den Zellen eine Situation simuliert wird, die nur im Herbst bzw. im Frühjahr unter natürlichen Bedingungen vorkommt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Vergesellschaftung der beiden Arten *Paramecium bursaria* und *Paramecium caudatum* hin. Die im Kühlteich herrschenden Umweltparameter könnten optimale Bedingungen für diese beiden Arten darstellen, während die Zelldichte der Art *Paramecium primaurelia*, die als weniger tolerant gegenüber Umweltbedingungen gilt, zurückgeht.

Hinweise für eine saisonale Vergesellschaftung der *Paramecium*-Arten findet man wiederum bei Stoeck (1998). Er beobachtete bei der Probenahme im Frühjahr eine Vergesellschaftung der Arten *P. caudatum* und *P. bursaria*, während er an gleicher Stelle im Herbst vorwiegend *P. caudatum* und *P. aurelia* vorfand. Wäre eine Art gänzlich verdrängt worden, so ließen sich nicht die beiden vergesellschafteten Arten abwechselnd nachweisen. Vielmehr deutet das geringe Nährstoffangebot und die

geringe Temperatur im Teich darauf hin, dass den Zellen eine Situation vorgespielt wird, die denen im Frühjahr herrschenden Bedingungen in natürlichen Gewässern am nächsten kommt. Diese Schlussfolgerungen könnten die geringe Zelldichte der Art *Paramecium primaurelia* im Vergleich zu den beiden Kokurrenzarten erklären.

Ein weiterer Hinweis auf die präferierten Umweltparametern von *Paramecium primaurelia* ergibt sich aus der Tatsache, dass Stoeck der Erstdnachweis für die Art *Paramecium primaurelia* in Deutschland gelang. Im Gegensatz zu den anderen, etwa 40 beprobten Gewässern, konnte bei mehrmaliger Beprobung des Schönungsteiches konstant die Art *Paramecium primaurelia* daraus isoliert werden. In den anderen Untersuchungsgebieten ließ sich diese Art nicht nachweisen. Statt dessen konnte er nur Zellen des *P. aurelia*-Komplexes nur *P. biaurelia* und *P. novaurelia* in großen Abundanz nachweisen. Er deutete diese Ergebnisse mit der Tatsache, dass im Schönungsteich<sup>1</sup> in Kaiserslautern, der direkt hinter der Kläranlage gelegen ist, keine saisonalen Schwankungen vorkommen. Statt dessen liegt die Teichtemperatur auch im Winter relativ hoch und das Nährstoffangebot befindet sich ebenfalls aufgrund der bakteriellen Reinigungsstufe der Kläranlage, auf einem konstant hohen Level. Auch Schweikert (1999) und Czubatinski (1998) nutzten die im Schönungsteich 1 in Weilerbach vorkommenden Zelldichten, um Freilandversuche an *Paramecium primaurelia* durchzuführen.

Im Laufe der Experimente im Kühlteich wurden ebenfalls Serotypbestimmungen der reisolierten *Paramecium primaurelia* Zellen vorgenommen.

Auffallend ist, dass sich der Serotyp der ausgesetzten *P. primaurelia*-Zellen nach nur 2 Wochen stark veränderte (Abb. 4-50). Es trat ein neuer Serotyp auf, der als X bezeichnet wurde. Literaturangaben zufolge liegt jedoch der Schluss nahe, dass es sich hierbei um das Serotypprotein 156S handelt, das nur bei einer Temperatur unter 12°C ausgeprägt werden soll (BEALE, 1954).

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei dem neu auftretenden Serotypprotein um 156S handelt, findet sich in der Diplomarbeit von Simon (2002), die sich unter anderem mit der Induktion des Serotypproteins S beschäftigte. Dieses wird nur unter Kälte bzw. unter Hunger exprimiert. Da im Kühlteich beides vorherrschte, scheint dies ein Hinweis zu sein, dass es sich bei dem im Kühlteich gefundenen Serotyp X wirklich um das Serotypprotein 156S handelt.

So konnte es in 50% aller reisolierten Zellen nach 2 Wochen, rein exprimiert, auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Im Laufe der Untersuchungen wurden jedoch auch Zellen gefunden, denen eine Koexpression von 156G/S zugrunde liegt. Auch diesen Zustand der Mischexpression von G/S konnte Simon in seinen Experimenten nachweisen.

Im Schönungsteich Weilerbach dokumentierte Czubatinski (1998) mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Y4 (CAPDEVILLE, 1987b) ebenfalls Zellen, die nicht nur den Serotyp G ausprägten. Er konnte aufgrund der heterogen auftretenden Immunofluoreszenzsignale eine serotypreine Expression des Serotyps G ausschließen. Wie Simon, vermutete Czubatinski ebenfalls die Expression von Serotypprotein S auf der Zellmembran der aus dem Teich isolierten Zellen. Diese Beobachtung stimmt mit denen aus der vorliegenden Arbeit überein.

Die Thematik der Koexpression wird im folgenden noch ausgiebig diskutiert (s. Kap. 5.6).

Der Kontrollteich:

Der Kontrollteich ist durch seine Temperaturabhängigkeit von der Außentemperatur und der Sonneneinstrahlung einem natürlichem Gewässer am nächsten. Als Nachteil muss jedoch erwähnt werden, dass aufgrund seiner fehlenden Regulierbarkeit dieser Teich im Winter zufror, weshalb ein Beobachten der ausgesetzten Kulturen im Winter nicht möglich war. Daten für den Herbst, das Frühjahr und für den Sommer konnten jedoch gesammelt werden.

So zeigte sich, dass im Kontrollteich während des Herbstes und des Frühlings die Abundanzen der *Paramecium*-Zellen höher lagen als im Sommer. In der Zeitspanne der Sommermonate konnte ein Abnehmen der Zelldichten innerhalb kürzester Zeit beobachtet werden. Auch hierfür lässt sich, analog zum beheizbaren Teich die Anwesenheit räuberischer Organismen verantwortlich gemacht werden. Diese Ergebnisse zeigen eine große Übereinstimmung mit denen, von Landis (1981) durchgeführten Untersuchungen.

Hinsichtlich der Serotypexpression zeigte sich im Herbstversuch keine oder fast keine Veränderung der Oberflächenproteine (Abb. 4-47). Eine geringfügige Zunahme des Serotypproteins S konnte registriert werden. Jedoch unterschied sich dieser Versuch von dem Frühlings- oder Sommersversuch, da in diesem Versuch zu 100%

serotypreine 156G-Zellen in den Teich ausgesetzt wurden, Versuch 2 und 3 jedoch jeweils zu 50% aus 156D-Zellen und zu 50% aus G-Zellen bestand.

Im Sommer, als auch im Frühjahrsversuch (Abb. 4-48 & 4-49) erwies sich der Serotyp 156G als besonders stabil. Die aus dem Kontrollteich reisolierten Zellen besaßen nach einer Woche bis zu über 80% das Serotypprotein G auf der Membran (Abb. 4-48). Das Serotypprotein 156D spielte dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Besonders im Frühlingsversuch ließ sich gegen Ende eine Zunahme des Serotypproteins X feststellen. Auch hierbei kann vermutet werden, dass es sich aufgrund der niedrigen Temperatur und dem niedrigen Nahrungsangebot, bei dem als X bezeichneten Serotyp um das Serotypprotein 156S handeln könnte (s.o.).

Sämtliche Experimente in den drei Teichen zeigten, dass die ausgesetzten Labor-kulturen sich ganz anders als erwartet verhielten. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Laborversuchen, waren die Ergebnisse in den Freilandteichen durch unterschiedliche, nicht kontrollierbare Umweltparameter gekennzeichnet. Es zeigte sich, dass in den Teichen ein multifaktorieller Einfluss durch die Anwesenheit von Räubern oder interspezifische Konkurrenz durch andere Arten herrschte.

Durch diese Experimente kann man nur annähernd sehen, wie wichtig Freilandunter-suchungen zur Serotypausprägung an *Paramecium spec.* sind. Die erhaltenen La-boruntersuchungen spiegeln augenscheinlich nur zu einem geringen Prozentsatz die Verhaltensweise von im Freiland lebenden Paramecien wider.

Als besonders stabil erwies sich vor allem der Serotyp 156G. Dies ist verständlich, da in unseren Breiten eher Wassertemperaturen zwischen 10° und 15°C herrschen. Als weiteres tritt besonders im Herbst ein unbekannter Serotyp auf, bei dem es sich ver-mutlich um das Serotypprotein 156S handelt, das zudem auch in Koexpression mit 156G ausgeprägt sein kann. Dieser, unter Laborbedingungen nur schwer induzier-bare Serotyp (BEALE, 1954; SIMON, 2002), scheint im Freiland eine große Rolle zum Überleben der Zellen bei kälteren Temperaturen oder unter Nahrungsmangel zu spielen.

Dahingegen zeigte sich das Oberflächenprotein 156D als instabil, obwohl es unter Laborbedingungen gut untersucht wurde. Innerhalb weniger Tage findet ein Wechsel zum stabileren 156G statt, was auf eine geringere Relevanz für unsere Breiten hin-deutet.

Um eine umfassende Reaktion von *Paramecium*-Zellen auf veränderte Umweltbedingungen zu dokumentieren, sind jedoch wesentlich mehr Experimente nötig. Mit der Etablierung und Inbetriebnahme dieser drei Teiche steht nun jederzeit ein System zur Manipulation von Freilandkonditionen zur Untersuchung der Relevanz und Funktion von Serotypproteinen zur Verfügung.

Denkbar wären zum Beispiel Versuche, in denen der Wärmeteich nicht konstant auf eine Temperatur reguliert würde, sondern die Temperatur periodisch verändert würde. Man könnte somit saisonale oder tageszeitliche Schwankungen simulieren und dabei die Reaktionen der ausgesetzten Zellen messen.

### 5.5 Wiederaufnahme von Oberflächenproteinen in die Zelle

Die vorangegangenen Untersuchungen zur Thematik der Serotyptransformation und die gleichzeitige Beobachtung des Ablösens der „alten“ Oberflächenproteine durch die Phospholipase C, führte zur Frage, was mit „alten“, überflüssig gewordenen Serotypproteinen passiert. Werden sie einfach ins Medium abgegeben, welches mit einem enormen Energieverlust für die Zelle einhergehen würde, oder findet ein Recycling durch Wiederaufnahme in die Futtervakuolen statt, wie es Flötenmeyer, et al 1999 in ihrer Veröffentlichung postulierten?

Ein Teilbereich dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung dieser Frage.

Experimente zeigten, dass die, von der Zellmembran abgespaltenen Oberflächenproteine, sich an Futterbakterien anheften und mit diesen wieder in die Zelle aufgenommen werden.

Dieses spricht für das Modell, das Flötenmeyer et al. 1999 postulierten. Seinen Vermutungen zufolge wäre der Verlust, den die Zellen durch die Abspaltung von Serotypproteinen erleiden, relativ groß. Mit einem Recycling der Proteinbestandteile durch Wiederaufnahme der Oberflächenproteine durch Einstrudeln mit den Futterbakterien in die Futtervakuolen, würden die Zellen einen enormen Energieverlust kompensieren, der zugunsten von Vermehrungsrate oder ökologischer Fitness anderen Arten gegenüber führen könnte.

Ein weiterer Grund zur Wiederaufnahme der abgespaltenen Oberflächenproteine könnte sein, dass viele Prädatoren die spezifischen Oberflächenproteine als Erkennungssignale nutzen (SUNDERMANN ET AL., 1986). In Experimenten zeigte sich, dass der räuberisch lebende Organismus *Discophyria collini* seine Beute *Tetrahymena pyriformis* an den Oberflächenproteinen der Cilien erkennt. Im Gegensatz zu unbehandelten *T. pyriformis* sank die Fangrate, von ursprünglich über 90%, auf nur 13%, wurden bei den Beutezellen die Oberflächenproteine durch ciliäres Antiserum blockiert.

Eine ähnliche beutespezifische Erkennung anhand der Serotypproteine könnten die auf *Paramecium* spezialisierten Räuber besitzen. Hinweise lassen sich in der Literatur bei Harumoto & Miake (1992) finden.

Findet eine Serotyptransformation statt, die durch eine schnelle Abspaltung vieler nicht mehr benötigter Oberflächenproteine gekennzeichnet ist, würden durch die hohen Konzentrationen von Oberflächenproteinen eventuell Räuber angelockt. Werden jedoch die abgespaltenen Oberflächenproteine vermehrt wieder in die Futtervakuolen aufgenommen, so könnte eine Feindattraktion durch hohe Serotypproteinkonzentration im umgebenden Medium vermieden werden.

Andererseits ist von parasitisch lebenden Einzellern, wie *Trypanosoma brucei* bekannt, dass sie den Serotypwechsel gezielt nutzen, um das Immunsystem des Wirtes abzulenken, während ein anderes Serotypprotein auf der Membran etabliert wird (WEBB ET AL., 1997).

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die Wiederaufnahme der Serotypproteine mit den Futterbakterien zufällig passiert, oder ob in Situationen, die durch besonders starken Abbau von Serotypproteinen gekennzeichnet sind, wie z.B. Serotyptransformation, ein aktiver Konzentrationsmechanismus zur vermehrten Aufnahme von Futterbakterien aktiviert wird.

Um diese Frage zu beantworten, würde es sich lohnen den Futterumsatz, sowie die Bakterienaufnahme vor, während und nach einem induzierten Serotypwechsel zu beobachten.

Außerdem wäre es interessant zu erfahren, ob dieser Mechanismus bei anderen freilebenden Ciliaten existiert, und ob die parasitisch lebenden Protozoen wie *Trypanosoma brucei* ebenfalls einen solchen Mechanismus der Wiederaufnahme von abgespaltenen Serotypproteinen nutzen. Denkbar wäre, dass sich als Resultat auf die unterschiedliche Lebensweise von freilebenden und parasitischen Protozoen ein

unterschiedlicher Mechanismus bezüglich der abgespaltenen Oberflächenproteine entwickelt haben könnte.

## **5.6 Koexpression von Serotypproteinen**

Im Laufe der Untersuchungen für diese Arbeit wurden vor allem Zellen dokumentiert, bei denen zwei Proteine gleichzeitig auf der Zellmembran exprimiert wurden (s. 4.2; 4.4). Da dies für *Paramecium* nur als Ausnahmeerscheinung in der Literatur beschrieben ist, wurde eine allgemeine Regel aufgestellt, die besagt, dass immer nur ein Oberflächenprotein zu einem Zeitpunkt auf der Membran präsentiert werden kann.

Dieses Prinzip wird als „mutual exclusion expression“ bezeichnet (BEALE, 1957). In mehr als 50 Jahren Forschung an Serotypproteinen wurden nur drei Ausnahmen von Koexpression zweier Serotypen in der Literatur erwähnt (BEALE, 1954; ANTONY & CAPDEVILLE, 1989; MARGOLIN, 1956; SMITH & DOERDER, 1992).

Aufgrund des vermehrten Auftauchens von Zellen in den Experimenten, bei denen sich mehr als ein Serotypprotein gleichzeitig auf der Membran befindet, stellt sich nun die Frage, nach der Bedeutung des Prinzips der „mutual exclusion expression“ für die *Paramecium*-Zelle.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich für die Suche nach Gesetzmäßigkeiten dieser aufgestellten Regel. Gilt sie etwa nur für das Verhalten von Zellen unter definierten Laborbedingungen? Oder besitzen die Zellen die Möglichkeit unter multifaktoriellem Einfluss eine Koexpression, also mehrere SAg's gleichzeitig, auszubilden.

Als erstes mussten zum gleichzeitigen Nachweis zweier Oberflächenproteine die Nachweismethoden moduliert werden. Dieses galt zum einen für die RT-PCR, die für den Nachweis von nur gering vorhandener oberflächenspezifischer mRNA an einer Einzelzelle nicht sensitiv genug gewesen wäre. Zum anderen musste im Falle der Doppelimmunofluoreszenzfärbung die Möglichkeit gegeben sein, das zweite Oberflächenprotein zur besseren Unterscheidung vom ersten, andersfarbig zu markieren.

Im Falle der RT-PCR wurde ein System-Kit von Eppendorf etabliert, der auf Basis einer Two Step Multiplex RT-PCR und mittels eines sensitiveren Enzyms, mit nur einem einzigen Strang mRNA in der Lage ist, zuverlässig dieses Stück in cDNA umzuschreiben und hinterher in der nachgeschalteten PCR dieses Fragment dann zu amplifizieren (SIMON ET AL, 2002).

Bei Verwendung dieser Methode stellte sich heraus, dass sie wesentlich sensitiver ist, als die bisher benutzte Technik. Damit wird die Nachweisgrenze für oberflächenspezifische mRNA erheblich herabgesetzt, was nun erstmals die Möglichkeit eröffnete die Expression zweier Serotypgene gleichzeitig an einer Zelle zu studieren. Jedoch ist diese Technik wesentlich arbeitsaufwendiger als die zuvor benutzte und wesentlich teurer in der Anwendung, durch das von der Firma Eppendorf hergestellte Enzym, so dass sich diese Methodik nicht zum routinemäßigen Einsatz in Experimenten eignet.

Jedoch besteht durch die Entwicklung dieser Methodik endlich auch die Möglichkeit Einzelzellen aus dem Freiland experimentell durch die RT-PCR zu untersuchen. Dies war bisher aufgrund der zu geringen mRNA-Synthese, verursacht durch Nahrungsmangel, nicht möglich.

Einer weiteren Modifizierung wurde auch die Technik der Immunfluoreszenzmarkierung unterzogen. Statt nur eines primären Antikörpers kam nun ein Zweiter zum Einsatz. In diesem Fall handelte es sich um den Serotyp G-spezifischen monoklonalen Antikörper Y4 von Capdeville (ANTONY & CAPDEVILLE, 1989; CAPDEVILLE, 1987b). Es lassen sich jedoch auch andere primäre Antikörper benutzen, sofern man beachtet, dass jeder weitere Antikörper in einem anderen Säuger entwickelt worden sein muss, da ansonsten die anschließende Markierung durch den sekundären Antikörper unspezifisch erfolgen würde.

Anhand dieser Methode war es nun möglich zwei Oberflächenproteine auf der Zellmembran von *Paramemecium primaurelia* nachzuweisen. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass aufgrund der weniger vernetzenden Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers die Markierung durch den G-spezifischen Y4 Antikörper gegenüber der Markierung durch das anti-156D polyklonale Antiserum in der Farbintensität zurückbleibt. Bessere Ergebnisse hätte man durch Markierung des Serotypproteins 156G mit anti-156G polyklonalem Antiserum erreichen können.



Anhand der beiden benutzten Techniken (RT-PCR und Immunfluoreszenzmarkierung) konnte nun erstmals der Nachweis einer Koexpression für *Paramecium primaurelia*, Stamm 156 erbracht werden.

Hierbei zeigte sich im mikroskopischen Bild, dass die beiden Oberflächenproteine auf der Membran geklumpt vorkommen, das heißt, es gibt einige Bereiche auf dem Cortex, auf denen das Oberflächenprotein 156G vorherrscht, andere Areale zeigen eine 156D-Markierung. Daneben existieren jedoch auch Bereiche, die sich in ihrer Farbintensität zu gelb addieren und dadurch anzeigen, dass beide Serotypen in nächster Nähe beieinander präsentiert werden.

Anthony und Capdeville (1989) machten bei Untersuchungen zur temperaturinduzierten Serotyptransformation Beobachtungen, dass Zellen existieren, deren Oberflächenproteine auf der Membran inhomogen, also geklumpt, lokalisiert sind. Auch hierbei unterliegen die Zellen für einen kurzen Zeitraum, in dem das alte Protein noch und das neue Serotypprotein schon auf der Membran vorliegt, einer Doppeldexpression.

Auch Czubatinski (1998) dokumentierte Freilandzellen aus dem Schönungsteich in Weilerbach, die nach einer Immunfluoreszenzmarkierung eine fleckenweise Verteilung der Fluoreszenzsignale auf dem Cortex aufwiesen, während die Cilienspitzen fast gar nicht markiert erschienen.

Aufgrund der Ergebnisse aus dieser Arbeit könnte vermutet werden, dass ein charakteristisches Merkmal einer Koexpression die ungleichmäßige Verteilung der Serotypproteine auf der Membran darstellt.

In nachgeschalteten Experimenten konnte beobachtet werden, dass Kulturen, in denen sich Zellen befanden, die über eine Koexpression der beiden Serotypen 156G/D verfügen, über einen längeren Zeitraum im konstanten Verhältnis vorliegen. Dieses Verhältnis ließ sich jedoch durch serotyptransformierende Faktoren wie Hunger oder pH-Wert Veränderungen, sowie hohe NaCl-Konzentration (50mM) beeinflussen.

Untersuchungen der Kulturflüssigkeit, in denen die Zellen mit einer Doppeldexpression kultiviert wurden, zeigten im Gegensatz zu instabilen transformierenden Kulturen keine erhöhte Konzentration von abgespaltenen Serotypproteinen in der Kulturflüssigkeit. Statt dessen ähnelten die gemessenen Werte diesen von stabilen 156D- und 156G-Kulturen.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der dokumentierten Koexpression der beiden Serotypen 156D/G um eine zeitgleiche

Ausprägung beider Serotypen auf der Zelloberfläche handelt und nicht etwa um einen Zustand, in dem die Zellen zwischen den beiden Serotypen 156G und 156D „hin- und hertransformieren“.

Hinweise für eine echte Koexpression lassen sich auch in den Arbeiten von Simon (2002) und Czubatinski (1998) finden. In beiden Fällen wurden Zellen untersucht, die zwar unter kühlen Bedingungen, jedoch über genügend Nahrung im umgebenden Medium verfügten. So isolierte Czubatinski *Paramecium primaurelia*-Zellen aus dem Klärungsteich im Weilerbach, in dem ein ständig hohes Futterangebot aufgrund der vorangeschalteten Kläranlage herrscht. Diese Zellen wiesen in immunofluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine geklumpfte und sehr unregelmäßige Verteilung des Serotyps G auf. Er vermutete, dass sich auf den nicht angefärbten Bereichen der Zelloberfläche ein weiteres Serotypprotein befand, bei dem es sich wahrscheinlich, aufgrund der im Teich herrschenden Temperatur, um den Serotyp S handelte.

Simon, der sich mit der Induktion des S-Serotyps im Rahmen seiner Diplomarbeit beschäftigte (SIMON, 2002), konnte zeigen, dass die Expression des Serotypproteines 156S nur bei gleichzeitigem Nahrungsmangel und Temperaturen unter 12°C erfolgt. Erhöhte er das Nahrungsangebot, wurde zeitgleich mit dem Serotyp S das Oberflächenprotein 156G auf der Membran präsentiert.

Als nachteilig zur Untersuchung von Koexpression erweisen sich die methodischen Fehler, die in der Anwendung molekularbiologischer und immunochemischer Techniken begründet liegen. So ist es zwar möglich an einer einzigen Zelle eine Koexpression nachzuweisen, in dem Stadium der Untersuchung ist sie jedoch schon tot und man kann somit nicht mehr beobachten, wie sich die Serotypexpression dieser Zelle im Laufe des Experimentes verändern würde. Es lassen sich nur Aussagen über die Entwicklung der restlichen Zellen in dieser Kultur treffen. Deshalb ist es sehr wichtig eine genügend große Zellzahl zu untersuchen. So lässt sich jedenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit und unter Annahme, dass die Zellen einer Kultur ähnlich auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren, eine Aussage für den zeitlichen Ablauf der Expression von Serotypproteinen auf der Membran treffen.

In welcher Weise lässt sich nun die Koexpression der Serotypproteine von 156G/D bei Stamm 156D verstehen?

Ein Hinweis zur Erklärung der Koexpression mehrerer Serotypen findet sich bei Keller und Meyer (1992). Ihnen gelang die Konstruktion einer *Paramecium primaurelia* Mutante, die im Makronukleus sowohl das Allel für 156G als auch für 168G trägt. Diese Gene produzierten nebeneinander sowohl Oberflächenproteine 156G, als auch Serotypproteine des Typs 168G. Auffällig war hierbei, dass heterozygote Zellen wesentlich mehr 156G-Protein synthetisierten als vergleichbare homozygote Zellen. Zudem wurde in den heterozygoten Zellen mehr 156G produziert, als 168G-Protein.

Zur Erklärung dieser unterschiedlichen Expressionsrate untersuchten sie die Position, in der sich die beiden oberflächenproteinkodierenden Gensequenzen in den heterozygoten Zellen befanden. Hierbei stellten sie fest, dass das Gen für 156G in heterozygoten Zellen wesentlich näher am Telomer positioniert war als in den homozygoten Zellen. Sie schlossen daraus, dass die Lage des Serotypgens wesentlich zur Expressionsrate beiträgt.

Für die Zellen würde dies folgendes bedeuten: Käme es im Makronukleus zu einem sogenannten „DNA-rearrangement“, also zu einer Neuverteilung der Gene, würde im Fall, dass ein Gen wesentlich näher am Telomer zu liegen käme, dieses Gen vermehrt abgelesen werden. Somit würde es zu der Ausbildung einer Koexpression kommen.

Diese Theorie würde der von Beale 1954 erwähnten Ausnahme der „mutual exclusion expression“ entsprechen (BEALE, 1954), bei der heterozygote Zellen nach einer Kreuzung sowohl das Protein für 60D, als auch 90G produzierten.

Eine weitere Erklärung zur Außerkraftsetzung der „mutual exclusion expression“ liefert das bereits in der Einleitung aufgeführte Modell von Thai & Forney (1999).

Darin postulieren sie das Vorhandensein von Repressoren, die durch die Transkription des aktiven Serotypproteingens gebildet werden und die an die alternativen Oberflächenproteingene binden, um deren Expression zu verhindern. Denkbar wäre, dass in Situationen, bei denen mehrere unterschiedliche Umweltreize als Signale auf die Zellen einwirken (z.B. im Freiland), diese sich gegenseitig in ihrer Wirkung kompensieren, so dass das Expressionssignal nur noch geschwächt im Makronukleus ankommt. So werden von dem aktiven Gen weniger Repressoren gebildet. Diese verminderte Zahl von Repressoren wäre somit nicht mehr in der Lage alle Kopien der anderen Oberflächenproteingene im Makronukleus komplett in ihrer Ex-

pression zu inhibieren. Als Folge davon würde ein anderes Gen gleichzeitig abgelesen und es käme zur Koexpression mehrerer Serotypen auf der Membran.

Ebenso würde das Modell erklären, warum ein Umweltreiz, der nicht so stark ausgeprägt ist, nicht dazu führt, dass die Zellen in einer Kultur gleichzeitig „shiften“, sondern einen Mischzustand ausprägen, bei dem zwei Oberflächenproteine gleichzeitig von der Zelle exprimiert werden.

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gefundene Koexpression bei Stamm 156 keine Ausnahme der „mutual exclusion expression“ darstellt. Vielmehr lässt dieses Beispiel vermuten, dass auch weitere Stämme mehrere Serotypen gleichzeitig auf der Membran ausprägen können.

Ein Grund, weshalb Koexpression bei *Paramecium* nicht entdeckt wurde, könnte sein, dass fast alle Untersuchungen unter stabilen Laborbedingungen stattfanden, und nicht unter wechselnden Umwelteinflüssen, wie dies im Freiland der Fall ist. So stehen die Zellen unter stabilen Laborparametern nicht unter dem Druck ständig neue, an die veränderte Situation angepasste, Oberflächenproteine zu synthetisieren.

Ein weiterer Grund, weshalb die Koexpression bis heute fast unentdeckt geblieben sein könnte, ist die Tatsache, dass selbst neuere Untersuchungen des Serotyps meistens auf der Immobilisierungsreaktion basieren (KELLER ET AL., 1992). Die Immobilisierungsreaktion stellt jedoch eine Alles-oder-Nichts-Reaktion dar, mit der sich nicht klären lässt, ob nicht doch kleinere Mengen eines zweiten Serotypproteins auf der Zellmembran vorhanden sind. Für solche Untersuchungen eignet sich die Methode der Immunofluoreszenzmarkierung besser, weil sich dabei nicht nur zwei verschiedene Serotypproteine optisch unterscheiden lassen, sondern man zudem abschätzen kann, welche Anteile die unterschiedlichen Serotypproteine auf der Membran innehaben.

Als Weiterführung der Experimente würde es sich nicht nur lohnen bei weiteren Stämmen von *Paramecium primaurelia* (41 und 60) nach Koexpression zu schauen, sondern auch bei *Paramecium tetraurelia*, das noch dazu über ein weitaus größeres Repertoire an Serotypgenen verfügt als *Paramecium primaurelia*.

## 5.7 Mögliche Rolle der Serotypexpression und Serotyptransformation bei *Paramecium primaurelia* und Ausblick

Der kosmopolitisch vorkommende Ciliat *Paramecium spec.* stellt für die Wissenschaft ein Modellorganismus dar, an dem seit Jahrzehnten intensiv geforscht wird. Ein Vorteil dieses Einzellers gegenüber vielzelligen Organismen liegt vor allem darin, dass keine Spezialisierung der Zelle erfolgt, sondern dass eine *Paramecium*-Zelle ein komplex aufgebauter Organismus darstellt, der in seiner Gesamtheit zu vielfältigen inter- und intraspezifischen Interaktionen fähig ist. Er besitzt umfassende Möglichkeiten auf Umweltreize zu reagieren. Dies alles macht ihn zu einem unverzichtbaren Studienobjekt in der ökologischen Forschung (PREER, J.R, 1986).

Ein Thema dieser Forschung stellt die Untersuchung und Beschreibung des variablen Serotypsystems dar. Diese Klasse der membranständigen Oberflächenproteine erfüllt für *Paramecium* vielfältige Aufgaben, die allerdings bis heute nicht vollkommen geklärt werden konnten.

Nicht zuletzt die Tatsache, dass bis heute keine *Paramecium*-Zelle unter natürlichen Bedingungen gefunden wurde, die keine Oberflächenproteine auf ihrer Membran aufweist, zeigt jedoch wie äußerst wichtig diese Proteine für die Zellen sind (KUSCH & SCHMIDT, 2000). Deshalb wird dem variablen Serotypsystem von *Paramecium* eine große Bedeutung zugemessen.

Da Untersuchungen zumeist unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt wurden, ist die Serotypexpression insbesondere im Freiland nicht bekannt.

Durch die vorliegende Arbeit können zwar nicht alle Fragen bezüglich der Oberflächenthematik aufgeklärt werden, doch sie bietet konkrete Hinweise auf Funktion und Rolle der Serotypexpression und Serotyptransformation bei *Paramecium primaurelia*, die sich zu einem Gesamtbild zusammenfügen lassen.

Da die gesamte Zelle, wie von einem Mantel mit Oberflächenproteinen umgeben ist, stellt sie wahrscheinlich einen Schutz gegen Proteasen dar, die im Lebensraum von *Paramecium* durch Hefen und Bakterien ständig abgegeben werden (REISNER ET AL., 1969; PREER, 1986; CAPDEVILLE ET AL., 1993).

Eine weitere Funktion von Oberflächenproteinen ist wahrscheinlich mit deren Verankerung in der Membran, dem sog. GPI-Anker gekoppelt. Dieser ist, wie Capdeville (1979 a, b) vermutet, zur Signaltransduktion vom Zelläußeren zum Zellinneren verantwortlich. Die Reizweiterleitung erfolgt wahrscheinlich über eine Verstärkungskaskade mit einem „second-messenger“-System.

Ein anderer Autor vermutet darüber hinaus (RAMATHAN ET AL., 1983), dass die variablen Oberflächenproteine sich auf die Calcium-Kanäle der Membran auswirken und dadurch deren Durchlässigkeit beeinflussen.

Treffen veränderte Signale als Folge veränderter Umweltbedingungen bei der Zelle ein, so reagiert *Paramecium* mit einem Wechsel der Serotypproteine.

Zu denen in dieser Arbeit wirksamen serotyptransformierenden Umweltfaktoren gehören pH-Wert, Temperatur und Nahrungsangebot. Die Salinität oder Anwesenheit von räuberischen Organismen hatten keinerlei Einfluss auf die Ausprägung des Serotyps. Dies hängt wahrscheinlich unmittelbar mit der Stresssituation zusammen, in der sich die Zellen unter erhöhter Ionenkonzentration oder Prädationsdruck befinden.

Zudem konnten Schwellenwerte für transformierende Umweltreize (pH-Wert, Temperatur) festgestellt werden, durch die ein Serotypwechsel ausgelöst wird. Erreicht ein wirkender Reiz nicht den Schwellenwert oder erfolgt eine langsame Adaptation an veränderte Umweltparameter, so wird offenbar kein Wechsel der Oberflächenproteine ausgelöst.

Treffen multifaktorielle Signale auf der Zellmembran ein, kann dies zur gleichzeitigen Expression zweier oder mehrerer Serotypen führen. Während unter kontrollierten Laborbedingungen vorwiegend eine „mutual exclusive“ Expression beobachtet werden kann, scheint Koexpression unter Freilandbedingungen die Regel zu sein. Denn dort herrschen schnell wechselnde Umweltbedingungen und somit ist es für die Zelle energetisch günstiger, mehrere Oberflächenproteine auf der Membran zu präsentieren, bis sich eindeutige Parameter herauskristallisieren. In allen Fällen, der in dieser Arbeit dokumentierten Expressionen der SAg's, lässt sich deren Präsentation auf der Membran durch ein Modell von Thai & Forney (1999) erklären. Dieses postuliert die Regulation der Serotypexpression auf Transkriptionsebene. In der Literatur lassen sich jedoch auch Hinweise auf eine zusätzliche posttranskriptionell gesteuerte Ausprägung finden (GILLEY ET AL., 1990).

Eine weitere energetisch günstige Verhaltensweise der Zellen kann bei der schnellen Abspaltung der „alten“ Oberflächenproteine während einer Serotyptransformation festgestellt werden. Die löslichen Serotypproteine lagern sich an Futterbakterien und werden wieder in die Nahrungsvakuole mitaufgenommen. Vermutlich werden nach dem Abbau der Proteine die Aminosäurebestandteile zur Synthese von neuen Proteinen genutzt, was sich energetisch günstig auf den Stoffwechsel der Paramecien auswirkt (FLÖTENMEYER ET AL., 1999).

Augenscheinlich spielt das variable Serotypsystem von *Paramecium* eine große Rolle hinsichtlich der Antwort auf veränderte Umwelteinflüsse im umgebenden Medium. Dabei sollte man sich von der Idee verabschieden, dass eine ausgewählte *Paramecium*-Kultur als „Ganzes“ auf veränderte Umweltreize reagiert. Vielmehr stellt jede Zelle ein eigenes Individuum dar. Dies konnten die vorliegenden Untersuchungen belegen. Besonders auf dem Gebiet der Koexpression reagieren die verschiedenen Zellen ganz unterschiedlich. So lassen sich in einer Kultur Zellen finden, die nur einen Serotyp ausprägen, aber auch Zellen die zwei Oberflächenproteintypen auf dem Cortex präsentieren. Die Betrachtung einer ganzen Kultur sollte immer nur als Tendenz gesehen werden, die sich durch besonders viele Einzeluntersuchungen gegenseitig in ihrer Aussage unterstützen.

Besonders Freilandversuche stellen ein kompliziertes Netzwerk von Interaktionen als Reaktion auf biotische und abiotische Faktoren von Seiten der Paramecien dar, die sich gegenseitig addieren und verstärken oder aufheben können. So ist dieses System in seiner Gesamtheit nicht einfach zu verstehen und es müssen noch viele weitere Untersuchungen erfolgen, um die Reaktionen der Zellen auf unterschiedliche Umwelteinflüsse richtig deuten oder sogar voraussagen zu können. Mit der Etablierung der Methoden einer Doppelimmunofluoreszenzmarkierung und Multiplex RT-PCR an Einzelzellen sind jetzt jedoch die Voraussetzung zur Durchführbarkeit dieser Experimente gelegt worden.

Solange sich die Reaktionen der Paramecien unter Freilandbedingungen jedoch nicht abschätzen lassen, ist es zwar noch zu früh um *Paramecium*-Zellen in ein System zur Bioindikation einzubinden. Denkbar ist aber, dass nach entsprechender Forschung ein Bioindikatorensystem, ähnlich des Mikrosabrobienindex, aufgebaut werden könnte, in dem die Reaktionen von *Paramecium*-Zellen auf Schadstoffe anhand der Serotypexpression der Zellen sichtbar gemacht werden könnten.

Eine extrem spannende Frage ergibt sich aus einer Technik, mit der sich Gene gezielt ausschalten lassen. Diese wird als „gene silencing“ bezeichnet und wurde schon an *Paramecium*-Zellen experimentell getestet (GALVANI & SPERLING, 2002). Im Gegensatz zum ungezielten Ausschalten von Genen, was in durch Röntgenstrahlung induzierte Mangelmutanten erreicht wurde, kann das Abschalten von Genen durch die Methode des „gene silencing“ jederzeit wieder rückgängig gemacht werden.

Denkbar wäre, dass durch diese Technik gezielt die Serotypgene von *Paramecium primaurelia* abgeschaltet und dann beobachtet werden, ob und in welcher Reihenfolge die Zellen alternative Serotypen zur Präsentation auf der Zellmembran bilden. Dies könnte in naher Zukunft mehr Aufschluss über die Rolle und Funktion von Oberflächenproteinen bei *Paramecium* liefern.

Nicht zuletzt die nahe Verwandtschaft zu protozoologischen menschlichen Krankheitserregern, allen voran *Trypanosoma brucei*, der Erreger der Schlafkrankheit, der über ein ähnliches variables Serotypsystem verfügt, macht die Aufklärung der Rolle der Serotypproteine an *Paramecium* so wichtig.

Lässt sich die Frage nach der Expression der Oberflächenproteine an einem solch ungefährlichen Organismus wie *Paramecium* beantworten, ist es demnächst vielleicht möglich dieses Wissen für die Bekämpfung gefährlicher Parasiten anzuwenden.



## 6 Zusammenfassung

1. Die Serotypen 156G und 156D konnten serotyprein bei Zellen des Stammes 156 (*Paramecium primaurelia*) induziert werden.
2. Zum Nachweis verschiedener Oberflächenproteine und der Expression deren zugehöriger Gene, wurden die Immunofluoreszenzfärbung mit homologen polyklonalen Antiseren, die Immobilisierungsreaktion und eine, für Stamm 156 spezifische RT-PCR etabliert.
3. Um die Methode der RT-PCR auch auf die beiden Stämme 41 und 60 anwenden zu können, wurde mit isolierter genomischer DNA zuerst eine Long Run PCR durchgeführt, durch die, unter Verwendung sog. Konsensus-Primer, für Stamm 41, je drei Banden in der Größe der Serotypgene amplifiziert werden konnten, bei Stamm 60 lediglich nur zwei.
4. Eine weitere PCR mit genomischer DNA, durch Anwendung der spezifischen Primer für Stamm 156 der RT-PCR Methode, erbrachte für beide Stämme je zwei Banden in der erwarteten Größe. Durch klonieren dieser Fragmente und anschließender Sequenzanalyse der Inserts, konnte bestätigt werden, dass diese zu Oberflächenproteinsequenzen gehören. Eine Anwendung der RT-PCR auf die Stämme 41 und 60 ist nun möglich. Jedoch stellte sich heraus, dass es für die untersuchten Fragmente (41G, 60G, 60D) zwei Varianten gab, die nur zu 85%-95% homolog sind (Ausnahme: 41D mit nur einem Sequenzunterschied). Da ein Enzymfehler ausgeschlossen werden kann, liegt die Annahme nahe, es handelt sich hierbei um Pseudogene, die normalerweise von der Zelle nicht exprimiert werden.
5. Der Ablauf einer temperaturinduzierten Serotyptransformation von 156G→ 156D, sowie von 156D→ 156G konnte auf Stufe der Transkription und auf Proteinebene dokumentiert werden. Hierbei zeigte sich, dass der Wechsel von Serotyp 156G→ 156D wesentlich schneller von den Zellen durchlaufen wird, als die entgegengesetzte Serotyptransformation.

6. Im Laufe der Untersuchungen wurden weitere Umweltparameter auf ihre serotyp-transformierende Wirkung hin untersucht. Hierbei zeichneten sich neben der Temperatur, auch das Nahrungsangebot und der pH-Wert als wichtige Faktoren zur Induktion eines Serotypwechsels aus. Die Art der Kultivierungsflüssigkeit wirkte sich durch die Beeinflussung des Bakterienwachstums nur indirekt auf die Expression von Serotypen aus. Dahingegen zeigten erhöhte Salinität, sowie Prädatoren durch *Didinium nasutum* oder *Amoeba proteus*, keinerlei serotyp-transformierende Wirkung. Vielmehr scheint sich durch den Stress, der bei den *Paramecium*-Zellen verursacht wird, das Oberflächenprotein 156G auf der Zellmembran zu stabilisieren.
7. Es wurde die Frage untersucht, was mit den, von der PLC abgespaltenen, Oberflächenproteinen geschieht. Hierbei stellte sich heraus, dass offensichtlich ein Recyclingsystem für abgespaltene Serotypproteine existiert. Diese lagern sich nämlich an Futterbakterien an und werden mit diesen in die Nahrungsvakuole aufgenommen. Ob die Aufnahme zufällig passiert, oder ob ein Konzentrationsmechanismus zur Wiederaufnahme der Oberflächenproteine existiert, konnte bislang nicht geklärt werden.
8. In zum Teil temperaturregulierbaren Versuchsteichen wurden Laborkulturen exponiert und deren Serotypexpression im Laufe der Experimente beobachtet. Im Vergleich zu den gut kontrollierbaren Laborparametern, zeigten die ausgesetzten Paramecien differente Reaktionen auf die im Teich herrschende multifaktorielle Reizeinwirkung. Der Serotyp 156G erwies sich als besonders stabil, während der unter Laborbedingungen gut untersuchte Serotyp 156D im Freiland nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Dahingegen wird der Serotyp S, der im Labor nur sehr schwer induzierbar ist, bei niedrigeren Temperaturen regelmäßig exprimiert.
9. Zur Identifizierung von koexpressiven Zellen wurden die Nachweismethoden modifiziert. So konnte eine Doppelimmunofluoreszenzmarkierung zur gleichzeitigen Identifizierung zweier Serotypproteine auf der Membran einer Zelle entwickelt werden. Gleichzeitig erfolgte die Etablierung einer Einzelzell-Multiplex RT-PCR.

10. Mit Hilfe dieser Methoden konnte die Koexpression bei Stamm 156G an Einzelzellen nachgewiesen werden. Die Untersuchung einer Mischkultur (bei 33°C) zeigte, dass die Serotypen D, G und D/G in einem Verhältnis vorliegen, das selbst nach Monaten nahezu unverändert blieb. Die Zusammensetzung der Mischkultur ließ sich jedoch durch serotyptransformierende Faktoren wie pH-Wert, Nahrungsangebot oder erhöhte Salinität beeinflussen. Die Tatsache, dass sich auch in den Freilandteichen, sowie bei der Induktion von Serotypen koexpressive Zellen nachweisen ließen, zeigt, dass Koexpression bei *Paramecium* durchaus häufiger vorkommt als in der Literatur beschrieben.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	„copy“ komplementäre DNA
d	Tag
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Mix aus den vier Desoxyribonukleotiden
DTT	Dithithreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et aliis
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GPI	Glycosylphosphat-inositol
H <sub>2</sub> O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
LB-Medium	Lauria Bertani-Medium

M	Molarität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
mSAG	membranal surface antigene
p.A.	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rmp	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SAG	surface Antigen
SDS	Natriumdodecysulfat
StM	Strohmedium
T	Thymin
T	Temperatur
TE	Tris-EDTA
techn.	technisch
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TW	Teichwasser
Ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VSG	variant surface glycoprotein
WGP	wheat grass powder
z.B.	zum Beispiel

## 8 Literaturverzeichnis

**ANTONY, C & CAPDEVILLE, Y. (1989):** Uneven distribution of surface antigens during antigenic variation in *Paramecium primaurelia*, *J. Cell Sci.* **92**: 205-215

**AUSTIN, M.L. (1963):** Progress in control of the emergence and the maintenance of serotypes in stock 51, syngen 4, of *Paramecium*. *J. Protozool.* **10**: 21

**AUSTIN, M.L. PASTERNAK, J. & RUDMAN, B.M. (1967a):** Studies on the mechanism of serotypic transformation in *Paramecium aurelia*. I. The effects of actinomycin D, puromycin and chloramphenicol on transformation induced by patulin, actamin and antiserum. *Exp. Cell Res.* **45**: 289-305

**AUSTIN, M.L. PASTERNAK, J. & RUDMAN, B.M. (1967b):** Studies on the mechanism of serotypic transformation in *Paramecium aurelia*. I. The effects of actinomycin D, puromycin and chloramphenicol on transformation induced by patulin, actamin and antiserum. *Exp. Cell Res.* **45**: 306-322

**AZZOUZ, N.; CAPDEVILLE, Y. (1992):** Structural comparisons between the soluble and the GPI-anchored forms of the *Paramecium* temperatur-specific 156G surface antigen, *Biol Cell*, **75**: 217-223

**BEALE, G.H. (1948):** The process of transformation of antigenic type in *Paramecium aurelia* variety 4. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **34**: 418-423

**BEALE, G.H. (1954):** The genetics of *Paramecium aurelia*, Cambridge Univ. Press, New York

**BEALE, G.H. (1957):** The antigen system of *Paramecium primaurelia*. *Int. Rev. Cytol.* **6**: 1-23

**BOURGAIN-GUGLIELMETTI F.M. & CARON F.M.(1996):** Molecular Characterization of the D surface protein gene subfamily in *Paramecium primaurelia*, *J. Euk. Microbiology*, **43 (4)**: 303-313

**BREUER M.; SCHULTE, G.; SCHWEGMANN K.J. & SCHMIDT H.J. (1996):** Molecular characterization of the D surface protein gene subfamily in *Paramecium tetraurelia*. J. Euk. Microbiol., **43 (3)**: 314-322

**CAPDEVILLE, Y; (1979a):** Intergenic and interallelic exclusion in *Paramecium primaurelia*, Immunological comparisons between allelic and non-allelic surface antigens, Immunogenetics **9**: 77-96

**CAPDEVILLE, Y; (1979b):** Regulation of surface antigen expression in *Paramecium primaurelia*. II. Role of the surface antigen itself. J. Cell Physiol. **99**: 383-394

**CAPDEVILLE, Y; BALTZ, T.; DEREGNAUCOURT, C. & KELLER, A.-M. (1986):** Immunological evidence of a common structure between *Paramecium* surface antigens and *Trypanosoma* variant surface glycoproteins, Exp Cell Res, **167**: 75-86

**CAPDEVILLE, Y; CARDOSO DE ALMEIDA, M.L & DEREGNAUCOURT, C. (1987a):** The membrane-anchor of *Paramecium* temperature specific surface antigens is a glycosylinositol phospholipid. Biochem Biophys. Res. Commun., **147**: 1219-1225

**CAPDEVILLE, Y; CARON, F.; ANTONY, C.; DEREGNAUCOURT, C. & KELLER, A.-M. (1987b):** Allelic antigen and membrane-anchor epitopes of *Paramecium primaurelia* surface antigens. Journal of cell Science **88**: 553-562

**CAPDEVILLE, Y; CHARRET, R.; ANTONY, C.; DELORME, J.; NAHON, P. & ADOUETTE, A. (1993):** Ciliary and plasma membrane proteins in *Paramecium*: Description, localization and intracellular transit. In: Membrane traffic in Protozoa. H. Plattner, editor JAI Press, Greenwich: pp. 181-226.

**CAPDEVILLE, Y; BENWAKRIM A. (1994):** Temperature-dependent expression of ciliary GPI-proteins in *Paramecium*, Brazil J Biol Res, **27**: 415-420

**CAPDEVILLE, Y; BENWAKRIM A. (1996):** The major ciliary membrane proteins in *Paramecium primaurelia* are all glycosylinosol-anchored, Eur J Cell Biol, **70**: 339-346

**CONNER, R.L.; LANDREY, J.R.; KANESHIRO, E.S.; VAN WAGTENDONK, W.J. (1971):** The metabolism of stigmasterol and cholesterol by *Paramecium aurelia*. Biochim. Biophys. Acta **239(2)**: 312-319

**CZUBATINSKI, L. (1998):** Untersuchungen zur ökologischen Bedeutung der Serotypvariation bei *Paramecium primaurelia*: Diplomarbeit in der Abteilung Ökologie, Universität Kaiserslautern

**DONELSON, J.E. & TURNER, M.J. (1985):** Wie Trypanosomen das Immunsystem täuschen. Spektrum der Wissenschaft **4**: 84-92

**DUBRANA, K. & AMAR, L. (2000):** Programmed DNA under-amplification in *Paramecium primaurelia*. Chromosoma, **109**: 460-466

**DUBRANA, K. & AMAR, L. (2001):** Control of DNA excision efficiency in *Paramecium*. Nucleic Acids Research, **29 (22)**: 4654-4662

**FINGER, I. (1967):** The control of antigenic type in *Paramecium*. In Goldstein, L. The control of nuclear activity, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.:pp. 377-411

**FINGER, I.; DILWOTH, L., HELLER, C. & FISHBEIN, G. (1968):** Transformation of antigenic types in *Paramecium* by conditioned medium. Genetics **60**: 177

**FINGER, I. (1974):** Surface antigens of *Paramecium aurelia*. In: Van Wagtendonk, W.J. (ed): *Paramecium*, a current survey. Elsevier, New York, pp. 131-164

**FLÖTENMEYER, M; MOMAYEZI, M. PLATTNER, H. (1999):** Immunolabeling analysis of biosynthetic degradative pathways of cell components (glycocalyx) in *Paramecium* cells. Eur. J. Cell Biol **78**: 67-77

**FOISSNER, W.; BLATTERER, H.; BERGER, H.; KOHMANN, F. (1991/92/94/95):** Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems Band I - IV, Informationsberichte des Baer. Landesamtes für Wasserwirtschaft.



**FORNEY, J.D.; EPSTEIN, L.M.; PREER, L.B.; RUDMAN, B.M.; WDMAYER, D.J.; KLEIN, W.H.; PREER, J.R. (1983):** Structure and expression of genes for surface proteins in *Paramecium*. *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 466-474

**Galvani A. & Sperling L. (2001):** Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3'non-coding sequences in *Paramecium*, *Nucleic Acid Research*: **29(21)**: 4387-4394

**Galvani A. & Sperling L. (2002):** RNA interference by feeding in *Paramecium*, *Trends in Genetics* **18(1)**: 11-12

**GILL, D.E.; HAIRSTON, N.G. (1972):** The dynamics of a natural population of *Paramecium* and the role of interspecific competition in community structure. *J. Anim. Ecology* **41**: 134-139

**GILLEY, D.; RUDMAN, B.M.; PREER J.R, J.R.; POLISKY, B. (1990):** Multilevel regulation of surface antigen gene expression in *Paramecium aurelia*. *Molecular and ciliar biology*. **10 (4)**: 1538-1544

**GODISKA, R. (1987):** Structure and sequence of the H surface protein gene of *Paramecium* and comparison with related genes. *Mol. Gen. Genet.*, **208**: 529-536

**GRASS, F.S. (1972):** An immobilization Antigen in *Tetrahymena pyriformis* expressed under conditions of high salt stress. *J. Protozool.*, **19 (3)**: 505-511

**GROß, A. (1997):** Verbreitung der Ciliatengattung *Paramecium* in der Westpfalz. Diplomarbeit in der Abt. Ökologie an der Universität Kaiserslautern

**HANSMA, H.G.; KUNG, C. 1(975):** Studies on the cell surface of *Paramecium*. Ciliary membrane proteins and immobilization antigens. *Biochem. J.* **152**: 523-528

**HAIRSTON, N.G. (1967):** Studies on the limitations on a natural population of *Paramecium aurelia*. *Ecology* **48**: 904-910

**HARUMOTO, T. & MIAKE, A. (1992):** Possible participation of surface antigens in the predator-prey interaction between *Didinium* and *Paramecium*. J. Euk. Microbiol. **40**: 27A

**KAMADA, T. & KINOSITA, H. (1940):** Calcium-potassium factor in ciliary reversal of *Paramecium*. Proc. Imp. Acad. Tokyo **16**: 125-130

**KIMBALL, R.F. :** The induction of inheritable modification in reaction to antiserum in *Paramecium aurelia*. Genetics **32**: 486-499

**KELLER, A.M.; LE MOUËL, A.; CARON, F.; KATINKA, M.; MEYER E., (1992):** The differential expression of the G surface antigen alleles in *Paramecium primaurelia* heterozygous cells correlates to macronuclear DNA rearrangement. Developmental genetics **13**: 306-317

**KLEINIG, H. & MAIER, U. (1999):** Zellbiologie 4.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 49-80

**KOVACS, P. & CSABA, G.(1995):** Effects of choline and ethanolamine on the synthesis and breakdown of the inositol phospholipid (PI) system in *Tetrahymena*. Cell Bioch. Funct. **13**: 61-67

**KOVACS, P, (1996):** Cell-surface GPI expression in Protozoa. The connection with the PI System. In: Progress in molecular and subcellular biology 17. Signaling mechanisms in Protozoa and Invertebrates. Ed. By Csaba, G & Müller, W.E.G.; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, p.p. 105-118

**KOSAKA, T. (1991):** Life cycle of *Paramecium bursaria*, syngen 1 in nature. J. Protozool. **38(2)**: 140-148

**KUSCH J. & SCHMIDT H.J. (2000):** Genetically controlled expression of surface antigens in free-living protozoa. J. Membrane Biol. **180**: 101-109

**MARGOLIN, P., 1956:** An exception to mutual exclusion of the ciliary antigens, *Genetics* **41**: 685-699

**LANDIS, W.G. (1982):** The spatial and temporal distribution of *Paramecium bursaria* in the littoral zone. *J. Protozool.* **29 (2)**: 159-161

**MC KONKEY, G.A.; WATERS, A.P.; MC CUTCHAN, T.F. (1990):** The generation of genetic diversity in Malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 479-498

**MEYER, E.; CARON, F.; GUIARD B. (1994):** Blocking of the in vitro translation of *Paramecium* messenger RNAs is due to messenger RNA primary structure. *Biochemie* **66**: 403-412

**PAQUETTE, A.C.; RAKOCHY, V.; BUSH, A. & VAN HOUTEN, J.L. (2001):** Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in *Paramecium tetraurelia*: Possible role in chemoresponse. *The Journal of Experimental Biology* **204**: 2899-2910

**PORTER, K.G.; SHERR, E.B.; SHERR, B.F.; PACE, M.L.; SANDERS, R.W. (1985):** Protozoa in planctonic food webs. *J. Protozool.* **32**: 409-415

**PRAT, A.; KATINKA, M.; CARON, F.; MEYER, E., (1985):** Nucleotide sequence of the *Paramecium primaurelia* G surface protein. *J. of Mol. Biol.* **189**: 47-60

**PRAT, A., (1990):** Conserved sequences flank variable tandem repeats in two alleles of the G surface protein of *Paramecium primaurelia*. *J. Mol. Biol.* **211**: 521-535

**PREER, J.R. (1959a):** Studies on the immobilization antigens of *Paramecium*. I Assay methods, *J. Immunol.* **83**: 378-384??

**PREER, J.R. (1959b):** Studies on the immobilization antigens of *Paramecium*. II Isolation, *J. Immunol.* **83**: 378-384

**PREER, J.R. (1959c):** Studies on the immobilization antigens of *Paramecium*. III Properties, *J. Immunol.* **83**: 385-391

**PREER, J.R. JR. (1968):** Surface antigens of *Paramecium*. In Gall J. (ed): Molecular Biology of the ciliated protozoa. Academic Press, London New York, pp. 301-339

**PREER, J.R. JR.; PREER, L.B.; RUDMAN, B.M.; BARNETT A.J. (1985):** Deviation from the universal code shown by the gene surface protein 51A in *Paramecium*. Nature (London) **314 (6007):** 188-190

**PREER, J.R. JR. (1986):** Surface antigens of *Paramecium*. In: Gall J. (ed): Molecular biology of ciliated protozoa. Academic Press, London New York: pp 301-339

**RAFALCO, M.; SONNEBORN, T.M. (1959):** A new syngen (13) of *Paramecium aurelia* consisting of stocks from Mexico, France and Madagascar. J. Protozool. **6(Suppl.)** 30

**RAMATHATAN, R.; ADOUETTE, A. & DUTE, R. (1981):** Biochemical studies of the excitable membrane of *Paramecium tetraurelia*. V. Effects of proteases of the ciliary membrane. Biochim. Biophys. Acta **641:** 349-365

**RAMATHATAN, R.; SAIMI, Y.; PETERSON, J.B.; NELSON, D.L.; KUNG, C. (1983):** Antibodies to the ciliary membrane of *Paramecium tetraurelia* alter membrane excitability. J. Cell Biol. **97:** 1421-1428

**REISNER, A.H.; ROWE, J. & SLIGHT, R. (1969):** Concerning the tertiary structure of the soluble surface proteins of *Paramecium*. Biochemistry **8:** 4637-4644

**RÖSLE, R. (1905):** Spezifische Seren gegen Infusorien. Arch Hyg Bakteriol **54:** 1-31

**SCHMIDT, H.J. (1983):** Identification of the immobilization antigens of *Paramecium* by their cyanogen bromid cleavage patterns. J. Protozool. **30:** 577-580

**SCHMIDT, H.J. (1987):** Characterization and comparison of genomic DNA clones containing complementary sequences to mRNA from serotyp 51D of *Paramecium tetraurelia*. Mol. Gen. Genet. **208:** 450-456

**SCHMIDT, H.J. (1988):** Immobilization antigens. In: Görtz H.D. (ed) 1988 *Paramecium*.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio pp. 155-166

**SIMON, M. (2002):** Untersuchungen zur Expression des S-Serotyps bei *Paramecium primaurelia*, Diplomarbeit in der Abteilung Ökologie an der Universität Kaiserslautern

**SCOTT, J.M.; LEECK, C.L. & FORNEY J.D. (1993):** Molecular and genetic analysis of the B Type surface protein from *Paramecium tetraurelia*. *Genetics*, **133**: 189-198

**SINGER, S. J.; NICOLSON, G.L. (1972):** Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. *Ann. NY Acad. Sci.* **195 (45)**: 368-375

**SMITH, D. & DOERDER, P., (1992):** Exceptions to mutual exclusion among cell surface i-antigens of *Tetrahymena thermophila* during salt stress and stationary phase, *J. Protozool.* **39(5)**: 628-635

**SONNEBORN, T. M. (1943):** Acquired immunity to specific antibodies and its inheritance in *P. aurelia*. *Pro. Indiana Acad. Sci.* **52**: 190-191

**SONNEBORN, T. M. (1947):** Developmental mechanisms in *Paramecium* Growth Symp. **11**: 291-301

**SONNEBORN, T. M. (1951):** The role of the genes in cytoplasmic inheritance. In Dunn, L.C., *Genetics in the Twentieth Century*, Macmillian, New York, N.Y. 291-314

**STOECK, T. & SCHMIDT, H.J. (1998):** Fast and accurate identification of European species of the *Paramecium aurelia* complex by RAPD-fingerprints. *Microbiol. Ecol.* **35**: 311-317

**SUNDERMANN, C.A.; PAULIN, J.J. & DICKERSON, H.W.; (1986):** Recognition of prey by suctoria: The role of Cilia. *J. Protozool.* **33 (4)**: 473-475

**THAI, K.Y. & FORNEY, J.D.; (1999):** Evidence for transcriptional self-regulation of variable surface Antigens in *Paramecium tetraurelia*. *Gene Expr.* **8**:263-273

**WEBB, H.; CARNALL, N.; VANHAMME, L.; ROLIN, S.; VAN DEN ABBEELE, J.; WELBURN, S.; PAYS, E. & CARRINGTON M. (1997):** The GPI- Phospholipase C of *Trypanosoma brucei* is nonessential but influences parasitemia in mice. *J. of Cell Biology* **139 (1):** 103-114

**VIVIER, E. (1974):** Morphology, taxonomy and general biology of the genus *Paramecium*, Wagtendonk, W.J. van, ed., *Paramecium - A current Survey*, Elsevier, Amsterdam, pp1-89

**YOU, Y.; AUFDERHEIDE, K. MORAND, J.; RODKEY, K; FORNEY, J. (1991):** Macronuclear transformation with specific DNA fragments controls the content of the new macronuclear genome in *Paramecium tetraurelia*

**ZIGMOND, S. & SULLIVAN, S.J. (1979):** Sensory adaption of leucocytes to chemotactic peptides. *J. Cell Biol.* **82:** 517-527

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abb. 1-1: Modell zur Expression von Serotypgenen (nach FORNEY & THAI, 1999)	9
Abb. 1-2 Temperaturbereiche der verwendeten Stämme 60 und 156 von <i>Paramecium primaurelia</i>	11
Abb. 3-1 Elektromigration (Apparatur nach Hairston)	50
Abb. 4-1 Titertest des anti-156G Serums	53
Abb. 4-2 Titertest des anti-156D Serums	54
Abb. 4-3 Serotypreine 156G-Zelle durch anti-156G Serum markiert	55
Abb. 4-4 Markierung einer 156D Zelle mit anti-156G Serum (Negativkontrolle)	56
Abb. 4-5 Immunofluoreszenzmarkierung einer 156D Zelle mit anti-156D Serum	57
Abb. 4-6 Markierung einer 156G Zelle mit anti-156D Serum (Negativkontrolle)	58
Abb. 4-7 Gelbild mit diagnostische Banden aus der RT-PCR	59
Abb. 4-8 RT-PCR Gel für die Serotyptransformation von 156G → 156D	61
Abb. 4-9 156G Mark. nach 48h	63
Abb. 4-10 156G Mark. nach 72h	63
Abb. 4-11 156G Mark. nach 96h	63
Abb. 4-12 156D Mark. nach 48h	63
Abb. 4-13 156D Mark. nach 72h	63
Abb. 4-14 156D Mark. nach 96h	63
Abb. 4-15 RT-PCR Gel für die Serotyptransformation von 156D → 156G	65
Abb. 4-16 156G Mark. nach 6h	66
Abb. 4-17 156G Mark. nach 24h	66
Abb. 4-18 156G Mark. nach 48h	66
Abb. 4-19 156D Mark. nach 6h	66
Abb. 4-20 156D Mark. nach 24h	66
Abb. 4-21 156D Mark. nach 48h	66

Abb. 4-22	Zeitlicher Ablauf bei temperaturinduzierter Serotyptransformation	67
Abb. 4-23	Auswirkung des Nahrungsangebots auf die Serotypexpression	69
Abb. 4-24	Auswirkung verschiedener Medien auf die Populationsgröße	70
Abb. 4-25	Populationswachstum bei pH5 in verschiedenen Medien	72
Abb. 4-26	Populationsentwicklung in verschiedenen Medien bei pH6	73
Abb. 4-27	Populationsentwicklung bei pH7	74
Abb. 4-28	Populationsentwicklung bei pH8	75
Abb. 4-29	Populationsentwicklung bei pH9	75
Abb. 4-30	Populationsentwicklung in Strohmedium	76
Abb. 4-31	Populationsentwicklung in Teichwasser/Stroh	76
Abb. 4-32	Populationsentwicklung in Teichwasser/ Sediment	76
Abb. 4-33	Populationsentwicklung in Teichwasser	76
Abb. 4-34	Populationsveränderung einer 156G-Kultur in Abhängigkeit von der Salinität	80
Abb. 4-35	Populationsveränderung einer 156G Kultur in Anwesenheit von <i>Amoeba proteus</i>	81
Abb. 4-36	Populationsveränderung einer 156G Kultur in Anwesenheit von <i>Didinium nasutum</i>	82
Abb 4-37	Entstehung von Mischkulturen bei der Induktion von Serotypprotein 156D	83
Abb. 4-38	Immobilisierung einer Mischzellenkultur durch unterschiedliche Antiseren	84
Abb. 4-39	Immunofluoreszenzmarkierung einer koexpressiven Zelle mit anti-156G Serum	85
Abb. 4-40	Doppelmarkierung einer koexpressiven Zelle	86
Abb. 4-41	Gel einer Multiplex RT-PCR	87
Abb. 4-42	Prozentuale Zusammensetzung einer Mischzellenkultur in Abhängigkeit von der Zeit	88
Abb. 4-43	Auswirkung des pH-Wertes auf die Zusammensetzung der Mischkultur	92
Abb.4-44	Einfluss des Nahrungsangebotes auf die Expression des Mischzustandes	92
Abb. 4-45	Auswirkung der Salinität auf die Serotypexpression	93
Abb. 4-46	Populationsentwicklung der exponierten Kulturen im Kontrollteich	95



Abb. 4-47	Serotypentwicklung im Kontrollteich im Herbst	96
Abb. 4-48	Serotypentwicklung im Kontrollteich im Frühjahr	97
Abb. 4-49	Serotypentwicklung im Kontrollteich im Sommer	98
Abb. 4-50	Serotypentwicklung im Kühlteich	100
Abb. 4-51	Immunofluoreszenzmarkierung der Futterbakterien	101
Abb. 4-52	Gel der Long Run PCR	103
Abb. 4-53	Gel der amplifizierten Fragmente der Stämme 41 und 60	104
Abb. 10-1	Alignment der beiden Sequenzen von 41D	
Abb. 10-2	Sequenzanalyse der beiden Sequenzen 41Ga und 41Gb	
Abb. 10-3	Sequenzalignment der beiden Fragmente 60D	
Abb. 10-4	Sequenzalignment der beiden Fragmente von 60G	
		Seite
Tab. 1-1:	Tabelle der Serotypen und Stämme	10
Tab. 4-1	Tabelle der chemischen Parameter für verschiedene Medien	71
Tab. 4-2	zeitlich abhängige pH-Entwicklung der verwendeten Medien	78
Tab. 4-3	Tabelle zur Auswirkung von Medium und pH-Wert auf die Serotypexpression	79
Tab. 4-4	Tabelle der Extinktionswerte (ELISA-Methode)	90
Tab. 10-1	Titertest des anti-156G Serums (Abb. 4-1)	164
Tab.10-2	Titertest des 156D-Serums (Abb. 4-2)	165
Tab.10-3	Auswirkung von Hunger auf die Serotypexpression (Abb. 4-23)	166
Tab. 10-4	Auswirkung verschiedener Medien auf das Populationswachstum (Abb. 4-24)	166
Tab. 10-5	Populationsentwicklung bei pH5 (Abb. 4-25)	167
Tab. 10-6	Populationswachstum bei pH6 (Abb. 4-26)	168
Tab.10-7	Populationswachstum bei pH7 (Abb. 4-27)	169
Tab. 10-8	Populationswachstum bei pH8 (Abb. 4-28)	170
Tab. 10-9	Populationsentwicklung bei pH9 (Abb. 4-29)	171
Tab. 10-10	Populationsentwicklung in Abhängigkeit von der Salinität	171

	(Abb. 4-34)	
Tab. 10-11	Populationsentwicklung bei Anwesenheit von Didinium (Abb. 4-36)	172
Tab. 10-12	Mischkulturentstehung bei der Induktion von 156D (Abb. 4-37)	172
Tab. 10-13	Immobilisierung einer Mischzellenkultur (Abb. 4-38)	172
Tab. 10-14	Prozentuale Zusammensetzung der Mischzellenkultur in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 4-42)	173
Tab. 10-15	Auswirkung verschiedener Umweltparameter auf die Zusammensetzung der Mischkultur (Abb. 4-43; 4-44; 4-45)	173
Tab. 10-16	Populationsentwicklung im Kontrollteich (Abb. 4-46)	174
Tab. 10-17	Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Herbstversuch (Abb. 4-47)	175
Tab. 10-18	Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Frühlingsversuch (Abb. 4-48)	175
Tab. 10-19	Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Sommersversuch (Abb. 4-49)	175
Tab. 10-20	Serotypentwicklung im Kühlteich (Abb. 4-50)	175

# 10 Anhang

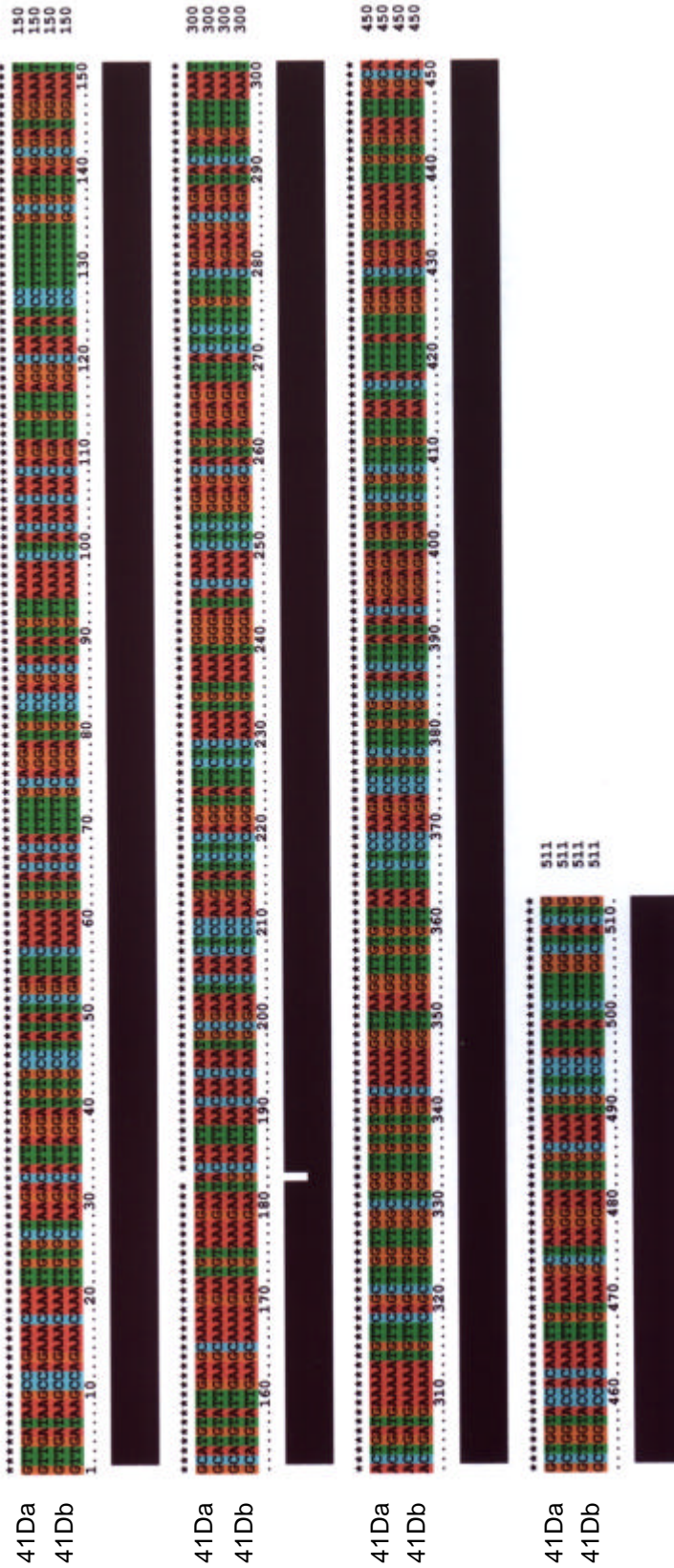


Abb. 10-1: Alignment der beiden Sequenzen von 41D (Legende: s.u.)

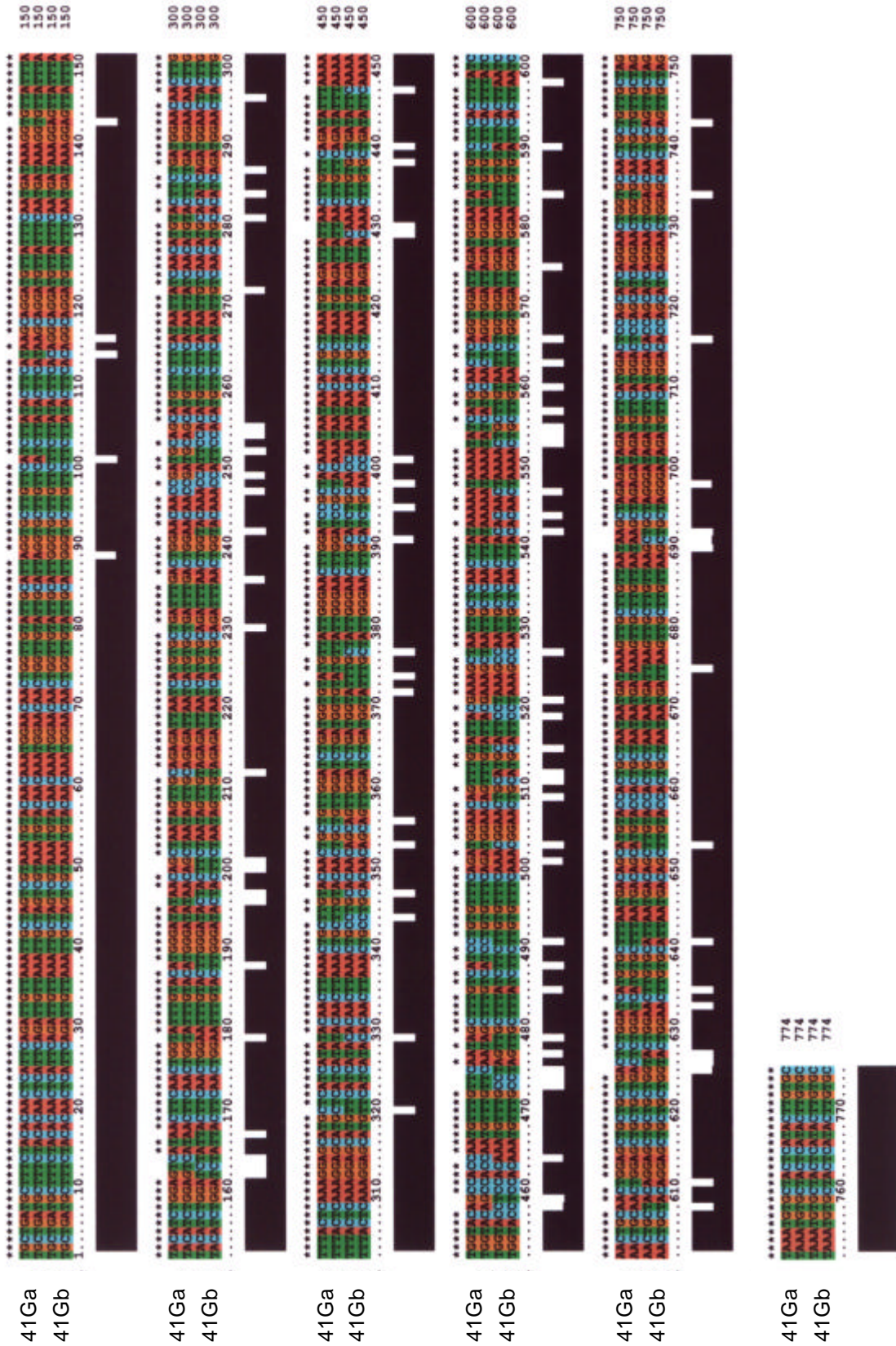


Abb. 10-2: Sequenzanalyse der beiden Sequenzen 41Ga und 41Gb

- C = Cytosin
- G = Guanin
- A = Adenin
- T = Thymin



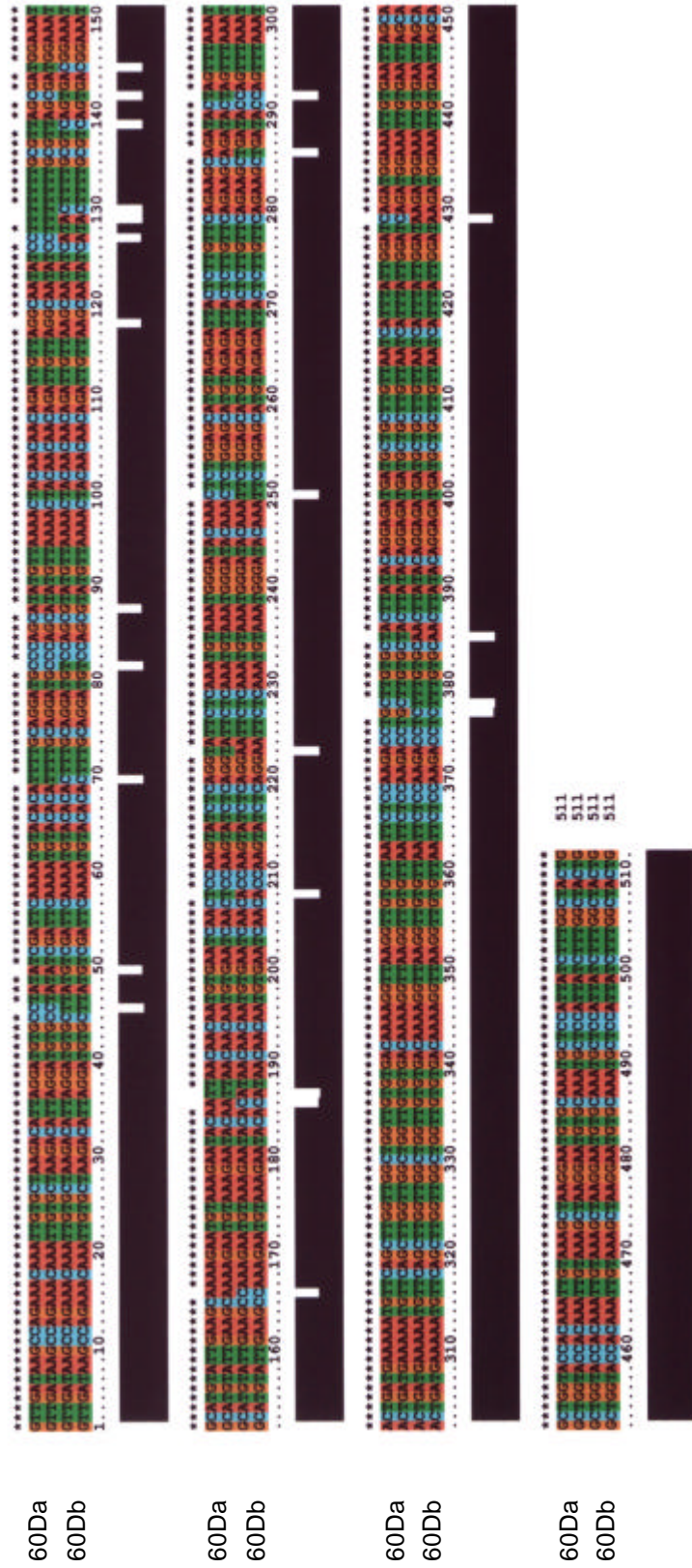


Abb. 10-3: Sequenzalignment der beiden Fragmente 60D

(Legende : s.o.)

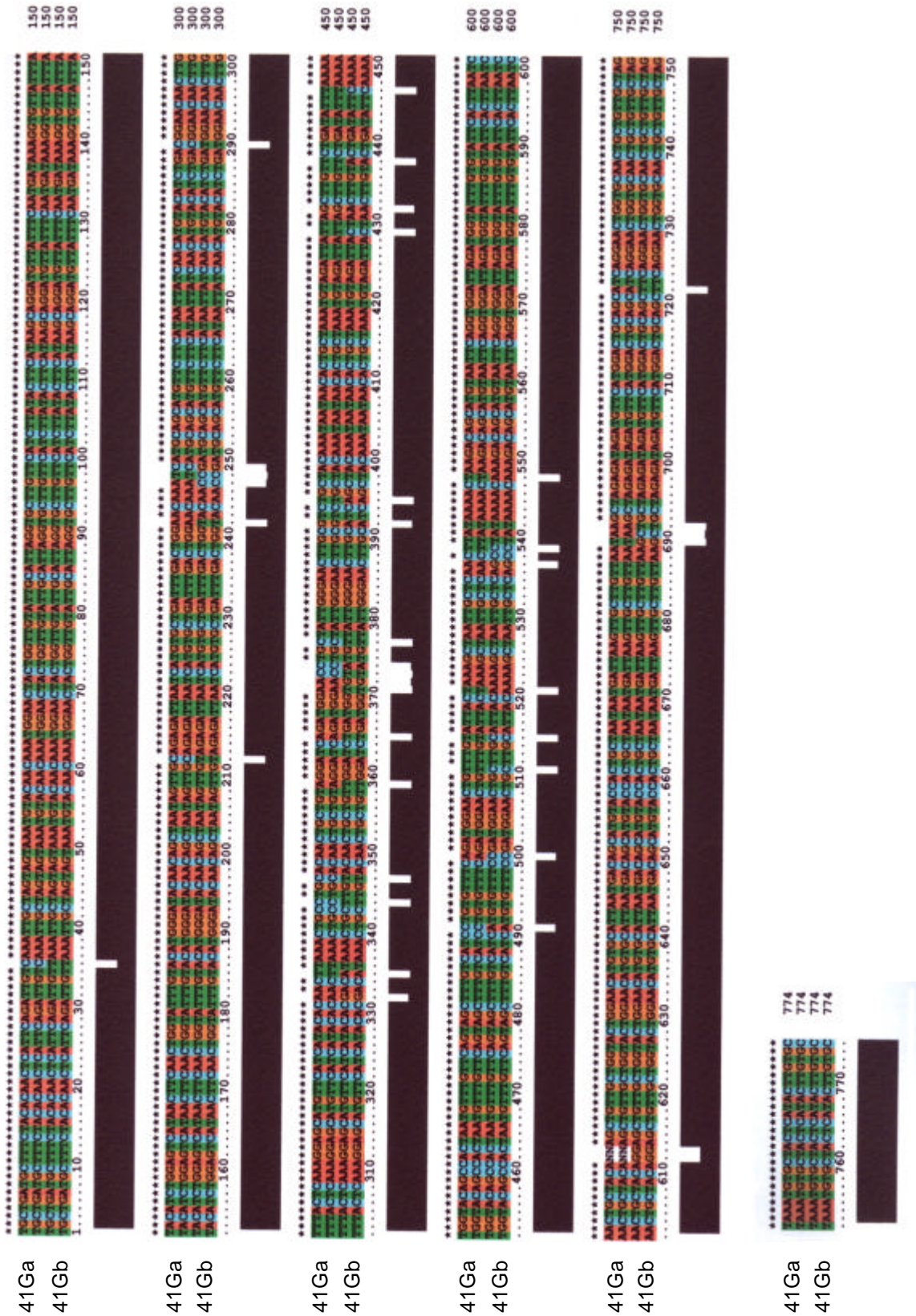


Abb. 10-4: Sequenzalignment der beiden Fragmente von 60G (Legende: s.o.)

**Rohdaten:****Titertest mit 156G-Serum**

5 min												
1:100	50	52	49	42	55	51	48	49	54	51	47	50
1:50	72	74	77	68	73	69	72	72	69	71	78	76
1:25	86	82	83	78	75	84	85	86	84	80	79	81
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

15 min												
1:100	92	99	89	98	93	91	92	95	91	99	98	90
1:50	99	98	99	100	95	99	98	99	98	97	99	100
1:25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

60 min												
1:100	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1:50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1:25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	5min	Summe Mw		Standar Mittelw			
				tabw.	ertabw.		
1:100	49	44	51	688	49,47	3,38	2,44
1:50	70	75	71	1018	72,47	3,02	2,43
1:25	83	80	77	1139	81,53	3,34	2,76
Kontrolle	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	15min						
1:100	92	89	92	1309	93,33	3,56	2,98
1:50	98	98	99	1378	98,40	1,24	0,91
1:25	100	100	100	1399	99,93	0,26	0,12
Kontrolle	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	60min						
1:100	100	99	100	1398	99,87	0,35	0,23
1:50	100	100	100	1400	100,00	0,00	0,00
1:25	100	100	100	1400	100,00	0,00	0,00
Kontrolle	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00

**Tab. 10-1: Titertest des anti-156G Serums (Abb. 4-1)**

5min											
1:100	2	1	3	1	2	2	5	3	1	1	1
1:50	2	1	3	1	1	1	1	3	2	2	2
1:25	2	4	1	3	2	2	1	2	5	1	2
Kontrolle	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
15min											
1:100	5	6	3	4	5	8	2	4	5	4	4
1:50	5	3	6	7	5	6	5	3	3	5	3
1:25	3	7	3	9	7	8	12	5	9	1	3
Kontrolle	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
30min											
1:100	61	59	54	57	54	64	61	59	54	58	49
1:50	78	74	68	80	87	80	77	85	73	75	74
1:25	93	99	89	97	92	89	87	99	91	89	82
Kontrolle	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
60min											
1:100	89	87	86	92	94	87	86	90	93	95	88
1:50	100	100	100	100	99	97	100	98	99	100	100
1:25	98	99	100	99	98	98	100	100	100	100	100
Kontrolle	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3
5min											
						Mw		Standartabw.		Mittelwertabw.	
1:100	1	1		3		1,87		1,19		0,92	
1:50	2	1		1		1,73		0,80		0,68	
1:25	2	2		4		2,47		1,25		1,02	
Kontrolle	0	0		0		0,13		0,35		0,23	
15min											
1:100	3	4		5		4,33		1,45		1,07	
1:50	4	4		3		4,33		1,35		1,16	
1:25	4	3		7		5,93		3,06		2,60	
Kontrolle	0	0		0		0,20		0,56		0,35	
30min											
1:100	64	52		55		56,93		4,43		3,67	
1:50	82	72		85		77,53		5,53		4,57	
1:25	88	92		93		91,60		4,60		3,49	
Kontrolle	0	0		0		0,27		0,59		0,43	
60min											
1:100	91	92		95		90,33		3,13		2,62	
1:50	100	99		99		99,33		0,90		0,71	
1:25	99	100		100		99,40		0,83		0,72	
Kontrolle	0	0		1		0,40		0,83		0,59	

Tab.10-2: Titer test des 156D-Serums (Abb. 4-2)



0 Tage		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	Mwabw
	<b>156D</b>	98	100	89	99	100	97	99	100	100	97	97,9	2,14
	<b>Misch</b>	2	0	11	1	0	3	1	0	0	3	2,1	2,14
8 Tage		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	Mwabw
	<b>156D</b>	10	15	11	8	5	9	13	8	9	15	10,3	2,56
	<b>Misch</b>	90	85	89	92	95	91	87	92	91	85	89,7	2,56
12		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	Mwabw
	<b>156D</b>	64	89	73	75	89	76	82	71	78	85	78,2	6,44
	<b>Misch</b>	36	11	27	25	11	24	18	29	22	15	21,8	6,44
14		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	Mwabw
	<b>156D</b>	90	91	85	88	96	89	90	91	87	91	89,8	2,04
	<b>Misch</b>	10	9	15	12	4	11	10	9	13	9	10,2	2,04

Tab.10-3: Auswirkung von Hunger auf die Serotypexpression (Abb. 4-23)

		A	B	C	D	E	MW	Mwabw	Mwabw/2
<b>StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 1</b>	31	2	10	15	23	16	8,64	4,32
	<b>Tag 2</b>	60	5	45	34	50	39	15,44	7,72
	<b>Tag 8</b>	550	290	1140	830	470	656	263,20	131,6
	<b>Tag 13</b>	210	280	1430	840	420	636	399,20	199,6
<b>TW</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 1</b>	25	6	31	9	27	20	9,68	4,84
	<b>Tag 2</b>	87	30	85	41	82	65	23,60	11,8
	<b>Tag 8</b>	120	45	70	57	115	81	28,88	14,44
	<b>Tag 13</b>	220	40	30	51	180	104	76,64	38,32
	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 1</b>	16	16	18	17	19	17	1,04	0,52
	<b>Tag 2</b>	60	60	100	52	112	77	23,36	11,68
	<b>Tag 8</b>	100	800	850	130	870	550	348,00	174
	<b>Tag 13</b>	490	290	760	340	630	502	154,40	77,2

Tab. 10-4: Auswirkung verschiedener Medien auf das Populationswachstum (Abb. 4-24)

		A	B	C	D	E	MW	Mwabw	Mwabw/2
<b>StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 2</b>	7	9	12	14	8	10	2,40	1,20
	<b>Tag 4</b>	28	54	78	54	34	50	14,88	7,44
	<b>Tag 7</b>	65	102	79	110	98	91	15,04	7,52
	<b>Tag 9</b>	89	150	110	105	160	123	25,76	12,88
	<b>Tag 14</b>	220	240	140	110	170	176	43,20	21,60
	<b>Tag 16</b>	210	210	98	113	150	156	43,04	21,52
<b>TW</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	10	12	6	8	17	11	3,12	1,56
	<b>Tag 4</b>	42	48	68	57	45	52	8,40	4,20
	<b>Tag 7</b>	98	102	120	108	84	102	9,28	4,64
	<b>Tag 9</b>	120	130	150	140	110	130	12,00	6,00
	<b>Tag 14</b>	150	130	140	150	120	138	10,40	5,20
	<b>Tag 16</b>	110	160	105	130	98	121	19,52	9,76
<b>TW + StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	8	14	6	15	22	13	4,80	2,40
	<b>Tag 3</b>	15	24	14	37	67	31	16,48	8,24
	<b>Tag 4</b>	27	46	19	48	110	50	24,00	12,00
	<b>Tag 8</b>	67	110	61	92	280	122	63,20	31,60
	<b>Tag 9</b>	155	210	140	240	370	223	65,60	32,80
	<b>Tag 12</b>	220	250	140	290	360	252	58,40	29,20
<b>TW + Sed</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 1</b>	4	6	5	5	7	5	0,88	0,44
	<b>Tag 2</b>	33	48	49	32	35	39	7,28	3,64
	<b>Tag 3</b>	51	97	108	89	67	82	18,72	9,36
	<b>Tag 7</b>	50	120	130	110	71	96	28,56	14,28
	<b>Tag 8</b>	105	140	140	110	96	118	17,44	8,72
	<b>Tag 9</b>	100	130	160	105	107	120	19,68	9,84

Tab. 10-5: Populationsentwicklung bei pH5 (Abb. 4-25)

		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>MW</b>	<b>Mwabw</b>	<b>Mwabw/2</b>
<b>StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 1</b>	31	2	10	15	23	16	8,64	4,32
	<b>Tag 2</b>	60	5	45	34	50	39	15,44	7,72
	<b>Tag 8</b>	550	290	1140	830	470	656	263,20	131,6
	<b>Tag 13</b>	210	280	1430	840	420	636	399,20	199,6
<b>TW</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	52	27	58	49	29	43	12,00	6,00
	<b>Tag 3</b>	140	61	120	99	84	101	23,36	11,68
	<b>Tag 4</b>	54	87	110	130	96	95	19,92	9,96
	<b>Tag 8</b>	110	82	160	170	100	124	32,48	16,24
	<b>Tag 9</b>	105	67	120	140	98	106	19,20	9,60
	<b>Tag 12</b>	94	86	115	130	82	101	16,88	8,44
<b>TW + StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	48	68	81	54	21	54	16,08	8,04
	<b>Tag 3</b>	98	64	110	89	56	83	18,72	9,36
	<b>Tag 4</b>	140	120	170	99	98	125	23,68	11,84
	<b>Tag 8</b>	240	210	320	110	97	195	73,52	36,76
	<b>Tag 9</b>	360	270	310	200	105	249	77,20	38,60
	<b>Tag 12</b>	290	280	270	160	110	222	69,60	34,80
<b>TW + Sed</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	74	41	89	84	52	68	17,20	8,60
	<b>Tag 3</b>	91	120	130	115	104	112	11,60	5,80
	<b>Tag 4</b>	120	99	130	118	100	113	11,12	5,56
	<b>Tag 7</b>	110	65	79	54	91	80	16,56	8,28
	<b>Tag 9</b>	105	85	102	83	108	97	10,08	5,04
	<b>Tag 14</b>	250	160	230	150	260	210	44,00	22,00
	<b>Tag 15</b>	270	320	250	150	280	254	43,20	21,60

Tab. 10-6: Populationswachstum bei pH6 (Abb. 4-26)

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>MW</b>	<b>Mwabw</b>	<b>Mwabw/2</b>
<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
<b>Tag 1</b>	10	8	14	12	7	10	2,24	1,12
<b>Tag 4</b>	410	220	470	430	205	347	107,60	53,80
<b>Tag 5</b>	730	840	1230	1150	780	946	195,20	97,60
<b>Tag 6</b>	720	630	1300	1110	740	900	244,00	122,00
<b>Tag 7</b>	610	720	1060	980	680	810	168,00	84,00
<b>Tag 8</b>	730	750	1400	1040	690	922	238,40	119,20
<b>Tag 11</b>	780	830	1110	1100	720	908	157,60	78,80
<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
<b>Tag 1</b>	7	10	7	9	12	9	1,60	0,80
<b>Tag 4</b>	90	70	70	88	85	81	8,48	4,24
<b>Tag 5</b>	110	82	120	95	110	103	11,92	5,96
<b>Tag 6</b>	62	85	91	72	98	82	11,68	5,84
<b>Tag 7</b>	82	92	110	95	124	101	13,12	6,56
<b>Tag 8</b>	180	140	110	154	168	150	20,32	10,16
<b>Tag 11</b>	160	110	71	125	150	123	26,16	13,08
<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
<b>Tag 1</b>	6	1	5	3	6	4	1,76	0,88
<b>Tag 4</b>	32	51	55	24	75	47	15,52	7,76
<b>Tag 5</b>	91	99	150	86	110	107	18,24	9,12
<b>Tag 6</b>	92	130	180	140	160	140	23,68	11,84
<b>Tag 7</b>	100	110	110	120	140	116	11,20	5,60
<b>Tag 8</b>	120	100	130	95	150	119	17,20	8,60
<b>Tag 11</b>	130	120	110	86	140	117	15,36	7,68
<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
<b>Tag 2</b>	100	115	89	112	86	100	10,48	5,24
<b>Tag 3</b>	180	150	160	150	140	156	11,20	5,60
<b>Tag 4</b>	130	150	120	160	120	136	15,20	7,60
<b>Tag 7</b>	240	210	150	230	140	194	39,20	19,60
<b>Tag 9</b>	240	230	150	240	150	202	41,60	20,80
<b>Tag 14</b>	130	230	300	320	180	232	62,40	31,20
<b>Tag 15</b>	180	320	330	370	210	282	69,60	34,80

Tab.10-7: Populationswachstum bei pH7 (Abb. 4-27)

		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>MW</b>	<b>Mwabw</b>	<b>Mwabw/2</b>
<b>StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 2</b>	12	6	12	9	7	9	2,24	1,12
	<b>Tag 4</b>	54	36	110	51	81	66	23,28	11,64
	<b>Tag 7</b>	150	89	300	110	160	162	55,28	27,64
	<b>Tag 9</b>	210	160	360	190	250	234	56,80	28,4
	<b>Tag 14</b>	670	450	840	620	750	666	104,80	52,4
	<b>Tag 16</b>	660	430	800	640	720	650	92,00	46
<b>TW</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	8	6	8	9	12	9	1,52	0,76
	<b>Tag 4</b>	28	19	21	17	26	22	3,84	1,92
	<b>Tag 6</b>	41	54	59	43	57	51	7,04	3,52
	<b>Tag 8</b>	120	130	150	130	160	138	13,60	6,8
	<b>Tag 13</b>	150	130	140	160	150	146	8,80	4,4
	<b>Tag 16</b>	130	130	145	150	150	141	8,80	4,4
<b>TW + StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 1</b>	7	4	9	8	10	8	1,68	0,84
	<b>Tag 2</b>	15	8	19	12	22	15	4,24	2,12
	<b>Tag 3</b>	48	18	54	71	61	50	13,92	6,96
	<b>Tag 7</b>	98	110	78	130	86	100	15,68	7,84
	<b>Tag 8</b>	160	120	88	160	96	125	28,16	14,08
	<b>Tag 9</b>	180	190	150	210	140	174	23,20	11,6
	<b>Tag 10</b>	190	240	260	350	210	250	44,00	22
	<b>Tag 14</b>	530	510	490	620	480	526	39,20	19,6
	<b>Tag 16</b>	510	540	450	600	470	514	44,80	22,4

Tab. 10-8: Populationswachstum bei pH8 (Abb. 4-28)

		A	B	C	D	E	MW	Mwabw	Mwabw/2
<b>StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0
	<b>Tag 2</b>	15	5	8	14	12	11	3,44	1,72
	<b>Tag 4</b>	54	64	82	75	62	67	8,88	4,44
	<b>Tag 7</b>	180	140	210	130	210	174	31,20	15,6
	<b>Tag 9</b>	290	230	280	310	290	280	20,00	10
	<b>Tag 14</b>	420	320	450	490	570	450	64,00	32
	<b>Tag 16</b>	410	380	420	500	450	432	34,40	17,2
<b>TW</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	9	12	10	8	7	9	1,44	0,72
	<b>Tag 4</b>	65	28	24	17	19	31	13,76	6,88
	<b>Tag 6</b>	81	66	42	56	62	61	9,92	4,96
	<b>Tag 8</b>	160	110	95	105	120	118	17,60	8,8
	<b>Tag 13</b>	170	130	90	110	130	126	20,80	10,4
	<b>Tag 16</b>	120	98	65	98	120	100	15,84	7,92
<b>TW + StM</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 1</b>	12	17	14	9	15	13	2,32	1,16
	<b>Tag 2</b>	24	32	19	15	39	26	7,76	3,88
	<b>Tag 3</b>	54	63	43	55	54	54	4,32	2,16
	<b>Tag 7</b>	115	130	89	120	98	110	13,52	6,76
	<b>Tag 8</b>	160	180	106	130	120	139	24,64	12,32
	<b>Tag 9</b>	210	220	140	140	140	170	36,00	18
	<b>Tag 10</b>	260	290	180	110	160	200	60,00	30
	<b>Tag 14</b>	350	470	210	270	350	330	72,00	36
	<b>Tag 16</b>	450	420	190	230	320	322	90,40	45,2
<b>TW + Sed</b>	<b>Tag 0</b>	5	5	5	5	5	5	0,00	0,00
	<b>Tag 2</b>	54	41	49	55	53	50	4,32	2,16
	<b>Tag 4</b>	33	62	54	67	66	56	10,32	5,16
	<b>Tag 6</b>	41	85	92	97	81	79	15,28	7,64
	<b>Tag 9</b>	310	160	110	140	170	178	52,80	26,4
	<b>Tag 12</b>	650	370	150	210	320	340	136,00	68
	<b>Tag 16</b>	600	380	43	120	310	291	167,28	83,64

Tab. 10-9: Populationsentwicklung bei pH9 (Abb. 4-29)

		A	B	C	D	E	P. prim.156	Mwabw	Mwabw/2
<b>Param.</b>	<b>0</b>	610	590	650	620	610	616	15,20	7,60
	<b>10</b>	500	490	490	460	510	490	12,00	6,00
	<b>20</b>	520	390	450	480	490	466	36,80	18,40
	<b>40</b>	430	410	440	390	420	418	14,40	7,20
	<b>50</b>	380	370	330	420	390	378	22,40	11,20
	<b>80</b>	290	270	310	330	290	298	17,60	8,80
	<b>160</b>	130	110	140	90	140	122	17,60	8,80

Tab. 10-10: Populationsentwicklung in Abhängigkeit von der Salinität (Abb. 4-34)

Param.		A	B	C	D	E	MW	Mwabw	Mwabw/2
Param.	Tag 0	100	100	100	100	100	100	0,00	0,00
	Tag 2	80	92	120	87	115	99	14,96	7,48
	Tag 4	65	72	89	69	82	75	8,08	4,04
	Tag 7	41	48	55	71	68	57	10,32	5,16
	Tag 9	30	35	24	73	54	43	16,24	8,12
	Tag 11	13	21	8	35	22	20	7,44	3,72
	Tag 15	0	0	0	2	1	1	0,72	0,36
Didinium	Tag 0	3	3	3	3	3	3	0,00	0,00
	Tag 2	3	3	4	3	4	3	0,48	0,24
	Tag 4	3	3	4	3	6	4	0,96	0,48
	Tag 7	8	7	5	7	13	8	2,00	1
	Tag 9	15	17	12	15	22	16	2,64	1,32
	Tag 11	34	41	32	27	43	35	5,28	2,64
	Tag 15	51	67	56	42	55	54	6,16	3,08

Tab. 10-11: Populationsentwicklung bei Anwesenheit von Didinium (Abb. 4-36)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	MW	MWabw
156G	1	1	6	7	0	0	1	0	0	0	1	5	1,83	2,08
156D	8	7	4	1	6	5	7	8	3	10	4	1	5,33	2,33
Misch	1	2	0	2	4	5	2	2	7	0	5	4	2,83	1,81

Tab. 10-12: Mischkulturentstehung bei der Induktion von 156D (Abb. 4-37)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	Mwabw
anti-156G-Serum	25	32	21	33	30	21	29	23	26	22	26,2	3,84
anti-156D-Serum	11	17	19	7	21	19	12	18	15	24	16,3	4,04
beide Seren	100	98	100	100	99	100	100	100	100	100	99,7	0,48

Tab. 10-13: Immobilisierung einer Mischzellenkultur (Abb. 4-38)

	Mittelwert M [%]	Mittelwert G [%]	Mittelwert D [%]
1	57,3	25,3	17,5
2	65,1	27,7	7,2
3	62,5	30,0	7,6
15	70,0	20,4	9,7

**Tab. 10-14: Prozentuale Zusammensetzung der Mischzellenkultur in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 4-42)**

	MW M [%]	MW G [%]	MW D [%]
Kontrolle	61,7	28,9	9,6
Hunger	15,7	77,0	7,3
10mM NaCl	60,7	30,0	8,9
20mM NaCl	57,8	25,6	6,6
50mM NaCl	53,56	41,82	4,62
pH5	26,9	69,6	3,5
pH6	47,4	45,8	6,8
pH7	62,3	29,1	8,6
pH8	56,5	35,6	7,9
pH9	45,2	50,3	4,5

**Tab. 10-15: Auswirkung verschiedener Umweltparameter auf die Zusammensetzung der Mischkultur (Abb. 4-43; 4-44; 4-45)**



		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>MW</b>	<b>Mwabw</b>	<b>Mwabw/2</b>
<b>Vers 1</b>	<b>Tag 0</b>	27	26	27	25	26	26	0,64	0,32
in TW	<b>Tag 2</b>	60	54	61	67	59	60	3,04	1,52
100%156G	<b>Tag 4</b>	20	19	17	19	22	19	1,28	0,64
7-10°C	<b>Tag 6</b>	15	14	21	15	11	15	2,32	1,16
	<b>Tag 9</b>	3	5	5	4	3	4	0,80	0,4
	<b>Tag 11</b>	10	11	10	7	12	10	1,20	0,6
	<b>Tag 14</b>	3	4	3	3	2	3	0,40	0,2
	<b>Tag 20</b>	2	5	1	3	4	3	1,20	0,6
	<b>Tag 23</b>	1	1	0	3	1	1	0,72	0,36
<b>Vers 2</b>									
in Stroh	<b>Tag 0</b>	30	34	31	29	33	31	1,68	0,84
50%156G	<b>Tag 3</b>	31	33	32	33	35	33	1,04	0,52
50%156D	<b>Tag 6</b>	61	65	64	59	56	61	2,80	1,4
Raumt.	<b>Tag 11</b>	21	27	19	23	26	23	2,64	1,32
	<b>Tag 13</b>	13	10	10	12	11	11	1,04	0,52
	<b>Tag 15</b>	15	14	16	14	12	14	1,04	0,52
	<b>Tag 20</b>	20	22	20	19	21	20	0,88	0,44
	<b>Tag 23</b>	14	12	9	10	14	12	1,84	0,92
<b>Vers 3</b>									
WGP/TW	<b>Tag 0</b>	20	21	20	23	19	21	1,12	0,56
50%156G	<b>Tag 2</b>	10	12	10	9	11	10	0,88	0,44
50% 156D	<b>Tag 5</b>	3	4	5	3	7	4	1,28	0,64
18°C	<b>Tag 8</b>	1	2	1	1	2	1	0,48	0,24
	<b>Tag 12</b>	1	0	1	0	2	1	0,64	0,32
	<b>Tag 16</b>	1	0	0	0	1	0	0,48	0,24

Tab. 10-16: Populationsentwicklung im Kontrollteich (Abb. 4-46)

Versuch 1	Tage	Zellen/ml	G [%]	X [%]
	0	26	100	0
	2	60	100	0
	4	19	100	0
	6	15	100	0
	9	4	100	0
	11	10	98	2
	14	3	97	3
	20	3	97	3
	23	1	95	5

Tab. 10-17: Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Herbstversuch (Abb. 4-47)

Versuch 2	Tage	Zellen/ml	G [%]	D [%]	X [%]
	0	31	50	50	0
	3	33	72	28	0
	6	61	90	10	0
	11	23	88	12	13
	15	14	92	5	3
	20	20	76	16	8
	23	12	79	9	12

Tab. 10-18: Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Frühlingsversuch (Abb. 4-48)

Versuch 3	Tage	Zellen/ml	G [%]	D [%]	X [%]
	0	21	50	50	0
	2	10	62	38	0
	5	4	81	17	2
	8	1	95	4	1
	12	1	94	3	3

Tab. 10-19: Serotypentwicklung im Kontrollteich/ Sommersversuch (Abb. 4-49)

Versuch KT	Wochen	Zellen/ml	G [%]	X [%]	Misch [%]	P. bursaria [%]	P. caudatum [%]
	0	220,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	43,0	51,2	48,8	0,0	0,0	0,0
	4	2,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	5	7,0	0,0	57,1	42,9	0,0	0,0
	6	100,0	0,0	0,0	0,0	50,0	50,0
	8	100,0	0,0	0,0	0,0	45,0	55,0

Tab. 10-20: Serotypentwicklung im Kühlteich (Abb. 4-50)

---

# 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. H.J. Schmidt für die Vergabe des interessanten Themas, seine hilfreichen Anregungen, sowie seine stete Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich für die Zeit bedanken, die er sich trotz engem Terminkalenders für die Betreuung meiner Arbeit genommen hat.

Herrn Prof. H. Zankl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. J. Cullum für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Ökologie, die mich während der gesamten Arbeit hilfreich unterstützt hat, besonders Hans Werner Breiner und Beatrix Weber für die Hilfe bei Klonierungen und anschließenden Sequenzierungen.

Meinen Laborkolleginnen Vera Müller-Ruprecht und Tamara Weisel danke ich für die gute Zusammenarbeit und den Spaß im Labor. Ein besonderer Dank geht an Martin Simon für seine rege Diskussionsbereitschaft. Seine Ideen gaben meiner Arbeit besonders im letzten Jahr neue molekularbiologische Impulse.

Dem Fachbereich Chemie danke ich für die Möglichkeit Gerätschaften zu benutzen, so z.B. die Gefriertrockenanlage der Abteilung Lebensmittelchemie und des ELISA-Photometers der Abteilung Biochemie.

Herrn Dr. Momayesi, sowie Prof. Dr. H. Plattner der Arbeitsgruppe Zellbiologie (Universität Konstanz) danke ich für die langjährige Kooperation, die zu einer Publikation führte.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Oliver und Jan-Eric bedanken, ohne deren Verständnis und Liebe ich sicherlich diese Arbeit nicht so glücklich zu Ende gebracht hätte.

---

## Curriculum Vitae

### Persönliches

#### **Petra Albrecht**

Diplom-Biologin

geboren am 09.12.1970

in Kaiserslautern

ledig (bis 22.08.03)

ein Sohn: Jan-Eric, geb. am 19.03.94

### Schulbildung

1976 – 1980

Grundschule in Kaiserslautern

1980 – 1990

Gymnasium mit Abitur am St. Franziskusgymnasium  
in Kaiserslautern

### Ausbildung

08/1990 – 06/1993

Ausbildung zur Chemielaborantin in der BASF-AG in  
Ludwigshafen

### Hochschulbildung

Am Fachbereich Biologie der Universität  
Kaiserslautern, im Studienfach Diplom-Biologie

10/1993 – 10/1996

**Grundstudium mit Vordiplom**

10/1996 – 07/1999

**Hauptstudium mit Diplom**

11/1998 – 07/1999

**Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Ökologie**  
(Arbeitskreis PD. Dr. J. Kusch)

Seit 08/1999

**Promotion in der Arbeitsgruppe Ökologie**  
(Arbeitskreis Prof. Dr. H.J. Schmidt)

---

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

-----  
Petra Albrecht