

**Genomweite Bestimmung von Chromatindichte und  
polycistronischer RNA-Synthese im Zuge der  
Stadiendifferenzierung des humanpathogenen  
Parasiten *Leishmania donovani* (Ross, 1903)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich der Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Janne Grünebast**  
aus Cuxhaven

Hamburg, 2022

Diese Arbeit wurde zwischen März 2019 und Februar 2022 in der Arbeitsgruppe und unter der Anleitung von PD Dr. Joachim Clos am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

**1. Gutachter:** PD Dr. Joachim Clos  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM)  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger  
Centre for Structural Systems Biology (CSSB)  
Notkestraße 85, 22607 Hamburg

**Disputation am: 22.04.2022**

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 17.02.2022

*J. Grünebart*

# Zusammenfassung

Leishmaniose zählt zu den bedeutendsten vernachlässigten Tropenkrankheiten weltweit und wird von einzelligen, protozoischen Parasiten der Gattung *Leishmania* verursacht. Die Krankheitsformen unterscheiden sich in kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniose, wobei letztere ohne Behandlung zum Tod führt. Die therapeutischen Optionen bei Leishmaniose beruhen auf Chemotherapie, die z.T. hohe Nebenwirkungen haben. Eine effektive Impfung gibt es bislang nicht.

Diese Arbeit befasst sich mit dem humanpathogenen Erreger der viszeralen Leishmaniose, *L. donovani*. *Leishmania* spp. durchlaufen während des Lebenszyklus eine Stadiendifferenzierung: längliche, begeißelte Promastigoten, die im Mitteldarm der Sandmücke leben, differenzieren bei einer Übertragung auf einen Säugetier-Wirt zu eiförmigen, unbegeißelten Amastigoten. Die Differenzierung wird durch eine erhöhte Temperatur und ein saures Milieu im Phagolysosom von phagozytierenden Zellen ausgelöst. In *L. donovani* kann diese Stadiendifferenzierung zum einen chemisch durch eine Hemmung des Hitzeschockproteins 90 und zum anderen durch eine Temperatur/pH-induzierte Differenzierung zu axenischen Amastigoten nachgeahmt werden. Die Stadiendifferenzierung ist von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Etablierung der *Leishmania*-Infektion im Wirt. Dabei zeigen diese Parasiten eine ungewöhnliche Regulation der Genexpression im Vergleich zu anderen Eukaryoten. Gene sind in Tandem-artigen Transkriptionseinheiten organisiert und werden polycistronisch transkribiert, wodurch eine Regulation der Transkription einzelner Gene unmöglich ist. Genexpression wird in *Leishmania* spp. auf anderen Stufen, wie Genkopien-Zahlen, mRNA-Stabilität und Translation reguliert.

*Ribosome profiling*-Analysen, die sich mit der Proteinsynthese vor dem Hintergrund der chemisch-induzierten Differenzierung durch Radicol (RAD) befassten, zeigten eine erhöhte Histonsynthese im Vergleich zu Promastigoten. In dieser Arbeit konnte ich durch *micrococcal nuclease* Assays zeigen, dass die erhöhte Histonsynthese in RAD-behandelten Promastigoten mit einer dichteren Chromatinstruktur einhergeht. Diese verdichtete Chromatinstruktur wurde auch für axenische Amastigotendifferenzierung und einen Hitzeschock bei 37 °C beobachtet, aber nicht bei einem G1-Zellzyklusarrest. Nachfolgend habe ich durch die Etablierung von ATAC-seq, einem Assay für Transposase-zugängliches Chromatin in Verbindung mit Hochdurchsatz-Sequenzierung, feststellen können, dass vor allem Regionen der Transkriptionsinitiation ein dichteres Chromatin bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung aufweisen. Sowohl divergente *strand switch regions* (dSSR), die zwischen zwei divergenten polycistronischen Transkriptionseinheiten (PTU) liegen, und Telomerregionen stromaufwärts des Transkriptionsstarts zeigten diese Verdichtung. Um zu prüfen, ob das dichtere Chromatin in den Regionen der Transkriptionsinitiation zu einer verringerten Transkription bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung führt, habe ich PRO-seq, eine hochauflösende *nuclear run-on* Reaktion mit anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung, in *L. donovani* etabliert, die

erste Anwendung dieser Methode in Trypanosomatida. Die Ergebnisse bestätigten endgültig, dass das Genom von *L. donovani* in PTUs organisiert ist, konstitutiv transkribiert wird und die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird. Eine Auswirkungen der dichteren Chromatinstuktur in dSSRs auf die Transkriptionsinitiation bei HSP90-Hemmung und axenischer Amastigotendifferenzierung konnte nicht festgestellt werden. Eine detaillierte, vergleichende Analyse aller divergenten und konvergenten SSRs in Promastigoten, RAD-behandelten Promastigoten und axenischen Amastigoten zeigte, dass Transkriptionsinitiation und -termination jeweils in den gleichen Bereichen stattfindet, was das Vorhandensein von definierbaren Transkriptions-Startpunkten vermuten lässt. Außerdem wurden Hinweise auf pausierende RNA Polymerase II Komplexe gefunden, weshalb sich in zukünftigen Analysen die Frage stellt, welchen Einfluss *promoter-proximal pausing* in der Transkription von *Leishmania* spp. hat.

# Abstract

Leishmaniasis is one of the most important neglected tropical diseases worldwide and is caused by unicellular, protozoan parasites of the genus *Leishmania*. The manifestations of the disease are distinguished into cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis, the latter leading to death in the absence of treatment. The therapeutic options for leishmaniasis are based on chemotherapy, which often has severe side effects. There is no effective vaccine yet.

This thesis deals with the human pathogenic agent of visceral leishmaniasis, *L. donovani*. *Leishmania* spp. undergo stage differentiation during their life cycle: elongated, flagellated promastigotes living in the midgut of the sandfly differentiate into ovoid, aflagellated amastigotes when transmitted to a mammalian host. Differentiation is triggered by an elevated temperature and the acidic environment in the phagolysosome of phagocytosing cells. In *L. donovani*, this stage differentiation can be mimicked either chemically by inhibition of the heat shock protein 90, or by temperature/pH-induced differentiation into so-called axenic amastigotes. Stage differentiation is central to the effective establishment of *Leishmania* infection in the host. In this context, these parasites show an unusual regulation of gene expression compared to other eukaryotes. Genes are organised in tandemly arranged transcription units and are transcribed polycistronically, making regulation of transcription of individual genes impossible. Gene expression in *Leishmania* spp. is regulated at other levels, such as gene copy numbers, mRNA stability and translation.

Ribosome profiling analyses looking at protein synthesis in the context of chemically induced differentiation by HSP90 inhibition using radicicol (RAD) showed increased histone synthesis compared to promastigotes. In this work, I was able to show by micrococcal nuclease assays that the increased histone synthesis in RAD-treated promastigotes coincides with a denser chromatin structure, which was also observed for axenic amastigote differentiation and heat shock at 37 °C, but not during a G1 cell cycle arrest. Subsequently, by establishing ATAC-seq, an assay for transposase-accessible chromatin in combination with high-throughput sequencing, I was able to show that regions of transcription initiation in particular exhibit denser chromatin upon chemical- and temperature/pH-induced differentiation. Both divergent strand switch regions (dSSR), located between two divergent polycistronic transcription units (PTUs), and telomere regions upstream of PTUs showed this condensation. To test whether the denser chromatin in the regions of transcription initiation leads to reduced transcription in chemical- and temperature/pH-induced differentiation, I established PRO-seq, a precise nuclear run-on reaction followed by high-throughput sequencing, in *L. donovani*, which is the first application of this method in Trypanosomatida. The results ultimately confirmed that the *L. donovani* genome is organised in PTUs, is constitutively transcribed, and that gene expression is regulated at the post-transcriptional level. An effect of the denser chromatin structure in dSSRs on transcription initiation upon HSP90 inhibition and axenic amastigote differentiation could not be observed. Detailed comparative analysis of all divergent and

convergent SSRs in promastigotes, RAD-treated promastigotes and axenic amastigotes revealed that transcription initiation and termination occur in the same regions in each case, suggesting the presence of definable transcription start sites. Furthermore, evidence of paused RNA polymerase II complexes was found, which raises the question of the influence of promoter-proximal pausing in *Leishmania* spp. transcription in future analyses.

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>I</b>    |
| <b>Abstract</b>  | <b>III</b>  |
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>  | <b>V</b>    |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>XI</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis und Symbole</b>   | <b>XIII</b> |
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>    |
| 1.1 Leishmaniose: Krankheitsbild und geographische Verbreitung                       | 1           |
| 1.2 Lebenszyklus von Leishmania spp.   | 3           |
| 1.2.1 Axenische Amastigotendifferenzierung   | 4           |
| 1.3 Die Bedeutung von HSP90 in der Stadiendifferenzierung                            | 5           |
| 1.3.1 Hitzeschockproteine  | 5           |
| 1.3.2 Funktion von HSP90   | 6           |
| 1.3.3 HSP90-spezifische Genexpression in der Stadiendifferenzierung                  | 7           |
| 1.4 Genomorganisation, Chromatinstruktur und Genexpression                           | 8           |
| 1.4.1 Genomorganisation in Leishmania spp.   | 8           |
| 1.4.2 Genexpressionskontrolle in Leishmania spp.                                     | 9           |
| 1.4.3 Chromatinstruktur und epigenetische Regulation der Transkription in Eukaryoten | 11          |
| 1.4.4 Epigenetische Regulation in Leishmania spp.                                    | 13          |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit   | 14          |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | <b>16</b>   |
| 2.1 Material   | 16          |
| 2.1.1 Leishmania Stämme  | 16          |
| 2.1.2 Plasmide   | 16          |
| 2.1.3 Oligonukleotide  | 16          |
| 2.1.4 Puffer und Lösungen  | 18          |
| 2.1.5 Zellkulturmedien   | 20          |
| 2.1.6 Antibiotika und Inhibitoren  | 21          |
| 2.1.7 Enzyme   | 21          |
| 2.1.8 Antikörper   | 22          |
| 2.1.9 Kits   | 22          |
| 2.1.10 Größenstandards und Färbemittel   | 23          |
| 2.1.11 Biotin nuclear run-on und Anreicherung  | 23          |

|  |    |
|--|----|
| 2.1.12 Chemikalien   | 23 |
| 2.1.13 Verbrauchsmaterialien   | 24 |
| 2.1.14 Laborgeräte   | 24 |
| 2.1.15 Computerprogramme, Online Ressourcen und Datenbanken                  | 26 |
| 2.2 Methoden   | 27 |
| 2.2.1 Zellbiologische Methoden   | 27 |
| 2.2.1.1 Kultivierung von Promastigoten                                       | 27 |
| 2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Leishmanien                       | 27 |
| 2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahlen  | 27 |
| 2.2.1.4 Axenische Amastigotendifferenzierung                                 | 27 |
| 2.2.1.5 Behandlung mit Radicol und Hydroxyurea                               | 28 |
| 2.2.1.6 Fixieren von Zellen auf Objektträgern                                | 28 |
| 2.2.2 Molekularbiologische Methoden  | 28 |
| 2.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien                       | 28 |
| 2.2.2.2 Micrococcal nuclease (MNase) Assay                                   | 28 |
| 2.2.2.3 Gelelektrophorese  | 29 |
| 2.2.3 ATAC-Seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing) | 29 |
| 2.2.3.1 Zellpräparation  | 29 |
| 2.2.3.2 Transposition und Aufreinigung                                       | 30 |
| 2.2.3.3 gDNA Kontrolle   | 30 |
| 2.2.3.4 PCR Amplifikation  | 30 |
| 2.2.3.5 Bestimmung der Zyklenzahl via qPCR und finale Amplifikation          | 31 |
| 2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung und Illumina Sequenzierung                  | 31 |
| 2.2.3.7 Bioinformatische Analyse der ATAC-seq Daten                          | 31 |
| 2.2.4 PRO-seq (precision nuclear run-on and sequencing)                      | 32 |
| 2.2.4.1 Kernisolierung aus Leishmania spp.                                   | 32 |
| 2.2.4.2 Nuclear run-on   | 32 |
| 2.2.4.3 RNA-Isolierung aus der nuclear run-on Reaktion                       | 33 |
| 2.2.4.4 RNA-Fragmentierung durch Basenhydrolyse                              | 33 |
| 2.2.4.5 Biotin RNA-Anreicherung  | 33 |
| 2.2.4.6 3' RNA Adapterligation und zweite Biotin RNA-Anreicherung            | 34 |
| 2.2.4.7 5' RNA Adapterligation und dritte Biotin RNA-Anreicherung            | 34 |
| 2.2.4.8 Reverse Transkription  | 35 |
| 2.2.4.9 Test PCR Amplifikation   | 35 |
| 2.2.4.10 Kontrolle der Test PCR Amplifikation via PAGE                       | 36 |
| 2.2.4.11 Full-Scale Amplifikation  | 37 |
| 2.2.4.12 Aufreinigung der library via PAGE                                   | 37 |
| 2.2.4.13 Bestimmung der Konzentration und Illumina Sequenzierung             | 38 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.4.14 Bioinformatische Analyse der PRO-seq Daten  | 38        |
| 2.2.5 Mikroskopie  | 38        |
| 2.2.5.1 Immunfluoreszenz   | 38        |
| 2.2.6 Statistik  | 38        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>39</b> |
| 3.1 Etablierung eines micrococcal nuclease Assays zur Bestimmung der Chromatinstruktur in <i>L. donovani</i>                         | 39        |
| 3.1.1 Der Einfluss von HSP90 auf die Chromatindichte   | 40        |
| 3.1.2 Der Einfluss von Hitzeschock oder axenischer Amastigotendifferenzierung auf die Chromatindichte                                | 43        |
| 3.1.3 Der Einfluss eines Hydroxyurea-induzierten Zellzyklusarrest auf die Chromatindichte  | 45        |
| 3.2 Etablierung von ATAC-seq für eine genomweite Analyse von Chromatindichte   | 47        |
| 3.2.1 ATAC-seq library preparation und Sequenzierung   | 48        |
| 3.2.2 Bestimmung von Peaks und Peak Längen   | 49        |
| 3.2.3 Alignment der Peaks  | 50        |
| 3.2.4 Verteilung von offenen Chromatinbereichen im Genom von <i>L. donovani</i>  | 52        |
| 3.2.5 Offenes Chromatin in Regionen der Transkriptionsinitiation   | 53        |
| 3.2.6 Wechsel zu offenen Chromatinbereichen unmittelbar stromaufwärts von polycistronischen Transkriptionseinheiten in Promastigoten | 55        |
| 3.2.7 tRNAs und rRNAs liegen in offenen Chromatinbereichen   | 57        |
| 3.3 Etablierung von PRO-seq zur Messung der RNA-Synthese   | 61        |
| 3.3.1 PRO-seq library preparation  | 61        |
| 3.3.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung  | 63        |
| 3.3.3 Konstitutive Transkription des Genoms von <i>L. donovani</i>   | 65        |
| 3.3.4 Verteilung der PRO-seq reads   | 66        |
| 3.3.5 Transkriptionsinitiation innerhalb der dSSRs   | 70        |
| 3.3.6 Transkriptionstermination innerhalb der cSSRs  | 72        |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>75</b> |
| 4.1 Chromatinstruktur im Zuge der Stadiendifferenzierung und der Einfluss auf die Transkription                                      | 76        |
| 4.1.1 Dichteres Chromatin ist spezifisch für die Stadiendifferenzierung  | 77        |
| 4.1.2 Veränderungen in der Chromatinstruktur zeigen sich in Bereichen der Transkriptionsinitiation                                   | 79        |
| 4.1.3 Der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Transkriptionsinitiation  | 80        |
| 4.2 PRO-seq als Methode zur Analyse der Transkription in <i>L. donovani</i>  | 82        |
| 4.2.1 Etablierung von PRO-seq  | 83        |
| 4.2.2 Konstitutive Transkription in <i>L. donovani</i>   | 84        |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 4.2.3 Transkriptionsinitiation in <i>L. donovani</i>  | 85                |
| 4.2.4 Transkriptionstermination in <i>L. donovani</i> | 87                |
| 4.3 Fazit   | 88                |
| <b><u>Bibliografie</u></b>                            | <b><u>89</u></b>  |
| <b><u>Anhang</u></b>                                  | <b><u>104</u></b> |
| <b><u>Publikationen</u></b>                           | <b><u>144</u></b> |
| <b><u>Danksagung</u></b>                              | <b><u>145</u></b> |

# Abbildungsverzeichnis

|                     |   |    |
|---------------------|---|----|
| <b>Abbildung 1</b>  | Weltweite Verbreitung der viszeralen Leishmaniose (VL) in 2020  | 2  |
| <b>Abbildung 2</b>  | Lebenszyklus von <i>Leishmania</i> spp.   | 4  |
| <b>Abbildung 3</b>  | Elektronenmikroskopische Aufnahmen von axenischen Amastigoten und Geldanamycin-behandelten Promastigoten.                 | 7  |
| <b>Abbildung 4</b>  | Polycistronische Transkription in <i>Leishmania</i> spp.  | 9  |
| <b>Abbildung 5</b>  | Chromatinstruktur   | 11 |
| <b>Abbildung 6</b>  | <i>Micrococcal nuclease</i> Verdau von <i>L. don</i> 1S Promastigoten   | 39 |
| <b>Abbildung 7</b>  | Phänotypanalyse einer RAD-induzierten HSP90-Hemmung auf <i>L. don</i> Promastigoten                                       | 41 |
| <b>Abbildung 8</b>  | Phänotypanalyse einer RAD-induzierten HSP90-Hemmung auf <i>L. don</i> Promastigoten mit episomaler Expression von HSP90rr | 42 |
| <b>Abbildung 9</b>  | <i>Micrococcal nuclease</i> Assay von axenischen Amastigoten und bei Hitzeschock (37 °C)                                  | 44 |
| <b>Abbildung 10</b> | Phänotypanalyse eines Hydroxyurea (HU)-induzierten G1-Zellzyklusarrests in <i>L. don</i> Promastigoten                    | 46 |
| <b>Abbildung 11</b> | Schematischer Ablauf des ATAC-seq   | 47 |
| <b>Abbildung 12</b> | Anzahl und Länge von Peaks  | 49 |
| <b>Abbildung 13</b> | Alignment der ATAC Peaks der Chromosomen 1, 16, 25, 31 und 36 von <i>L. donovani</i>                                      | 51 |
| <b>Abbildung 14</b> | Verteilung offener Chromatinbereiche über das Genom von <i>L. donovani</i>  | 52 |
| <b>Abbildung 15</b> | Chromatinstruktur in Bereichen der Transkriptionsinitiations und -termination   | 54 |
| <b>Abbildung 16</b> | ATAC Peaks in Nukleotid-genauer Auflösung innerhalb von dSSRs und der proximalen, kodierenden Regionen                    | 56 |
| <b>Abbildung 17</b> | ATAC Peaks in Nukleotid-genauer Auflösung im Bereich der 5' Telomere und der proximalen, kodierenden Regionen             | 57 |
| <b>Abbildung 18</b> | Schematischer Ablauf des PRO-seq in <i>Leishmania</i> spp.  | 62 |
| <b>Abbildung 19</b> | Verteilung der Basen und Länge der <i>reads</i>   | 64 |
| <b>Abbildung 20</b> | Alignment der PRO-seq <i>reads</i> der Chromosom 3, 32 und 36   | 66 |
| <b>Abbildung 21</b> | Verteilung und Abdeckung einzelner Bereiche des Genoms von <i>L. donovani</i> mit PRO-seq <i>reads</i>                    | 68 |
| <b>Abbildung 22</b> | 3' Telomerregion auf Chromosom 27   | 70 |

|                     |   |     |
|---------------------|---|-----|
| <b>Abbildung 23</b> | Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in<br><i>L. donovani</i>  | 71  |
| <b>Abbildung 24</b> | Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in<br><i>L. donovani</i> | 73  |
| <b>Abbildung 25</b> | Amplifikation der PRO-seq <i>library</i>  | 104 |
| <b>Abbildung 26</b> | Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 1-8  | 105 |
| <b>Abbildung 27</b> | Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 9-16                                       | 106 |
| <b>Abbildung 28</b> | Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 17-24                                      | 107 |
| <b>Abbildung 29</b> | Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 25-32                                      | 108 |
| <b>Abbildung 30</b> | Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 33-36                                      | 109 |

# Tabellenverzeichnis

|                   |   |       |
|-------------------|---|-------|
| <b>Tabelle 1</b>  | Übersicht der verwendeten <i>Leishmania</i> Stämme                            | 16    |
| <b>Tabelle 2</b>  | Übersicht der verwendeten Plasmide  | 16    |
| <b>Tabelle 3</b>  | Übersicht der verwendeten Oligonukleotide                                     | 16/17 |
| <b>Tabelle 4</b>  | Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen                            | 18-20 |
| <b>Tabelle 5</b>  | Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien                                    | 21    |
| <b>Tabelle 6</b>  | Übersicht der verwendeten Antibiotika und Inhibitoren                         | 21    |
| <b>Tabelle 7</b>  | Übersicht der verwendeten Enzyme  | 22    |
| <b>Tabelle 8</b>  | Übersicht der verwendeten Antikörper  | 22    |
| <b>Tabelle 9</b>  | Übersicht der verwendeten Kits  | 22/23 |
| <b>Tabelle 10</b> | Übersicht der verwendeten Größenstandards und Färbemittel                     | 23    |
| <b>Tabelle 11</b> | Übersicht der verwendeten Materialien für den <i>nuclear run-on</i> (PRO-seq) | 23    |
| <b>Tabelle 12</b> | Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien                          | 24    |
| <b>Tabelle 13</b> | Übersicht über die verwendeten Laborgeräte                                    | 24/25 |
| <b>Tabelle 14</b> | Verwendete Computerprogramme, Online-Ressourcen und Datenbanken               | 26    |
| <b>Tabelle 15</b> | PCR-Ansatz für die Barcode-PCR  | 30    |
| <b>Tabelle 16</b> | PCR Programm, Teilamplifikation   | 30    |
| <b>Tabelle 17</b> | PCR-Ansatz für die Barcode-PCR  | 31    |
| <b>Tabelle 18</b> | qPCR Programm   | 31    |
| <b>Tabelle 19</b> | Zusammensetzung des 2x <i>run-on</i> Mix (2x NRO)                             | 32    |
| <b>Tabelle 20</b> | Ligationsmix für die Adapterligation  | 34    |
| <b>Tabelle 21</b> | Primer-Mix  | 35    |
| <b>Tabelle 22</b> | RT-Puffer-Mix   | 35    |
| <b>Tabelle 23</b> | Verdünnungsreihe der cDNA für die Test-Amplifikation                          | 35    |
| <b>Tabelle 24</b> | PCR-Ansatz für die Testamplifikation  | 36    |
| <b>Tabelle 25</b> | Amplifikation Test-PCR  | 36    |
| <b>Tabelle 26</b> | Zusammensetzung 8%iges Polyacrylamidgel                                       | 36    |
| <b>Tabelle 27</b> | PCR-Mix für die finale Amplifikation  | 37    |
| <b>Tabelle 28</b> | finale Amplifikation  | 37    |

|                   |   |         |
|-------------------|---|---------|
| <b>Tabelle 29</b> | <i>Output</i> des ATAC-seq  | 48      |
| <b>Tabelle 30</b> | ATAC Peak Abdeckung von rRNA-Genen  | 58      |
| <b>Tabelle 31</b> | ATAC Peak Abdeckung von tRNA-Genen  | 59/60   |
| <b>Tabelle 32</b> | <i>Output</i> des PRO-seq   | 63      |
| <b>Tabelle 33</b> | Alignment der PRO-seq <i>reads</i> aller 36 Chromosomen in <i>L. donovani</i> | 110-117 |
| <b>Tabelle 34</b> | Übersicht der Positionen der dSSRs im Genom von <i>L. donovani</i>            | 118-119 |
| <b>Tabelle 35</b> | Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in <i>L. donovani</i> | 120-132 |
| <b>Tabelle 36</b> | Übersicht der Positionen der cSSRs im Genom von <i>L. donovani</i>            | 132-133 |
| <b>Tabelle 37</b> | Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von cSSRs in <i>L. donovani</i> | 134-143 |

# Abkürzungsverzeichnis und Symbole

|                    |   |
|--------------------|---|
| °C                 | Grad Celsius                                      |
| ®                  | Registrierte Marke                                |
| ™                  | <i>trade mark</i>                                 |
| α                  | alpha   |
| μg                 | Mikrogramm  |
| μL                 | Mikroliter  |
| μM                 | Mikromolar  |
| A                  | Adenin  |
| A2                 | Stress Protein A2                                 |
| ac                 | acetyl  |
| Ama                | Amastigote  |
| APC                | <i>antigen presenting cells</i>                   |
| APS                | Ammoniumperoxodisulfat                            |
| ASF1               | <i>Anti-silencing function 1</i>                  |
| ATAC               | <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin</i> |
| ATP                | Adenosintriphosphat                               |
| ATPase             | Adenosintriphosphatasen                           |
| bp                 | Basenpaar   |
| BSA                | Bovines Serumalbumin                              |
| C                  | Cytosin   |
| CAF1               | <i>Chromatin assembly factor 1</i>                |
| Cd <sup>2+</sup>   | Cadmiumionen                                      |
| cDNA               | <i>complementary DNA</i>                          |
| ChIP               | <i>Chromatin immunoprecipitation</i>              |
| Chr.               | Chromosom   |
| CL                 | Kutane Leishmaniose                               |
| Cu <sup>2+</sup>   | Kupferionen                                       |
| CpG                | CpG-Dinukleotid                                   |
| C-Terminus         | Carboxyl-Terminus                                 |
| cSSR               | konvergente SSR                                   |
| CTP                | Cytidintriphosphat                                |
| DAPI               | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                      |
| ddH <sub>2</sub> O | zweifach destilliertes Wasser                     |
| DEPC               | Diethyldicarbonat                                 |
| d. h.              | das heißt   |

|               |   |
|---------------|---|
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure  |
| DNAJ          | Chaperon DNAJ   |
| DNMT          | C-5 DNA Methyltransferase                                     |
| dNTP          | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                |
| <i>don.</i>   | <i>donovani</i>   |
| DOT1B         | Histon-Methyltransferase                                      |
| dSSR          | divergente SSR  |
| DTT           | Dithiothreitol  |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| eIF2 $\alpha$ | <i>Eukaryotic Initiation Factor-2<math>\alpha</math></i>      |
| eIF4E         | <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>            |
| et al.        | lat. et alii  |
| FACT          | <i>Facilitates Chromatin Transcription</i>                    |
| FAIRE         | <i>Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements</i> |
| FCS           | <i>fetal calf serum</i>                                       |
| G             | Guanin  |
| GA            | Geldanamycin  |
| GC            | Guanin, Cytosin   |
| gDNA          | genomische DNA  |
| GRO           | <i>Global Run-On</i>  |
| GRP94         | <i>Glucose-regulated protein 94</i>                           |
| h             | <i>hours</i>  |
| H             | Histon  |
| HAT           | Histon-Acetyltransferasen                                     |
| HEPES         | N-2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure              |
| Hi-C          | <i>Chromosome conformation capture (all-vs-all)</i>           |
| HIV           | Humanes Immundefizienz-Virus                                  |
| Hsc70         | <i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>                      |
| HSP           | Hitzeschockprotein  |
| HSP90rr       | RAD resistente Variante von HSP90                             |
| HU            | Hydroxyurea   |
| I             | Isoleucin   |
| IgG           | Immunglobulin-G   |
| JBP1          | Thymidine hydroxylase 1                                       |
| JBP2          | Thymidine hydroxylase 2                                       |
| JBP3          | Base J bindendes Protein                                      |
| K             | Lysin   |
| kb            | Kilobasen   |

|            |   |
|------------|---|
| kbp        | Kilobasenpaare  |
| kDA        | Kilo Dalton   |
| L          | Liter   |
| <i>L.</i>  | <i>Leishmania</i>   |
| lat.       | <i>lateinisch</i>   |
| M          | Molar   |
| mAb        | monoklonaler Antikörper                                   |
| MAPK1      | <i>mitogen-activated protein kinase 1</i>                 |
| max.       | maximal   |
| Mb         | Megabase  |
| MCL        | Mukokutane Leishmaniose                                   |
| me         | methyl  |
| mg         | Milligramm  |
| min        | Minute  |
| mL         | Milliliter  |
| mm         | Millimeter  |
| mM         | Millimolar  |
| MNase      | <i>Micrococcal nuclease</i>                               |
| mRNA       | messenger RNA   |
| N          | Normalität  |
| NASP       | <i>nuclear autoantigenic sperm protein</i>                |
| NET        | <i>Native Elongating Transcript</i>                       |
| ng         | Nanogramm   |
| nm         | Nanometer   |
| nt         | Nukleotid   |
| NTD        | <i>neglected tropical disease</i>                         |
| NTP        | Nukleosidtriphosphat                                      |
| N-Terminus | Amino-Terminus  |
| PAGE       | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                           |
| PBS        | Phosphatgepufferte Salzlösung                             |
| PCR        | Polymerase Kettenreaktion                                 |
| PEG        | Polyethylenglykol   |
| PfHda2     | Histon-Deacetylase in <i>Plasmodium falciparum</i>        |
| PfHP1      | Heterochromatin Protein 1 in <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfSET2     | Histon-Methyltransferase in <i>Plasmodium falciparum</i>  |
| pH         | lat. pondus hydrogenii                                    |
| PKDL       | Post-Kala-Azar Hautleishmaniose                           |
| PMSF       | Phenylmethylsulfonylfluorid                               |

|           |   |
|-----------|---|
| pre-mRNA  | Vorläufer mRNA  |
| Pro       | Promastigote  |
| PRO       | <i>Precision nuclear run-on</i>   |
| Pro/RAD   | Promastigote mit Radicicol behandelt  |
| PTM       | posttranslationale Modifikation   |
| PTU       | polycistronischen Transkriptionseinheit ( <i>polycistronic transcription unit</i> ) |
| qRT-PCR   | <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>                             |
| RAD       | Radicicol   |
| RBP       | RNA-bindende Proteine   |
| RNA       | Ribonukleinsäuren   |
| RNA Pol   | RNA Polymerase  |
| RNase     | Ribonukleasen   |
| rRNA      | ribosomale RNA  |
| RT        | Raumtemperatur  |
| s         | Sekunden  |
| SDS       | Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )                               |
| seq       | sequencing  |
| SIDER     | <i>Short Interspersed Degenerated Retroposon</i>                                    |
| SL        | <i>spliced leader</i>   |
| sog.      | sogenannt   |
| spp.      | Spezies   |
| SSR       | <i>strand switch regions</i>  |
| Sti1      | <i>stress-inducible protein 1</i>   |
| T         | Thymin  |
| <i>T.</i> | <i>Trypanosoma</i>  |
| TAE       | Tris-Acetat-EDTA  |
| TBE       | Tris-Borat-EDTA   |
| TEMED     | Tetramethylethyldiamin  |
| TRAP1     | <i>TNF receptor associated protein 1</i>  |
| TRIS      | Tris(hydroxymethyl)aminomethan  |
| tRNA      | transfer-RNA  |
| U         | <i>Units</i> , Einheiten  |
| u. a.     | unter anderem   |
| UTR       | untranslatierte Region  |
| UV        | Ultraviolett  |
| ü.N.      | über Nacht  |
| V         | Volt  |
| <i>V.</i> | <i>Viannia</i>  |

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| VL      | Viszerale Leishmaniose              |
| vol/vol | Volumenprozent                      |
| VSG     | <i>variant surface glycoprotein</i> |
| WHO     | Weltgesundheitsorganisation         |
| WT      | Wildtyp                             |
| w/vol   | Gewicht/Volumen                     |
| z. B.   | zum Beispiel                        |
| z. T.   | zum Teil                            |

# 1. Einleitung

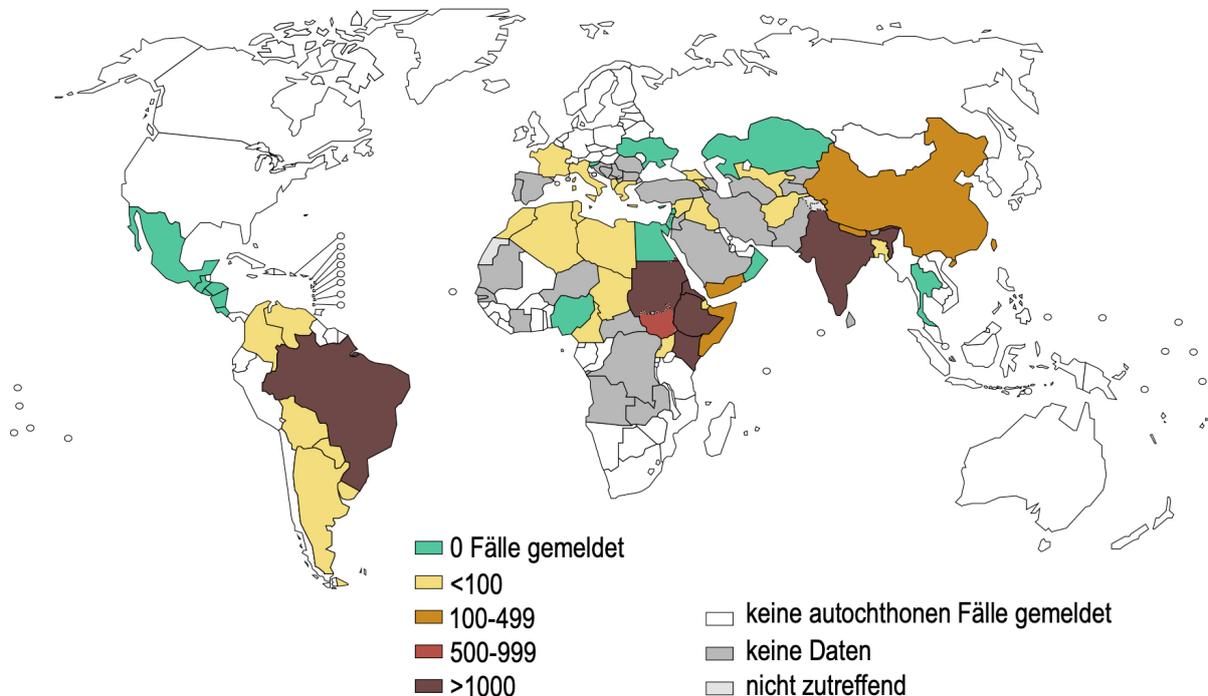
## 1.1 Leishmaniose: Krankheitsbild und geographische Verbreitung

Leishmaniosen zählen laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu den wichtigsten vernachlässigten Tropenkrankheiten (NTD = *neglected tropical diseases*) und wurden 2020 in 98 Ländern der Welt als endemisch eingestuft (Ruiz-Postigo, 2021). Insgesamt sind mehr als eine Milliarde Menschen in den überwiegend tropischen und subtropischen endemischen Gebieten einem Infektionsrisiko ausgesetzt. Ausgelöst wird die Leishmaniose durch parasitäre Protozoen der Gattung *Leishmania*, die zur Klasse Kinetoplastea und zur Ordnung Trypanosomatida gehören. *Leishmania* lassen sich in die drei Untergattungen *Leishmania*, *Viannia* und *Endotrypanum* unterteilen, wobei mehr als 20 humanpathogene Arten bekannt sind (Espinosa et al., 2018). Die Leishmaniose ist eine mit Armut assoziierte Erkrankung, die zumeist in ländlichen Regionen auftritt und für die Betroffenen eine enorme finanzielle Belastung darstellt (Okwor and Uzonna, 2016). Die Behandlung der Leishmaniose ist sehr komplex und abhängig von der *Leishmania* Spezies. Zur Verfügung stehende Medikamente weisen meist unerwünschte Nebenwirkungen auf, haben häufig eine unzureichende Wirksamkeit und sind zudem mit hohen Kosten verbunden (Bekhit et al., 2018). Aufgrund des Anstiegs von Resistenzen gegenüber Anti-*Leishmania* Medikamenten in endemischen Regionen wird die Behandlung zunehmend erschwert (Dumetz et al., 2018; Ponte-Sucre et al., 2017; Tejera Nevado et al., 2016). Eine für den Menschen zugelassene Impfung gegen die Leishmaniose gibt es bisher nicht (Ikeogu et al., 2020; Karmakar et al., 2021).

Die Leishmaniose tritt in drei Haupt-Formen auf: kutane Leishmaniose (CL), mukokutane Leishmaniose (MCL) und viszerale Leishmaniose (VL), auch Kala-Azar genannt. Die kutane Leishmaniose ist die häufigste Form der Leishmaniose mit etwa 0,7 bis 1,2 Millionen Fälle pro Jahr (Alvar et al., 2012). Die östliche Mittelmeerregion und Algerien gelten als epidemiologischer Hotspot der CL mit 79 % der in 2018 an die WHO gemeldeten Fälle. Weitere schwer betroffene Regionen sind Brasilien, Kolumbien, Afghanistan, Pakistan und der Irak. Zwischen 1998 und 2018 wurde ein starker Anstieg an Fällen der CL beobachtet (Ruiz-Postigo, 2018). Erreger der CL der Alten Welt sind *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica*, während die Erreger der Neuen Welt unter anderem *L. amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. mexicana* und *L. (Viannia) peruviana* umfassen. Die kutane Leishmaniose äußert sich in der Regel in Geschwüren im Gesicht, an Armen und an Beinen jeweils an der Einstichstelle, wobei aber auch manchmal bis zu 200 Läsionen (diffuse CL) auftreten können. Bei der Heilung der Geschwüre bleiben häufig Narben, die zu einer Stigmatisierung der Betroffenen führen können (David and Craft, 2009). Die mukokutane Leishmaniose (*Espundia*) ist eine sekundäre Symptomatik, wird von Leishmanien der Untergattung *Viannia* wie *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* und *L. (V.) panamensis* ausgelöst und ist durch Zerstörung der Mund- und Nasen-Schleimhäute gekennzeichnet. Die MCL tritt in Mittel- und Südamerika auf (David and Craft, 2009).

Die viszerale Leishmaniose ist die schwerste, lebensbedrohliche Form der Leishmaniose, die unbehandelt in 95 % der Fälle zum Tod führt. Typische Symptome sind langanhaltendes Fieber, eine vergrößerte Milz und Leber, eine erhebliche Gewichtsabnahme zusammen mit einer fortschreitenden Anämie (Alves et al., 2018). In HIV-positiven Patienten stellt die VL eine opportunistische Infektion dar, die nur schwer behandelbar ist und mit hoher Mortalität einhergeht (Lindoso et al., 2018). Im Jahr 2018 wurden ~18000 neue VL-Fälle an die WHO gemeldet, wobei 2011 noch ~65000 neue Fälle auftraten. Dieser starke Rückgang der VL geht zum einen auf erfolgreiche VL-Eliminierungsprogramme in Südostasien zurück, wo seit 2011 87% weniger VL-Fälle gemeldet wurden (Bhattacharya and Dash, 2017; Ruiz-Postigo, 2018). Die epidemiologischen Hotspots für VL sind Äthiopien, Eritrea, Kenia, Somalia, Südsudan, Sudan und Uganda in Ostafrika, Bangladesch, Indien und Nepal auf dem indischen Subkontinenten und Brasilien (Ruiz-Postigo, 2021). Jährlich führt die Leishmaniose zu ~20000 – ~40000 Todesfälle (Alvar et al., 2012). Erreger der viszeralen Leishmaniose sind *L. donovani* und *L. infantum*. Eine Komplikation der VL ist die Post-Kala-Azar Hautleishmaniose (PKDL), eine kutane Folgeerscheinung der VL, die in der Regel 6 Monate bis ein Jahr nach der der VL auftritt. Symptome sind ein hypopigmentierter Hautausschlag mit makulösen, papulösen oder knotigen Läsionen. PKDL tritt vor allem auf dem indischen Subkontinent (Bangladesch, Indien, Nepal) und in Ostafrika (Sudan) auf. Tödlich ist die PKDL nicht, jedoch sind die persönlichen Folgen für die Betroffenen durch die entstellenden Läsionen z. T. enorm (Mukhopadhyay et al., 2014; Zijlstra et al., 2017).

#### Status der weltweiten Verbreitung der viszeralen Leishmaniose (VL), 2020



**Abbildung 1: Weltweite Verbreitung der viszeralen Leishmaniose (VL) in 2020.** Dargestellt sind die im Jahr 2020 neuen gemeldeten Fälle der VL an die Weltgesundheitsorganisation (WHO). Die Abbildung wurde modifiziert anhand des Berichtes der globalen Leishmaniose-Überwachung 2019-2020 der WHO (Ruiz-Postigo, 2021).

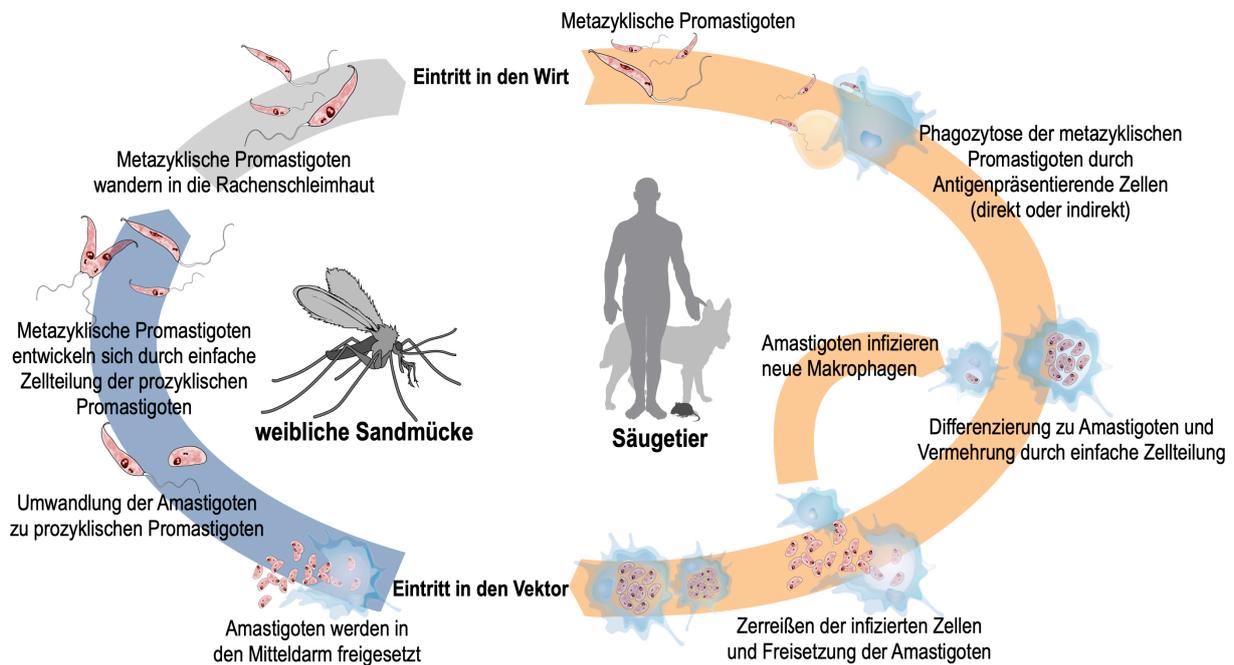
## 1.2 Lebenszyklus von *Leishmania* spp.

Leishmaniose ist eine Vektor-übertragende Krankheit, die durch den Biss von weiblichen, infizierten Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* spp. und *Lutzomyia* spp. übertragen wird (Volf and Myskova, 2007). Bei der Interaktion zwischen *Leishmania* spp. und Sandmücken spielt die Vektor-Spezifität, die je nach *Leishmania* spp. unterschiedlich ist, eine Rolle. Die Verbreitung der Leishmaniose ist vorwiegend abhängig von der Verteilung des jeweiligen Vektors. *Phlebotomus* spp. sind vor allem in der Alten Welt, also in Afrika, Asien und Europa heimisch, während *Lutzomyia* spp. für die Verbreitung der Leishmaniose in Lateinamerika verantwortlich ist (Sacks, 2001).

*Leishmania* spp. durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus mit verschiedenen Entwicklungsstadien, die sich sowohl morphologisch als auch biochemisch unterscheiden. Der Lebenszyklus beginnt im Vektor, der Sandmücke, wo die Leishmanien als längliche, geißeltragende Promastigoten auftreten, die stark vermehrungsfähig sind (Bates and Rogers, 2004). Im Verdauungstrakt der Sandmücke entwickeln sich prozyklischen Promastigoten in die für den Wirbeltier-Wirt infektiösen, metazyklischen Promastigoten, die nicht mehr proliferieren (Gossage et al., 2003). Durch eine veränderte Lipophosphoglykan-Struktur auf der Oberfläche der metazyklischen Promastigoten lösen sich diese aus dem Mitteldarm und verbreiten sich in den Vorderdarm der Sandmücke (Sacks et al., 2000; Sacks et al., 1995). Bei der Blutmahlzeit werden diese sehr beweglichen metazyklischen Promastigoten über den Speichel der Sandmücke in das subkutane Gewebe des Wirbeltier-Wirts übertragen und dort von verschiedenen Antigenpräsentierenden Zellen (APC = *antigen presenting cells*), wie Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen und Fibroblasten phagozytiert (Bogdan and Rollinghoff, 1998; Passelli et al., 2021; Rittig and Bogdan, 2000). Im Phagolysosom der APCs durchlaufen die metazyklischen Promastigoten aufgrund der erhöhten Umgebungstemperatur von 37 °C und einem sauren pH-Wert eine Differenzierung zu eiförmigen, unbegeißelten, unbeweglichen Amastigoten (Zilberstein and Shapira, 1994). Um das Überleben zu sichern, sind die intrazellulären Amastigoten in der Lage, die Aktivität der Makrophagen, die den primären Wirt darstellen, durch die Abgabe von proteinbeladenen Exosomen zu beeinflussen (Silverman et al., 2010; Soto-Serna et al., 2020). Innerhalb des Phagolysosoms proliferieren die Amastigoten bis die Makrophagen schließlich reißen und dann neue APCs infizieren können.

Die Freisetzung der Parasiten wird mit den klinischen Symptomen der Leishmaniose in Verbindung gebracht, da durch die anschließende Immunreaktion ein Einwandern verschiedener Immunzellen, Entzündungsreaktionen und Gewebeschwellungen auftreten. Bei der CL ist die Symptomatik in der Regel auf die Infektionsstelle beschränkt, während bei der durch *L. donovani* verursachten VL die Parasiten die wichtigsten lymphatischen Organe wie Milz, Leber und das Knochenmark befallen (Bogdan and Rollinghoff, 1998; Das et al., 2020; David and Craft, 2009). Durch den erneuten Biss einer Sandmücke schließt sich der Lebenszyklus und Amastigoten oder infizierte Zellen werden aufgenommen. Die

Rückdifferenzierung der Amastigoten zu prozyklischen Promastigoten erfolgt innerhalb von zwei bis drei Tagen im Mitteldarm.



**Abbildung 2: Lebenszyklus von *Leishmania* spp..** Metazyklische Promastigoten gelangen durch den Biss einer weiblichen Sandmücke in den Säugetier-Wirt. Dort kommt es zur Phagozytose durch Antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen. Es folgt eine Differenzierung der metazyklischen Promastigoten zu Amastigoten im Phagolysosom der Makrophagen. Durch einfache Zellteilung vermehren sich die Amastigoten bis letztlich die Makrophagen zerstört und die Amastigoten freigesetzt werden. Nun kommt es entweder zur Infektion weiterer Antigenpräsentierenden Zellen oder die Amastigoten bzw. infizierten Zellen werden durch einen erneuten Biss wieder vom Vektor aufgenommen. Die Amastigoten werden nun im Mitteldarm freigesetzt und wandeln sich hier zu prozyklischen Promastigoten um. Durch einfache Zellteilung entwickeln sich aus diesen metazyklische Promastigoten, die dann in die Rachenschleimhaut wandern und hier wieder auf den Wirt übertragen werden können. [modifiziert nach: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)]

### 1.2.1 Axenische Amastigotendifferenzierung

Leishmanien sind in ihrem Lebenszyklus zwei verschiedenen Umgebungen ausgesetzt: ein poikilothermer Sandmücken-Vektor und ein homoiothermer Wirbeltier-Wirt. Im Mitteldarm der Sandmücke, wo prozyklische Promastigoten proliferieren, herrscht eine Umgebungstemperatur von durchschnittlich 26 °C und ein leicht basischer pH-Wert von 7,4. Die Hauptnährstoffe sind Aminosäuren und Zucker (Kelly et al., 2021; Zilberstein and Nitzan Koren, 2019). In den Phagolysosomen von Makrophagen kommt es zum Absinken des extrazellulären pH-Wertes verbunden mit den Gewebetemperaturen des Wirts. Zucker sind in den Phagolysosomen nur spärlich vorhanden, weshalb als Hauptnährstoffe für die intrazellulären Amastigoten Aminosäuren und Fettsäuren zur Verfügung stehen (Kröber-Boncardo et al., 2020; Zilberstein and Nitzan Koren, 2019). Durch eine schnelle zelluläre

Antwort auf die Stressoren sind die Leishmanien in der Lage sich an beide Umgebungen optimal anzupassen.

Für die Untersuchung der verschiedenen Stadien wurde ein System entwickelt, mit dem es möglich ist, die Differenzierung zu Amastigoten *in vitro* auszulösen, da eine Isolierung von intrazellulären Amastigoten sich als schwierig erweist. Die Promastigoten brauchen zwei Signale, um *in vitro* zu Amastigoten zu differenzieren: eine erhöhte Temperatur von 33°-37 °C und einen sauren pH von 5,5 (Barak et al., 2005; Bates et al., 1992; Zilberstein and Nitzan Koren, 2019). Die erste erfolgreiche axenische Differenzierung zu Amastigoten wurde in *L. mexicana* durch eine Ansäuerung des Mediums und eine Inkubation bei 34 °C durchgeführt (Bates, 1994). Die axenische Differenzierung von *L. donovani* wurde von Dan Zilbersteins Labor etabliert (Barak et al., 2005; Saar et al., 1998). Für *L. donovani* werden die Promastigoten für 24 Stunden einer erhöhten Temperatur von 37 °C ausgesetzt und anschließend in saurem Medium bei 37 °C für fünf weitere Tage inkubiert. Eine Rückdifferenzierung zu Promastigoten kann durch einen pH-Wert von 7,4 und einer Umgebungstemperatur von 25 °C induziert werden und dauert 48 Stunden (Zilberstein and Nitzan Koren, 2019). Die erfolgreiche Differenzierung kann morphologisch durch Mikroskopie überprüft werden.

### **1.3 Die Bedeutung von HSP90 in der Stadiendifferenzierung**

Schon früh wurde angenommen, dass Hitzeschockproteine (HSPs) eine zentrale Rolle bei der Stadiendifferenzierung von *Leishmania* spp. spielen (Lawrence and Robert-Gero, 1985; Van der Ploeg et al., 1985). Durch reverse Genetik konnte später bestätigt werden, dass HSPs für Morphologie, Lebensfähigkeit, Infektiosität, Virulenz und Stressresistenz bei der Stadiendifferenzierung wichtig sind. Über ihre biochemischen Funktionen in *Leishmania* ist jedoch bisher wenig bekannt (Kröber-Boncardo et al., 2020).

#### **1.3.1 Hitzeschockproteine**

HSPs sind molekulare Chaperone, die als Reaktion auf eine plötzlich erhöhte Temperatur und andere Stressfaktoren, wie oxidativer, osmotischer und thermischer Stress erhöht synthetisiert werden, wodurch die Zelle in der Lage ist, schnell auf die veränderten Umgebungsbedingungen zu reagieren (Lindquist and Craig, 1988). Sie werden unabhängig von Stress oftmals konstitutiv synthetisiert, da sie bei der *de novo* Proteinfaltung helfen (D'Souza and Brown, 1998; Wiech et al., 1992). Bei der *de novo* Synthese von Polypeptiden sind hydrophobe Aminosäure-Seitenketten exponiert, wodurch Proteinaggregate gebildet werden können, die mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind. HSPs schützen vor der Entstehung von Proteinaggregaten, indem sie mit den hydrophoben Seitenketten eine nicht-kovalente Bindung eingehen (He et al., 2017). Darüber hinaus sind HSPs für den Abbau oder die Neufaltung von beschädigten Proteinen zuständig (Beere, 2004). Die durch Hitzeschock hochregulierten HSPs sind somit unerlässlich für die Proteinhomeostase der Zelle und die

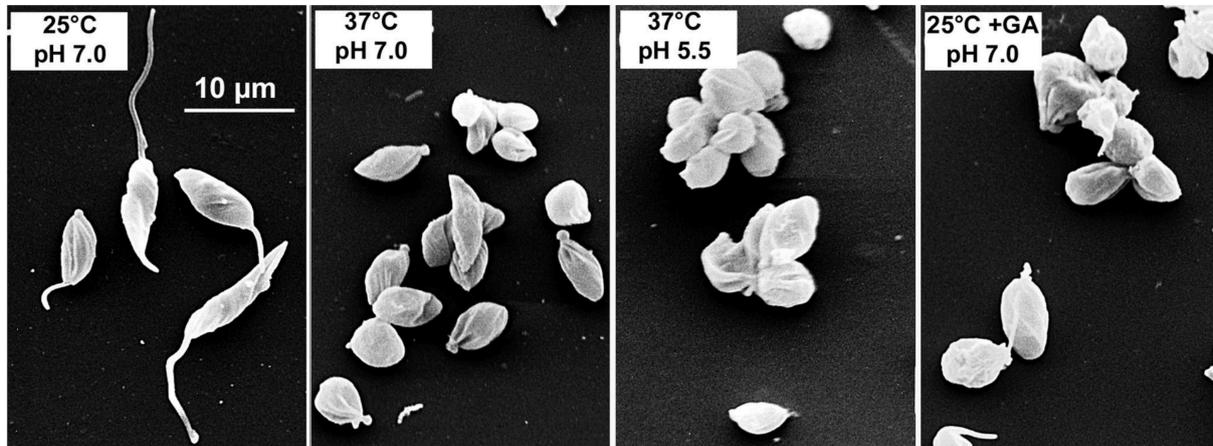
Stabilisierung von wichtigen regulatorischen Proteinen. Außerdem verhindern sie die Anhäufung von denaturierten Proteinen, beschleunigen deren Abbau und sind für die korrekte Struktur und Aktivität bei der Rückfaltung verantwortlich. Hitzeschockproteine sind in allen Prokaryoten und Eukaryoten vorhanden, evolutionär hoch konserviert und ubiquitär. Sie sind strukturell nicht miteinander verwandt und erfüllen unterschiedliche Funktionen, die auch von Organismus zu Organismus variieren können (Carper et al., 1987). Bei *Leishmania* spp. werden sie vor allem aufgrund ihrer Molekularmasse (kDA) und spezifischer Sequenzmerkmale in die folgenden sechs Familien eingeteilt: kleine HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100 (Kröber-Boncardo et al., 2020). Im Gegensatz zu anderen Organismen werden HSPs bei *Leishmania* spp. nur durch erhöhte Temperatur induziert, nicht aber durch andere chemische Stressfaktoren wie Ethanol, saure pH-Werte, zweiwertige Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$ ), fünfwertige Antimonverbindungen wie Natriumstibugluconat, ein Anti-Leishmania-Medikament und andere stressige Kulturbedingungen wie Serum-Entzug oder ein Mangel an Aminosäuren (Clos et al., 1998).

### 1.3.2 Funktion von HSP90

Von zentraler Bedeutung ist das für Eukaryoten essentielle 90 kDA-schwere Hitzeschockprotein 90 (HSP90), das bei vielen zellulären Prozessen eine Rolle spielt, z. B. beim Zellüberleben, bei der Kontrolle des Zellzyklus, bei Hormon- und anderen Signalwegen (Jackson, 2013; Scheibel and Buchner, 1998). Es ist im Zytosol lokalisiert und besitzt eine ATPase Aktivität (Panaretou et al., 1998; Wiech et al., 1992). Zusammen mit einer Reihe von Co-Chaperonen und Co-Faktoren, bildet HSP90 einen Multi-Protein-Komplex, auch Foldosom genannt. Die Co-Chaperone modulieren dabei die spezifische Substraterkennung, die Chaperonfunktion und den ATPase-Zyklus von HSP90 (Picard, 2002). Bestandteil dieses Komplexes sind ein HSP90-Dimer, HSP70, HSP40, Sti1 (*stress-inducible protein 1*) und P23 (Cintron and Toft, 2006; Sullivan et al., 2002). Der Foldosom-Komplex wird aktiv durch die Phosphorylierung von HSP70 und HSP90 durch die MAP Kinase 1 (MAPK1) in *L. donovani* beeinflusst (Kaur et al., 2017). HSP90 kann durch HSP90-spezifische Inhibitoren wie Geldanamycin (GA) oder Radicol (RAD) gehemmt werden, was die Analyse dieses essenziellen Proteins ermöglicht. Die Hemmung erfolgt durch eine kompetitive Bindung an die ATP-Bindetasche, wodurch der ATPase-Zyklus von HSP90 gestört und die Foldosom-Aktivität aufgehoben wird.

In *Leishmania* spp. spielt HSP90 (HSP83) eine zentrale Rolle im Lebenszyklus und bei der Differenzierung von Promastigote zu Amastigote. Es wird in *L. donovani* von multiplen, identischen, und tandemartig angeordneten Genkopien kodiert und besitzt einen Anteil von 2,8 % an den SDS-extrahierbaren Proteinen von Promastigoten (Brandau et al., 1995). Eine Hemmung von HSP90 führt in *L. donovani* zu einer morphologischen Differenzierung zu Amastigoten-ähnlichen Formen, die der pH/Temperatur-induzierten axenischen Differenzierung ähnelt (Abbildung 3) (Wiesgigl and Clos, 2001). Außerdem resultiert die HSP90-Hemmung in Promastigoten in einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (Wiesgigl

and Clos, 2001). Dieser spezifische Wachstumsarrest wurde auch für *Trypanosoma cruzi* beobachtet. Eine chemisch induzierte Differenzierung konnte jedoch in *T. cruzi* nicht erzeugt werden, was auf Unterschiede in der Kontrolle des Lebenszyklus zwischen *Trypanosoma* und *Leishmania* zurückzuführen ist (Graefe et al., 2002).



**Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von axenischen Amastigoten und Geldanamycin-behandelten Promastigoten.** Dargestellt sind *L. donovani* Promastigoten bei 25 °C und pH 7,0; Inkubation von Promastigoten bei 37 °C für 24 h (pH 7,0); axenische Amastigotendifferenzierung (37 °C, pH 5,5) nach fünf Tagen und mit GA-behandelte Promastigoten nach 24 h (100 ng/mL GA, 25 °C, pH 7,0). Abbildung aus Wiesgigl und Clos, 2001.

### 1.3.3 HSP90-spezifische Genexpression in der Stadiendifferenzierung

Aufgrund einer fehlenden Regulation der Transkription bei *Leishmania* spp. (Abschnitt 1.4.2) muss sich die Genexpressionsanalyse auf Untersuchungen auf Proteinebene konzentrieren, z. B. durch Proteomanalysen oder Proteinsyntheseanalysen (Bifeld et al., 2018; Rosenzweig et al., 2008b). RNA-seq-Analysen eignen sich wegen einer geringen Korrelation zwischen mRNA-Abundanz und Proteinabundanz bzw. -Synthese nicht für die Analyse der Genexpression (Bifeld et al., 2018; Lahav et al., 2011).

In frühen Analysen von Wiesgigl und Clos aus dem Jahr 2001 konnte zusätzlich zur morphologischen Veränderung eine erhöhte Expression des Amastigoten-spezifischen Stress Proteins A2 als Reaktion auf die HSP90-Hemmung festgestellt werden. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2003 (Bente et al., 2003) zeigte außerdem, dass eine Reihe von Amastigoten-spezifischen Proteinen ebenfalls unter HSP-90 Hemmung eine erhöhte Abundanz zeigen. Außerdem war die Abundanz von wichtigen HSPs unter HSP90-Hemmung sowohl in *Leishmania* als auch in *T. cruzi* erhöht. Die Stadien-spezifisch regulierten Proteine ließen sich in folgende, funktionelle Gruppen einteilen: Stressreaktion, Zytoskelett und Zellmembran, Energiestoffwechsel und Phosphorylierung, Zellzyklus und Proliferation, und Aminosäurestoffwechsel (Bente et al., 2003). Die Amastigoten-spezifische Genexpression wurde später durch umfangreiche Proteomanalysen detaillierter untersucht und bestätigt (Rosenzweig et al., 2008b). Insgesamt waren 11,8 % des Proteoms Stadien-

spezifisch reguliert. Die Proteomanalyse zeigte u.a., dass sich der Kohlenhydratstoffwechsel von Promastigoten auf Fettsäuren und Aminosäuren in Amastigoten verlagert, was die intrazellulär verfügbaren Nährstoffe im Phagolysosom des Säugetierwirts widerspiegelt.

In neueren *ribosome profiling*-Analysen wurde der Einfluss der HSP90-Hemmung auf die Proteinsynthese in *L. donovani* analysiert (Bifeld et al., 2018). *Ribosome profiling* ist eine neue Methode, bei der die von Ribosomen geschützten mRNA-Fragmente mit Hochdurchsatz-Sequenzierung untersucht werden, so dass die aktive Translation der mRNA, d. h. die Proteinsynthese, analysiert werden kann (Ingolia et al., 2009). Unter der Hemmung von HSP90 wurde eine erhöhte Syntheserate für die meisten Chaperone und Stressproteine beobachtet, darunter HSP70, HSP90, HSP100, DNAJ und A2 (Bifeld et al., 2018). Dies geht mit früheren Beobachtungen einher (Bente et al., 2003; Rosenzweig et al., 2008b). Darüber hinaus wurden eine Reihe von Redox-Enzymen, Amastin-ähnliche Zelloberflächenmarker, die für Amastigoten typisch sind, Proteinkinasen und Histone hochreguliert. Die Hemmung von HSP90 durch Radicicol führt jedoch auch zu Off-Target-Effekten, die durch episomale Expression einer HSP90rr-Variante untersucht wurden (Bifeld et al., 2018). HSP90rr ist eine RAD-resistente Variante mit einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Isoleucin an Position 33 in der ATP-bindenden Tasche von ATP/Radicicol (Hombach et al., 2013). Die Off-Target-Effekte von RAD betreffen vermutlich die zwei Paraloge von HSP90 in *Leishmania* spp.. Das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Paralog von HSP90, GRP94, wird von einer Genkopie kodiert und ist hoch immunogen, wodurch möglicherweise die Immunreaktion gesteuert wird (Descoteaux et al., 2002; Larreta et al., 2000). Ein weiteres Paralog von HSP90 ist das mitochondriale TRAP1 (*TNF receptor associated protein 1*), welches auch als HSP75 bekannt ist. HSP75 ist zudem Teil der Beladung von Exosomen (Silverman et al., 2010).

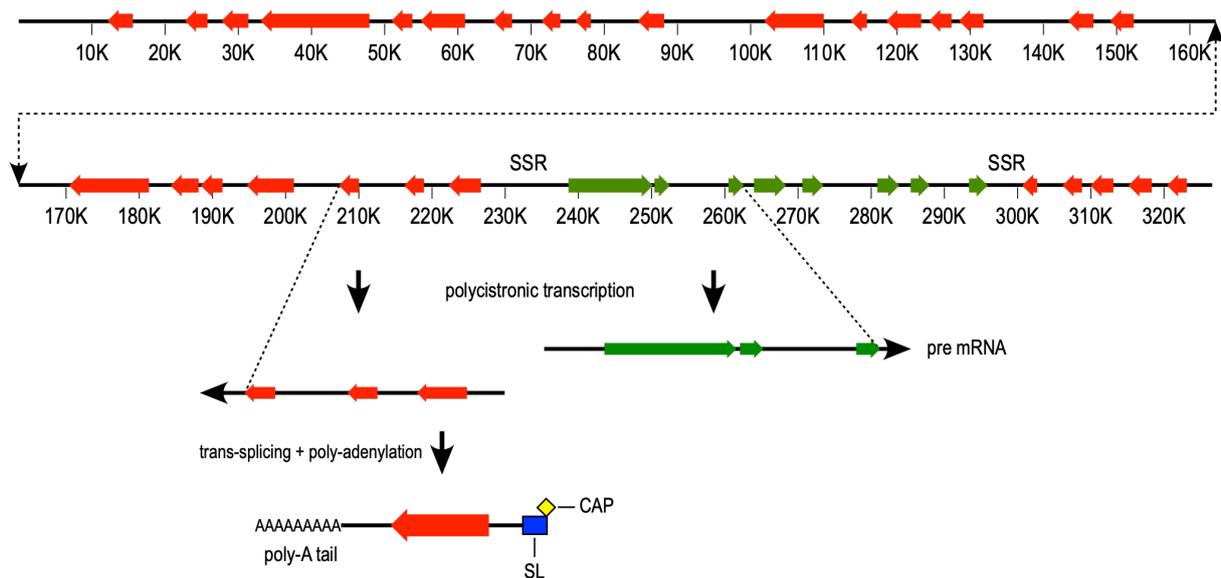
## **1.4 Genomorganisation, Chromatinstruktur und Genexpression**

### **1.4.1 Genomorganisation in *Leishmania* spp.**

Das Genom von *Leishmania* spp. besitzt einen haploiden Chromosomensatz mit 36 Chromosomen für Leishmanien der Alten Welt und 34 oder 35 Chromosomen für Leishmanien der Neuen Welt. Es umfasst 32 Mb mit einem GC-Gehalt von ca. 60 % und weist dabei um die 8000 Protein-kodierenden Gene auf, wobei die genaue Anzahl Spezies-abhängig ist (Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007). Protein-kodierende Gene der RNA Polymerase II (RNA Pol II)- abhängigen Transkription sind in großen, polycistronischen Transkriptionseinheiten (PTU = *polycistronic transcription unit*) organisiert. Dabei liegen funktionell nicht verwandte Gene in einer PTU, welche mehrere hunderte Gene umfassen kann und sich teilweise über ein halbes Chromosom erstreckt (Martínez-Calvillo et al., 2003). Die Transkription erfolgt unidirektional und initiiert und terminiert in den Regionen zwischen den PTUs, in den sog. *strand switch regions* (SSR) (Martínez-Calvillo et al., 2004; Martínez-

Calvillo et al., 2003). Dabei unterscheidet man zwischen divergenten SSRs (dSSR), in denen die Transkription initiiert, und konvergenten SSRs (cSSR = *convergent* SSR), in denen die Transkription terminiert (Lombrana et al., 2016). Jedoch ist die genaue Initiation und Termination der Transkription in *Leishmania* spp. bis heute ein Enigma.

Die Transkription verläuft polycistronisch zu sog. pre-mRNAs, welche im Anschluss durch gekoppeltes *Trans*-Spleißen und Polyadenylierung zu ausgereiften mRNAs prozessiert werden (LeBowitz et al., 1993). Beim *Trans*-Spleißen wird eine 39 nt lange Cap-Struktur an das 5' Ende der polycistronisch transkribierten pre-mRNAs gespleißt, welche auch *spliced leader* (SL) RNA genannt wird (Zeiner et al., 2003). Das SL-RNA Gen wird durch die RNA Pol II transkribiert und steht unter der Kontrolle eines stromaufwärts gelegenen Promotors. Dieser Promotor ist bis heute der erste und einzig identifizierte RNA Pol II-abhängige Promotor in Trypanosomatida (Gilinger and Bellofatto, 2001; Hitchcock et al., 2007). Es wurden keine weiteren RNA Pol II-abhängigen Promotoren und Transkriptionsfaktoren in *Leishmania* spp. gefunden, und auch der Mechanismus des *cis*-Spleißens und Introns fehlen in diesen Protozoen (Clayton, 2002; Grunebast and Clos, 2020).



**Abbildung 4: Polycistronische Transkription in *Leishmania* spp..** Gene sind in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert und von *strand switch regions* (SSR) getrennt. Die Transkription erfolgt polycistronisch zu pre-mRNAs, die co-transkriptionell durch *Trans*-Spleißen und Polyadenylierung zu ausgereiften mRNAs reifen. Diese besitzen einen Poly-A-Schwanz am 3' Ende und einen *spliced leader* (SL) mit Cap-Struktur (gelber Diamant) am 5' Ende (Grunebast and Clos, 2020)

#### 1.4.2 Genexpressionskontrolle in *Leishmania* spp.

Durch das Fehlen von RNA Pol II-abhängigen Promotoren wird das Genom von *Leishmania* spp. konstitutiv transkribiert und eine Gen-spezifische Regulation der Transkription ist nicht möglich (Clayton, 2002; Leifso et al., 2007). Die Kontrolle der

Genexpression findet vor allem auf posttranskriptioneller Ebene statt, wobei mRNA-Stabilität, Translationseffizienz und posttranslationale Modifikationen (PTMs) eine zentrale Rolle bei der Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse spielen (Grunebast and Clos, 2020). Die Stabilität von mRNA wird durch *cis*-Elemente in den 3'- und 5'-untranslatierten Regionen (UTRs) beeinflusst. Diese regulatorischen RNA Motive können durch RNA-bindende Proteine (RBP) gebunden werden, wodurch die Stabilität, der Transport und das intrazelluläre Ziel der mRNA, aber auch die Translation und dessen Effizienz beeinflusst wird (Requena, 2011). In *Leishmania* spp. wurden vor allem regulatorische *cis*-Elemente in der 3' UTR identifiziert, welche z.B. für die Abundanz der HSP90-mRNA oder der HSP70-mRNA als Reaktion auf einen Hitzeschock verantwortlich sind (Larreta et al., 2004; Quijada et al., 2000; Requena, 2011). Des Weiteren wurden in *L. major* zwei Gruppen regulatorischer Elemente namens SIDERs (**S**hort **I**nterspersed **DE**generated **R**etroposons) beschrieben, LmSIDER1 und LmSIDER2. SIDERs sind repetitive DNA Elemente, auch Retrotransposons genannt, die fast ausschließlich in 3' UTRs vorkommen (Bringaud et al., 2007). LmSIDER2 kann dabei zu einem Zerfall der mRNA führen (Azizi et al., 2017), wohingegen LmSIDER1 an der Stadien-spezifischen Genregulation beteiligt ist (Boucher et al., 2002).

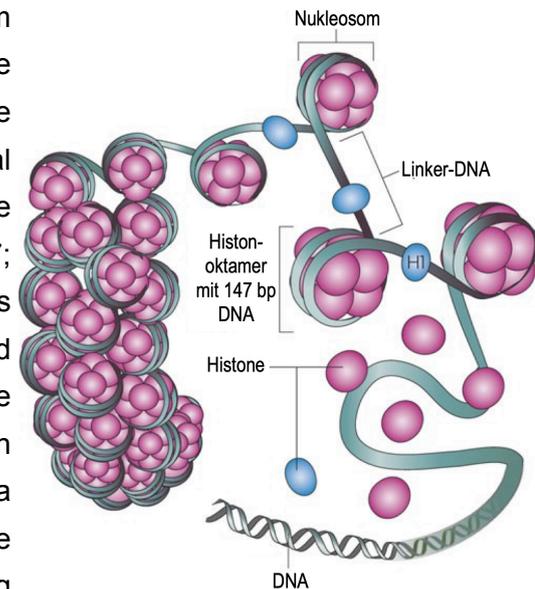
Die Bedeutung der 3' UTRs zeigt sich auch im Hinblick auf die direkte Regulation der Translation. So induziert z.B. ein regulatorisches Element in der 3' UTR der Amastin-mRNA die Translation als Antwort auf einen Hitzeschock (McNicoll et al., 2005). Schon früh wurde beobachtet, dass *Leishmania* spp. Mechanismen entwickelt haben, die Genexpression durch gezielte Translation zu regulieren. Die Synthese der Histone erfolgt Zellzyklus-abhängig in der S-Phase, wo die Histon-mRNAs mit Ribosomen-gebundenen Fraktionen assoziiert sind, während in der G1-Phase die Histon-mRNA in Ribosomen-freien Fraktionen vorliegen (Soto et al., 2004). Für die mRNA der Histone wurde jedoch in allen Phasen des Zellzyklus ein konstantes Level beobachtet (Soto et al., 2000). Die Synthese der Histone wird demnach vermutlich durch eine Stilllegung der Translation außerhalb der S-Phase kontrolliert (Requena, 2011). Die Translation kann darüber hinaus auch durch einen Wechsel von Cap-abhängiger zu Cap-unabhängiger Translation reguliert werden. Leishmanien haben eine für Leishmanien-spezifische Cap4-Struktur, die mit dem Cap-bindenden Protein eIF4E assoziiert ist und wodurch möglicherweise der Wechsel zu Cap-unabhängiger Translation reguliert wird (Dhalia et al., 2005; Zinoviev et al., 2011). Des Weiteren spielen Translationsfaktoren bei der Kontrolle der Genexpression in *Leishmania* spp. eine Rolle. So geht die axenische Amastigotendifferenzierung mit der Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  und einer geringeren Translationsrate einher (Cloutier et al., 2012).

Posttranslationale Modifikationen beeinflussen durch Acetylierung, Glycolysierung, Methylierung und Phosphorylierung die Stabilität und Funktion von Proteinen und nehmen dadurch ebenfalls Einfluss auf die Regulation der Genexpression (Grunebast and Clos, 2020). In axenischen Amastigoten wurde beobachtet, dass Proteinabundanzen und Modifizierungen sich zu Promastigoten unterscheiden (Rosenzweig et al., 2008a). Während eine schnelle, kurzfristige Anpassung an veränderte Umweltbedingungen durch die oben

ausgeführten Mechanismen (mRNA Stabilität, Translationsregulation, PTMs) erfolgt, geschieht die langfristige Anpassung durch Mosaik Aneuploidy und extra- und intrachromosomale Genamplifikation. Leishmanien haben zwischen ein und sechs Schwesterchromosomen, wobei die individuelle Chromosomenzahl innerhalb der Populationen variieren kann (Grunebast and Clos, 2020). Aneuploidy ist häufig eine Reaktion auf Arzneimittelbehandlung und wird mit der Resistenz gegenüber Antimon in Verbindung gebracht (Croft et al., 2006; Laffitte et al., 2016). Chromosomenamplifikation und auch extra- und intrachromosomale Genamplifikationen führen zu einer höheren Genkopienzahl, wodurch in Leishmanien die Menge der Transkripte und dadurch die Genexpression direkt beeinflusst werden kann (Iantorno et al., 2017; Rogers et al., 2011).

### 1.4.3 Chromatinstruktur und epigenetische Regulation der Transkription in Eukaryoten

Damit die DNA als Träger der Erbinformation in den Nukleus einer Zelle passt, muss sie als Chromatin verpackt werden. Die kleinste Einheit des Chromatins sind Histone (H), kleine, basische Proteine, die evolutionär hochkonserviert sind (Littau et al., 1965). Aufgebaut sind sie aus einer kugelförmigen Kopfdomäne am C-Terminus und einem geladenen N-terminalen Histonschwanz, der Ziel für posttranslationale, epigenetische Modifikationen ist. Histone setzen sich zum Nukleosom zusammen, einem Oktamer, das aus zwei Dimeren der *core*-Histone H2A und H2B und einem Tetramer der *core*-Histone H3 und H4 besteht. Die DNA windet sich 1,65-mal um die Nukleosomen, wodurch 146 Basenpaare (bp) DNA aufgewickelt werden (Finch et al., 1977; Kornberg, 1974, 1977). Ein weiteres Histon, das Histon H1 bindet die Linker-DNA an der Ein- und Austrittsstelle zum Nukleosomen. Es ist für die Ausbildung der 30 nm Chromatinfaser, auch Solenoidstruktur genannt, verantwortlich (Thoma and Koller, 1977). Diese wird durch eine helikale Anordnung von sechs Nukleosomen pro Windung erreicht (Carpenter et al., 1976). Diese 30 nm Chromatinfaser ist die stark kondensierte, transkriptionsinaktive Form des Chromatins, auch Heterochromatin genannt (Berlowitz, 1974). Bei der Zellteilung wird die Solenoidstruktur weiter kondensiert, wodurch die dichteste Verpackungsform der DNA, das Chromosom, entsteht.



**Abbildung 5: Chromatinstruktur.** Histone setzen sich zu Nukleosomen zusammen, die zusammen mit dem Histon H1 in die 30 nm Chromatinfaser kondensieren. Abbildung modifiziert nach Figueiredo et al., 2009.

Bei der Transkription müssen Gene für Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Proteine zugänglich sein. Zu diesem Zweck befinden sich die Gene in einer aufgelockerten,

transkriptionell aktiven Form des Chromatins, dem Euchromatin (Manuelidis, 1990; Matsui et al., 1980; McCarthy et al., 1974). Die epigenetische Genregulation erfolgt durch verschiedene Mechanismen in Eukaryoten. Während Nukleosomen das Grundgerüst des Chromatins bilden, sind Histone direkt an der strukturellen Organisation beteiligt sind. Bereits in frühen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Methylierung und Acetylierung von Histonen und der Transkriptionsaktivität vermutet (Allfrey et al., 1964). Eine der am meisten untersuchten Histonmodifikationen ist die Acetylierung von Lysinen an den aminoterminalen Histonschwänzen. Durch das kovalente Anhängen von Acetylgruppen an Lysine, wird die positive Ladung der Histone neutralisiert. Als Folge dessen nimmt die Bindungsaffinität zur DNA ab und die Chromatinstruktur öffnet sich, wodurch die Zugänglichkeit für Transkriptionsregulationsproteine erhöht wird (Struhl, 1998; Verdone et al., 2006). Neben dem direkten Einfluss der Histonmodifikationen auf die Chromatinstruktur, können die PTMs der Histone jedoch auch als Signal für andere Enzyme dienen, die dann Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren rekrutieren (Chen et al., 2017). Im menschlichen Genom wurden acetylierte Histone an den 5' Enden der Transkriptionsstarts gefunden (Liang et al., 2004). Während Acetylierung überwiegend mit Transkriptionsaktivität verbunden wird, führt Histon-Methylierung je nach Position und Methylierungsgrad zu Euchromatin oder Heterochromatin (Bartova et al., 2008). Dabei unterscheiden sich die Histonmodifikationen zwischen den Organismen. Einige sind konserviert, andere nicht (Zhang et al., 2007).

Darüber hinaus ist die Position der Nukleosomen für die Initiation der Transkription wichtig, da die *cis*-regulatorische DNA Sequenzen für die DNA-bindende Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder die RNA Pol II frei zugänglich sein müssen. Die Position der Nukleosomen wird von der DNA-Sequenz und den Chromatin-Remodelern beeinflusst (Chen et al., 2017). Chromatin-Remodeler befinden sich oft in unmittelbarer Nähe von RNA Pol II oder bilden mit der Polymerase und anderen Proteinen, die die Chromatinstruktur modifizieren können, einen Komplex. Dabei helfen sie der RNA Pol II sich durch Nukleosomen-gebundene DNA Abschnitte zu bewegen (Cho et al., 1998; Orphanides et al., 1998). Chromatin-Remodeler spielen eine Rolle bei der Neupositionierung von Nukleosomen, dem Abbau von Nukleosomen, dem Austausch von Histonen gegen Histonvarianten und Veränderungen der DNA-Histon-Interaktion (Varga-Weisz and Becker, 2006).

Eine weitere epigenetische Regulation der Genexpression erfolgt durch DNA-Methylierung, bei der eine Methylgruppe durch DNA-Methyltransferasen an einen Cytosinring der DNA angehängt wird. Die häufigste DNA-Methylierung ist eine zusätzliche Methylgruppe an Position 5 des Cytosins (5-Methylcytosin) von CpG Dinukleotiden. Methylierte Promotorregionen unterdrücken die Transkription nachgeschalteter Gene, indem sie Histonverändernde Enzyme oder DNA-bindende Proteine rekrutieren, die die Transkription unterdrücken (Chen et al., 2017).

#### 1.4.4 Epigenetische Regulation in *Leishmania* spp.

In *Leishmania* spp. wurden verschiedene epigenetische Mechanismen identifiziert, die bei der Transkriptionsregulation von Bedeutung sind. Zum einen spielen posttranslationale Modifikationen von Histonen eine Rolle, wobei der Fokus der Forschung bisher auf der Acetylierung von Histonen lag. An den Ursprüngen der polycistronischen Transkription wurden acetylierte Histone H3 gefunden, was auf eine Regulation der Transkription durch den Acetylierungsgrad von H3 hindeutet (Thomas et al., 2009). Dabei war der Anteil an acetylierten Histonen in sich schnell teilenden Parasiten höher als in Stationärphasen-Parasiten. Der überwiegende Anteil der acetylierten Histone H3 befand sich in den dSSRs, also den Regionen, wo die Transkription initiiert. Bis heute wurden vier Histon-Acetyltransferasen (HAT) in Trypanosomatida identifiziert. HAT2 ist essentiell für das Überleben der Parasiten (Chandra et al., 2017), aber auch die Acetylierung von H4K4 durch HAT3 scheint wichtig für das Überleben der Parasiten (Kumar and Saha, 2015). Eine Überexpression von HAT2 führte zu einer erhöhten Zugänglichkeit des Chromatins für die *micrococcal nuclease*, was auf eine Dekondensierung des Chromatins hindeutet (Jha et al., 2017). Die Abnahme von HAT2 wiederum stört das Wachstum und den Zellzyklus (Chandra et al., 2017). HAT4 ist durch die Acetylierung von H4K14 für die Aufrechterhaltung von Euchromatin verantwortlich und für die Zellzykluskontrolle von Bedeutung (Yadav et al., 2016). In der Promotorregion der rRNA Gene in *L. major* wurden die H3K9me<sup>3</sup>, H3K14ac, H3K23ac und H3K27ac mit aktiver Transkription assoziiert (Afrin et al., 2019; Vizuet-de-Rueda et al., 2016).

Histone sind in den Trypanosomatida hoch konserviert und strukturell mit denen anderer Eukaryoten verwandt (Kumar et al., 2012). In *L. major* wurden zudem die Histonvarianten H2A.Z, H2B.V und H3.V identifiziert. Ein Ortholog für die in *T. cruzi* vorkommende Variante H4.V wurde bisher nicht gefunden. Die Histonvarianten H2A.Z und H2B.V sind in *L. major* essentiell (Anderson et al., 2013). In *T. brucei* sind H2A.Z und H2B.Z in dSSRs lokalisiert, während H3.V und H4.V in cSSRs eingebunden sind. Daher wird den Histonvarianten eine Rolle bei der Initiation und Termination der Transkription zugeschrieben (Siegel et al., 2009). Der Einbau von H2A.Z anstelle von H2A führt zu einer dekondensierteren Chromatinstruktur, die für die Transkription besser zugänglich ist (Wedel et al., 2017).

*Leishmania* spp. und weitere Trypanosomatida weisen außerdem eine einzigartige DNA Modifikation namens Base J auf. Es handelt sich dabei um glykosylierte Thymine, genauer gesagt um  $\beta$ -D-Glucosylhydroxyuracil (Figueiredo et al., 2009). Die Modifikation findet sich in repetitiven Telomersequenzen (GGGTTA) und in konvergenten und divergenten SSRs und ist vermutlich an der Transkriptionsinitiation und -termination beteiligt (Afrin et al., 2019; Olinski et al., 2016). Die Modifikation Base J wird von zwei Thymidin Hydroxylase, JBP1 und JBP2 verursacht. JBP1 ist essentiell in *L. infantum* und eine Nullmutation von JBP2 führte dazu, dass die Transkription an Abbruchstellen weiterläuft (van Luenen et al., 2012).

Der wichtige, epigenetische Mechanismus der DNA Methylierung am Cytosin C5 wurde in *Leishmania* bisher nicht nachgewiesen. In *L. donovani* wurde zwar eine C-5 DNA Methyltransferase (DNMT) der Unterfamilie 6 identifiziert, jedoch konnte in genomweiten Bisulfit Sequenzierungen keine DNA Methylierung festgestellt werden (Cuypers et al., 2020).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Übertragung der Leishmanien vom poikilothermen Sandmücken-Vektor auf den homoiothermen Säugetier-Wirt differenzieren sich die Parasiten von der länglichen, begeißelten Promastigote zur eiförmigen, unbegeißelten Amastigote. Diese Stadiendifferenzierung stellt den Mittelpunkt des Lebenszyklus von *Leishmania* spp. dar. Das Hitzeschockprotein 90 nimmt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung ein, da eine Hemmung von HSP90 neben einem Wachstumsarrest auch zu einer Amastigoten-ähnlichen Morphologie führt. Die Differenzierung zu Amastigoten kann in *L. donovani* außerdem axenisch durch eine erhöhte Temperatur und ein saures Milieu ausgelöst werden. Durch *ribosome profiling*-Analysen (Bifeld et al., 2018) konnte gezeigt werden, dass unter HSP90-Hemmung eine Amastigoten-spezifische Proteinsynthese auftritt. Besonders auffällig war, dass alle Histone unter HSP90-Hemmung hochreguliert waren.

In dieser Arbeit soll die Auswirkung der erhöhten Histonsynthese auf die Chromatinstruktur in *L. donovani* untersucht werden. Dafür soll zunächst ein *micrococcal nuclease* Assay etabliert werden, um genomweite Veränderungen in der Chromatinstruktur zu untersuchen. Für die Analysen werde ich zum einen die Hemmung von HSP90 mit dem HSP90-spezifischen Inhibitor Radicicol untersuchen, als auch Promastigoten zu axenischen Amastigoten differenzieren und analysieren. Diese chemisch- und Temperatur/pH-induzierte Differenzierung soll mit logarithmisch wachsenden Promastigoten verglichen werden. In einem nächsten Schritt soll dann überprüft werden, welche spezifischen Bereiche im Genom von Veränderungen der Chromatinstruktur betroffen sind. Dies werde ich durch die Etablierung von ATAC-seq, einem Assays für Transposase-zugängliches Chromatin in Verbindung mit Hochdurchsatz-Sequenzierung, untersuchen. Auch hier stehen die Veränderungen zwischen den verschiedenen Stadien im Mittelpunkt.

Das Genom von Leishmanien ist polycistronisch organisiert und wird konstitutiv exprimiert. Die genaue Transkriptionsinitiation und -termination ist bis heute nicht verstanden, da in Leishmanien RNA Pol II abhängige Promotoren und Transkriptionsfaktoren fehlen. Bisher ist die Transkriptionsinitiation nur durch *nuclear run-on* Experimente auf Chromosom 1 und 3 in *L. major* untersucht worden (Martinez-Calvillo et al., 2004; Martínez-Calvillo et al., 2003). Ziel ist es in *L. donovani* die Bereiche der Initiation und Termination der Transkription zu identifizieren, um ein besseres Verständnis über die Transkription in Leishmanien zu erlangen. Daher werde ich in der folgenden Arbeit eine neue Methode, die bisher in Trypanosomatida noch nicht zur Anwendung kam, etablieren. Es handelt sich dabei um PRO-seq, eine hochauflösende *nuclear run-on* Reaktion mit anschließender Hochdurchsatz-

Sequenzierung. PRO-seq wird mir ermöglichen, die aktive Transkription in Leishmanien zu analysieren und dadurch die genauen Bereiche der Transkriptionsstarts und -stops festzulegen. Auch hier soll zwischen Promastigote und chemisch- oder Temperatur/pH-induzierter Differenzierung unterschieden werden, um Unterschiede in der Transkription zwischen den Stadien zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 *Leishmania* Stämme

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten *Leishmania* Stämme**

| Stamm                         | Identifikationsnummer | Herkunft | Zur Verfügung gestellt                                       |
|-------------------------------|-----------------------|----------|--|
| <i>Leishmania donovani</i> 1S | MHOM/SD/00/1SR        | Sudan    | Dan Zilberstein, Israel<br>Institut of Technology,<br>Israel |

#### 2.1.2 Plasmide

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide**

| Plasmid | Anwendung   | Referenz                |
|---------|---|-------------------------|
| HSP90rr | Aminosäureaustausch von Leucin zu Isoleucin an Position 33 zur Überwindung der RAD-induzierten Wachstumshemmung | Hombach et al.,<br>2013 |

#### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide**

| Bezeichnung                    | Sequenz  | Anwendung/ Herkunft  |
|--------------------------------|--|--|
| Nextera Index 1 (i7) Adapter   | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG                     | Sequenzierung der ATAC-seq <i>librarys</i> .                     |
| Nextera Index 2 (i5) Adapter   | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC                  | Nextera Index Kit von Illumina®                                  |
| RP1                            | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGA               | Reverse Transkription<br>PRO-seq und forward<br>Sequenzierprimer |
| RNA PCR Primer, Index 1 (RPI1) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA |  |
| RNA PCR Primer, Index 3 (RPI3) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA |  |

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide**

| <b>Bezeichnung</b>                   | <b>Sequenz</b>  | <b>Anwendung/ Herkunft</b>  |
|--------------------------------------|---|---|
| RNA PCR<br>Primer, Index 3<br>(RPI3) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>GCCTAA</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 3<br>(RPI3) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>GCCTAA</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 4<br>(RPI4) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>TGGTCA</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 5<br>(RPI5) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>CACTGT</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA | Sequenzierung der<br>PRO-seq <i>library</i> .<br>Sequenzen stammen<br>aus dem TruSeq Small<br>RNA Kit von Illumina® |
| RNA PCR<br>Primer, Index 6<br>(RPI6) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>ATTGGC</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 7<br>(RPI7) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>GATCTG</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 8<br>(RPI8) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>TCAAGT</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| RNA PCR<br>Primer, Index 9<br>(RPI9) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u><b>CTGATC</b></u><br>GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATT<br>CCA |   |
| VRA3                                 | /5Phos/<br>GAUCGUCGGACUGUAGAACUCUGAAC<br>/inverted dT/                                  | 3' RNA Adapter PRO-<br>seq  |
| VRA5                                 | CCUUGGCACCCGAGAAUCCA  | 5' RNA Adapter PRO-<br>seq  |

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen**

| <b>Bezeichnung</b>                    | <b>Zusammensetzung oder Hersteller</b>  |
|---------------------------------------|---|
| 10% APS                               | 10 % (w/vol) Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in ddH <sub>2</sub> O                                  |
| Betain-Lösung                         | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA   |
| Bindepuffer                           | 10 mM Tris-HCl pH 7,4<br>300 mM NaCl<br>0,1 % (vol/vol) Tergitol 15-S-9<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O                   |
| Blockierungslösung (Immunfluoreszenz) | 2 % (w/vol) BSA<br>0,1 % (vol/vol) Tergitol 15-S-9  |
| ISOTON™ II Diluent                    | Beckmann Coulter, Brea, USA   |
| DAPI                                  | 1 mg/mL DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)<br>in ddH <sub>2</sub> O   |
| DNA-Elutionspuffer                    | 10 mM Tris-HCl pH 8,0<br>300 mM NaCl<br>1mM EDTA<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O  |
| Ethidiumbromid                        | 10 mg/mL Ethidiumbromid<br>Endkonzentration im Gel: 0,5 µg/mL   |
| High-Salt-Waschpuffer                 | 50 mM Tris-HCl pH 7,4<br>2 M NaCl<br>0,5 % (vol/vol) Tergitol 15-S-9<br>1mM EDTA<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O          |
| Kernlagerpuffer (2X)                  | 80 % (vol/vol) Glycerol<br>10 mM Tris-HCl pH 8,3<br>0,2 mM EDTA<br>In DEPC-H <sub>2</sub> O                           |
| Formamid-Ladepuffer (6X)              | 90 % Formamid<br>10 mM EDTA<br>0,25 % gesättigtes Bromphenolblau (1 mg/mL)<br>0,25 % gesättigtes Xylenxylan (1 mg/mL) |

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen**

| <b>Bezeichnung</b>                                      | <b>Zusammensetzung oder Hersteller</b>  |
|---|---|
| Low-Salt-Waschpuffer                                    | 5 mM Tris-HCl pH 7,4<br>0,1 % (vol/vol) Tergitol 15-S-9<br>1mM EDTA<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O   |
| Lysispuffer für Kernisolierung mit/ohne Tergitol 15-S-9 | 10 mM Tris-HCl pH 8,0<br>10 mM Natriumchlorid<br>5 mM DTT<br>1,5 mM Magnesiumchlorid<br>1 mM Spermidin<br>1 mM EDTA<br>0,1 mM PMSF<br>optional: 0,5 % (vol/vol) Tergitol 15-S-9<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O |
| Lysis-Verdünnungspuffer                                 | 150 mM NaCl<br>5 mM EDTA  |
| MOWIOL  | 30 % (vol/vol) Glycerol<br>30 % (vol/vol) Mowiol 4-88<br>120 mM Tris pH 8,5   |
| 5x <i>Nuclear run-on</i> Puffer                         | 80 mM Tris-HCl pH 7,5<br>50 mM Natriumchlorid<br>50 mM Kaliumchlorid<br>8 mM Magnesiumchlorid<br>0,5 mM Spermidin<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O   |
| Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)             | 50 mM NH <sub>4</sub> Cl<br>0,1 % (vol/vol) Triton X-100<br>in 1 × PBS  |
| Permeabilisierungslösung I mit/ohne Triton X-100        | 150 mM Saccharose<br>80 mM KCl<br>35 mM HEPES pH 7,4<br>5 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>5 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,5 mM CaCl <sub>2</sub><br>optional: 0,05 % (vol/vol) Triton X-100               |

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen**

| <b>Bezeichnung</b>                             | <b>Zusammensetzung oder Hersteller</b>  |
|--|---|
| Permeabilisierungslösung II                    | 150 mM Saccharose<br>50 mM Tris-HCl pH 7,5<br>50 mM NaCl<br>2 mM CaCl <sub>2</sub>  |
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung<br>(1 × PBS) | 0,137 M NaCl<br>10,14 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>2,68 mM KCl<br>1,76 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4  |
| Präparationspuffer                             | 0,1 N NaOH<br>50 mM NaCl<br>In DEPC H <sub>2</sub> O  |
| Spermidin-Lösung (0,1 M)                       | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA   |
| TAE-Puffer pH 8,0 (50×)                        | 2 M TRIS<br>1 M Essigsäure<br>50 mM EDTA  |
| ROTIPHORESE®10x TBE-Puffer                     | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland   |
| TE (Tris-EDTA)-Puffer pH                       | 10 mM Tris-HCl pH 8,0<br>1 mM EDTA  |
| TE-RNase Puffer                                | 10 µg/mL RNaseA in TE-Puffer  |
| TNESK (2X)                                     | 20 mM Tris-HCL pH 7,5<br>50 mM NaCl<br>2 mM EDTA<br>2 % (w/vol) SDS<br>0,2 mg/mL Proteinase K (Bioline, Cincinnati,<br>USA) |
| Tris-HCl                                       | 1 M TRIS in ddH <sub>2</sub> O<br>pH (6,8; 7,5; 8,0; 8,5) mit Salzsäure einstellen  |
| Waschpuffer (Immunfluoreszenz)                 | 0,1 % (vol/vol) Triton X-100<br>in 1 × PBS  |

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien**

| <b>Bezeichnung</b>                                 | <b>Zusammensetzung/Hersteller</b>  |
|--|--|
| Medium 199 with Earle's salts                      | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  |
| M199+ Parasiten Zellkulturmedium (pH 7,4 oder 5,5) | 1x M199<br>20 % FCS (hitzenedenaturiert) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)<br>40 mM HEPES<br>10 mg/L Haemin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)<br>0,1 mM Adenin<br>5 µM 6-Biopterin (Biomol, Hamburg, DE)<br>2 mM L-Glutamin<br>100 U Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>Lagerung bei 4 °C |

## 2.1.6 Antibiotika und Inhibitoren

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antibiotika und Inhibitoren**

| <b>Bezeichnung</b>                  | <b>Endkonzentration</b>                       | <b>Hersteller</b>                  |
|-------------------------------------|---|------------------------------------|
| Geneticin (G418)                    | 50 µg/mL                                      | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Hydroxyurea                         | 0,125 - 0,5 mM                                | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) | 100 U Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin    | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA      |
| Radicicol                           | 200-1600 ng/mL<br>Stammlösung: 1 M in Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |

## 2.1.7 Enzyme

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Enzyme**

| <b>Bezeichnung</b>                       | <b>Hersteller</b>                 |
|--|-----------------------------------|
| Micrococcal Nuclease                     | New England Biolabs, Beverly, USA |
| NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix | New England Biolabs, Beverly, USA |
| Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase    | New England Biolabs, Beverly, USA |

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Enzyme**

| <b>Bezeichnung</b>                     | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| RNase A                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA          |
| SUPERase•In™ RNase Inhibitor (20 U/μl) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| SuperScript™ III Reverse Transcriptase | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| T4 RNA Ligase 1                        | New England Biolabs, Beverly, USA      |
| TDE1                                   | Illumina San Diego, USA                |

### 2.1.8 Antikörper

Die hier aufgeführten Antikörper wurden für eine Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper**

| <b>Bezeichnung</b>                                     | <b>Konzentration</b> | <b>Hersteller</b>                         |
|--|----------------------|---|
| anti-α-Tubulin-IgG<br>(polyklonal, Maus)               | 1/4000               | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA             |
| anti-mouse Alexa Fluor® 594<br>IgG (polyklonal, Ziege) | 1/250                | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>USA |

### 2.1.9 Kits

Die in Tabelle 9 aufgeführten Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet, sofern nicht anders in den Methoden vermerkt.

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Kits**

| <b>Bezeichnung</b>                                       | <b>Hersteller</b>                                 |
|--|---|
| Agencourt AMPure XP Kit                                  | Beckmann Coulter, Brea, USA                       |
| Biozym Blue S'Green qPCR Kit                             | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf,<br>Deutschland |
| ISOLATE II Genomic DNA Kit                               | Bioline, Luckenwalde, Deutschland                 |
| Illumina Tagment DNA TDE1 Enzyme and<br>Buffer Kits      | Illumina, San Diego, USA                          |
| KAPA Library Quantification Kit qPCR<br>MasterMix        | Roche, Basel, Schweiz                             |
| KAPA Library Quantification Kit DNA<br>Standards (1 - 6) | Roche, Basel, Schweiz                             |
| Nextera XT DNA Library Preparation Kit                   | Illumina, San Diego, USA                          |

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Kits**

| <b>Bezeichnung</b>                               | <b>Hersteller</b>          |
|--|----------------------------|
| Nextera® XT index Kit                            | Illumina, San Diego, USA   |
| NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) | Illumina, San Diego, USA   |
| NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles) | Illumina, San Diego, USA   |
| MinElute PCR Purification Kit                    | Qiagen, Venlo, Niederlande |

### 2.1.10 Größenstandards und Färbemittel

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Größenstandards und Färbemittel**

| <b>Bezeichnung</b>                     | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| Gene Ruler 1 kb DNA Ladder             | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| GlycoBlue™ Coprecipitant               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder            | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| SYBR™ Gold Nukleinsäuregel-Färbemittel | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Ultra Low Range DNA Ladder             | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

### 2.1.11 Biotin *nuclear run-on* und Anreicherung

**Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Materialien für den *nuclear run-on* (PRO-seq)**

| <b>Bezeichnung</b>                         | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| Biotin-11-CTP                              | Jena Bioscience, Jena, Deutschland     |
| Micro Bio-Spin® Columns with Bio-Gel® P-30 | BIO-RAD, Hercules, USA                 |
| Ribonucleoside Triphosphate Set            | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA          |
| Dynabeads™ M-280 Streptavidin              | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

### 2.1.12 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders spezifiziert, bei Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, Deutschland) bestellt.

## 2.1.13 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien**

| <b>Bezeichnung</b>                                      | <b>Hersteller</b>                              |
|---|--|
| Corning®-Costar®-Spin-X®-Zentrifugenröhrchen-Filter     | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                  |
| Kryokonservierungsgefäß 2 mL                            | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |
| Eppendorf DNA LoBind® Tubes 0,2 mL                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                |
| Eppendorf DNA LoBind® Tubes 0,5 mL                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                |
| Eppendorf DNA LoBind® Tubes 1,5 mL                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                |
| Eppendorf DNA LoBind® Tubes 2,0 mL                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                |
| Invitrogen™ Empty Gel Cassettes, mini, 1.0 mm           | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA         |
| SafeSeal Tips Professional 200 µl XL, steril            | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland |
| Safe Seal Tips, SurPhob Spitzen, steril, 10 µL, 1250 µL | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland |
| Zellkulturflasche T25 cm <sup>2</sup>                   | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |
| Zellkulturflasche T175 cm <sup>2</sup>                  | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |
| Zellkulturflasche T25 cm <sup>2</sup> mit Filter        | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |
| Zellkulturflasche T175 cm <sup>2</sup> mit Filter       | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |
| Zentrifugenröhrchen 15 mL & 50 mL                       | Sarstedt, Waldbronn, Deutschland               |

## 2.1.14 Laborgeräte

**Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte**

| <b>Bezeichnung</b>   | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| Amersham Pharmacia Biotech Elektrophorese Netzteil EPS 301 | Amersham, Buckinghamshire, UK          |
| CASY® Cellcounter & Analyzer                               | Roche, Basel, Schweiz                  |
| EVOS® FL Auto Cell Imaging System                          | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| EVOS™ XL Cell Imaging System                               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| PerfectBlue™ Gel System                                    | VWR International, Radnor, USA         |
| Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

**Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte**

| <b>Bezeichnung</b>  | <b>Hersteller</b>  |
|---|--|
| Horizontalschüttler KS250 basic                                   | IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany                   |
| Inkubator WTC Binder  | Binder, Tuttlingen, Deutschland                            |
| New Brunswick™ Galaxy® 170S Inkubator                             | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                            |
| neoMag Magnetrührer D-6010  | neoLab, Heidelberg, Deutschland                            |
| Mastercycler® Gradient  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                            |
| Multisizer™ 3 Coulter Counter®                                    | Beckmann Coulter, Brea, USA                                |
| NanoDrop™   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                     |
| NextSeq™ 550-System   | Illumina, San Diego, USA                                   |
| pH-Meter Microprocessor pH 211                                    | Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Germany                  |
| Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer                                  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                     |
| Rotor-Gene™ RG 3000 Instrument                                    | Corbett, Sydney, Australien                                |
| Sunlab® Rotator mit Drehteller, regelbar; Modell SU 1010   D-8010 | neoLab, Heidelberg, Deutschland                            |
| Sicherheitswerkbank MSC-Advantage                                 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                     |
| Sigma Tischkühlzentrifuge 2-16KL                                  | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland |
| Taumel-Rollenmischer 5 Rollen, 4-30 UpM                           | neoLab, Heidelberg, Deutschland                            |
| Thermoschüttler TS-100  | bioSan, Riga, Lettland                                     |
| UVP Transilluminator  | Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland)                     |
| Vortexer VF2  | IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany                   |
| Wasserbad VWB 6   | VWR International, Radnor, USA                             |
| Eppendorf® Zentrifuge 5415 D                                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                            |
| Eppendorf® Zentrifuge 5415 R                                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                            |

## 2.1.15 Computerprogramme, Online Ressourcen und Datenbanken

**Tabelle 14: Verwendete Computerprogramme, Online-Ressourcen und Datenbanken**

| Bezeichnung                                   | Anwendung   | Referenz  |
|---|---|---|
| Bowtie2                                       | Alignment der ATAC-seq und PRO-seq Daten zum Genom <i>L. donovani</i> BPK282A1 (Version 46)     | Langmead et al., 2009   |
| Cutadapt                                      | Trimmen von <i>reads</i>  | Martin, 2011  |
| Endnote X9.3.3                                | Literaturverzeichnis und Zitate   | <a href="https://endnote.com/downloads">https://endnote.com/downloads</a>               |
| Genrich                                       | Peak Calling der ATAC-seq Daten   | <a href="https://github.com/jsh58/">https://github.com/jsh58/</a> Genrich               |
| Google Scholar                                | Literaturrecherche  | <a href="https://scholar.google.com">https://scholar.google.com</a>                     |
| GraphPad Prism9, Version 9.3.1                | Auswerten von Daten, Erstellen von Diagrammen und Statistische Analyse                          | <a href="http://www.graphpad.com">www.graphpad.com</a>                                  |
| ImageJ, Version 1.53                          | Quantifizierung der MNase Agarosegelbilder und Bearbeitung der Immunfluoreszenzaufnahmen        | <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>                     |
| Intaglio™, Version 3.9.5                      | Erstellen von Abbildungen   | <a href="https://intaglio.en.softonic.com/mac">https://intaglio.en.softonic.com/mac</a> |
| LibreOffice, Version 7.0.1.2                  | Auswertung von Daten  | <a href="https://de.libreoffice.org">https://de.libreoffice.org</a>                     |
| MacVector, Inc. mit Assembler, Version 18.0.1 | Sequenzanalyse, Analyse von ATAC-seq und PRO-seq  | <a href="https://macvector.com/index.html">https://macvector.com/index.html</a>         |
| Pages, Version 10.1                           | Verfassen der Dissertation  | <a href="https://www.apple.com/de/pages/">https://www.apple.com/de/pages/</a>           |
| Rotor-Gene real-time analysis software 6.1.81 | qRT-PCR Analyse   | -   |
| SAMtools                                      | Entfernen von PCR Duplikaten von ATAC-seq und PRO-seq & Auswertung ATAC-seq („ <i>pileup</i> “) | Li, 2011  |
| TriTryp                                       | Datenbank für Trypanosomatidae  | <a href="https://tritrypdb.org/tritrypdb/">https://tritrypdb.org/tritrypdb/</a>         |
| PubMed-NCBI                                   | Literaturrecherche  | <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov</a>           |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Promastigoten**

Promastigoten sind die begeißelte, längliche Form der Leishmanien, die im Darm der weiblichen Sandmücke vorkommen. Im Labor werden Promastigoten bei verminderter Luftzufuhr bei 25 °C in komplementiertem M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) kultiviert. Bei transfizierten Zellen wird das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben. Die Zellen werden alle drei bis vier Tage auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/mL bis  $1 \times 10^6$  Zellen/mL verdünnt.

#### **2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Leishmanien**

Es werden  $1 \times 10^8$  Zellen aus einer spät-logarithmisch wachsenden Kultur ( $8 \times 10^6$  Zellen/mL) für 10 min bei  $1000 \times g$  und 4 °C sedimentiert. Anschließend werden die Zellen in 500 µL eiskaltem M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) resuspendiert, mit 500 µL Einfriermedium gemischt und in ein 2 mL Kryokonservierungsgefäß überführt. Die Leishmanien werden in einer Styroporbox über Nacht bei -70 °C langsam runtergekühlt und am nächsten Tag in einen Stickstoff-Kryotank überführt.

Für das Auftauen der Zellen werden die eingefrorenen Kryokonservierungsgefäße in einem Wasserbad bei 37 °C schnell erwärmt und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 9 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) und entsprechenden Antibiotika überführt. Nach einem Tag werden die Zellen 1/10 verdünnt und am darauffolgenden Tag 1/100. Danach können die Zellen entsprechend Abschnitt 2.2.1.1 kultiviert werden.

#### **2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahlen**

Die Zellzyklen der Leishmanien wurden mit Hilfe eines automatischen Zellzählsystems (Multisizer™ 3 Coulter Counter®) bestimmt. Dafür wurde die Zellen 1:1000 in 7 mL ISOTON™ II Diluent verdünnt und vor dem Messen gründlich durch Invertieren gemischt.

#### **2.2.1.4 Axenische Amastigotendifferenzierung**

Die Differenzierung von Promastigoten zu Amastigoten soll *in vitro* nachgestellt werden. Dafür werden an Tag 0 logarithmisch wachsende Promastigoten von *L. donovani* in 10 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^6$  Zellen/mL ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h bei 25 °C ohne CO<sub>2</sub> werden die Kulturen zu 37 °C ohne CO<sub>2</sub> überführt. Am darauffolgenden Tag werden die Kulturen für 10 min bei  $1000 \times g$  und RT sedimentiert und in 10 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 5,5) resuspendiert. Die Zellen werden in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Filterkappe überführt und bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag vier werden die Kulturen in 10 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 5,5) 1/5 gesplittet. Die vollständige Differenzierung zu axenischen Amastigoten sollte an Tag 7 abgeschlossen sein. Die Rückdifferenzierung der axenisch differenzierten Amastigoten wird an Tag acht eingeleitet.

Dafür werden die Kulturen erneut für 10 min bei  $1000 \times g$  und RT sedimentiert und das Pellet in 10 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) resuspendiert. Die Inkubation erfolgt in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ohne Filterkappe bei 25 °C für 72 h. Die Kontrolle der Stadiendifferenzierung erfolgt durch das Fixieren der Zellen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.2.1.6 und 2.2.5.1).

#### **2.2.1.5 Behandlung mit Radicicol und Hydroxyurea**

Für die Behandlung mit Radicicol (RAD) oder Hydroxyurea (HU) werden logarithmisch wachsende *L. donovani* Promastigoten mit einer Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen/mL in 10 mL M199<sup>+</sup>-Medium (pH 7,4) ausgesät. Anschließend erfolgt die Zugabe der gewünschten Konzentration RAD oder HU. Die Kulturen werden bei 25 °C für 24 h (HU) oder 72 h (RAD) inkubiert.

#### **2.2.1.6 Fixieren von Zellen auf Objektträgern**

Für die Analyse der Leishmanien via Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 2.2.5.1) werden  $1 \times 10^7$  Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur bei  $1000 \times g$  für 8 min bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wird in kaltem  $1 \times$  PBS gewaschen ( $1000 \times g$ , 8 min, 4 °C) und in 100-500 µL kaltem  $1 \times$  PBS resuspendiert. Anschließend werden 40 µL auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Fixierung der Zellen erfolgt für 3 min in eiskaltem Methanol. Die Objektträger können im trockenen Zustand bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden oder entsprechend des Protokolls zur Immunfluoreszenzfärbung (Abschnitt 2.2.5.1) weiter behandelt werden.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Leishmanien**

Genomische DNA von *L. donovani* wurde mit dem Isolate II Genomic DNA Kit aufgereinigt. Dafür wurden  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen bei  $1000 \times g$  für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zwei Mal in kaltem  $1 \times$  PBS gewaschen ( $1000 \times g$ , 8 min, 4 °C) und in 200 µL GL-Lysispuffer resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT, werden 200 µL G3-Lysispuffer und 25 µL Proteinase K hinzugegeben, gevortext und 15 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend werden 210 µL 96 % Ethanol zugegeben und die Probe auf die Säule pipettiert. Für das weitere Vorgehen wird den Herstellerangaben gefolgt.

### **2.2.2.2 Micrococcal nuclease (MNase) Assay**

Es werden  $5 \times 10^7$  Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen abgenommen und bei  $1000 \times g$  für 8 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 10 mL  $1 \times$  PBS gewaschen ( $1000 \times g$ , 8 min) und die Zellen in 500 µL Permeabilisierungslösung I mit Triton X-100 resuspendiert. Nach einer Inkubation von

5 min werden die permeabilisierten Zellen bei  $1000 \times g$  für 8 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Danach erfolgt ein Waschschrift mit 500  $\mu$ L Permeabilisierungslösung I ohne Triton X-100 bei  $1000 \times g$  für 8 min. Das Pellet wird in 500  $\mu$ L Permeabilisierungslösung II resuspendiert und das Chromatin mit MNase verdaut. Dafür werden 10 – 80 Units MNase hinzugegeben und die Reaktion nach exakt 5 min durch die Zugabe von 500  $\mu$ L 2xTNECK abgestoppt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 500  $\mu$ L Lysis-Verdünnungspuffer. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C im Wasserbad werden die Proben durch eine Ethanol-Präzipitation gefällt. Dafür wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen 96%iges Ethanol hinzugegeben und die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 60 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 3 mL 70%igem Ethanol gewaschen (max. Geschwindigkeit, 10 min, RT). Der Überstand wird sorgfältig abgenommen, das Pellet getrocknet und in 50  $\mu$ L TE-Puffer pH 8,0 für 30 min gelöst. Für die Auswertung werden 3000 ng DNA auf einem 1,5%igem Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen (siehe Abschnitt 2.2.2.3).

### **2.2.2.3 Gelelektrophorese**

Für das Auftrennen von DNA-Fragmenten wurden 1–1,5%ige (w/vol) Agarosegele verwendet. Die Gele werden mit 1  $\times$  TAE Puffer hergestellt und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ g/mL pro Gel versetzt. Die DNA wird mit 1/6 Vol des 6X Formamid-Ladepuffers versetzt und das Gel beladen. Außerdem wird ein entsprechender Größenmarker verwendet. Die Auftrennen erfolgt in einem PerfectBlue™ Gel System in 1  $\times$  TAE Puffer bei 80 – 120 V für ~60 min. Anschließend wurde die DNA mit UV Illuminator sichtbar gemacht.

## **2.2.3 ATAC-Seq (*Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing*)**

### **2.2.3.1 Zellpräparation**

Für die Zellpräparation werden  $2 \times 10^7$  Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur entnommen und diese bei  $1000 \times g$  für 10 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Anschließend werden die Zellen in eiskaltem 1  $\times$  PBS gewaschen ( $1000 \times g$ , 10 min 4 °C). Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 500  $\mu$ L Permeabilisierungslösung mit Triton X-100 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wird erneut zentrifugiert ( $1000 \times g$ , 8 min, 4 °C). Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet in 500  $\mu$ L Permeabilisierungslösung ohne Triton X-100 gewaschen ( $1000 \times g$ , 8 min, 4 °C). Den Überstand vorsichtig mit einer Pipette abnehmen und direkt mit der Transposition beginnen. Das Pellet wird auf Eis gelagert.

### 2.2.3.2 Transposition und Aufreinigung

Für die Transposition wird ein Mix aus 25 µL TD-Puffer, 2,5 µL TDE und 22,5 µL Nuklease-freiem Wasser hergestellt und damit das Pellet aus der Zellpräparation gründlich resuspendiert. Die Transposition wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit dem Qiagen MinElute PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 2.2.3.3 gDNA Kontrolle

Für die Kontrolle der genomischen DNA werden 50 ng und 200 ng gDNA verwendet. Dafür wird in einem 0,2 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß für ein Gesamtvolumen von 20 µL die Konzentration entweder auf 2,5 ng/µL oder 10 ng/µL eingestellt. Für die Transposition werden 25 µL TD-Puffer, 2,5 µL TDE und 2,5 µL Nuklease-freies Wasser hinzugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 1000 × g für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Reaktion wird dann für 30 min bei 37 °C im PCR-Cycler inkubiert, wobei der Deckel auf 55 °C eingestellt ist. Im Anschluss werden die Proben sofort mit dem Qiagen MinElute PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 2.2.3.4 PCR Amplifikation

Die Transposase-behandelten DNA-Fragmente werden in einer PCR amplifiziert und dabei mit spezifischen Barcodes markiert. Die PCR-Reaktion wird entsprechend der Tabelle 15 in einem 0.2 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß pipettiert.

**Tabelle 15: PCR-Ansatz für die Barcode-PCR**

| Reagenz  | Volumen pro Reaktion (µL) |
|--|---------------------------|
| Transposase-behandelte DNA                                   | 10                        |
| Nuklease-freies Wasser                                       | 5                         |
| Index 1 (i7) Adapter (25 µM) aus Nextera XT Index Primer Kit | 5                         |
| Index 2 (i5) Adapter (25 µM) aus Nextera XT Index Primer Kit | 5                         |
| NEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix                      | 25                        |

Der Ansatz wird entsprechend der Tabelle 16 für 5 Zyklen amplifiziert und anschließend die optimale Zyklusanzahl mittels qPCR bestimmt (Abschnitt 2.2.3.5).

**Tabelle 16: PCR Programm, Teilamplifikation**

| PCR-Schritt            | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|------------------------|------------|-------|--------|
| Primer Verlängerung    | 72 °C      | 5 min | x 1    |
| Initiales Denaturieren | 98 °C      | 30 s  |        |
| Denaturieren           | 98 °C      | 10 s  | x 5    |
| Annealing              | 63 °C      | 30 s  |        |
| Elongation             | 72 °C      | 1 min |        |

### 2.2.3.5 Bestimmung der Zyklenzahl via qPCR und finale Amplifikation

Um eine Verzerrung der Größen in der PCR zu verhindern, wird die optimale Zyklenzahl für die PCR der *library* via qPCR bestimmt. Dies erlaubt die finale Amplifikation noch vor der Sättigung der PCR zu stoppen. Dafür wird ein Ansatz entsprechend der Tabelle 17 pipettiert.

**Tabelle 17: PCR-Ansatz für die Barcode-PCR**

| Reagenz  | Volumen pro Reaktion (µL) |
|--|---------------------------|
| Teil-amplifizierte <i>library</i>                            | 5                         |
| Nuklease-freies Wasser                                       | 4                         |
| Index 1 (i7) Adapter (25 µM) aus Nextera XT Index Primer Kit | 0,5                       |
| Index 2 (i5) Adapter (25 µM) aus Nextera XT Index Primer Kit | 0,5                       |
| 2x SYBR Green Master Mix                                     | 10                        |

Die qPCR wird nach Tabelle 18 amplifiziert:

**Tabelle 18: qPCR Programm**

| PCR-Schritt            | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|------------------------|------------|-------|--------|
| Initiales Denaturieren | 98 °C      | 30 s  | x 1    |
| Denaturieren           | 98 °C      | 10 s  |        |
| Annealing              | 63 °C      | 30 s  | x 20   |
| Elongation             | 72 °C      | 1 min |        |

Für die Kalkulation der Zyklenzahl (N) wird die relative Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl der qPCR aufgetragen. Es wird die Zyklenzahl bestimmt, bei der  $\frac{1}{3}$  der maximalen Fluoreszenzintensität erreicht ist.

Die übrigen 45 µL der PCR Reaktion aus Abschnitt 2.2.3.4 werden anhand der Tabelle 18 amplifiziert, nur das statt 20 Zyklen, die durch qPCR-bestimmte Zyklenzahl N verwendet wird. Die *library* wird anschließend mit AMPure XP Beads nach den Angaben des Hersteller aufgereinigt und in 32,5 µL Resuspensionspuffer (RD Puffer aus Illumina Nextera XT Kit) eluiert. Die *library* kann für eine Woche bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung und Illumina Sequenzierung

Die Konzentration der *libraries* wurden mit dem KAPA Library Quantification Kit bestimmt und die Sequenzierung auf einem NextSeq™ 550-System mit einem NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) *paired-end* nach Angaben des Hersteller durchgeführt.

### 2.2.3.7 Bioinformatische Analyse der ATAC-seq Daten

Die *reads* wurden zunächst getrimmt, indem die 3' Adapter-Sequenzen entfernt wurden. Anschließend wurden die *reads* mit *bowtie2* in einem Alignment dem Referenzgenom *L. donovani* BPK282A1 (Version 46) zugeordnet. Danach wurden mit SAMtools PCR-

Duplikate entfernt und ein „*pileup*“ erstellt, womit dann anschließend unter Berücksichtigung der gDNA-Kontrolle mit Genrich Peak generiert wurde. Die Peaks wurden dann für die weitere Analyse der Daten verwendet, wobei die Peaks die offenen Chromatinbereiche reflektieren.

## 2.2.4 PRO-seq (*precision nuclear run-on and sequencing*)

### 2.2.4.1 Kernisolierung aus *Leishmania spp.*

Von einer logarithmisch wachsenden Kultur werden  $1,5 - 2 \times 10^9$  Zellen abgenommen und für 15 min bei  $1000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  sedimentiert. Das Pellet wird anschließend in 50 mL eiskaltem 1 x PBS gewaschen ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min,  $1000 \times g$ ) und der Überstand wird vorsichtig entfernt. Das Sediment wird für die Zellyse in 5 mL eiskaltem Lysispuffer mit Tergitol 15-S-9 für 5 min auf Eis inkubiert und nach erneuter Zentrifugation ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min,  $1000 \times g$ ) der cytosolische Überstand vorsichtig dekantiert. Nachfolgend wird das Kernsediment in 5 mL eiskaltem Lysispuffer ohne Tergitol 15-S-9 gewaschen ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min,  $1000 \times g$ ), der Überstand entfernt und das Kernsediment in 200  $\mu\text{L}$  Lysispuffer ohne Tergitol 15-S-9 resuspendiert. Dazu wird das gleiche Volumen 2x Kernlagerpuffer (ca. 200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Kerne werden in Aliquots zu 100  $\mu\text{L}$  bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, welches ca.  $5 \times 10^8$  Kerne pro Aliquot entspricht.

### 2.2.4.2 Nuclear run-on

Zunächst wird der  $2 \times$  run-on Mix ( $2 \times$  NRO) wie in Tabelle 19 vorbereitet und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  vorgewärmt. Für den nuclear run-on werden 100  $\mu\text{L}$  Kerne aus der Kernisolierung (Abschnitt 2.2.4.1) mit einer abgeschnittenen P-200 Pipettenspitze zu 100  $\mu\text{L}$  vorgewärmten  $2 \times$  NRO pipettiert und die Reaktion für 10 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch die Isolierung der RNA (Abschnitt 2.2.4.3).

**Tabelle 19: Zusammensetzung des  $2x$  run-on Mix ( $2x$  NRO)**

| Volumen pro Reaktion | Reagenz                          |
|----------------------|----------------------------------|
| 40 $\mu\text{L}$     | $5 \times$ Nuclear run-on Puffer |
| 2,5 $\mu\text{L}$    | ATP (10 mM)                      |
| 2,5 $\mu\text{L}$    | GTP (10 mM)                      |
| 2,5 $\mu\text{L}$    | UTP (10 mM)                      |
| 1 $\mu\text{L}$      | CTP (0,05 mM)                    |
| 5 $\mu\text{L}$      | biotin-11-CTP (1 mM)             |
| 0,8 $\mu\text{L}$    | DTT (0,5M)                       |
| 2 $\mu\text{L}$      | SUPERase_Inhibitor               |
| 43,7 $\mu\text{L}$   | 2 % Sarcosyl                     |

### 2.2.4.3 RNA-Isolierung aus der *nuclear run-on* Reaktion

Zu der *nuclear run-on* Reaktion aus Abschnitt 2.2.4.2 werden 500  $\mu\text{L}$  Trizol LS hinzugefügt und durch Vortexen gemischt. Die homogenisierte Probe wird anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nukleoproteine zu ermöglichen. Dem Ansatz wird 130  $\mu\text{L}$  Chloroform hinzugegeben, die Probe für 15 s gründlich gevortext und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 14000  $\times$  g für 5 min und 4 °C. Die obere, wässrige Phase wird vorsichtig in ein neues 2,0 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt, mit 2,5 Volumen 100 % (vol/vol) Ethanol versetzt und für 10 s kräftig gevortext. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wird die RNA bei 14000  $\times$  g für 20 min und 4 °C präzipitiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 75% (vol/vol) Ethanol gewaschen (14000  $\times$  g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird erneut vollständig entfernt und das Pellet für 5-10 min getrocknet. Es gilt drauf zu achten, das Pellet nicht übertrocknen zu lassen, da sonst die Löslichkeit stark verringert wird. Abschließend wird das Pellet in 20  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### 2.2.4.4 RNA-Fragmentierung durch Basenhydrolyse

Die RNA wird bei 65 °C im Heizblock für 40 s denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Zu der Hitze-denaturierten RNA wird 5  $\mu\text{L}$  1 N NaOH hinzugegeben, die Mischung für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  Tris-HCl pH 6,8 neutralisiert. Es schließt sich ein Pufferaustausch an, bei dem die basisch-hydrolysierte RNA-Probe nach Anweisungen des Hersteller durch eine P-30-Säule gegeben wird. Nach erfolgreichem Pufferaustausch wird die RNA mit 1  $\mu\text{L}$  RNase-Inhibitor versetzt.

### 2.2.4.5 Biotin RNA-Anreicherung

Die Streptavidin M280 Beads müssen vorgewaschen werden, wofür pro *library* 90  $\mu\text{L}$  Streptavidin M280 Beads entnommen werden und für 1 min auf einem Magnetständer vom Überstand getrennt werden. Der Überstand wird verworfen und die Beads anschließend in 1 mL Präparationspuffer gewaschen. Es folgt eine erneute Inkubation auf einem Magnetständer (1 min), der Überstand wird entfernt und die Beads werden zwei mal mit 1 mL 100 mM NaCl gewaschen. Nach Entfernen des Waschpuffers werden die Beads in 150  $\mu\text{L}$  Bindepuffer resuspendiert und drei Aliquots je 50  $\mu\text{L}$  abgefüllt. Die vorgewaschenen Beads können für eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

Für die Biotin-Anreicherung werden 50  $\mu\text{L}$  der RNA mit 50  $\mu\text{L}$  vorgewaschenen Streptavidin Beads gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor (8 U/min) inkubiert. Die Mischung wird dann für 1 min auf einem Magnetständer separiert und die Flüssigkeit entfernt. Die Beads werden zwei mal mit 500  $\mu\text{L}$  High-Salt-Waschpuffer für 1 min auf einem Rotor gewaschen, wobei dazwischen der Waschpuffer durch den Einsatz des Magnetständers entfernt wird. Anschließend folgt ein Waschschriff mit 500  $\mu\text{L}$  Low-Salt-Waschpuffer. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers, werden die Beads in 300  $\mu\text{L}$  Trizol resuspendiert, gründlich gevortext und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird

60 µL Chloroform hinzugegeben, die Mischung gründlich geschüttelt und erneut für 3 min Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 14000 × g für 5 min und 4 °C. Danach wird die obere, wässrige Phase (~180 µL) in ein neues 1,5 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase verworfen. Von den Beads wird erneut, wie bereits beschrieben, mit Trizol und Chloroform isoliert. Zu der gesammelten wässriger Phase (~360 µL) werden 360 µL Chloroform gegeben, die Mischung geschüttelt und zentrifugiert (14000 × g, 5 min, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wird in ein neues 1,5 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µL GlycoBlue und 900 µL 100 % (vol/vol) Ethanol versetzt und gründlich gevortext. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur schließt sich ein Zentrifugationsschritt bei 14000 × g für 20 min und 4 °C an. Das Pellet wird dann in 750 µL 75 % (vol/vol) Ethanol gewaschen (14000 × g, 5 min, 4 °C) und 5-10 min getrocknet.

#### 2.2.4.6 3' RNA Adapterligation und zweite Biotin RNA-Anreicherung

Das Pellet aus Schritt 2.2.4.5 wird direkt in einem Volumen 3' RNA-Adaptor-haltiger Lösung gelöst, wofür 0,5 µL 100 µM VRA3 in 3,5 µL DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Anschließend folgt eine Hitze-Denaturierung bei 65 °C im Heizblock für 20 s. Die Probe wird direkt auf Eis gestellt und ein Ligationsmix entsprechend der Tabelle 20 hergestellt. Zu den 4 µL RNA-Adapter-Mix werden 6 µL des Ligationsmix zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Mischung wird für 4 h bei 20 °C inkubiert.

**Tabelle 20: Ligationsmix für die Adapterligation**

| Reagenz                    | Volumen pro Reaktion (µL) | Finale Konzentration |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| T4 RNA ligase buffer (10x) | 1                         | 1x                   |
| ATP (10 mM)                | 1                         | 1 mM                 |
| 50 % PEG                   | 2                         | 10 %                 |
| SUPERase_Inhibitor         | 1                         | 2 Units pro µL       |
| T4 RNA ligase I            | 1                         | 1 Unit pro µL        |

Das Volumen der Adapter-ligierten RNA wird durch die Zugabe von 40 µL DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL gebracht. Für die zweite Biotin RNA Anreicherung wird dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.4.5 gefolgt.

#### 2.2.4.7 5' RNA Adapterligation und dritte Biotin RNA-Anreicherung

Die 5' Adapterligation folgt der 3' Adapterligation (Abschnitt 2.2.4.6), nur das der VRA5 Adapter verwendet wird. Es schließt sich eine dritte Biotin RNA-Anreicherung an (Abschnitt 2.2.4.5), wobei das Gesamtvolumen vorher durch die Zugabe von 40 µL DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL gebracht wird.

### 2.2.4.8 Reverse Transkription

Das RNA-Pellet aus der 5' Adapterligation wird in 10 µL DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und 2,5 µL eines Primer-Mix, der entsprechend der Tabelle 21 hergestellt wird, zugegeben.

**Tabelle 21: Primer-Mix**

| Reagenz                          | Volumen pro Reaktion (µL) | Finale Konzentration in 20 µL Volumen (µM) |
|----------------------------------|---------------------------|--|
| DEPC-H <sub>2</sub> O            | 1                         |  |
| RP1 reverse transcription primer | 0,5                       | 2,5  |
| 12,5 mM dNTP mix                 | 1                         | 665  |

Die Mischung wird für 2 min auf 70 °C erhitzt, für 2 min auf Eis runtergekühlt und bei 500-1000 X g für 5 s zentrifugiert. Zu den 12,5 µL RNA-Primer-Mix werden 6 µL RT-Puffer-Mix entsprechend der Tabelle 22 hinzugegeben.

**Tabelle 22: RT-Puffer-Mix**

| Reagenz                  | Volumen pro Reaktion (µL) | Finale Konzentration |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| First-strand buffer (5x) | 4                         | 1x                   |
| DTT (0,1 M)              | 1                         | 5 mM                 |
| SUPERase_Inhibitor       | 1                         | 1 Unit pro µL        |

Die Mischung wird für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt die Zugabe von 1,5 µL Superscript III RT-Enzym. Die Mischung wird durch Pipettieren gemischt und wie folgt inkubiert: 5 min bei 45 °C, dann für 40 min bei 50 °C, 10 min bei 55 °C und 15 min bei 70 °C. Die RT-Reaktion wird durch 6 µL DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 26 µL aufgefüllt und kann bis zu einem Monat bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.4.9 Test PCR Amplifikation

Für die Testamplifikation wird eine Verdünnungsreihe entsprechend der Tabelle 23 vorbereitet. Diese dient dazu, die optimale Anzahl an PCR-Zyklen für die finale Amplifikation zu bestimmen.

**Tabelle 23: Verdünnungsreihe der cDNA für die Test-Amplifikation**

| Verdünnung | Menge cDNA        | H <sub>2</sub> O (µL) | PCR Zyklen in der finalen Amplifikation |
|------------|-------------------|-----------------------|---|
| 1          | 2 µL RT Probe     | 6                     | 17                                      |
| 2          | 2 µL Verdünnung 1 | 6                     | 15                                      |
| 3          | 2 µL Verdünnung 2 | 6                     | 13                                      |
| 4          | 2 µL Verdünnung 3 | 6                     | 11                                      |

Der PCR-Ansatz wird entsprechend der Tabelle 24 vorbereitet und 14  $\mu\text{L}$  PCR-Ansatz zu den Verdünnungen von je 6  $\mu\text{L}$  zugegeben.

**Tabelle 24: PCR-Ansatz für die Testamplifikation**

| Reagenz                          | Volumen pro Reaktion ( $\mu\text{L}$ ) | Finale Konzentration         |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| DEPC-H <sub>2</sub> O            | 4,3                                    |                              |
| HF Puffer (5x)                   | 4                                      | 1x                           |
| Betaine (5 M)                    | 4                                      | 1 M                          |
| dNTP mix (12.5 mM jeweils)       | 0,5                                    | 250 $\mu\text{M}$ jeweils    |
| RP1 primer (10 $\mu\text{M}$ )   | 0,5                                    | 250 nM                       |
| RPI-n primer (10 $\mu\text{M}$ ) | 0,5                                    | 250 nM                       |
| Phusion DNA Polymerase           | 0,2                                    | 0,02 Units pro $\mu\text{L}$ |

Die Amplifikation wird entsprechend Tabelle 25 durchgeführt:

**Tabelle 25: Amplifikation Test-PCR**

| Zyklus | Denaturieren (95 °C) | Annealing      | Elongation (72 °C) |
|--------|----------------------|----------------|--------------------|
| 1      | 2 min                |                |                    |
| 2-6    | 30 s                 | 56 °C für 30 s | 30 s               |
| 7-22   | 30 s                 | 65 °C für 30 s | 30 s               |
| 23     |                      |                | 10 min             |

#### 2.2.4.10 Kontrolle der Test PCR Amplifikation via PAGE

Für die Kontrolle der Test-PCR wird für eine bessere Visualisierung der Ergebnisse eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Dafür wird die entsprechende Anzahl an 8 % Polyacrylamidgelen (10 mL pro Gel) nach Tabelle 26 vorbereitet.

**Tabelle 26: Zusammensetzung 8%iges Polyacrylamidgel**

| Reagent                   | 8 %               | Finale Konzentration |
|---------------------------|-------------------|----------------------|
| Polyacrylamid (19:1) 40 % | 2 mL              | 8 %                  |
| TBE 5X                    | 2 mL              | 1x                   |
| APS 10 %                  | 100 $\mu\text{L}$ | 0,1 %                |
| TEMED                     | 4 $\mu\text{L}$   | -                    |
| DEPC-H <sub>2</sub> O     | ad 10 mL          |                      |

Die Polyacrylamidgele werden für 30 min bei 180 V in 1 X TBE äquilibriert, die Proben mit 6 X Ladepuffer versetzt und pro Well 20  $\mu\text{L}$  aufgetragen. Als Marker wird der Ultra Low Range DNA Ladder verwendet. Das Auftrennen erfolgt für ~40 min bei 180 V. Anschließend werden die Banden mit SYBR Gold sichtbar gemacht, indem 5  $\mu\text{L}$  SYBR Gold in 50 mL 1 X TBE verdünnt wird. Es folgt eine lichtgeschützte Inkubation von 5 min.

### 2.2.4.11 Full-Scale Amplifikation

Für die finale Amplifikation wird ein PCR-Mix entsprechend der Tabelle 27 hergestellt.

**Tabelle 27: PCR-Mix für die finale Amplifikation**

| Reagenz                    | Volumen pro Reaktion (µL) | Finale Konzentration |
|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| DEPC-H <sub>2</sub> O      | 1,25                      |                      |
| HF Puffer (5x)             | 10                        | 1x                   |
| Betaine (5 M)              | 10                        | 1 M                  |
| dNTP mix (12.5 mM jeweils) | 1,25                      | 250 µM jeweils       |
| RP1 primer (10 µM)         | 1,25                      | 250 nM               |
| Phusion DNA Polymerase     | 1                         | 0,04 Units pro µL    |

Der PCR-Mix (25,5 µL) wird zu der verbleibenden 24 µL der cDNA hinzugefügt und zu jeder Probe 1,25 µL des entsprechenden RPI-n Primers gegeben. Die Amplifikation folgt der Tabelle 28.

**Tabelle 28: finale Amplifikation**

| Zyklus | Denaturieren (95 °C) | Annealing      | Elongation (72 °C) |
|--------|----------------------|----------------|--------------------|
| 1      | 2 min                |                |                    |
| 2-6    | 30 s                 | 56 °C für 30 s | 30 s               |
| 7- N   | 30 s                 | 65 °C für 30 s | 30 s               |
| N + 1  |                      |                | 10 min             |

### 2.2.4.12 Aufreinigung der *library* via PAGE

Die PCR-Produkte der finalen Amplifikation werden entsprechend des Abschnitts 2.2.4.11 auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 25). Anschließend wird die *library* zwischen ~140 bp und ~350 bp mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Die Bande bei 120 bp entspricht Adapter-Dimeren und darf nicht mit ausgeschnitten werden. Das ausgeschnittene Gel wird in ein 0,5 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß mit einem Loch am Boden überführt. Dieses wird dann in ein 2 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß gesetzt und bei 16000 × g für 2 min zentrifugiert. Dabei wird das Gel durch das Loch im Boden in das neue 2 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß zerkleinert. Die Überreste aus dem 0,5 mL DNA LoBind Reaktionsgefäß werden ebenfalls überführt und 500 µL DNA Elutionspuffer hinzugegeben. Danach folgt ein Inkubationsschritt auf einem rotierenden Rad über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wird die Gel-Masse mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein Spin-X *Centrifugation Tube Filter* überführt und bei 16900 × g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Die Säulen werden verworfen. Anschließend werden 1,5 µL Glycoblue und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben, die Proben gevortext und mind. 30 min bei -20 °C inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 16000 × g und 4 °C für 30 min. Danach wird der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet

mit 1 mL kaltem 80%igen Ethanol gewaschen (16000 × g, 4 °C, 20 min). Der Überstand wird restlos abgenommen, das Pellet ca. 10 min bei RT getrocknet und in 12 µL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung der fertigen *library* erfolgt bei -20 °C.

#### **2.2.4.13 Bestimmung der Konzentration und Illumina Sequenzierung**

Die Konzentration wurden mit dem KAPA Library Quantification Kit bestimmt und die *librarys* auf einem NextSeq™ 550-System mit einem NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles) *single-end* nach Angaben des Hersteller sequenziert.

#### **2.2.4.14 Bioinformatische Analyse der PRO-seq Daten**

Die *reads* wurden zunächst mit Cutadapt getrimmt, indem die 3' Adapter-Sequenzen entfernt wurden. Die *reads* wurden mit *bowtie2* in einem Alignment dem Referenzgenom *L. donovani* BPK282A1 (Version 46) zugeordnet. Für die Auswertung wurden die *reads* an den jeweiligen Positionen im Genom gezählt.

### **2.2.5 Mikroskopie**

#### **2.2.5.1 Immunfluoreszenz**

Die Objektträger werden für 1 min in einer Waschlösung gewaschen und anschließend für 15 min in 30 µL Permeabilisierungslösung inkubiert. Es erfolgt ein Waschschrift für 15 min und eine Inkubation in 30 µL Blockierungslösung für 30 min in einer feuchten Kammer. Danach werden die Objektträger mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dafür wird der Antikörper in Blockierungslösung verdünnt und pro Objektträger 30 µL verwendet. Es folgt ein erneuter Waschschrift für 15 min in Waschlösung und eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt und zusätzlich DAPI in einer Verdünnung von 1/50 hinzugegeben. Pro Objektträger werden 30 µL für die Inkubation in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer verwendet (1 h, RT oder ü.N., 4 °C). Die Objektträger werden für 15 min in Waschlösung gewaschen, die Flüssigkeit abgeklopft und mit 20 µL Mowiol das Deckgläschen auf den Objektträger gegeben. Das Mowiol muss ü.N. bei 4 °C aushärten, bevor die Objektträger am EVOS™ FL Auto Imaging System bei 60-facher Vergrößerung analysiert werden können.

#### **2.2.6 Statistik**

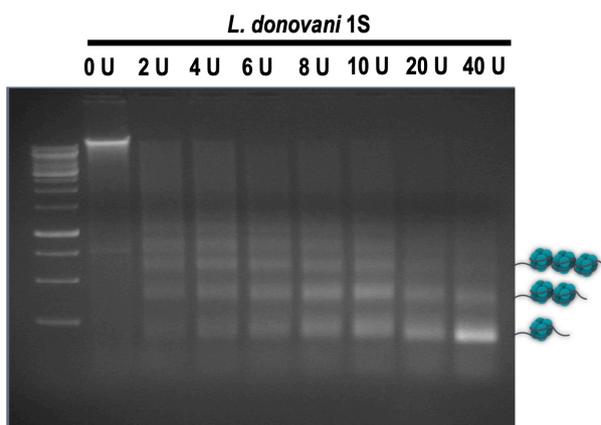
Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism9 (Version 9.3.1) verwendet. Die ATAC-seq Experimente wurden mit zwei, PRO-seq mit drei biologischen Wiederholungen durchgeführt. Für alle weiteren Experimente in dieser Arbeit wurden mindestens drei biologische Replikate analysiert. Die statistische Analyse von zwei zu vergleichenden Gruppen wurde mit dem Differenzen t-Test (*ratio paired t-test*) durchgeführt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde dies mit dem Kruskal-Wallis Test (*One way ANOVA*) mit anschließendem Dunn's Test statistisch ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

Im nachfolgenden Ergebnisteil wurden ausschließlich Parasiten der viszeralen Spezies *L. donovani* 1S verwendet. Der Ergebnisteil gliedert sich in drei wesentliche Teile. Dabei befasst sich der erste Teil mit der Analyse von genomweiten Veränderungen in der Chromatinstruktur. Im zweiten Teil wurde durch die Etablierung von ATAC-seq untersucht, welche spezifischen Bereiche des Genoms sich verändern. Außerdem wurde durch die Etablierung einer weiteren Sequenziermethode (PRO-seq) die polycistronische Transkription der Leishmanien analysiert.

#### 3.1 Etablierung eines *micrococcal nuclease* Assays zur Bestimmung der Chromatinstruktur in *L. donovani*

Die *micrococcal nuclease* (MNase) ist eine Endo-Exonuklease aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*, mit deren Hilfe u.a. die Position von Nukleosomen und die Dichte des Chromatins bestimmt werden kann. Dabei werden vor allem Regionen verdaut, in denen Proteine nicht stabil binden. Nukleosomen, die stabil an die DNA zur Verpackung des Chromatins gebunden sind, schützen die DNA vor einem Verdau. Dadurch wird bevorzugt die Linker-DNA zwischen den Nukleosomen bis hin zum Nukleosom durch die MNase verdaut, aber nicht die DNA, die um die Nukleosomen gewunden ist. Durch eine anschließende Isolation der DNA erhält man Fragmente, deren Länge ca. 200 bp bzw. Vielfachen davon entsprechen und somit die DNA aus Mono-, Di-, Tri- und Oligo-Nukleosomen repräsentieren (Abbildung 6). In einer anschließenden Quantifizierung der Bandenintensität können Rückschlüsse auf die Dichte des Chromatins geschlossen werden. Je offener das Chromatin, desto besser ist die Erreichbarkeit der DNA für die MNase, was zu stärkeren Mono-Nukleosomen-Banden führt. Der MNase Assay ist jedoch abhängig von der Menge des eingesetzten Enzyms und der Inkubationszeit, weshalb zunächst die optimalen Bedingungen für *L. donovani* getestet werden mussten. Für die anschließende Quantifizierung sollte die Intensität der Mono-Nukleosomen-Banden verglichen werden, weshalb sich eine Konzentration von 40 Units MNase oder höher als geeignet erwiesen hat.



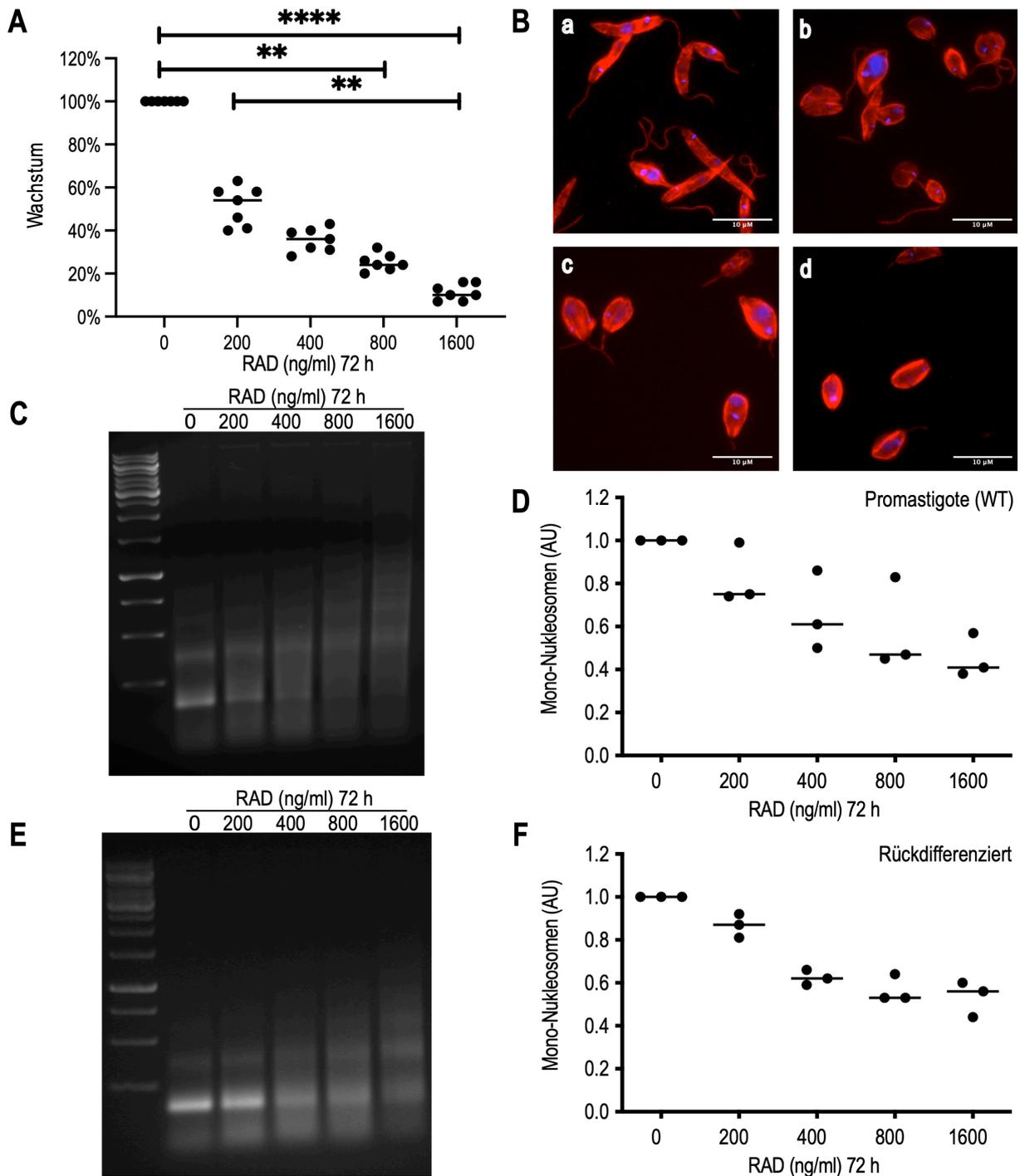
**Abbildung 6: *Micrococcal nuclease* Verdau von *L. don* 1S Promastigoten.**  $5 \times 10^7$  Parasiten wurden permeabilisiert und für 5 min mit 0-40 Units MNase behandelt. Die Reaktion wurde abgestoppt und die Ansätze für 2 h mit Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und 3  $\mu$ g auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert (Marker = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). Die Banden entsprechen den von Mono-, Di-, Tri- und Oligonukleosomen stammenden DNA Fragmenten. Dargestellt ist eine Dosis-Abhängigkeit der MNase, die sich auf die Intensität der Mono-Nukleosomen auswirkt.

### 3.1.1 Der Einfluss von HSP90 auf die Chromatindichte

In *ribosome profiling*-Analysen mit *L. donovani* konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von HSP90 mit RAD (IC<sub>80</sub>) mit einer erhöhten Synthese von Histonen einhergeht (Bifeld et al., 2018). Daher sollte durch MNase Verdau-Analysen festgestellt werden, ob diese erhöhte Synthese der Histone unter HSP90-Hemmung auch zu einer dichteren Chromatinstruktur führt. Dafür wurde zunächst die Proliferation von *L. donovani* 1S Promastigoten nach 72 h RAD-Behandlung untersucht (Abbildung 7 A). Bereits die Behandlung mit 200 ng/mL führt im Vergleich zur unbehandelten Kultur zu einer 46%igen Inhibition des Wachstums, während die höheren Konzentrationen von 800 ng/mL und 1600 ng/mL zu einer Inhibition von 76 % bzw. 90 % führen.

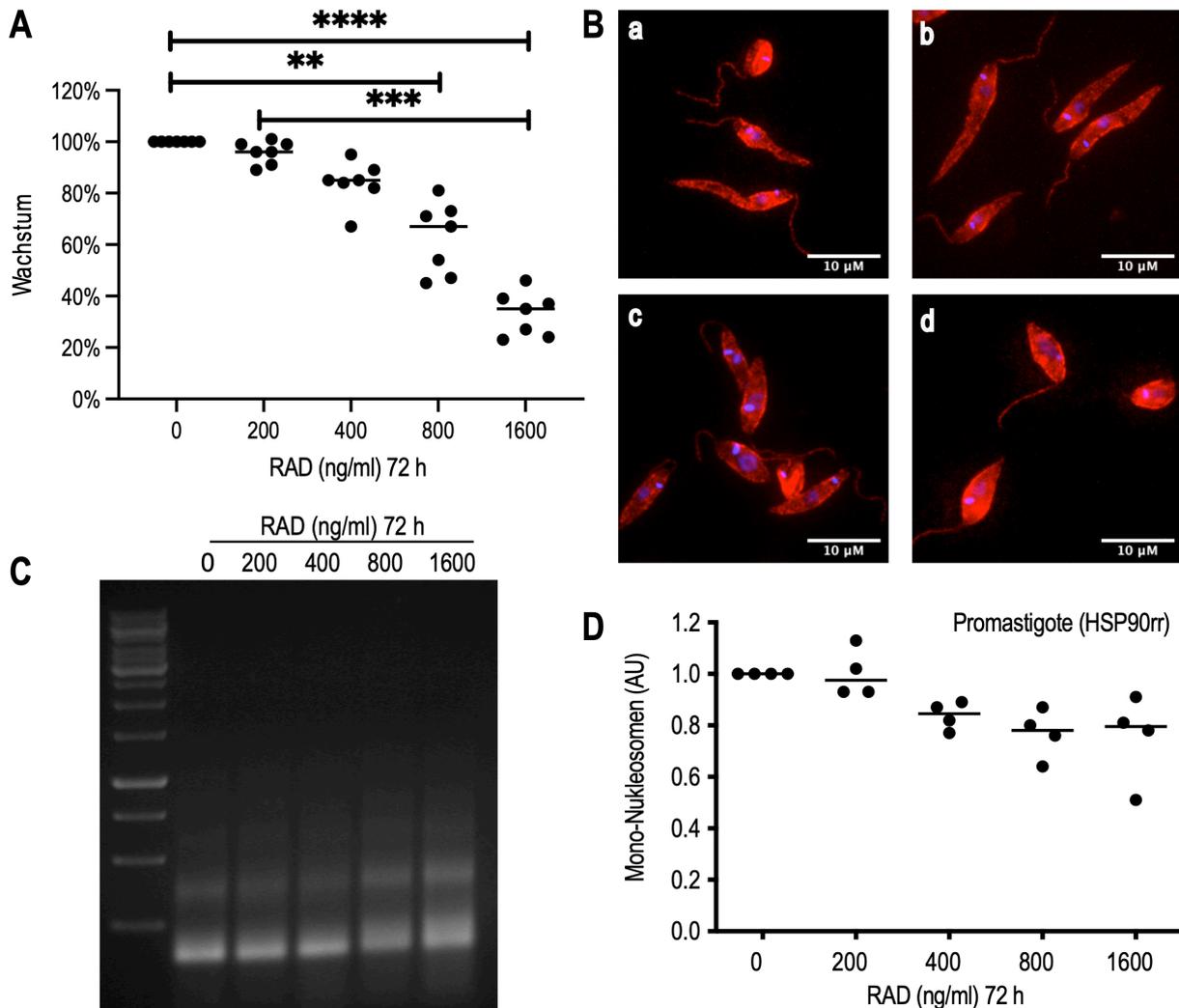
Parallel dazu wurden die Auswirkungen der RAD-Behandlung auf die Morphologie durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die unbehandelte Kultur zeigt Promastigoten mit einer länglichen Zellform und einem Flagellum. Mit steigender Konzentration von RAD ist eine zunehmend rundlichere Form und eine Rückbildung bzw. ein Verlust des Flagellums zu beobachten (Abbildung 7 B). Zudem zeigt sich bei den höheren Konzentrationen ein RAD-induzierter Zellzyklusarrest, indem die Parasiten teilweise nicht mehr in der Lage sind, eine Zellteilung abzuschließen.

Für die folgenden Analyse der Chromatindichte durch MNase Analysen wurde eine Dosis-Wirkungskurve von RAD erstellt. Dafür wurden zunächst Wildtyp Promastigoten für 72 h mit 0 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL und 1600 ng/mL RAD bei 25 °C und neutralem pH (pH 7,4) kultiviert, die Zellen permeabilisiert und das Chromatin mit 80 Units MNase für exakt 5 min verdaut. Anschließend wurde die DNA isoliert und durch Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 7 C). Das Agarosegel zeigt ein klares Auftrennen von Mono-, Di-, Tri- und Oligo-Nukleosomen, wobei mit steigender RAD-Konzentration eine schwächere Mono-Nukleosomen-Bande erkennbar ist. Die Intensität der Mono-Nukleosomen-Banden wurden mit ImageJ quantifiziert und zur unbehandelten Kultur normalisiert (Abbildung 7 D). Bereits unter Verwendung von 200 ng/mL RAD konnte eine ~20%ige Abnahme der Intensität der Mono-Nukleosomen-Bande festgestellt werden. Die Intensität der Mono-Nukleosomen-Bande wurde mit steigender Konzentration RAD immer schwächer. Unter Verwendung von 1600 ng/mL RAD konnte eine deutliche Reduktion (~60 %) der Bandenintensität beobachtet werden, was auf eine schlechtere Zugänglichkeit für die MNase schließen lässt und somit für eine dichtere Chromatinstruktur unter HSP90-Hemmung spricht. Dieses Ergebnis ließ sich auch mit *L. donovani* Promastigoten bestätigen, die zuvor durch erhöhte Temperatur und einem sauren pH zu axenischen Amastigoten differenziert und anschließend rückdifferenziert wurden. Bei einer nachfolgenden Behandlung mit RAD konnten ähnliche Veränderungen in der Chromatindichte festgestellt werden (Abbildung 7 E & F), wie bereits bei den nicht differenzierten Promastigoten beobachtet.



**Abbildung 7: Phänotypanalyse einer RAD-induzierten HSP90-Hemmung auf *L. don* Promastigoten.**  $4 \times 10^6$  Parasiten/mL wurden in 10 mL komplementiertem M199 Medium (pH 7,4) mit 0, 200, 400, 800 und 1600 ng/mL RAD bei 25 °C inkubiert. **(A)** Wachstum (%) wurde nach 72 h bestimmt; n=7. **(B)** Immunfluoreszenzfärbung von RAD-behandelten Kulturen (a = 0 ng/mL, b = 200 ng/mL, c = 800 ng/mL, d = 1600 ng/mL) nach 72 h mit Maus anti-Tubulin Antikörper (1:4000) und DAPI (1:50). Aufnahmen wurden an einem EVOS FL Cell Imaging System gemacht und diese mit ImageJ bearbeitet. **(C-F)** MNase Verdau:  $5 \times 10^7$  Parasiten wurden permeabilisiert und für 5 min mit 80 U MNase behandelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion und einer Inkubation (2 h) mit Proteinase K wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und 3  $\mu$ g auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert (Marker = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). **(C)** Promastigote, **(E)** Rückdifferenzierte Promastigote nach axenischer Amastigotendifferenzierung. Die Intensität der von Mono-Nucleosomen stammenden DNA-Bande wurde mit ImageJ quantifiziert und zur Kontrolle (0 ng/mL RAD) normalisiert. **(D)** Promastigote; n=3, **(F)** Rückdifferenzierte Promastigote nach axenischer Amastigotendifferenzierung; n=3. Signifikanzen wurden unter Anwendung des Kruskal-Wallis Tests bestimmt; \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Um jedoch zu zeigen, dass das verdichtete Chromatin spezifisch auf die Hemmung von HSP90 zurückzuführen ist, wurde der Versuch zusätzlich mit *L. donovani* Stämmen durchgeführt, die HSP90rr episomal exprimieren (Hombach et al., 2013). Bei der HSP90rr-Variante handelt es sich um einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Isoleucin an Position 33 (L33I), der dazu führt, dass die RAD-induzierte Wachstumshemmung überwunden wird.



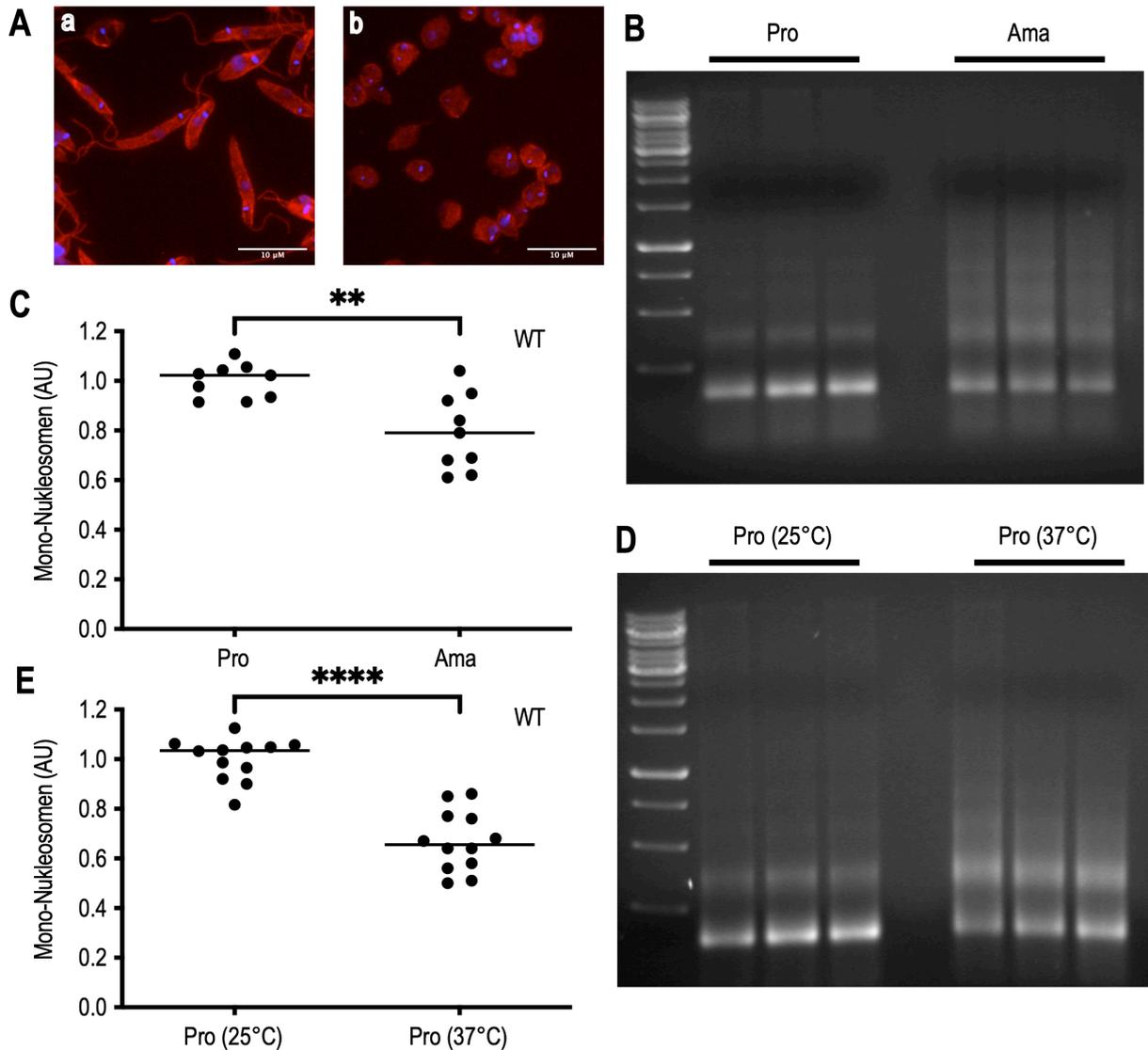
**Abbildung 8: Phänotypanalyse einer RAD-induzierten HSP90-Hemmung auf *L. donovani* Promastigoten mit episomaler Expression von HSP90rr.**  $4 \times 10^6$  Parasiten/mL (*L. donovani* 1S HSP90rr) wurden in 10 mL komplementiertem M199 Medium (pH 7,4) mit 0, 200, 400, 800 und 1600 ng/mL RAD bei 25 °C für 72 h inkubiert. **(A)** Die Zellzahlen wurde nach 72 h bestimmt und das Wachstum in % dargestellt; n=7. **(B)** Von RAD-behandelten Kulturen (a = 0 ng/mL, b = 200 ng/mL, c = 800 ng/mL, d = 1600 ng/mL) wurde nach 72 h eine Immunfluoreszenzfärbung mit Maus anti-Tubulin Antikörper (1:4000) und DAPI (1:50) durchgeführt, an einem EVOS FL Cell Imaging System Aufnahmen gemacht und diese mit ImageJ bearbeitet. **(C+D)** MNase Verdau:  $5 \times 10^7$  Parasiten wurden permeabilisiert und für 5 min mit 80 U MNase behandelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion und einer Inkubation (2 h) mit Proteinase K wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und 3 µg auf einem 1,5 %igen Agarosegel **(C)** analysiert (Marker = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). **(D)** Die Intensität der von Mono-Nukleosomen stammenden DNA-Bande wurde mit ImageJ quantifiziert und zur Kontrolle (0 ng/mL RAD) normalisiert; n=4. Signifikanzen wurden unter Anwendung des Kruskal-Wallis Tests bestimmt; \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Wachstumsversuche mit RAD zeigten, dass vor allem bei niedrigen Konzentrationen von 200 ng/mL und 400 ng/mL eine geringere Inhibition im Vergleich zu den Wildtyp Promastigoten zu beobachten ist. 200 ng/mL und 400 ng/mL RAD zeigen bei WT Promastigoten eine Inhibition von 46 % und 64 % (Abbildung 7 A), während eine episomale Expression von HSP90rr dazu führt, dass die Inhibition lediglich 4 % und 15 % beträgt (Abbildung 8 A). Hohe Konzentrationen von RAD resultieren jedoch auch bei der HSP90rr-Variante in einer geringeren Wachstumsrate. So konnte bei 1600 ng/mL RAD für die episomale Expression von HSP90rr eine Inhibition von 65 % beobachtet werden (Abbildung 8 A), verglichen mit 90 % Inhibition beim Wildtyp (Abbildung 8 A). Zusätzlich wurde die Morphologie durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Hier konnte im Vergleich zu WT Promastigoten beobachtet werden, dass eine Abrundung der Zellen sowie verkürzte Flagella bei einer episomalen Expression von HSP90rr erst bei hohen Konzentrationen auftraten, wohingegen bei WT Promastigoten bereits 200 ng/mL RAD zu einer rundlicheren Form führt (Abbildung 8 B). Zusammenfassend konnte für die Proliferation und die Morphologie festgestellt werden, dass die HSP90rr-Variante den Effekt von RAD vor allem bei geringen Konzentrationen von 200 ng/mL und 400 ng/mL RAD kompensiert und bei hohen Konzentrationen (800 ng/mL und 1600 ng/mL RAD) abschwächt bzw. verlangsamt.

Der anschließende MNase Assay zeigte, dass bei der Verwendung von 800 ng/mL und 1600 ng/mL lediglich eine um ~20 % verminderte Bandenintensität beobachtet wurde (Abbildung 8 C, D). Dahingegen wurde bei WT Promastigoten und bei Rückdifferenzierten Promastigoten bei den selben Konzentrationen eine Verminderung der Mono-Nukleosomen-Banden von 40-60 % gezeigt (Abbildung 8 D, F). Die ektopische Expression von HSP90rr führte also dazu, dass die verminderte Zugänglichkeit für die MNase abgeschwächt wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt der schlechteren Zugänglichkeit des Chromatins durch eine RAD-induzierte HSP90 Hemmung spezifisch auf die Hemmung von HSP90 zurückzuführen ist und die in den *ribosome profiling*-Analysen festgestellte, erhöhte Histonsynthese zu einer dichteren Chromatinstruktur führt.

### **3.1.2 Der Einfluss von Hitzeschock oder axenischer Amastigotendifferenzierung auf die Chromatindichte**

Die HSP90-Hemmung durch RAD führt zu einer Amastigoten-ähnlichen Morphologie, da mit steigender RAD Konzentration eine rundlichere Form und ein Rückgang des Flagellums beobachtet werden konnte. Darüber hinaus zeigten *ribosome profiling*-Analysen, dass die Proteinsynthese unter RAD-Behandlung der Proteinabundanz von Amastigoten ähnelt (Bifeld et al., 2018; Kröber-Boncardo et al., 2020; Rosenzweig et al., 2008b). Daher sollte geprüft werden, ob ein Hitzeschock bei 37 °C oder eine axenische Amastigotendifferenzierung ebenfalls zu einer dichteren Chromatinstruktur führen. Für die Analyse der Chromatindichte von axenischen Amastigoten wurden WT Promastigoten für 24 h bei 37 °C/pH 7,4 und anschließend bei 37 °C/pH 5,5 differenziert. Am Tag 4 wurden die Zellen permeabilisiert, das



**Abbildung 9: *Micrococcal nuclease* Assay von axenischen Amastigoten und bei Hitzeschock (37 °C).** (A) Immunfluoreszenzfärbung von a = Promastigoten (25 °C, pH 7,4) und b = axenischen Amastigoten (Tag 4) mit einem Maus anti-Tubulin Antikörper (1:4000) und DAPI (1:50). Die Aufnahmen wurden an einem EVOS FL Auto Cell Imaging System aufgenommen anschließend mit ImageJ bearbeitet. (B+C) MNase Verdau von axenischen Amastigoten (Ama).  $3 \times 10^7$  *L. don* Promastigoten wurden 24 h bei 37 °C in komplementiertem M199 (pH 7,4) ohne CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend bei 37 °C in komplementiertem M199 Medium (pH 5,5) mit CO<sub>2</sub> inkubiert. Für den MNase Verdau wurden an Tag 4  $5 \times 10^7$  Parasiten permeabilisiert und für 5 min mit 80 U MNase behandelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion und einer Inkubation von 2 h mit Proteinase K wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und 3 µg auf einem 1,5 %igen Agarosegel (B) analysiert (Marker = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder). (C) Die Intensität der von Mono-Nukleosomen stammenden DNA-Bande wurde mit ImageJ quantifiziert und zur Kontrolle (Pro) normalisiert; n=12. (D+E)  $4 \times 10^7$  *L. don* Promastigoten wurden für 72 h in 10 mL komplementiertem M199 (pH 7,4) bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> inkubiert (Pro (37 °C)) und wie bereits beschrieben ein MNase Verdau durchgeführt. Die isolierte DNA wurde auf einem Agarosegel (1,5 %) analysiert (D) und die Intensität der Mono-Nukleosomen-Banden mit ImageJ bestimmt und zu Promastigoten bei 25 °C und pH 7,4 (Pro (25 °C)) normalisiert; n=9 (E). Signifikanzen wurden unter Anwendung des Differenzen t-Tests (*ratio paired t-test*) bestimmt; \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Chromatin mit 80 Units MNase verdaut und die anschließend isolierte DNA auf einem Agarosegel sichtbar gemacht (Abbildung 9 B).

Die Quantifizierung der Mono-Nukleosomen-Banden zeigte für axenische Amastigoten im Vergleich zur Promastigoten Population (25 °C/pH 7,4) eine signifikant reduzierte Zugänglichkeit für die MNase um ~20 % (Abbildung 9 C). Die Differenzierung zu Amastigoten wurde wie zuvor durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem Maus anti-Tubulin-mAb und DAPI überprüft. Dabei wiesen die axenisch differenzierten Amastigoten die typische Morphologie mit rundem Zellkörper ohne Flagellum auf (Abbildung 9 A).

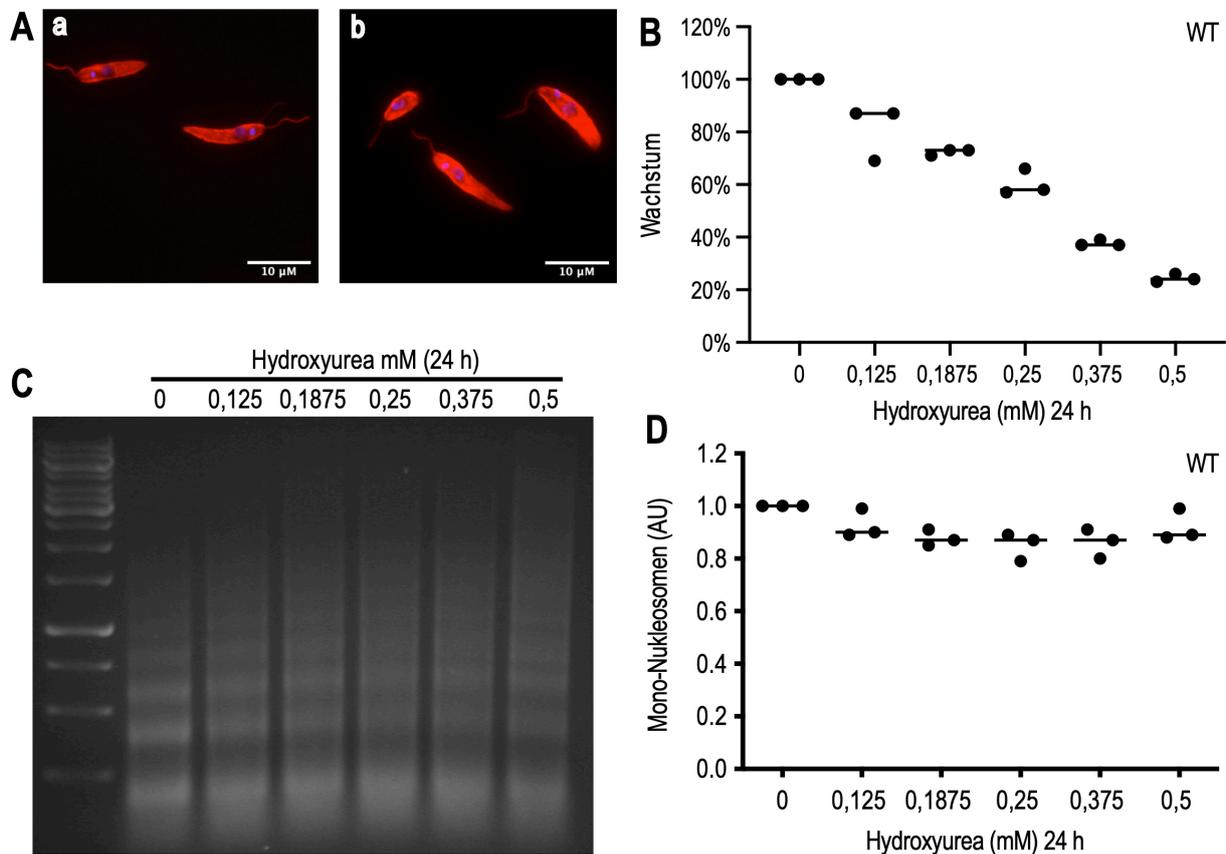
Zur Analyse der Wirkung eines 37 °C-Hitzeschocks auf die Chromatinstruktur wurden WT Promastigoten für 72 h bei 37 °C/pH 7,4 ohne CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit 80 Units MNase für 5 min behandelt. Die nachfolgende Quantifizierung der Agarose-Gel-Bandenmuster zeigte, dass ~40 % weniger Mono-Nukleosomen-Banden als bei der Vergleichskultur von 25 °C/pH 7,4 beobachtet werden konnten (Abbildung 9 D&F). Sowohl ein Hitzeschock bei 37 °C als auch die axenische Amastigotendifferenzierung führen somit zu einer dichteren Chromatinstruktur, wobei das Chromatin unter Hitzeschock eine geringere Zugänglichkeit für die MNase aufweist als bei axenischen Amastigoten.

### **3.1.3 Der Einfluss eines Hydroxyurea-induzierten Zellzyklusarrest auf die Chromatindichte**

Um auszuschließen, dass Stress generell zu einer dichteren Chromatinstruktur führt, wurde ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Zugabe von Hydroxyurea (HU) herbeigeführt und anschließend ein MNase Verdau durchgeführt. Dafür wurden, wie bei RAD, das den Zellzyklus in der G2/M-Phase arretiert, verschiedene Konzentrationen getestet. Zunächst wurde der Einfluss eines HU-induzierten G1-Zellzyklusarrests auf das Wachstum untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei einer Konzentration von 0,25 mM HU eine Inhibition des Wachstums von ~40 % auftritt, währenddessen der Einsatz von 0,5 mM HU zu einer Inhibition von 75 % führt (Abbildung 10 B). Auf die Morphologie hat der Zellzyklusarrest in der G1-Phase jedoch keine Auswirkungen. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Maus anti-Tubulin Antikörper zeigte bei 0,375 mM HU eine längliche Zellform mit Flagellum, die sich nicht von unbehandelten Promastigoten unterscheidet (Abbildung 10 A).

Die Zugänglichkeit des Chromatins für die MNase erfuhr hingegen keine signifikante Veränderung. Es konnte lediglich eine verminderte Intensität der Mono-Nukleosomen-Banden um ~10 % festgestellt werden (Abbildung 10 D). Auch konnte hier im Vergleich zu RAD keine Konzentrations-abhängige Verminderung der Mono-Nukleosomen-Banden beobachtet werden. Das Agarosegel zeigte eine gleichmäßige Verteilung von Mono-, Di-, Tri- und Oligo-Nukleosomen von 0 mM bis 0,5 mM HU (Abbildung 10 C). Dies bedeutet, dass ein Zellzyklusarrest allein nicht zu einer veränderten Chromatindichte führt. Eine dichtere Chromatinstruktur ist also nicht die Folge von Wachstumsarrest allein, sondern konnte im

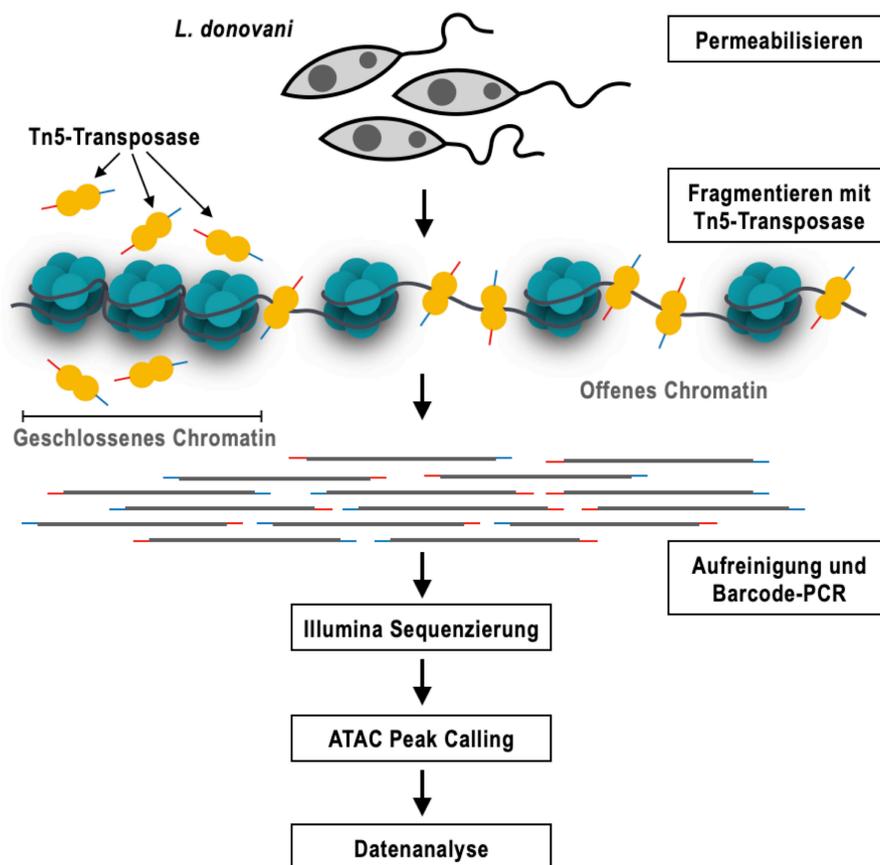
Zusammenhang mit Stadiendifferenzierung beobachtet werden. Eine chemisch induzierte Differenzierung durch die Hemmung von HSP90, eine axenische Amastigotendifferenzierung durch erhöhte Temperatur und sauren pH oder ein Hitzeschock führten alle zu einer schlechteren Zugänglichkeit für die MNase, was auf eine dichtere Chromatinstruktur schließen lässt.



**Abbildung 10: Phänotypanalyse eines Hydroxyurea (HU)-induzierten G1-Zellzyklusarrests in *L. don* Promastigoten.** (A) Von HU-behandelten Kulturen (a = 0 mM, b = 0,375 mM) wurde nach 24 h eine Immunfluoreszenzfärbung mit Maus anti-Tubulin Antikörper (1:4000) und DAPI (1:50) durchgeführt, an einem EVOS FL Auto Cell Imaging System Aufnahmen gemacht und diese mit ImageJ bearbeitet. (B)  $4 \times 10^6$  Parasiten/mL wurden in 10 mL komplementiertem M199 Medium (pH 7,4) mit 0; 0,125; 0,1875; 0,25; 0,375 und 0,5 mM HU bei 25 °C für 24 h inkubiert und das Wachstum in % dargestellt; n=3. (C+D) MNase Verdau:  $5 \times 10^7$  Parasiten wurden permeabilisiert und für 5 min mit 40 U MNase behandelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion und einer Inkubation (2 h) mit Proteinase K wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert und 3 µg auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert (Marker = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder) (C). Die Intensität der von Mono-Nukleosomen stammenden DNA-Bande wurde mit ImageJ quantifiziert und zur Kontrolle (0 mM HU) normalisiert; n=3 (D).

### 3.2 Etablierung von ATAC-seq für eine genomweite Analyse von Chromatindichte

Die *micrococcal nuclease* Assays zeigten bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung Veränderungen in der Zugänglichkeit des Chromatins. Um diese Veränderungen der Chromatindichte genomweit zu lokalisieren, etablierte ich im Folgenden ein Assay für Transposase-zugängliches Chromatin in Verbindung mit Hochdurchsatz-Sequenzierung, kurz ATAC-seq, (**A**ssay for **T**ransposase-**A**ccessible **C**hromatin using **s**equencing) (Buenrostro et al., 2015a) in *L. donovani* (Grunebast et al., 2021). ATAC-seq basiert auf der hyperaktiven Tn5-Transposase, welche die genomische DNA in offenen Chromatinbereichen schneidet und dabei gleichzeitig Adapter an die DNA fügt. Dieser Prozess wird auch als Tagmentierung bezeichnet. In einer anschließenden PCR werden die Adapter-markierten Fragmente mit entsprechenden Barcodes markiert und einer Illumina-Sequenzierung zugeführt (Abbildung 11). Die erzeugten *reads* zeigen offene Chromatinbereiche an, sodass Veränderungen in der Chromatindichte unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden können.



**Abbildung 11: Schematischer Ablauf des ATAC-seq.** Parasiten von *L. donovani* werden permeabilisiert und das offene Chromatin im Anschluss mit Tn5-Transposase fragmentiert. Dabei werden an die DNA-Fragmente gleichzeitig Adapter angefügt, wodurch in einer anschließenden Barcode-PCR die *libraries* mit entsprechenden Indexes versehen werden. Es folgt die Sequenzierung der *libraries* mit Illumina Sequenzierung. Für die Auswertung der Daten müssen zunächst die Peaks bestimmt werden, die dann für die Analyse genutzt werden.

### 3.2.1 ATAC-seq *library preparation* und Sequenzierung

Für die Sequenzierung des ATAC-seq wurde zunächst eine *library* (Genbibliothek) erstellt. Dafür wurde das Chromatin von Promastigoten (25 °C, pH 7,4), axenischen Amastigoten (37 °C, pH 5,5) und RAD-behandelten Promastigoten (1200 ng/mL RAD, 25 °C, pH 7,4) mit Tn5-Transposase fragmentiert. Anschließend wurde die DNA-Fragmente aus jeder Probe in einer Barcode-PCR mit einem spezifischen Index-Sequenzen versehen. Zusätzlich wurde eine gDNA-Kontrolle mitgeführt, bei der "nackte" genomische DNA mit Tn5-Transposase verdaut wurde. Sequenziert wurde im *paired-end*-Verfahren mit einem NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Zyklen).

Insgesamt konnten  $4,9 \times 10^8$  *reads* generiert werden, wobei die Verteilung der *reads* pro Probe gleichmäßig bei ~10 bis ~15 % lag (Tabelle 29). Lediglich die 1. biologische Wiederholung der axenischen Amastigoten hat mit 20,61 % einen höheren Anteil an den gesamten *reads*. Anschließend wurden die *reads* mit Trimmomatic (Bolger et al., 2014) getrimmt, wobei die Adapter-Sequenzen am 3'-Ende entfernt wurden. Danach wurden die getrimmten *reads* in einem Alignment mit *bowtie2* (Langmead et al., 2009) dem Referenzgenom *L. donovani* BPK282A1 zugeordnet. Bei der gDNA Kontrolle konnten 95 % der *reads* zugeordnet werden, während die Zuordnung der Promastigoten und der RAD-behandelten Promastigoten bei ~80 % lag. Bei den axenischen Amastigoten ergab das Alignment eine Zuordnung der *reads* von etwa 45 % (Tabelle 29).

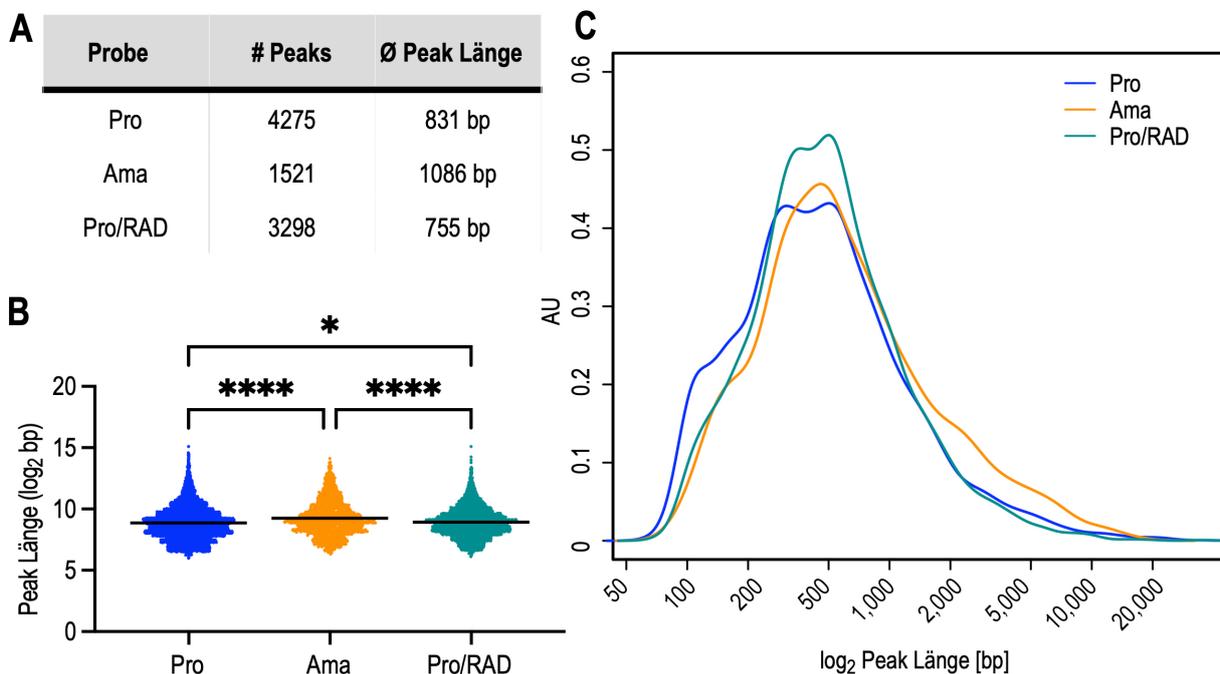
**Tabelle 29: Output des ATAC-seq.** Pro Probe wurden zwei biologische Replikate sequenziert; Pro = Promastigote (25 °C, pH 7,4), Ama = axenische Amastigote (37 °C, pH 5,5), Pro/RAD = RAD-behandelten Promastigote (1200 ng/mL RAD, 25 °C, pH 7,4). Angegeben ist die gesamte Anzahl der gesamten *reads*, der prozentuale Anteil der *reads* der einzelnen Replikate an den gesamten *reads*, die getrimmten *reads* und der prozentuale Anteil der getrimmten *reads*, die dem Referenzgenom (*L. donovani* BPK282A1 (Version 46)) zugeordnet werden konnten.

| Probe          | Gesamte <i>reads</i> | Anteil an den gesamten <i>reads</i> | Getrimmte <i>reads</i> | Alignment zum Referenzgenom |
|----------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Pro            | 46861085             | 9,54 %                              | 41341135               | 83,18 %                     |
|                | 50964607             | 10,38 %                             | 45292610               | 83,97 %                     |
| Ama            | 101234567            | 20,61 %                             | 91143536               | 43,42 %                     |
|                | 56613102             | 11,52 %                             | 50688537               | 45,67 %                     |
| Pro/RAD        | 52507739             | 10,69 %                             | 46491400               | 77,20 %                     |
|                | 70559742             | 14,37 %                             | 62331332               | 80,26 %                     |
| gDNA Kontrolle | 53306328             | 10,85 %                             | 46518293               | 95,04 %                     |
|                | 59116619             | 12,04 %                             | 51116634               | 94,81 %                     |

### 3.2.2 Bestimmung von Peaks und Peak Längen

Für die weitere Auswertung des ATAC-seq mussten die Peaks in einem sog. *peak calling* bestimmt werden. Die Peaks entsprechen den Bereichen, die für die Tn5-Transposase zugänglich sind und sind demnach mit offenen Chromatinbereichen assoziiert. Dafür wurden in einem ersten Schritt mit SAMtools (Li, 2011) PCR-Duplikate entfernt, damit Artefakte aus der *library preparation* nicht in die Analyse der Daten mit einfließen. Danach wurde, ebenfalls mit SAMtools, ein „*pileup*“, eine Anhäufung, erstellt, indem die DNA-Fragmente an jeder Position des Genoms gezählt wurden. Die Peaks wurden unter Verwendung von Genrich (<https://github.com/jsh58/Genrich>) generiert. Dabei werden die *pileups* der jeweiligen Probe mit einem Hintergrund, in diesem Fall der gDNA Kontrolle verglichen. Die Fläche unter der Kurve entspricht einem Peak. Für Promastigoten wurden 4275 Peaks, für axenische Amastigoten 1521 Peaks und für RAD-behandelte Promastigoten 3298 Peaks bestimmt (Abbildung 12 A).

Aus den Koordinaten der Peaks wurden anschließend die Peak Längen bestimmt. Die RAD-behandelten Promastigoten wiesen mit einer durchschnittlichen Peak Länge von 755 bp die niedrigste Peak Länge auf, worauf die Promastigoten mit 831 bp folgten. Die axenischen Amastigoten zeigten mit einer durchschnittlichen Peak Länge von 1086 bp die signifikant höchste Peak Länge (Abbildung 12 A, B). Abbildung 12 C zeigt zudem, dass die axenischen



**Abbildung 12: Anzahl und Länge von Peaks.** Die Peaks wurden mit der Genrich Pipeline generiert. **(A)** Tabelle mit der Anzahl der Peaks und der durchschnittlichen Länge in Promastigoten (Pro), axenischen Amastigoten (Ama) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD) **(B)** log<sub>2</sub> der Peak Längen (bp). Jeder Punkt entspricht einem Peak. Signifikanzen wurden unter Anwendung des Kruskal-Wallis Tests bestimmt; \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \* =  $p \leq 0.05$ . **(C)** Frequenzverteilung von Peak Längen. Die Peak Längen wurden gegen ihre relative Häufigkeit aufgetragen (AU = *arbitrary unit* (willkürliche Einheit)).

Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten und RAD-behandelten Promastigoten mehr Peaks in der Größenordnung 2000 bp - 20000 bp aufweisen. Die Promastigoten wiesen dafür mehr Peaks im Bereich von 75 bp - 150 bp auf (Abbildung 12 C). Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass die axenischen Amastigoten im Vergleich zwar die wenigstens, dafür aber die längsten Peaks aufzeigten. Für Promastigoten und RAD-behandelte Promastigoten wurden mehr aber kürzere Peaks festgestellt.

### 3.2.3 Alignment der Peaks

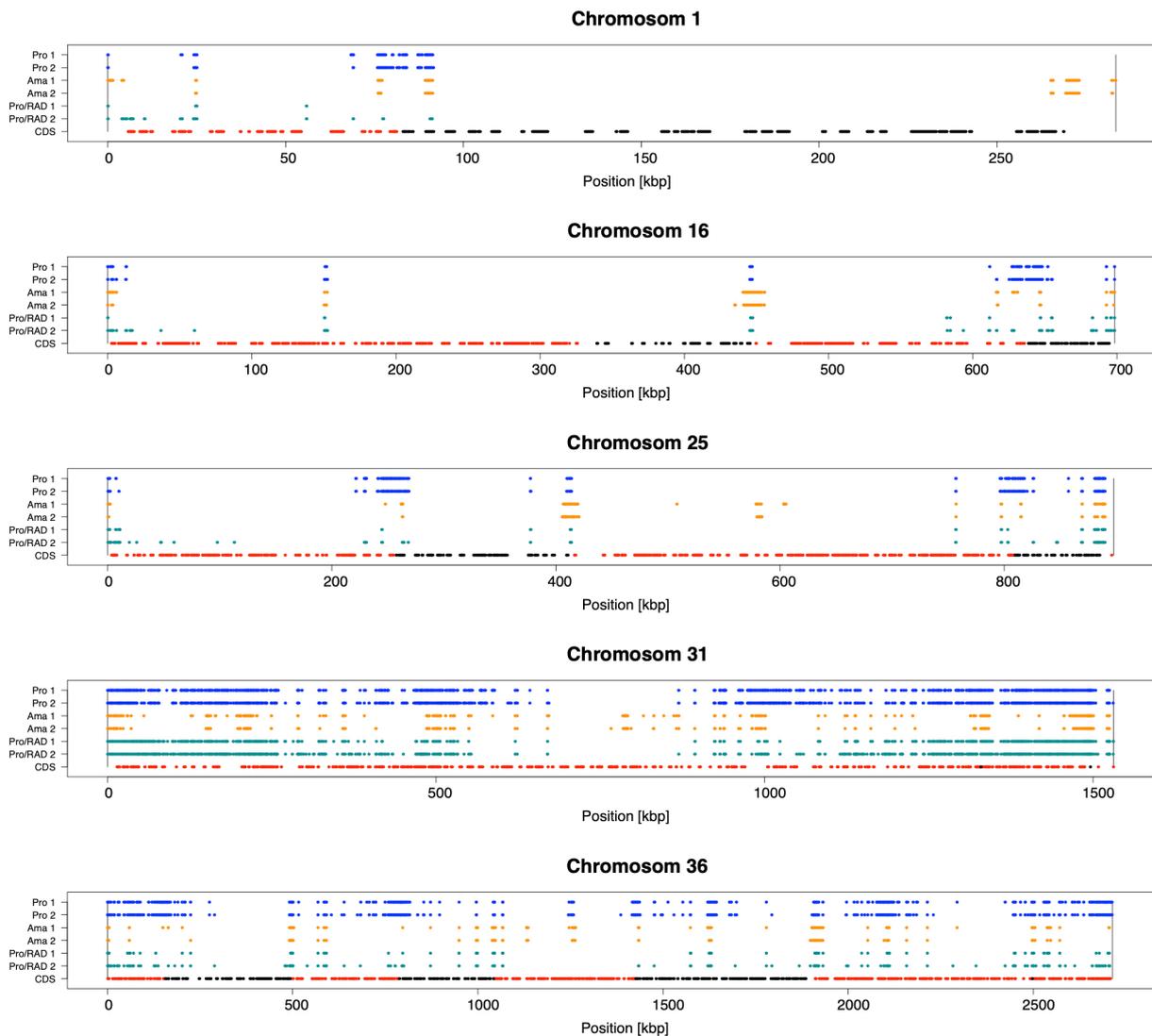
Zur Analyse der Chromatindichte von spezifischen Genom-Bereichen wurden die mit der Genrich Pipeline generierten Peaks dem Genom von *L. donovani* zugeordnet. Die Alignments zeigen die für die Tn5-Transposase zugänglichen, offenen Bereiche des Chromatin. Eine Übersicht aller Chromosomen findet sich im Anhang (Abbildungen 26-30). In Abbildung 13 sind exemplarisch die Alignments der Chromosomen 1, 16, 25, 31 und 36 dargestellt, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Die Alignments zeigen eine unterschiedliche Abdeckung der einzelnen Chromosomen mit Peaks. Auf manchen Chromosomen wie z.B. Chromosom 1 und 16 sind wenige Peaks vorhanden, während andere Chromosomen wie z.B. Chromosom 31 fast durchgängig mit Peaks belegt sind. Darüber hinaus ist zu beobachten, dass bei Promastigoten mehr Bereiche mit Peaks abgedeckt werden, als bei RAD-behandelten Promastigoten und axenischen Amastigoten. Viele Bereiche des Genoms sind unter allen drei Bedingungen ähnlich mit Peaks belegt. Es gibt allerdings auch Bereiche, die in axenischen Amastigoten offener sind (Chromosom 1 (~270 kbp), Chromosom 25 (~590 kbp), Chromosom 31 (~800 kbp).

Auf Chromosom 1 liegen zwei polycistronische Transkriptionseinheiten, die in der divergenten *strand switch region* bei ~80 kbp beginnen. Betrachtet man diesen Bereich genauer, fällt auf, dass der Bereich in Promastigoten mit Peaks belegt ist, in axenischen Amastigoten und in RAD-behandelten Promastigoten jedoch nicht. Dies spricht für eine offene dSSR in Promastigoten und eine geschlossene in axenischen Amastigoten und unter RAD Behandlung. In Promastigoten offene dSSRs, die in axenischen Amastigoten und in RAD-behandelten Promastigoten geschlossen sind, lassen sich auch auf Chromosom 16 (~640 kbp), Chromosom 25 (~250 kbp, ~810 kbp) und Chromosom 36 (~125 kbp, ~750 kbp, ~1400 kbp) beobachten. Es treten jedoch auch einige dSSRs auf, die unter allen drei Bedingungen offen sind auf (Chromosom 31 (~1300 kbp, ~1500 kbp) und Chromosom 36 (~2500 kbp)). Vereinzelt sind darüber hinaus dSSRs zu beobachten, die sowohl in Promastigoten als auch bei chemisch- oder Temperatur/pH-induzierter Differenzierung nicht mit Peaks belegt sind (Chromosom 16 (~325 kbp)).

Auffällig ist, dass die Bereiche, in denen die Transkription zwischen zwei PTUs terminiert (konvergente *strand switch regions*), überwiegend in mit Peaks abgedeckten Regionen, also offenen Bereichen liegen (Chromosom 16 (~450 kbp), Chromosom 25 (~410 kbp, ~900 kbp),

Chromosom 31 (~1300 kbp, ~1500 kbp) und Chromosom 36 (~500 kbp, ~1100 kbp, ~1900 kbp, 2500 kbp). Die PTUs, in denen die durch RNA Pol II transkribierten Gene organisiert sind, sind unterschiedlich stark mit Peaks belegt. Vor allem Regionen, in denen die Transkription initiiert oder terminiert scheinen von spezifischen Veränderung in der Belegung von Peaks betroffen zu sein. So sind einige dSSRs bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung schlechter zugänglich für die Tn5-Transposase, was für ein geschlosseneres Chromatin spricht. Diese Veränderungen müssen jedoch genauer für die verschiedenen Bereiche des Genoms quantifiziert werden.



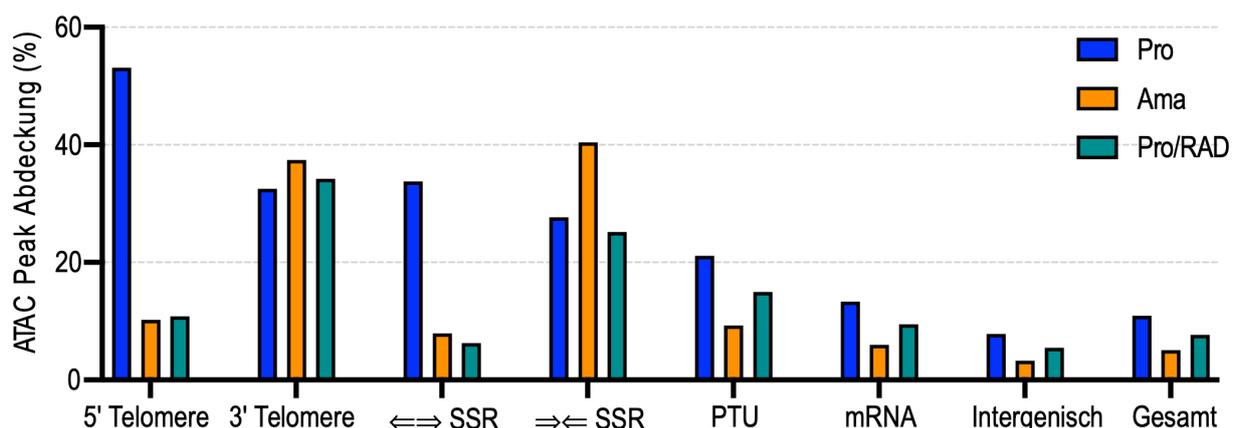
**Abbildung 13: Alignment der ATAC Peaks der Chromosomen 1, 16, 25, 31 und 36 von *L. donovani*.** Die mit der Genrich Pipeline generierten Peaks wurden über die Chromosomen von je zwei biologischen Replikaten für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet. Die kodierenden Sequenzen (CDS = *coding sequences*) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3', rote Punkte = 3' → 5'). Die Größe der Chromosomen ist in Kilobasenpaare (kbp) angegeben.

### 3.2.4 Verteilung von offenen Chromatinbereichen im Genom von *L. donovani*

Über die Chromosomen von *L. donovani* hinweg konnten Unterschiede zwischen Promastigoten und chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung gezeigt werden. Für die genauere Analyse dieser Veränderungen des Chromatins wurde die Abdeckung der Peaks in einzelnen, vorher definierten Bereichen quantifiziert und entsprechend der Größe der Bereiche normalisiert (Abbildung 14). Dabei wurde folgende Bereiche unterschieden: Telomerregionen, wobei 5' Telomere die Enden bezeichnet, in denen die Transkription initiiert und in 3' Telomeren die Transkription terminiert. Polycistronische Transkriptionseinheiten, die zusätzlich in für mRNA-kodierende Bereiche (mRNA) und nicht kodierende, intergenische Bereiche (Intergenisch) unterteilt wurden und SSRs, die Regionen zwischen den PTUs, in denen Transkription initiiert ( $\Leftarrow\Rightarrow$  SSR) und terminiert ( $\Rightarrow\Leftarrow$  SSR).

Über das gesamte Genom sind 11 % in Promastigoten, 7,6 % in RAD-behandelten Promastigoten und 5,1 % in axenischen Amastigoten mit Peaks abgedeckt (Abbildung 14). Diese Abstufung lies sich auch für die PTUs beobachten, wobei hier die Promastigoten eine Abdeckung von 21 % aufwiesen. Die für mRNA-kodierenden Bereiche innerhalb der PTUs zeigten eine doppelt so hohe Abdeckung wie die nicht kodierenden, intergenischen Bereiche.

Die Abdeckung in Regionen in denen Transkription initiiert, sowohl an den 5' Telomeren als auch in den divergenten SSRs ( $\Leftarrow\Rightarrow$  SSR), ist in Promastigoten um ein 4- bis 5-faches höher, als in axenischen Amastigoten und unter RAD Behandlung (Abbildung 14). Dies lies



**Abbildung 14: Verteilung offener Chromatinbereiche über das Genom von *L. donovani*.** Die Abdeckung mit Peaks (%) von 5' und 3' Telomeren; divergenten ( $\Leftarrow\Rightarrow$  SSR) und konvergenten ( $\Rightarrow\Leftarrow$  SSR) *strand switch regions*; polycistronischen Transkriptionseinheiten (PTU); kodierenden Sequenzen (mRNA); nicht kodierenden, intergenischen Bereichen und der gesamten Chromosomen jeweils normalisiert zu den einzelnen Bereichen. Daten aus zwei biologischen Replikaten wurden zusammengefasst für Promastigote (Pro, blau), axenische Amastigote (Ama, orange) und RAD-behandelter Promastigote (Pro/RAD, grün).

sich nicht für Regionen beobachten, in denen die Transkription terminiert, also in den 3' Telomeren und konvergenten SSRs ( $\Rightarrow\Leftarrow$  SSR). Dabei zeigten die 3' Telomeren für alle Proben eine ähnliche Abdeckung von ~35 %. In den konvergenten SSRs konnte für axenische Amastigoten im Vergleich zu Promastigoten eine ~13%-ig höhere Abdeckung und im Vergleich zu RAD-behandelten Promastigoten eine ~15 % höhere Abdeckung von beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Chromatin, wie bereits in dem Alignment der Peaks beobachtet wurde (Abbildung 13), in Promastigoten zugänglicher für die Tn5-Transposase, also offener ist, als in axenisch differenzierten Amastigoten und unter RAD Behandlung. Darüber hinaus konnte innerhalb der PTUs keine spezifische Zugänglichkeit der kodierenden Regionen für Tn5-Transposase gezeigt werden, da auch nicht kodierende, intergenische Bereiche mit Peaks abgedeckt sind. Generell ist die Abdeckung der PTUs mit Peaks im Vergleich zu Telomerregionen und SSRs jedoch relativ gering. Unterschiede ließen sich vor allem in Regionen der Transkriptionsinitiation feststellen. Hier zeigten die Promastigoten ein deutlich offeneres Chromatin als die chemisch- und Temperatur/pH-induzierte Differenzierung.

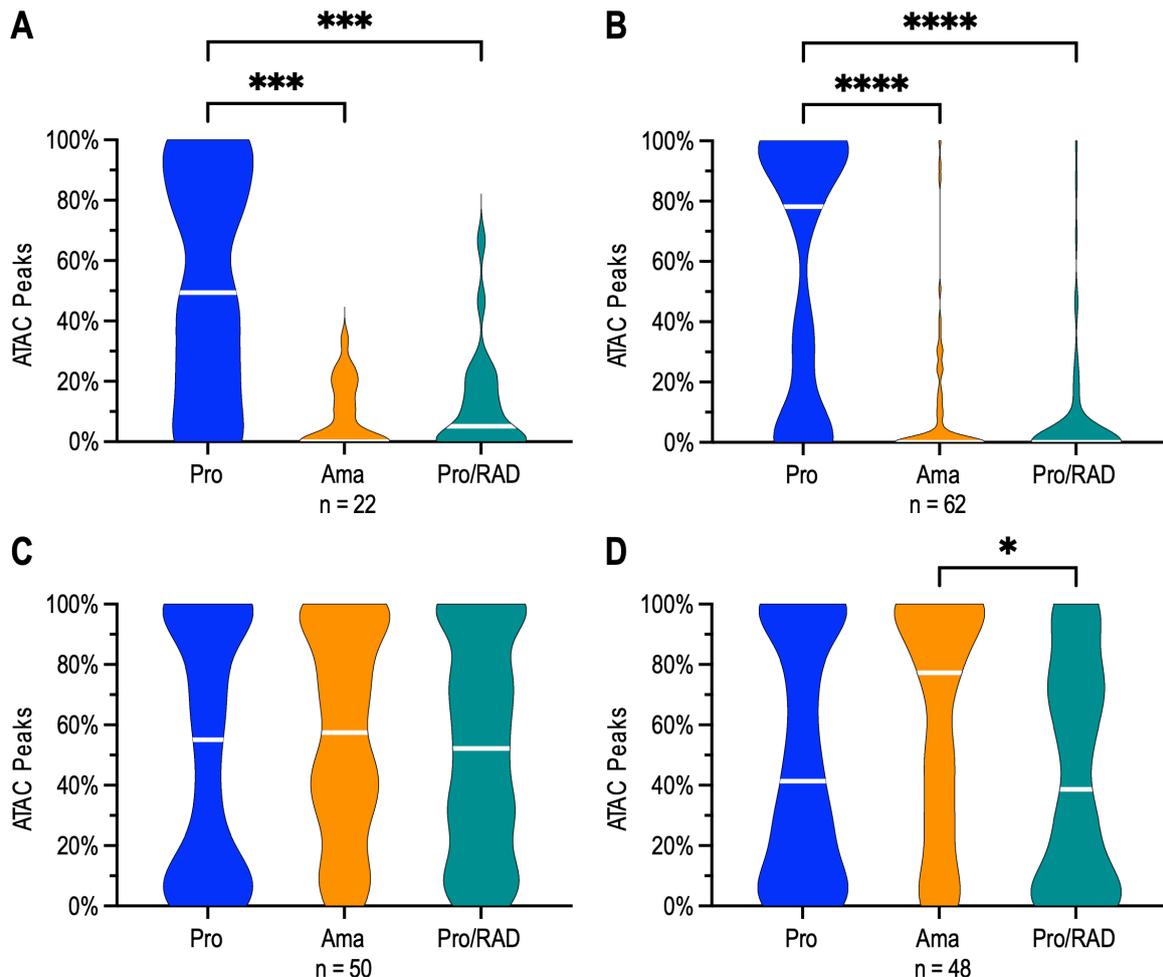
### **3.2.5 Offenes Chromatin in Regionen der Transkriptionsinitiation**

Die Analyse zur Verteilung der ATAC Peaks zeigte in Bereichen der Transkriptionsinitiation ein geschlossenes Chromatin für axenische Amastigoten und RAD-behandelte Promastigoten. Da die Verteilung nur allgemein über alle SSRs und Telomerregionen quantifiziert wurde, sollten die Regionen detaillierter analysiert werden. Dafür wurden für jede dSSRs, cSSRs, 5' und 3' Telomerregion die Peaks gezählt und die Abdeckung durch Peaks (%) berechnet.

Die 22 identifizierten Telomerregionen, die stromaufwärts von PTUs liegen (5' Telomere) zeigten in Promastigoten eine Abdeckung im Median von ~50 %. Die Abdeckung von RAD-behandelten Promastigoten lag hingegen bei ~5 % und die der axenischen Amastigoten bei nahezu 0 % (Abbildung 15 A). Betrachtet man die 62 dSSRs, in denen die Transkription bidirektional initiiert, so wird der Unterschied noch deutlicher. Hier zeigten die Promastigoten eine Abdeckung von ~80 %, während sowohl in axenischen Amastigoten als auch unter RAD Behandlung der Median gegen ~0 % geht (Abbildung 15 B).

Die Abdeckung in den 50 3' Telomerregionen, die stromabwärts von PTUs identifiziert wurden, war in allen drei Proben vergleichbar mit einem Median von ~50-55 % (Abbildung 15 C). In den 48 identifizierten konvergenten SRRs (cSSR) war die Abdeckung jedoch für axenische Amastigoten mit ~80 % signifikant höher als die von RAD-behandelten Promastigoten (~40 %, Abbildung 15 D). Die Promastigote wiesen ebenfalls eine mediane Abdeckung von ~40 % auf.

In Regionen der Transkriptionsinitiation (dSSRs und 5' Telomere) konnte demnach für Promastigoten ein offenes Chromatin beobachtet werden, während für chemisch- und Temperatur/pH-induzierte Stadiendifferenzierung wenige Peaks identifiziert werden konnten, was für eine eher geschlossene Chromatinstruktur spricht. Telomere, in denen die Transkription terminiert, zeigen gleiche Zugänglichkeit für Tn5-Transposase. Auffällig ist, dass die konvergenten SSRs in Amastigoten signifikant offener sind als in Promastigoten und unter RAD Behandlung.



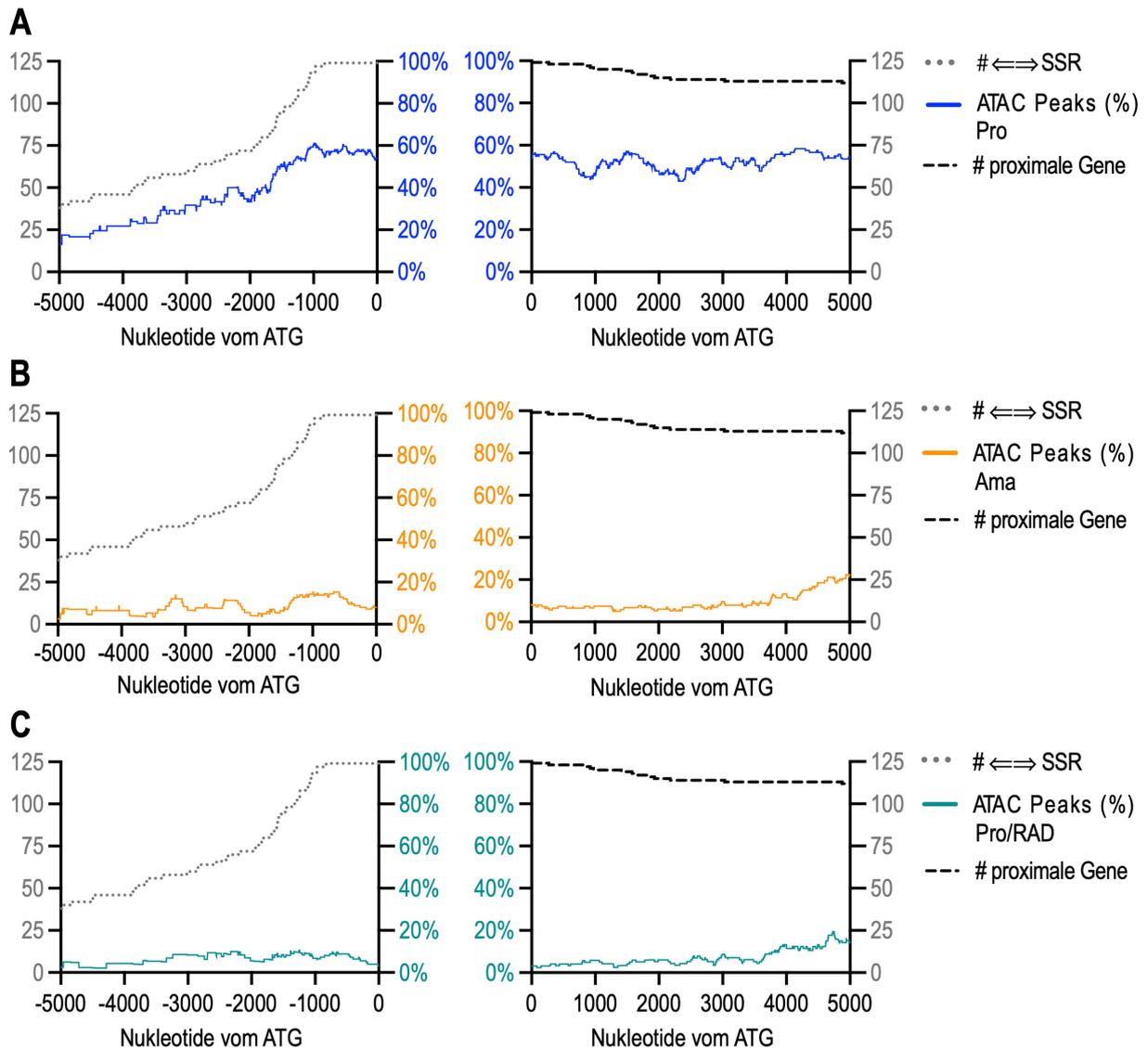
**Abbildung 15: Chromatinstruktur in Bereichen der Transkriptionsinitiations und -termination.** Die Abdeckung von ATAC Peaks (%) dargestellt in Geigenplots für Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Die Daten aus je zwei biologischen Replikaten wurden zusammengefasst. **(A)** 5' Telomere, n=22 **(B)** divergente ( $\Leftarrow\Rightarrow$ ) SSRs, n=62 **(C)** 3' Telomere, n=50 **(D)** konvergente ( $\Rightarrow\Leftarrow$ ) SSRs, n=48. Signifikanzen wurden unter Anwendung des Kruskal-Wallis Tests bestimmt; \*\*\*\* =  $p \leq 0.0001$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ , \* =  $p \leq 0.05$ . Als weißer Strich abgebildet ist der Median.

### **3.2.6 Wechsel zu offenen Chromatinbereichen unmittelbar stromaufwärts von polycistronischen Transkriptionseinheiten in Promastigoten**

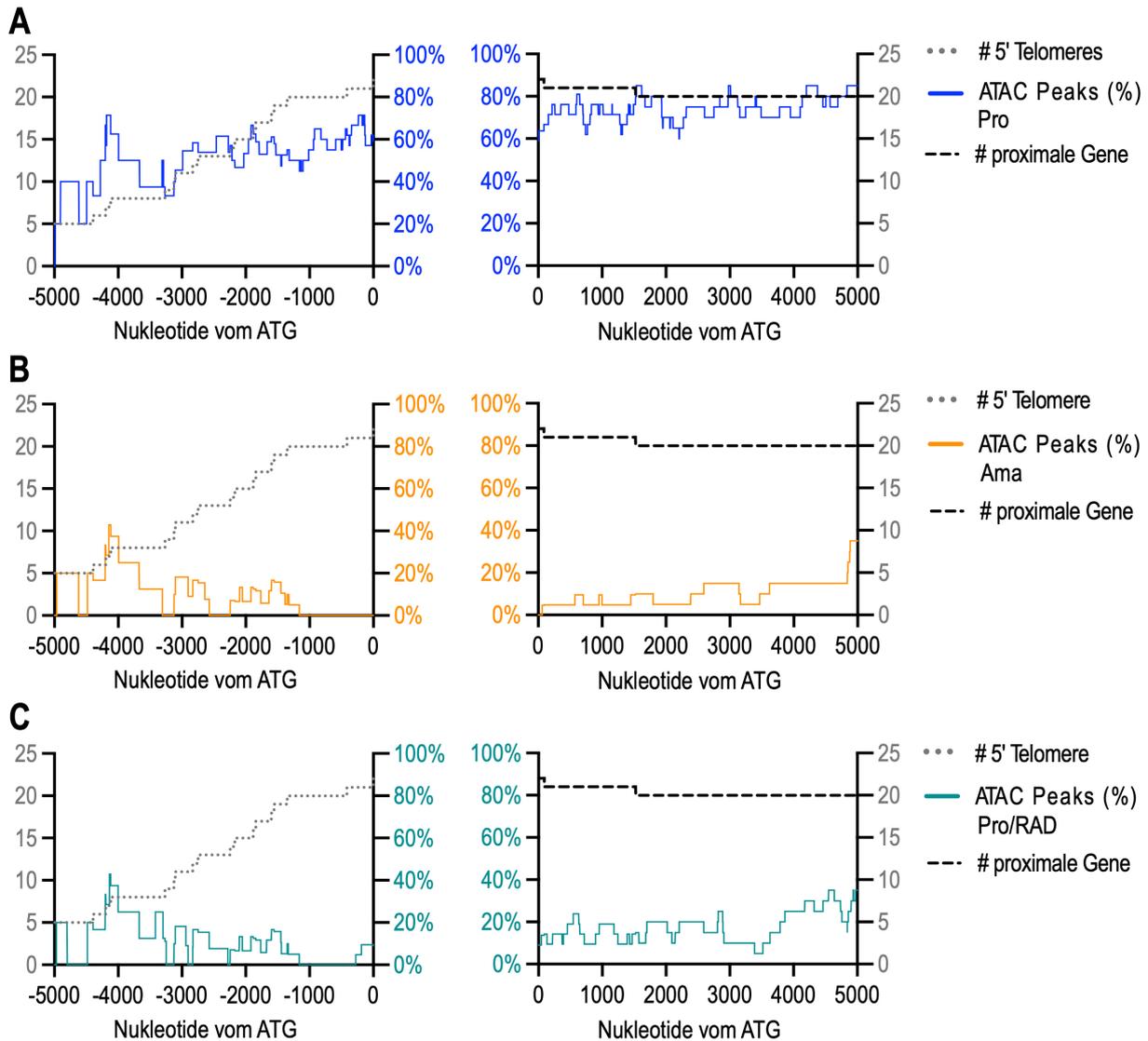
In den vorherigen Analysen wurde für Promastigoten ein offenes Chromatin in den divergenten SSRs beobachtet (Abbildung 15). Jedoch variieren dSSRs zwischen den PTUs in ihrer Länge von ~800 bp bis ~18000 bp, wobei die mediane Länge bei ~2800 bp liegt. Um offene Bereiche innerhalb der SSRs festzustellen, wurde eine auf das Nukleotid genaue Auflösung der ATAC Peaks abgebildet. Dafür wurden die Positionen von -5000 bis +5000 bp vom Startcodon der ersten kodierenden Sequenz der stromabwärts liegenden PTU dargestellt (Abbildung 16). Die Anzahl der Peaks wurde an jeder Nukleotidposition anhand der Anzahl der vorhandenen SSRs an dieser Position normalisiert, da einige SSRs kürzer als die abgebildeten 5000 Nukleotide sind.

Für Promastigoten konnte gezeigt werden, dass etwa 2000 bp vor dem Start-Codon des ersten Gens einer PTU die Abdeckung mit Peaks auf ~55 % ansteigt, also die offenen Chromatinbereiche zunehmen (Abbildung 16 A). In axenischen Amastigoten und in RAD-behandelten Promastigoten ist die Abdeckung innerhalb der dSSRs auf einem konstanten Level zwischen 5 % und 15 % (Abbildung 16 B, C) und damit um ein ~5-faches geringer als in Promastigoten. Die Abdeckung der ersten, proximalen Gene ist für Promastigoten auf einem gleichbleibenden Level von ~50 % (Abbildung 16 A). Auch hier ist die Abdeckung für die chemisch- und Temperatur/pH-induzierte Differenzierung um ein ~5-faches geringer mit einem leichten Anstieg ab etwa +4000 bp (Abbildung 16 B, C). Die Nukleotid-genaue Auflösung bestätigt das in Abschnitt 3.2.4 beobachtete geschlossene Chromatin für axenische Amastigoten und RAD-behandelte Promastigoten. Darüber hinaus konnte für Promastigoten gezeigt werden, dass das Chromatin innerhalb der dSSRs unmittelbar vor Beginn der PTU offener wird.

Die Analyse wurde ebenfalls für Telomerregionen, die stromaufwärts von PTUs liegen, durchgeführt, wobei auch hier für Promastigoten ein offenes und für axenische Amastigoten und RAD-behandelte Promastigoten ein geschlossenes Chromatin festgestellt wurde (Abbildung 15). Jedoch zeigte sich für Promastigoten im Vergleich zu den dSSRs für die 22 5'-Telomerregionen keine spezifische Öffnung des Chromatins unmittelbar vor Beginn der PTU (Abbildung 17 A). Vielmehr ist eine unterschiedliche Verteilung der ATAC Peaks in den Telomerregionen zu beobachten (~20-70 %). In den kodierenden Bereiche liegen die Peaks gleichmäßig bei ~60-80 % (Abbildung 17 A). Axenische Amastigoten und RAD-behandelte Promastigoten ähnelten sich in der Abdecken mit Peaks, die unmittelbar vor Beginn der kodierenden Region gegen 0 % geht. Die Abdeckung in den kodierenden Bereichen ist wie bereits in den dSSRs um ein 4- bis 5-faches geringer als in Promastigoten (Abbildung 17 B, C).



**Abbildung 16: ATAC Peaks in Nukleotid-genaue Auflösung innerhalb von dSSRs und der proximalen, kodierenden Regionen.** Die Abdeckung mit ATAC Peaks (%) wurde anhand der Anzahl der dSSRs und proximalen Gene normalisiert und Nukleotid-genau für einen Bereich von -5000 bp bis 0 (dSSR) und 0 bp bis +5000 bp (kodierende Region) dargestellt. Dabei wurde der Abstand vom Startcodon des ersten Gens gemessen. **(A)** Promastigote (Pro, blau), n=2 **(B)** axenische Amastigote (Ama, orange), n=2 **(C)** RAD-behandelte Promastigote (Pro/RAD, grün), n=2.



**Abbildung 17: ATAC Peaks in Nukleotid-genaue Auflösung im Bereich der 5' Telomere und der proximalen, kodierenden Regionen.** Die Abdeckung mit ATAC Peaks (%) wurde anhand der Anzahl der 5' Telomere und proximalen Gene normalisiert und Nukleotid-genaue für einen Bereich von -5000 bp bis 0 (5' Telomere) und 0 bp bis +5000 bp (kodierende Region) dargestellt. Dabei wurde der Abstand vom Startcodon des ersten Gens gemessen. **(A)** Promastigote (Pro, blau), n=2 **(B)** axenische Amastigote (Ama, orange), n=2 **(C)** RAD-behandelte Promastigote (Pro/RAD, grün), n=2.

### 3.2.7 tRNAs und rRNAs liegen in offenen Chromatinbereichen

Die PTUs werden von RNA Pol II transkribiert. Die tRNA-kodierenden Gene hingegen liegen innerhalb der *strand switch regions* oder in den Telomerregion und werden von RNA Pol III transkribiert. Die Gene für rRNAs sind ebenfalls in den SSRs und in den Telomeren lokalisiert, werden jedoch von RNA Pol I transkribiert. Wir haben daher die Abdeckung der durch RNA Pol III transkribierten tRNA-Gene und der RNA Pol I-transkribierten rRNA-Gene untersucht. Für alle tRNA-kodierenden Gene konnte eine 100%ige Abdeckung mit ATAC Peaks sowohl für Promastigoten als auch für chemisch- und Temperatur/pH-induzierte

Stadiendifferenzierung beobachtet werden (Tabelle 31). Die rRNA-kodierenden Gene zeigten für Promastigoten und axenische Amastigoten ebenfalls eine 100%ige Abdeckung mit Peaks. Für RAD-behandelte Promastigoten betrug die Abdeckung für LdBPK\_11rRNA1 77 %, für alle anderen auch 100 % (Tabelle 30). Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass im Unterschied zu den RNA Pol II transkribierten Genen, die tRNA- und rRNA-kodierenden Gene in den verschiedenen Stadien (Pro, Ama, Pro/RAD) als offenes Chromatin vorliegen.

Des Weiteren wurden RNA-seq Daten von Promastigoten (Bifield et al., 2018) mit den ATAC-seq Daten der Promastigoten korreliert, um zu überprüfen, ob hoch exprimierte Gene in offenen Chromatinbereichen liegen. Hierbei ergab sich keine Korrelation zwischen offenen Chromatinbereichen und der RNA-Abundanz für einzelne Gene (nicht dargestellt).

**Tabelle 30: ATAC Peak Abdeckung von rRNA-Genen**

| Gen-ID        | Länge (bp) | ATAC Peaks (%)<br>Pro | ATAC Peaks (%)<br>Ama | ATAC Peaks (%)<br>Pro/RAD |
|---------------|------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| LdBPK_05rRNA2 | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09rRNA1 | 116        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09rRNA2 | 68         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09rRNA3 | 303        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_11rRNA1 | 99         | 100                   | 100                   | 77                        |
| LdBPK_21rRNA1 | 231        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23rRNA1 | 120        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_27rRNA3 | 213        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_27rRNA4 | 1782       | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_27rRNA5 | 262        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_27rRNA6 | 1549       | 100                   | 100                   | 100                       |

**Tabelle 31: ATAC Peak Abdeckung von tRNA-Genen**

| Gen-ID         | Länge (bp) | ATAC Peaks (%)<br>Pro | ATAC Peaks (%)<br>Ama | ATAC Peaks (%)<br>Pro/RAD |
|----------------|------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| LdBPK_03tRNA1  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_05tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_07tRNA1  | 62         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA2  | 83         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA3  | 76         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA4  | 71         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA5  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA6  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA7  | 76         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA8  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_09tRNA9  | 71         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_10tRNA1  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_10tRNA2  | 71         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_10tRNA3  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_11tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_11tRNA2  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_11tRNA3  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_161tRNA1 | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_17tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_17tRNA2  | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_17tRNA3  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_21tRNA1  | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_21tRNA2  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_21tRNA3  | 74         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_21tRNA4  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA1  | 74         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA10 | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA2  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA3  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA4  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA5  | 83         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA6  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA7  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_23tRNA8  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |

| Gen-ID         | Länge (bp) | ATAC Peaks (%)<br>Pro | ATAC Peaks (%)<br>Ama | ATAC Peaks (%)<br>Pro/RAD |
|----------------|------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| LdBPK_23tRNA9  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_24tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_24tRNA2  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_24tRNA3  | 82         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_24tRNA4  | 136        | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_24tRNA5  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_29tRNA1  | 82         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_29tRNA2  | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_30tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_31_tRNA1 | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_31_tRNA2 | 71         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_31_tRNA3 | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_31_tRNA4 | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_31_tRNA5 | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_33tRNA1  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_33tRNA2  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_33tRNA3  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA1  | 74         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA2  | 74         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA3  | 73         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA4  | 80         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA5  | 81         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_34tRNA6  | 7          | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA1  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA2  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA3  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA4  | 82         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA5  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |
| LdBPK_36tRNA6  | 72         | 100                   | 100                   | 100                       |

### 3.3 Etablierung von PRO-seq zur Messung der RNA-Synthese

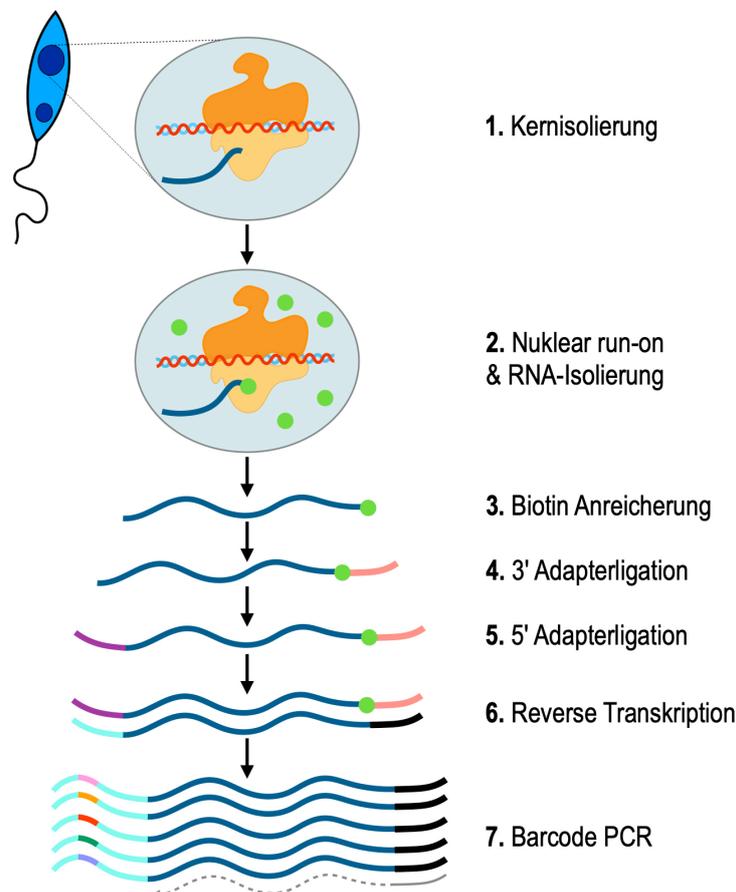
In höheren Eukaryoten wird eine dichtere Chromatinstruktur (Heterochromatin) mit Transkriptionsinaktivität in Verbindung gebracht. Im Licht der ATAC-seq-Ergebnisse stellte sich daher die Frage, ob das dichtere Chromatin, das bei der chemisch- oder Temperatur/pH-induzierten Stadiendifferenzierung in den dSSRs beobachtet wird, eine Auswirkung auf die Transkriptionsinitiation und damit auf die Transkription der nachgeschalteten PTUs hat. Die Transkriptionsinitiation und -termination der polycistronischen Transkription in *Leishmania* spp. ist jedoch bislang nicht verstanden. Um die Transkription zu analysieren und damit die Regionen der Transkriptionsinitiation und -termination genomweit zu identifizieren, muss die RNA-Synthese untersucht werden. Die RNA-Synthese kann durch eine Methode namens PRO-seq (*precision nuclear run-on and sequencing*) analysiert werden (Kwak et al., 2013; Mahat et al., 2016). Im Folgenden Abschnitt dieser Arbeit etablierte ich PRO-seq in *L. donovani*, was eine erste Anwendung dieser Methode in den Trypanosomatida darstellt. Bei PRO-seq handelt es sich um eine hochauflösende *nuclear run-on* Reaktion mit einem Biotin-markierten Nukleosidtriphosphat (NTP), welches zum Abbruch der *in vitro* RNA-Synthese führt. Die Biotin-markierten RNA-Fragmente werden aufgereinigt, und eine anschließende Hochdurchsatz-Sequenzierung gibt Aufschluss über die aktiv transkribierten Regionen des Genoms.

#### 3.3.1 PRO-seq library preparation

Für die Herstellung der *library* wurde ein bereits etabliertes PRO-seq Protokoll (Mahat et al., 2016) an die polycistronische Transkription von *Leishmania* spp. angepasst. In höheren Eukaryoten wird bei der Prozessierung der pre-mRNA bereits nach der Transkription der ersten ~30 Nukleotide eine 5' Cap Struktur angefügt, wobei es sich um eine m<sup>7</sup>G-Cap-Struktur (am N7-Atom methylierter Guanylrest) handelt. Weitere Prozessierungsschritte der pre-mRNAs, wie Polyadenylierung und Spleißen, erfolgen post-transkriptionell. Aufgrund der m<sup>7</sup>G-Cap-Struktur ist die Ligation eines RNA-Adapters am 5' Ende, der für die nachfolgende Barcode PCR benötigt wird, nicht möglich. Deshalb muss für die Ligation des 5' RNA-Adapters diese Cap Struktur entfernt und das freigelegte 5' OH-Ende vor der Ligation durch eine T4 Polynukleotidkinase in ein 5' Phosphat-Ende modifiziert werden.

Die Prozessierung von pre-mRNAs in Leishmanien unterscheidet sich jedoch aufgrund der polycistronischen Transkription von derjenigen in höheren Eukaryoten. Die Prozessierungsschritte in *Leishmania* spp. sind co-transkriptionell, wobei durch *Trans*-Spleißen eine SL-RNA mit einer Cap-4-Struktur an das 5'-Ende der pre-mRNA und durch Polyadenylierung ein Poly-A-Schwanz an das 3'-Ende angefügt wird. Das anfügen der Cap-Struktur durch *Trans*-Spleißen ist gekoppelt an die Polyadenylierung der vorher synthetisierten pre-mRNA (Clayton 2016). Daher ist für die *library preparation* in *Leishmania* spp. eine Entfernung der Cap-Struktur nicht notwendig, da naszierende pre-mRNAs noch nicht über eine Cap-Struktur verfügen.

Für die Herstellung der *library* wurden Zellkerne von Promastigoten (25 °C, pH 7,4), axenischen Amastigoten (37 °C, pH 5,5) und RAD-behandelten Promastigoten (1200 ng/mL RAD, 25 °C, pH 7,4) isoliert. Anschließend wurde eine *nuclear run-on* Reaktion durchgeführt, wobei zusätzlich zu den nicht markierten NTPs auch Biotin-markiertes CTP verwendet wurde. Der Einbau des Biotin-markierten CTPs in den naszierenden RNA Strang führt zum Abbruch der Transkription. *Nuclear run-on* Reaktionen wurden unter Zugabe von Sarkosyl, einem anionischen Detergenz, durchgeführt, das pausierende RNA Pol II-Komplexe veranlasst, die Transkription in einem *run-on* Assay wieder aufzunehmen (Rougvie and Lis, 1988). Außerdem verhindert Sarkosyl die Reinitiation der Transkription, so dass nur Regionen transkribiert werden, an die RNA Pol II bereits gebunden ist (Szentirmay and Sawadogo, 1994). Die aktive RNA Pol II-Transkription wird durch die Zugabe von Sarkosyl nicht beeinflusst, da Elongationskomplexe unter Sarkosyl stabil sind (Rougvie and Lis, 1988; Szentirmay and Sawadogo, 1994).



**Abbildung 18: Schematischer Ablauf des PRO-seq in *Leishmania* spp..** Die Kerne von *Leishmania* spp. werden isoliert und anschließend *in vitro* eine *nuclear run-on* Reaktion durchgeführt. Dabei wird ein Biotin-markiertes NTP (grüner Kreis) verwendet, wodurch die Transkription abbricht. Es folgt eine RNA-Isolierung mit folgender Biotin Anreicherung durch Streptavidin Beads. Anschließend wird ein RNA-Adapter an das 3' Ende der naszierenden mRNA (rosa) ligiert. Danach werden die Biotin markierten RNAs erneut angereichert und ein 5' RNA-Adapter (lila) ligiert. Nach einer weiteren Biotin Anreicherung werden die Adapter-markierten RNA-Fragmente revers transkribiert und in einer Barcode PCR die verschiedenen *libraries* mit unterschiedlichen Indexen versehen (türkis mit bunten Indexen). Die Sequenzierung erfolgt *single-end* vom 3' Ende (grauer Pfeil).

Nach Isolierung der Gesamt-RNAs wurden die Biotin-markierten RNAs durch eine Anreicherung mit Streptavidin Beads aufgereinigt. Nachfolgend wurde ein 3'-RNA-Adapter angefügt, und nach einer erneuten Biotin-Anreicherung ein 5' RNA-Adapter. Nach nochmaliger Biotin-Anreicherung wurde mit Hilfe eines zum 3'-RNA-Adapter komplementären Primers die Reverse Transkription der RNA durchgeführt. In einem letzten Schritt wurde die *library* für die finale Sequenzierung amplifiziert. Dabei wurden durch spezifische Barcode-Primer am 5' Ende die *libraries* der Einzel-Proben mit verschiedenen Indexen versehen, sodass diese nach der Sequenzierung unterschieden werden können. Die Sequenzierung erfolgte im *single-end*-Verfahren vom 3' Ende mit einem NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Zyklen).

### 3.3.2 Hochdurchsatz-Sequenzierung

#### 3.3.2.1 Sequenzier-Output

Für Promastigoten, axenische Amastigoten und RAD-behandelte Promastigoten wurden jeweils drei biologische Replikate sequenziert. Die Sequenzierung ergab insgesamt  $1,5 \times 10^8$  *reads*, mit einer gleichmäßigen Verteilung von ~9 bis ~13 % pro sequenzierter *library* (Tabelle 32). Anschließend wurden die PRO-seq Daten mit Cutadapt (Martin, 2011) getrimmt, und es wurde ein *bowtie2*-Alignment mit dem Referenzgenom *L. donovani* BPK282A1 (Version 46) durchgeführt. Im Alignment konnten für alle Proben gleichmäßig ~80 bis ~90 % der getrimmten *reads* zugeordnet werden.

**Tabelle 32: Output des PRO-seq.** Es wurden drei biologische Replikate pro Probe sequenziert; Pro = Promastigote (25 °C, pH 7,4), Ama = axenische Amastigote (37 °C, pH 5,5), Pro/RAD = RAD-behandelten Promastigote (1200 ng/mL RAD, 25 °C, pH 7,4). Angegeben ist die gesamte Anzahl der gesamten *reads*, der prozentuale Anteil der *reads* der einzelnen Replikate an den gesamten *reads*, die getrimmten *reads* und der prozentuale Anteil der getrimmten *reads*, die dem Referenzgenom (*L. donovani* BPK282A1 (Version 46)) zugeordnet werden konnten.

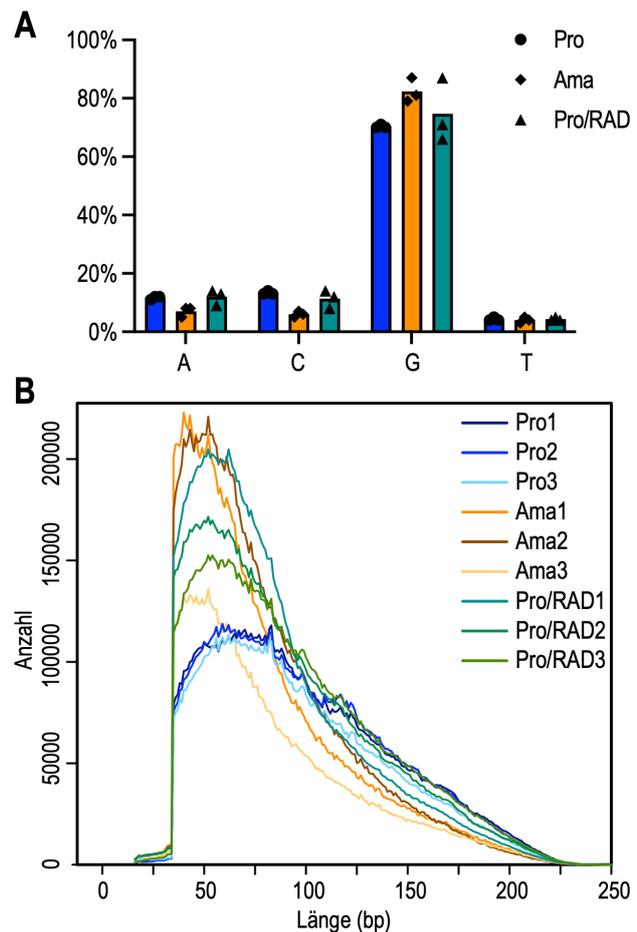
| Probe   | Gesamte <i>reads</i> | Anteil an den gesamten <i>reads</i> | Getrimmte <i>reads</i> | Alignment zum Referenzgenom |
|---------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Pro     | 15738343             | 10,13 %                             | 14293808               | 84,86 %                     |
|         | 15485621             | 9,97 %                              | 14230785               | 85,21 %                     |
|         | 14365074             | 9,25 %                              | 12883891               | 85,69 %                     |
| Ama     | 19554950             | 12,59 %                             | 14800438               | 88,38 %                     |
|         | 20218961             | 13,02 %                             | 15781300               | 89,17 %                     |
|         | 13690226             | 8,81 %                              | 10420369               | 87,52 %                     |
| Pro/RAD | 18954508             | 12,20 %                             | 16633990               | 83,83 %                     |
|         | 18995517             | 12,23 %                             | 16491911               | 83,08 %                     |
|         | 18321796             | 11,80 %                             | 16591002               | 80,60 %                     |

### 3.3.2.2 Qualität der *librarys*

In dieser Arbeit wurde die *nuclear run-on* Reaktion mit Biotin-markiertem CTP durchgeführt, dessen Einbau zum Abbruch der Transkription führt und somit das 3'-Ende der *run-on*-Transkripte bildet. Die von Illumina generierten *reads* sind allerdings revers-komplementär zu den sequenzierten *librarys*, weshalb der Anteil eines G an der ersten Position der *reads* eine Kontrolle für die erfolgreiche Inkorporation des Biotin-markierten CTPs in die RNA darstellt. Eine Übersicht über die Verteilung der Basen an Position 1 der *reads* findet sich in Abbildung 19 A. Der Anteil der Base G nimmt in allen Replikaten mit 70 bis 82 % den höchsten Anteil ein. Für Promastigoten liegt dieser im Durchschnitt bei 70 %, für axenische Amastigoten bei 82 % und für RAD-induzierte Promastigoten bei 72 %. Die Basen A und C stehen bei 7 bis 13 % der *reads* an erster Stelle, während die Base T nur 4 bis 5 % ausmacht (Abbildung 19 A).

Außerdem wurde die Längenverteilung der *reads* überprüft, um eine mögliche Degradation der *librarys* zu erkennen. Eine Länge von 20 Nukleotide (nt) zwischen dem RNA Pol- Ausgangskanal und dem 3' RNA Ende ist vor einem Abbau durch RNasen geschützt. Eine *read*-Länge von unter 20 nt weist also auf einen Abbau der *librarys* nach dem *nuclear run-on* hin (Smith et al., 2021). Der Bereich von 20 bis 30 nt wird mit einer teilweisen Degradation der *librarys* in Verbindung gebracht. *Librarys* mit

hoher Qualität sollten demnach außerhalb von 20 nt und am besten oberhalb von 30 nt ihren Peak erreichen. Für den Bereich unter 20 nt wurden keine *reads* und im Bereich von 20 bis 30 nt nur wenige *reads* nachgewiesen (Abbildung 19 B). Sowohl für Promastigoten, als auch für axenische Amastigoten und RAD-induzierte Promastigoten beginnen die *reads* ab einer Länge von 35 bp stark zuzunehmen. In axenischen Amastigoten waren die meisten *reads* ~50 bp lang. RAD-induzierte Promastigoten hatten die meisten *reads* bei einer Länge von ~60 bp und Promastigoten bei ~70 bp (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: Verteilung der Basen und Länge der reads.** Pro = Promastigote, Ama = axenische Amastigote, Pro/RAD = RAD-behandelten Promastigote **(A)** Prozentualer Anteil der Basen (A, C, G, T) an Position 1 der *reads*. Pro (blau, Kreis), Ama (orange, Diamant) Pro/RAD (grün, Dreieck), n=3. **(B)** Verteilung der *read*-Länge (bp). n=3.

Die sequenzierten *libraries* sind demnach alle von hoher Qualität und nicht degradiert. Auch der Einbau des Biotin-markierten CTPs während der *nuclear run-on* Reaktion hat für Promastigoten und chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung gut funktioniert. Beides spricht für eine erfolgreiche Etablierung des PRO-seq Protokolls in *Leishmania* spp.

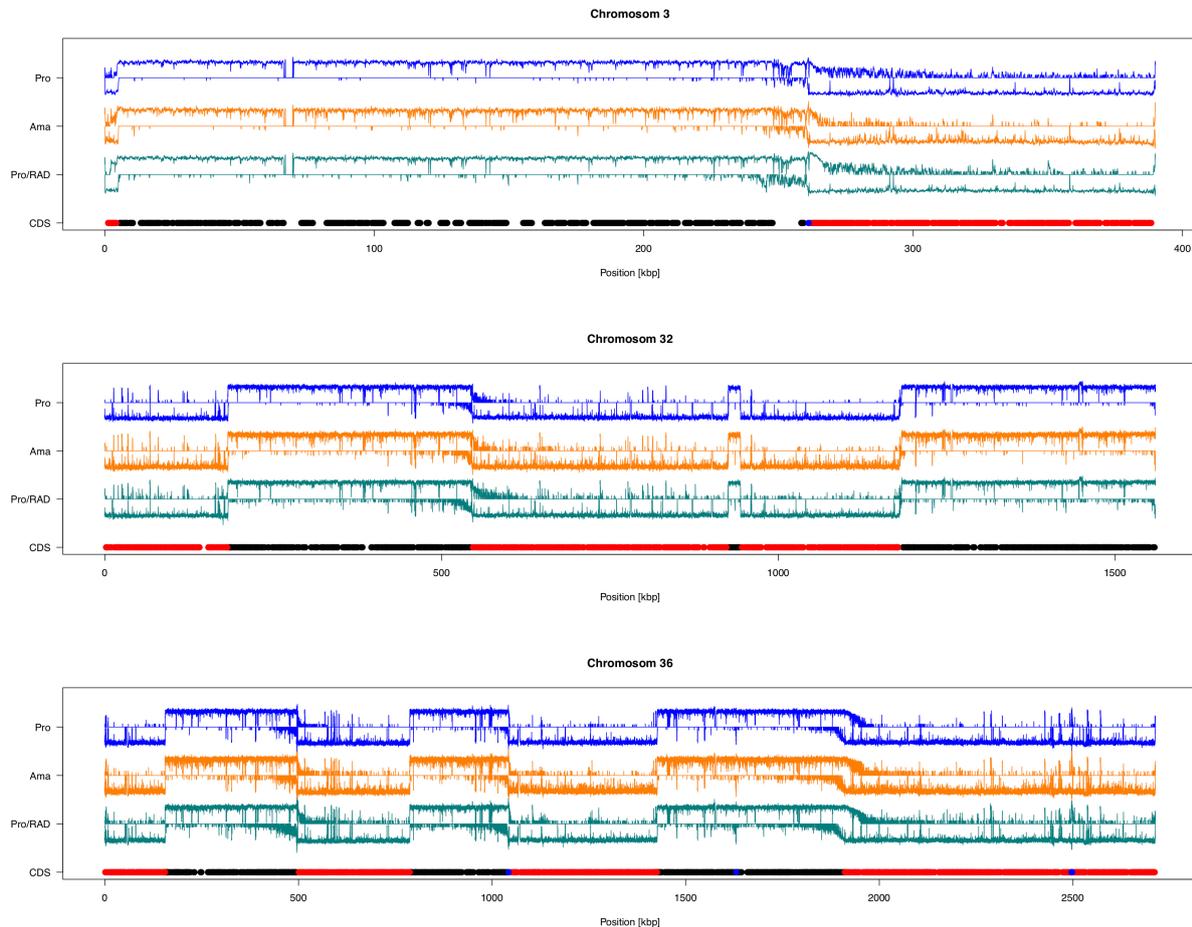
### 3.3.3 Konstitutive Transkription des Genoms von *L. donovani*

Um die Transkription über das Genom von *L. donovani* zu analysieren, wurden die *read*-Positionen logarithmisch über alle 36 Chromosomen geplottet. In diesem Abschnitt wird exemplarisch auf die Chromosomen 3, 32 und 36 näher eingegangen (Abbildung 20). Eine Übersicht aller Chromosomen befindet sich im Anhang (Tabelle 33).

Auf Chromosom 3 liegt eine PTU, die auf dem plus-Strang transkribiert wird und zwei, die auf dem minus-Strang abgelesen werden. Auch in den PRO-seq *reads*, die die aktiv transkribierten Bereiche des Genoms darstellen, lässt sich diese plus/minus-Strang-Verteilung beobachten (Abbildung 20). Sowohl für Promastigoten als auch für chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung wurden die *reads* einer auf dem plus-Strang transkribierten PTU überwiegend auf diesem lokalisiert und für den minus-Strang ebenfalls. Diese Zuordnung der *reads* ließ sich auch für Chromosom 32 und 36 beobachten. Auf Chromosom 36 z.B. liegen drei auf dem plus-Strang und vier auf dem minus-Strang transkribierten PTUs, die alle entsprechend mit PRO-seq *reads* belegt sind. Der Wechsel zwischen der Belegung der *reads* vom plus-Strang auf den minus-Strang erfolgte in den konvergenten und divergenten SSRs zwischen den PTUs. In den SSRs sind teilweise tRNA-Gene lokalisiert, an denen *reads* sowohl auf dem plus-Strang als auch auf dem minus-Strang liegen (Chromosom 3 (250 kbp), Chromosom 36 (1050 kbp, 2500 kbp)). Auf Chromosom 36 liegt ein tRNA-Gen innerhalb einer PTU (1650 kbp), jedoch ist hier kein Abbruch der Transkription auf dem plus-Strang festzustellen, sondern beide Stränge sind mit *reads* belegt.

Außerdem wurde beobachtet, dass die PTUs auf Chromosom 3, 32 und 36 in Promastigoten, axenischen Amastigoten und in RAD-behandelten Promastigoten durchgehend mit *reads* belegt sind (Abbildung 20). Es werden also nicht nur die für mRNA-kodierende Gene transkribiert, sondern auch die nicht kodierenden, intergenischen Bereiche dazwischen. Lücken in den PRO-seq *reads* gehen auf nicht sequenzierte Bereiche (poly(N), nicht dargestellt) in der Genomsequenz zurück (z.B. Chromosom 3 (~60 kbp)). Die durchgehende Belegung mit *reads* ließ sich für alle Chromosomen beobachten (Tabelle 33), was auf eine konstitutive Transkription des Genoms von *L. donovani* hinweist. Unterschiede zwischen Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten waren in dieser Auflösung kaum zu erkennen.

Das Genom von *L. donovani* wird also konstitutiv transkribiert und die Belegung der *reads* wurde überwiegend auf dem jeweiligen *sense*-Strang beobachtet. Darüber hinaus geht die chemisch- und Temperatur/pH-induzierte Stadiendifferenzierung nicht mit einer verringerten Transkriptionsaktivität einher. Für eine genaue Analyse sollten die einzelnen Bereiche jedoch genauer analysiert werden.



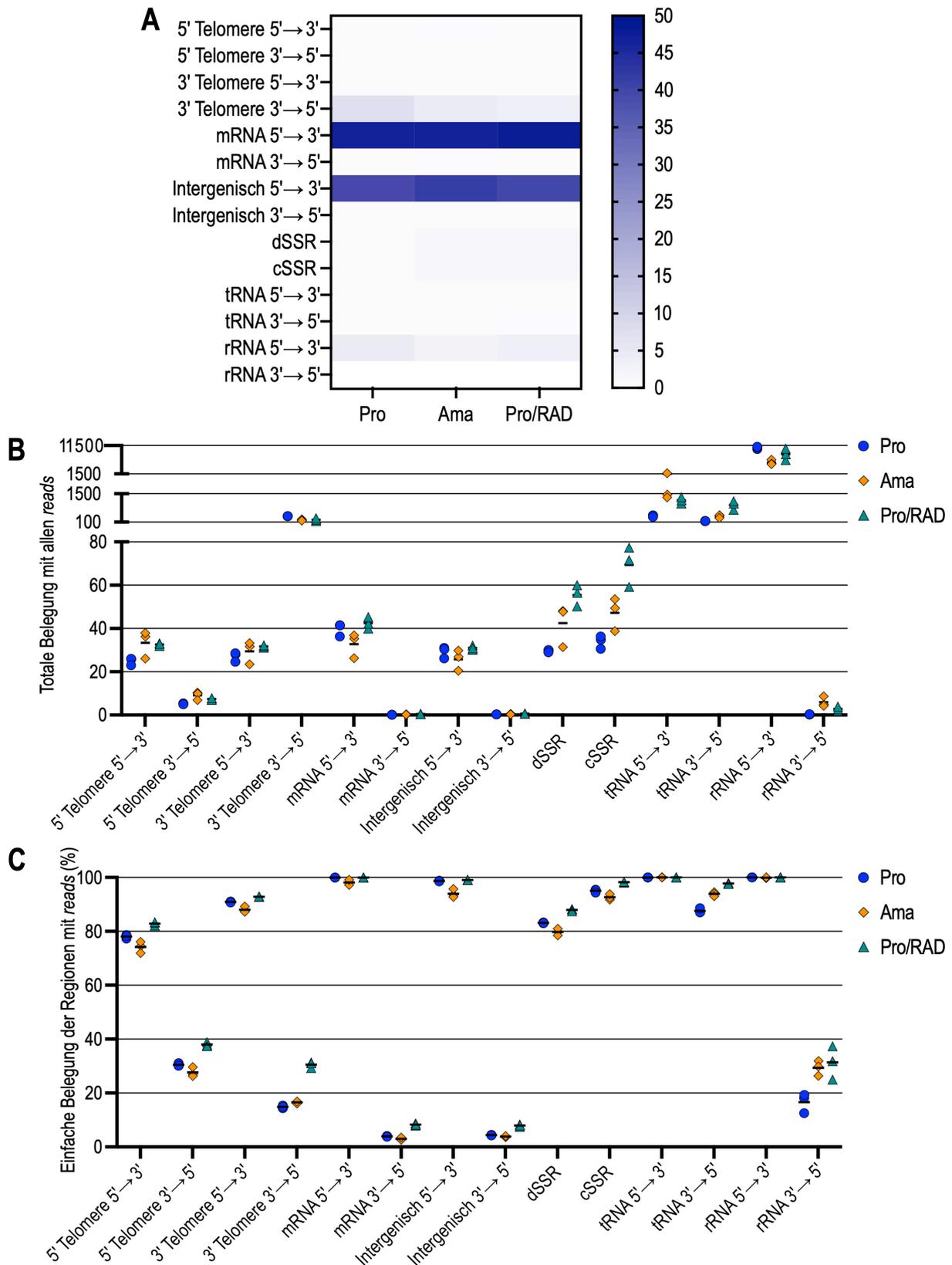
**Abbildung 20: Alignment der PRO-seq reads der Chromosom 3, 32 und 36.** Die totale Anzahl an *reads* wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet,  $n=3$  (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte =  $5' \rightarrow 3'$  (plus-Strang) , rote Punkte =  $3' \rightarrow 5'$  (minus-Strang)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt. Größe der Chromosomen ist in Kilobasenpaare (kbp) angegeben.

### 3.3.4 Verteilung der PRO-seq reads

Die Alignments der PRO-seq *reads* ließen bereits erkennen, dass die Transkriptionseinheiten überwiegend entsprechend ihrer Transkriptionsrichtung belegt sind. Die Darstellung der Alignments über die gesamten Chromosomen gibt jedoch keine detaillierte Übersicht über die Verteilung in den einzelnen Bereichen des Genoms. Deshalb wird im Folgenden näher auf die Belegung von PTUs, SSRs, Telomerregionen, tRNAs und rRNAs eingegangen.

Dafür wurde zunächst die Verteilung der gesamten *reads* auf die verschiedenen Bereiche des Genoms innerhalb der einzelnen Replikate analysiert (Abbildung 21 A). Der größte Anteil der *reads* einer *library* geht auf polycistronische Transkriptionseinheiten in 5' → 3' Orientierung zurück. PTUs nehmen aber mit 98 % auch den größten Anteil des Genoms von *L. donovani* ein. Genauer gesagt verteilen sich ~45 % der *reads* einer *library* auf mRNA-kodierende Bereiche (5' → 3') und ~40 % auf intergenische Bereiche (5' → 3'). Nur ~0,5 % der *reads* ließen sich in PTUs in 3' → 5' Orientierung lokalisieren. Auffällig ist, dass ~4 – 7 % der *reads* in Telomerregionen der Transkriptionstermination in 3' → 5' Orientierung lokalisiert sind. 3' Telomerregionen machen insgesamt nur 0,7 % des Genoms von *L. donovani* aus. Auch die rRNA-Gene decken mit 0,015 % nur einen sehr kleinen Teil des Genoms ab, haben aber in 5' → 3' Orientierung einen Anteil von ~2,5 – 4% an den gesamten *reads*. Insgesamt ist die Verteilung der *reads* innerhalb der einzelnen *libraries* zwischen den Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 21 A).

Da der Hauptanteil der gesamten *reads* den mRNA-kodierenden und intergenischen Bereichen in 5' → 3' Orientierung zuzuordnen ist und zudem 3' Telomere (3' → 5' ) und rRNA-Gene (5' → 3') mit einem großen Anteil an *reads* belegt sind, sollte im Folgenden analysiert werden wie viele *reads* in den einzelnen Bereichen des Genoms von *L. donovani* liegen. Zu diesem Zweck wurde anhand der Größe der einzelnen Bereiche berechnet, wie stark die Belegung der Bereiche mit *reads* ist (Abbildung 21 B). Die mRNA-kodierenden Bereichen (5' → 3') sind durchschnittlich von 35 bis 40 *reads* repräsentiert, intergenische Bereiche mit 25 bis 30. Die Menge naszierender Transkripte ist in intergenischen Bereichen also fast so hoch wie in den kodierenden Bereichen. 3' Telomere in 3' → 5'-Richtung sind hingegen durchschnittlich mit 200 bis 400 *reads* belegt, während 5' und 3' Telomererregionen in 5' → 3' Orientierung eine ~20 bis 40-fache Abdeckung zeigten. 5' Telomere in 3' → 5' sind jedoch nur durchschnittlich 5 bis 7,5 *reads* abgedeckt. Der zuvor beobachtete große Anteil der gesamten *reads*, der rRNA-Bereichen (5' → 3') zuzuordnen ist, spiegelt sich auch in der Menge der *reads* im Vergleich zur Größe der Region wieder. In axenischen Amastigoten wurde eine Belegung bis zu 5000 festgestellt; in Promastigoten und RAD-behandelten Promastigoten zwischen ~10000 und 11000. In 3' → 5' Orientierung der rRNA-Gene liegt die Abdeckung jedoch nur bei ~0,5 bis 8 %. Auch tRNA-Gene haben eine hohe Abdeckung mit *reads*. In 5' → 3' Orientierung wurde für Promastigoten eine ~350-fache Abdeckung beobachtet, für axenische Amastigoten eine ~1500-fache und für RAD-behandelte Promastigoten eine ~1200-fache. In 3' → 5' Orientierung lag die Abdeckung für Promastigoten bei ~150, für axenische Amastigoten bei ~300 und für RAD-behandelte Promastigoten bei ~1100. In den divergenten und konvergenten SSRS zeigten die chemisch induzierte Differenzierung die höchste *read*-Abdeckung (dSSR=~55-fach, cSSR=~70-fach), gefolgt von axenischen Amastigoten (dSSR=~42-fach, cSSR=~47-fach) und Promastigoten (dSSR=~30-fach, cSSR=~35-fach).

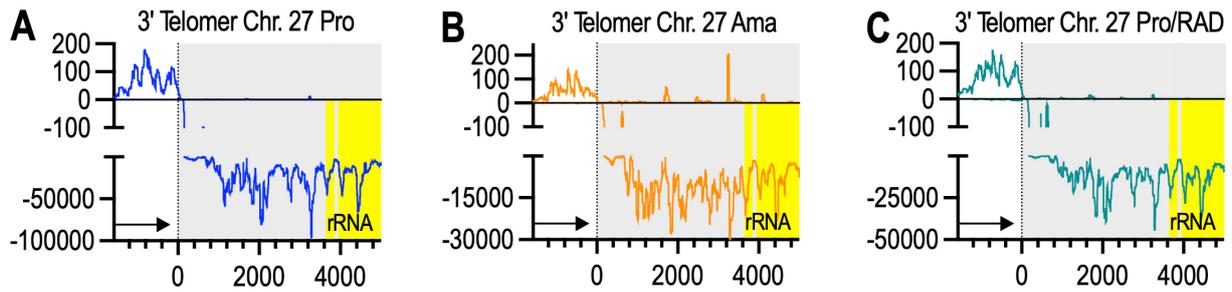


**Abbildung 21: Verteilung und Abdeckung einzelner Bereiche des Genoms von *L. donovani* mit PRO-seq reads. (A) Heatmap über die Verteilung der reads innerhalb der libraries von Promastigoten (Pro), axenischen Amastigoten (Ama) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD) auf die verschiedenen Bereiche des Genoms von *L. donovani* getrennt nach 5' → 3' und 3' → 5' Orientierung, n=3. Die Skala gibt die prozentuale Verteilung der reads an. (B) Totale Anzahl der reads innerhalb verschiedener Bereiche. Es sind drei biologische Replikate mit jeweils dem Mittelwert dargestellt. (C) Einfache Belegung der verschiedenen Bereiche mit reads in drei biologischen Replikaten. Prozentuale Darstellung, schwarze Linie zeigt den Mittelwert.**

Die Menge der *reads* über einen Bereich (Abbildung 21 B) gibt jedoch keine Auskunft über die Belegungsdichte. Diese wurde daher ebenfalls berechnet und in Abbildung 21 C dargestellt. Die PTUs sind in 5' → 3' Orientierung nahe zu 100 % durch *reads* abgedeckt, während auf dem Gegenstrang die Belegungsdichte bei nur 3 – 8 % liegt. Die Belegungsdichte der Regionen der Transkriptionstermination liegt für konvergente SSRs bei 92 % – 98 % und für 3' Telomere (5' → 3') bei 88 – 93 %. Für dSSRs und 5' Telomere (5' → 3'), in denen die Transkription initiiert, ist diese mit ~70 bis 80 % etwas niedriger. Telomerregionen in 3' → 5' Orientierung sind im Gegensatz zur hohen Anzahl an *reads* in 3' Telomeren nur an 15 bis 40 % der Positionen mit *reads* belegt. tRNA-Gene sind in ihrer Leserichtung zu 100 % mit *reads* belegt; entgegen ihrer Leserichtung zu 88 bis 98%. rRNA-Gene hingegen sind 5' → 3' zu 100 % abgedeckt; in 3' → 5' jedoch nur zu 15 bis 30 %.

Der überwiegende Anteil der PRO-seq *reads* ließ sich also den PTUs zuordnen, wobei die meisten *reads* in *sense*-Orientierung, also der Richtung der Transkription lokalisiert waren. Dies zeigte sich auch in der Belegung dieser Bereiche, die zu fast 100 % der Positionen von *reads* abgedeckt waren. Die Belegung war in Promastigoten und unter chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung sowohl in mRNA-kodierenden Bereichen als auch in den intergenischen Bereichen innerhalb der PTUs durchschnittlich mit 30 bis 40 *reads* belegt, was zeigt, dass die PTUs durchgehend polycistronisch auf etwa dem gleichen Niveau transkribiert wurden. An dieser Stelle muss jedoch betont werden, dass die *reads* des in dieser Arbeit durchgeführten PRO-seqs nicht nur die aktive Transkription widerspiegeln, sondern durch die Zugabe von Sarkosyl auch pausierende RNA Polymerase Komplexe zur Elongation bringen. In dSSRs und cSSRs war die Belegung mit *reads* in Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten ähnlich, weshalb an dieser Stelle keine Rückschlüsse auf die Transkriptionsinitiation und -termination gezogen werden können. Dafür sind genauere Analysen dieser Regionen notwendig.

Auffällig war eine sehr hohe Belegung der tRNA- und rRNA-Gene mit PRO-seq *reads*, wobei tRNA-Gene auf beiden Strängen eine hohe *read*-Belegung zeigten und rRNA-Gene überwiegend in ihrer Transkriptionsrichtung belegt waren. Telomerregionen zeigten vor allem eine durchgehende Belegung in Transkriptionsrichtung. Die große Menge an *reads* in 3' Telomeren in 3' → 5' Orientierung geht auf das rRNA-Gencluster, welches auf Chromosom 27 innerhalb dieser Region auf dem minus-Strang lokalisiert ist zurück. Die hohe *read*-Anzahl geht hier über die rRNA-Gen Bereiche hinaus in die 3' Telomerregion, weshalb der große Anteil an *reads* als Folge der rRNA-Transkription auftrat (Abbildung 22). Viel mehr scheint es, als kommt es erst mit dem Start der Transkription der RNA Pol II-abhängigen, angrenzenden PTU zur Transkriptionstermination der durch RNA Pol I vermittelten Transkription der rRNA-Gene auf Chromosom 27.



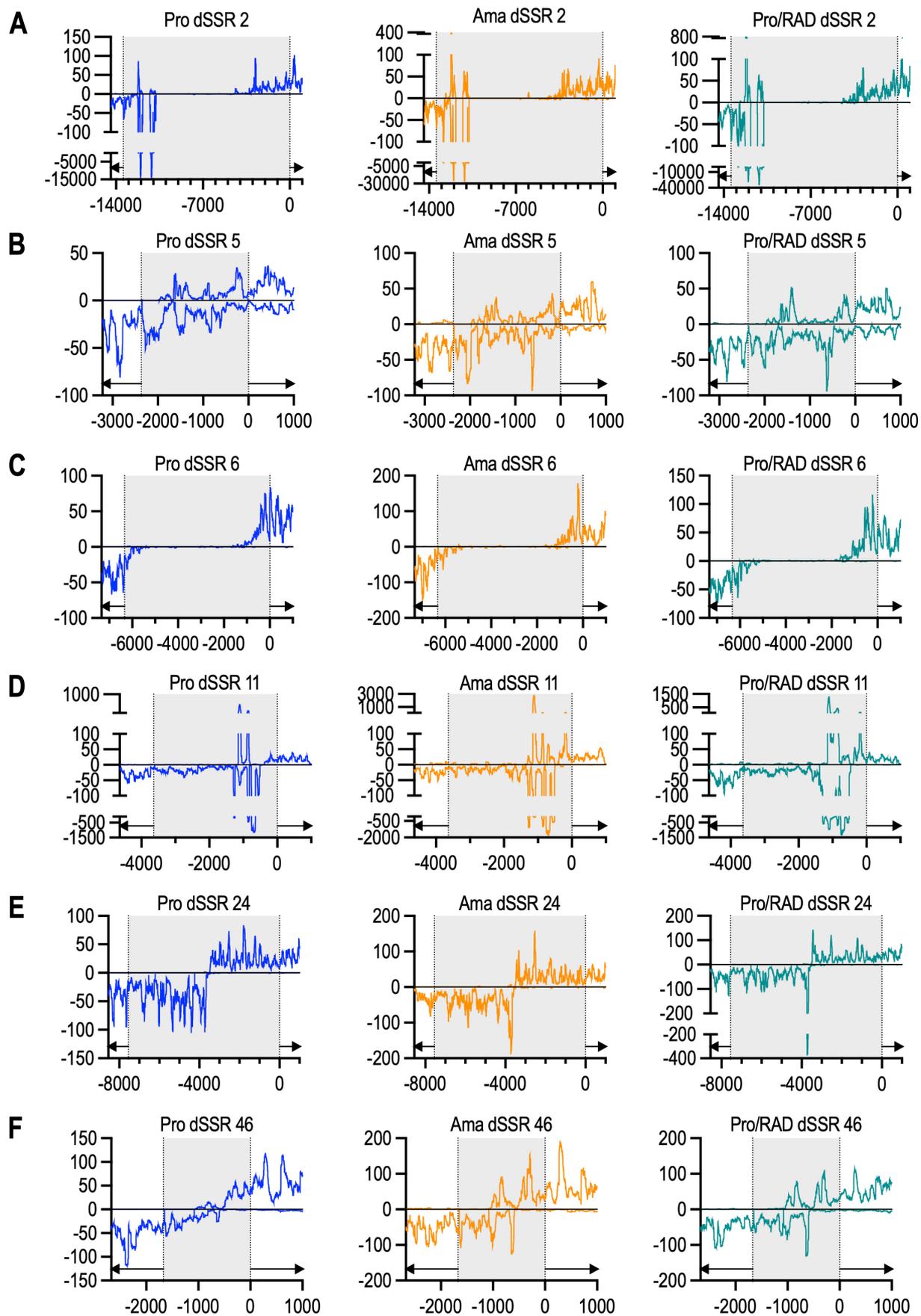
**Abbildung 22: 3' Telomerregion auf Chromosom 27.** Dargestellt ist die 3' Telomerregion auf Chromosom 27 mit einem rRNA-Genlocus (gelb) auf dem -Strang in **(A)** Promastigoten (Pro, blau), **(B)** axenischen Amastigoten (Ama, orange) und **(C)** RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Stopcodon der PTU und den Beginn der anschließenden Telomerregion (grau hinterlegt) kennzeichnet. Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2.  $n=3$  (Mittelwert).

### 3.3.5 Transkriptionsinitiation innerhalb der dSSRs

Die Transkription der PTUs initiiert in *Leishmania* spp. innerhalb der divergenten SSRs. Jedoch wurde dies bisher nur durch klassische *nuclear run-on* Experimente für zwei Chromosomen in *L. major* gezeigt und nicht genomweit bestätigt (Martinez-Calvillo et al., 2004; Martínez-Calvillo et al., 2003). Zudem gibt es bisher keine Informationen über die genauen Regionen der Transkriptionsinitiation. Daher wurde im Folgenden die Transkriptionsinitiation innerhalb der dSSRs in *L. donovani* einzeln analysiert. Eine Übersicht aller 62 dSSRs findet sich im Anhang (Tabelle 35) mit einer zugehörigen Tabelle über die Positionen im Genom von *L. donovani* (Tabelle 34). In diesem Kapitel sind nur Beispiele abgebildet, die aber für alle im Anhang abgebildeten dSSRs repräsentativ sind.

Die Transkription initiiert für den überwiegenden Teil der PTUs innerhalb der dSSRs. Ausnahmen stellen die dSSR 5, 7, 32 und 45 dar, in denen die Transkription einer der beiden PTUs bereits innerhalb der anderen PTU beginnt (Abbildung 23 B). Dadurch kommt es in einem kleinen Bereich zu einer Transkription auf beiden Strängen. Dies lässt sich auch für dSSRs beobachten, bei denen die Transkription innerhalb der dSSRs beginnt, jedoch überlappt, wie z.B. dSSR 46 (Abbildung 23 F). In anderen dSSRs (z.B. dSSR 24) initiiert die Transkription an einem bestimmten Punkt in beide Richtungen (Abbildung 23 E). Außerdem wurden dSSRs beobachtet, in denen ein großer Teil innerhalb der dSSR nicht transkribiert wurde und die Transkription an den Rändern der dSSRs vor dem Übergang zu den PTUs startet (Abbildung 23 C). Auch der Abstand, in dem die Transkription vor Beginn der PTU beginnt, ist für jede dSSRs verschieden.

Die Transkriptionsinitiation von Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-induzierten Promastigoten erfolgt jedoch in gleichen Bereichen in den jeweiligen dSSRs (Abbildung 23). Es sind lediglich kleinere Abweichungen zu beobachten, die allerdings auch



**Abbildung 23: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind die (A) dSSR 2, (B) dSSR 5, (C) dSSR 6, (D) dSSR 11, (E) dSSR 24 und (F) dSSR 46 in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).

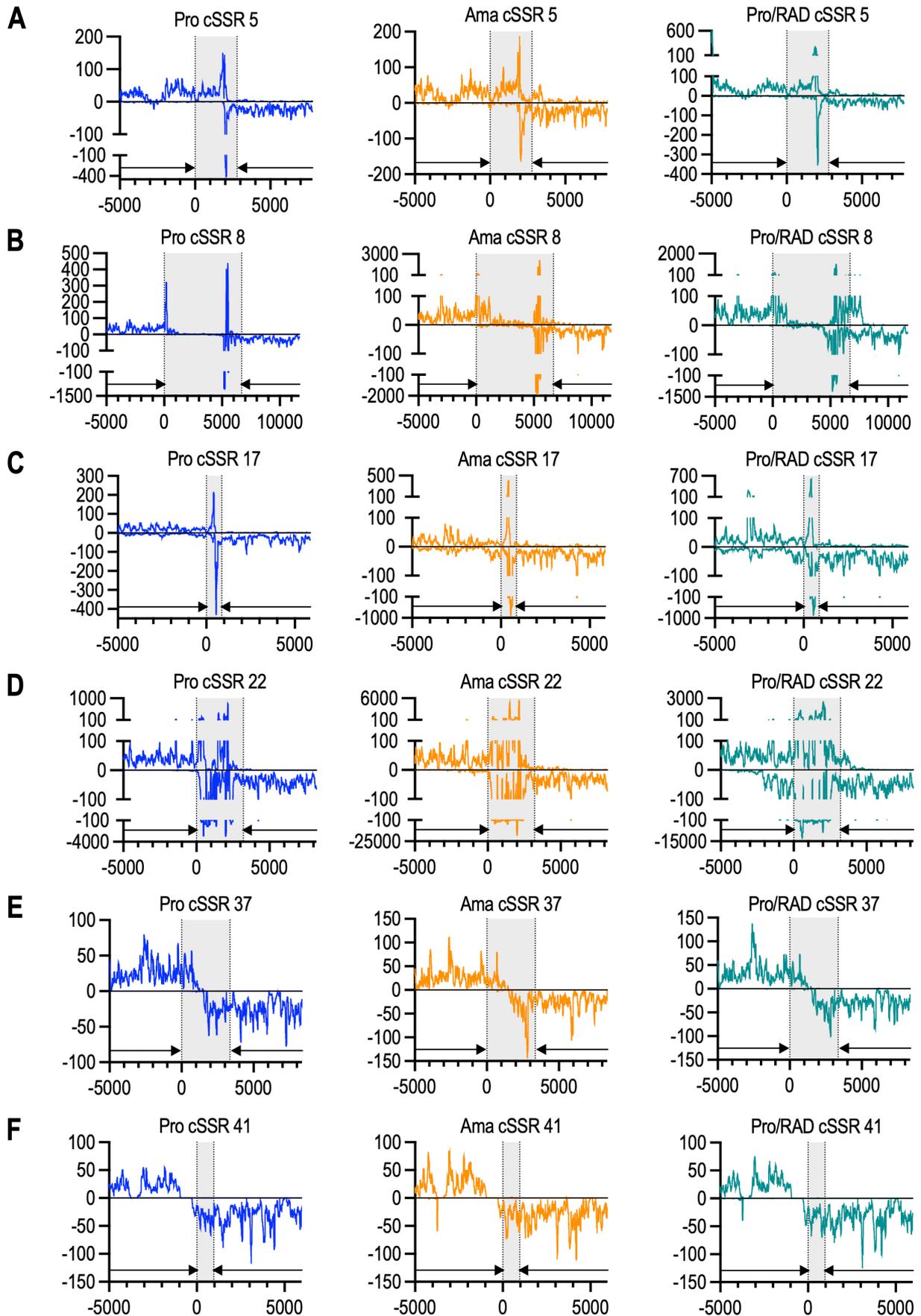
innerhalb der biologischen Replikate auftraten. Die Transkription initiiert demnach nicht Basen-spezifisch, aber immer in der gleichen Region. Was jedoch zwischen den verschiedenen Stadien unterschiedlich ist, ist die Menge der Transkriptionskomplexe an einer Position. Axenische Amastigoten und teilweise auch RAD-induzierte Promastigoten zeigten häufig eine höhere Belegung mit *reads*. Zudem sind Peaks an manchen Positionen verschieden stark ausgeprägt und teils nicht vorhanden. Dies fällt vor allem in der dSSR 2 auf, in der die SL-RNA Gene lokalisiert sind (Abbildung 23 A). In Promastigoten wurden in diesem Bereich ~15.000 *reads* geplottet, in axenischen Amastigoten ~30.000 und in RAD-behandelten Promastigoten sogar knapp 40.000. Auch Bereiche, in denen tRNA-Gene lokalisiert sind, wie z.B. in der dSSR 11, zeigen eine hohe Belegung mit *reads* auf beiden Strängen. Dabei war die Belegung in dSSR 11 in axenischen Amastigoten am höchsten, Promastigoten zeigten im Vergleich die niedrigste Belegung (Abbildung 23 D). Innerhalb der dSSRs sind jedoch nur drei tRNA-Cluster lokalisiert. Der größte Anteil an tRNAs befindet sich innerhalb der cSSRs und in Telomerregionen.

Die Transkription initiiert für die PTUs an unterschiedlichen Positionen innerhalb der verschiedenen dSSRs und nicht in einem definierten Abstand vor dem Startcodon. Allerdings ist die Region der Transkriptionsinitiation für Promastigoten und bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Stadiendifferenzierung identisch. Der genaue Startpunkt unterscheidet sich aber teilweise um wenige Basen, auch innerhalb der biologischen Wiederholungen, sodass nicht von spezifischen RNA Pol II Promotoren in diesem Bereich ausgegangen werden kann.

### 3.3.6 Transkriptionstermination innerhalb der cSSRs

Auch die Termination der RNA Pol II-abhängigen Transkription der PTUs ist bisher nicht verstanden, weshalb ich im Rahmen dieser Arbeit alle 48 cSSRs in *L. donovani* näher analysiert habe. Eine vollständige Übersicht und die entsprechend zugehörigen Positionen im Genom findet sich im Anhang (Tabelle 36, 37).

Die Transkription terminiert bis auf wenige Ausnahmen (Abbildung 24 F) innerhalb der cSSRs. Teilweise wurde aber noch eine geringe Transkription fortlaufend auf dem anderen Strang beobachtet (Abbildung 24 C). Oftmals terminiert die Transkription mit hohen Peaks auf beiden Strängen. Dies zeigte sich für cSSRs, in denen tRNA-Gene liegen (Abbildung 24 B, C, D), aber auch in cSSRs ohne tRNA-Gene, wie z.B. cSSR 5 (Abbildung 24 A). Diese



**Abbildung 24: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind die (A) cSSR 5, (B) cSSR 8, (C) cSSR 17, (D) cSSR 22, (E) cSSR 37 und (F) cSSR 41 in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Stopcodon der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Stopcodon der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).

hohen Peaks sind in den meisten cSSRs zu beobachten, wobei an dieser Stelle nicht unterschieden werden kann, ob es sich um pausierte RNA Pol II-Komplexe handelt. In einigen cSSRs terminiert die Transkription beider Stränge in einem Bereich ohne diese Ausbildung von Peaks (Abbildung 24 E, F).

Auch die Transkriptionstermination ist in Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten ähnlich, wobei sich die Anzahl an *reads* jedoch teilweise stark unterscheidet. Besonders auffällig ist das in cSSR 22, in der sich ein Cluster aus zehn tRNA-Genen befindet. In axenischen Amastigoten wurden in dieser Region die meisten *reads* beobachtet werden, gefolgt von RAD-behandelten Promastigoten und Promastigoten (Abbildung 24 D). Auch in der cSSR 17, in der sich ein tRNA-Gen befindet, ist eine unterschiedliche Belegung mit *reads* erkennbar, wobei hier die RAD-behandelten Promastigoten den höchsten Peak zeigten (Abbildung 24 C). Was anhand der PRO-seq Daten ebenfalls nicht unterschieden werden kann ist, welche *reads* auf RNA Pol I, II oder III zurückzuführen sind. Generell weisen Loci mit tRNA-Genen meist eine höhere Belegung auf, was mit der hohen *reads* Belegung von tRNAs aus Abbildung 21 B einhergeht.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich die Transkriptionstermination in *L. donovani* zwischen den verschiedenen cSSRs unterscheidet, aber ähnlich für Promastigoten und bei chemisch- und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung erfolgt. In der Regel terminiert die Transkription innerhalb der cSSRs bis auf ein paar Ausnahmen. Häufig ist ein Peak am Locus der Transkriptionstermination auf beiden Strängen zu beobachten. Ob es sich dabei um pausierte RNA Polymerase Komplexe handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Terminiert die Transkription in einer cSSR mit tRNA-Genen, so wurde eine höhere Belegung mit *reads* als in cSSRs ohne tRNA-Gene beobachtet. Die Übersichten in Tabelle 35 und 37 stellen eine genomweite Analyse der Transkriptionsinitiation und -termination in *L. donovani* dar.

## 4. Diskussion

*Leishmania* spp. durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus und differenzieren nach der Übertragung vom Vektor in den Wirt von länglichen, begeißelten Promastigoten zu eiförmigen, unbegeißelten Amastigoten. Diese Differenzierung zu Amastigoten findet innerhalb der Phagolysosomen phagozytierender Zellen, meist Makrophagen, statt und wird durch eine erhöhte Umgebungstemperatur und ein saures Milieu ausgelöst (Bates and Rogers, 2004; Bogdan and Rollinghoff, 1998). Die intrazellulären Amastigoten sind in der Lage, durch den Export von Exosomen die Immunreaktion in der Wirtszelle zu verändern und somit auch Funktionen zu unterdrücken, die zur Eliminierung der Parasiten in Makrophagen erforderlich sind (Silverman et al., 2010; Soto-Serna et al., 2020). Dies begünstigt die Infektion des Wirts, da intrazelluläre Amastigoten sich unbemerkt im Phagolysosom vermehren können. Schließlich kommt es zur Lyse der Makrophagen und zur Freisetzung der Amastigoten, so dass neue phagozytierende Zellen infiziert werden können. Dadurch wird ein Überschuss an Immunzellen und deren Aktivierung verursacht, was proinflammatorische Entzündungsprozesse auslöst und zur Ausbildung der klinischen Symptome der Leishmaniose führt (Bogdan and Rollinghoff, 1998). Das Verstehen der molekularen Prozesse während der Stadiendifferenzierung ist daher von zentraler Bedeutung.

Eine Differenzierung zu axenischen Amastigoten kann *in vitro* durch eine erhöhte Temperatur und einen sauren pH-Wert im Medium induziert werden (Zilberstein and Shapira, 1994). Das hat den Vorteil, dass eine große Anzahl an Parasiten gewonnen werden kann, ohne dass aufwendige *in vitro* oder *in vivo* Infektionsversuche durchgeführt werden müssen (Dias-Lopes et al., 2021). Die in dieser Arbeit benötigten Zellzahlen für ATAC-seq und PRO-seq, sind mit der Isolierung von intrazellulären Amastigoten nicht zu erreichen, weshalb die Verwendung der axenischen Amastigoten zwingend nötig war. Die erfolgreiche Differenzierung zu axenischen Amastigoten wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen mikroskopisch überprüft (Abbildung 9). Die Verwendung von axenischen Amastigoten im Vergleich zu intrazellulären Amastigoten hat jedoch auch ihre Grenzen, da die axenische Differenzierung die intrazelluläre Umgebung des Phagolysosoms nur durch Temperatur und pH-Wert nachahmt und komplexe Interaktionsmechanismen mit der Wirtszelle nicht nachgebildet werden können (Zilberstein and Nitzan Koren, 2019). Proteomanalysen und Infektionsexperimente in *L. donovani* zeigten, dass axenische Amastigoten in der *in vitro* Kultur wichtige Faktoren verloren haben, die für die Entwicklung einer stabilen Wirtsinfektion notwendig sind. Eine Infektion mit axenischen Amastigoten führte im Vergleich zu Milz-Amastigoten zu einer mildereren, nicht tödlichen Infektion im Hamster (Pescher et al., 2011). Stoffwechseluntersuchungen in *L. mexicana* haben jedoch gezeigt, dass sowohl intrazelluläre als auch axenische Amastigoten einen ähnlichen Stoffwechsel haben und nur eine geringe Menge an Glukose und Aminosäuren aufnehmen, was den geringen Zuckergehalt im Phagolysosom reflektiert (Saunders et al., 2014). Unterschiede zwischen

axenischen und intrazellulären Amastigoten zeigten sich vor allem in der Analyse von mRNA-Abundanzen und in Wirkstofftests (Dias-Lopes et al., 2021; Rochette et al., 2009). Allerdings sollte beachtet werden, dass mRNA-Abundanzen nicht mit Proteinsyntheseraten einhergehen und Veränderungen der Genexpression nicht auf der Ebene der Transkription kontrolliert werden (Bifeld et al., 2018; Clayton, 2016). Die Analyse von intrazellulären Amastigoten im Rahmen von Illumina Sequenzierung wird mit den Fortschritten von *single cell* Sequenzierungen möglich werden.

Darüber hinaus bewirkt eine Hemmung von HSP90 durch spezifische Inhibitoren wie z.B. Geldanamycin oder Radicicol ebenfalls eine morphologische Differenzierung zu Amastigoten-ähnlichen Formen (Wiesgigl and Clos, 2001). Diese chemisch-induzierte Differenzierung wurde in *ribosome profiling*-Analysen näher untersucht, und es wurde festgestellt, dass die Proteinsynthese unter HSP90-Hemmung der in Proteomstudien analysierten Amastigoten-spezifischen Protein-abundanzen ähnelt (Bente et al., 2003; Bifeld et al., 2018; Rosenzweig et al., 2008b). Eine vergleichende *ribosome profiling*-Analyse der Proteinsyntheseraten zwischen Amastigoten und HSP90-Hemmung steht jedoch noch aus. Da HSP90 eine zentrale Rolle in der Stadiendifferenzierung einnimmt, wurde auch diese chemisch-induzierte Stadiendifferenzierung im Vergleich zur Temperatur/pH-induzierten in dieser Arbeit analysiert, wobei Radicicol als HSP90-Inhibitor verwendet wurde. Die Hemmung von HSP90 durch Geldanamycin führt zu einem Wachstumsarrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus (Wiesgigl and Clos, 2001). Dies konnte morphologisch auch für eine Hemmung von HSP90 mit RAD beobachtet werden, da mit zunehmenden Wachstumsarrest die Parasiten teilweise nicht mehr in der Lage waren, die Zellteilung abzuschließen (Abbildung 7). Dieser Effekt konnte durch die Verwendung der Radicicol resistenten HSP90<sup>rr</sup>-Variante aufgehoben werden (Abbildung 8). Limitationen der HSP90-Hemmung sind jedoch, dass die Parasiten durch den Wachstumsarrest im Vergleich zu axenischen Amastigoten nicht in der Lage sind zu replizieren. Außerdem ist die morphologische Differenzierung nicht vollständig, da die Parasiten nicht gänzlich rund und unbegeißelt sind, wie es bei axenischen Amastigoten beobachtet wird (Abbildung 7) (Wiesgigl and Clos, 2001; Zilberstein and Shapira, 1994).

#### **4.1 Chromatinstruktur im Zuge der Stadiendifferenzierung und der Einfluss auf die Transkription**

Es wurde schon früh vermutet, dass eine offene Chromatinstruktur und eine schnelle Anpassung der Chromatinstruktur für die Stadiendifferenzierung in *Leishmania* von Bedeutung sind (Belli, 2000). Eine erhöhte Histonsynthese unter HSP90-Hemmung gab weitere Hinweise auf eine veränderte Chromatinstruktur im Kontext der Stadiendifferenzierung (Bifeld et al., 2018). Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der chemisch- und Temperatur/pH-induzierten Differenzierung auf die Chromatinstruktur näher analysiert. Dabei sollten die drei folgenden Fragen beantwortet werden: (i) Geht die

chemisch und/oder Temperatur/pH-induzierte Differenzierung mit einer veränderten Chromatinstruktur einher und sind diese Veränderungen spezifisch für den Differenzierungsprozess? (ii) Welche Regionen des Genoms sind von einer veränderten Chromatinstruktur betroffen? (iii) Haben Veränderungen in der Chromatinstruktur Auswirkungen auf die Transkription?

#### 4.1.1 Dichteres Chromatin ist spezifisch für die Stadiendifferenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die chemisch-induzierte Differenzierung als auch die axenische Amastigotendifferenzierung mit einer schlechteren Zugänglichkeit des Chromatins für die *micrococcal nuclease* einhergeht. Die schlechtere Zugänglichkeit des Chromatins lässt eine dichtere Chromatinstruktur vermuten, die in anderen Eukaryoten mit dem transkriptionsinaktiven Heterochromatin assoziiert wird. Frühe *in vitro* Chromatin Kondensations-Analysen in *Trypanosomatida* zeigten allerdings überwiegend das Vorhandensein der 10 nm *beads on a string*-Struktur und kein kondensiertes 30 nm Chromatin (Hecker and Gander, 1985). Die hier durchgeführten *micrococcal nuclease* Analysen deuten hingegen darauf hin, dass *L. donovani* durchaus in der Lage ist, sein Chromatin zu verdichten. Inwiefern es zur Ausbildung einer 30 nm Chromatinfaser kommt und inwiefern die hier beobachtete dichtere Chromatinstruktur dem Heterochromatin in anderen Eukaryoten ähnelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Der Wechsel von Euchromatin zu Heterochromatin wird in Eukaryoten durch viele verschiedene Faktoren reguliert. Vor allem posttranslationale Modifikationen von Histonen spielen eine wichtige Rolle bei der Heterochromatinbildung. Histonmodifikationen werden durch *reader*-, *writer*- und *eraser*-Elemente erkannt und modifiziert, sodass diese Enzyme essentiell für Veränderungen der Chromatinstruktur sind. Im zu den Apicomplexa gehörenden Parasiten *Plasmodium falciparum* wird die Genexpression der *var* Gene, die für Virulenzfaktoren kodieren, u.a. durch heterochromatisches Gen-*silencing* reguliert. Dabei konnte eine Histon-Methyltransferase (PfSET2), eine Histon-Deacetylase (PfHda2) und ein Histon *reader*-Protein, das Heterochromatin Protein 1 (PfHP1) gemeinsam mit den heterochromatischen Histonmodifikationen H3K9me<sup>3</sup> and H3K36me<sup>3</sup> als Faktoren für Bildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin identifiziert werden (Duraisingh and Horn, 2016). *Trypanosoma brucei* entgeht der Immunantwort des Wirtes durch die Expression verschiedener varianten Oberflächenglykoproteine (VSG = *variant surface glycoprotein*) und auch dieser Mechanismus scheint epigenetisch durch Heterochromatinbildung reguliert zu sein. Die Histon-Methyltransferase DOT1B, die die Trimethylierung am H3K76 modifiziert, aber auch die Histonvariante H3.V, die Histon Chaperone FACT, ASF1, CAF1 und die DNA-Modifikation Base J nehmen Einfluss auf das *silencing* der VSGs in *T. brucei* (Alsford and Horn, 2012; Denninger et al., 2010; Duraisingh and Horn, 2016; Reynolds et al., 2016). In *Leishmania* spp. ist die Heterochromatinbildung und die daran beteiligten Prozesse bisher jedoch wenig analysiert. Bisher konnten nur die Histonmodifikationen H3K9me<sup>3</sup> und H4K20me<sup>3</sup> mit Heterochromatin assoziiert werden (Afrin et al., 2019; Vizuet-de-Rueda et al., 2016).

Meine Ergebnisse belegen, dass die dichtere Chromatinstruktur spezifisch als Reaktion auf den Differenzierungsprozess und einen Hitzeschock auftritt. Nicht nur die axenische Amastigotendifferenzierung, ausgelöst durch eine erhöhte Temperatur und einen sauren pH-Wert, sondern auch eine erhöhte Temperatur von 37 °C, die die axenische Amastigotendifferenzierung in den ersten 24 Stunden einleitet, führte in den *micrococcal nuclease* Analysen zu einer verringerten Zugänglichkeit des Chromatins (Abbildung 9). Außerdem sind die Veränderungen im Chromatin als Reaktion auf die RAD-Behandlung speziell auf die Hemmung von HSP90 zurückzuführen, da der Effekt von RAD durch episodale Expression einer HSP90rr-Variante aufgehoben wurde (Abbildung 7, 8). Die HSP90rr-Variante trägt einen Aminosäure-Austausch in der ATP-Bindungstasche, wodurch der HSP90-Inhibitor RAD an der Bindung und Hemmung von HSP90 gehindert wird (Prodromou et al., 2009). Da RAD jedoch auch zu einem Wachstumsarrest führt und auch Amastigoten langsamer proliferieren als Promastigoten, wurde geprüft, ob das dichtere Chromatin generell als Folge eines Wachstumsarrests auftritt. Hierfür wurde durch Hydroxyurea ein Wachstumsstopp erzeugt und die Auswirkungen durch *micrococcal nuclease* Analysen untersucht, wobei jedoch keine Veränderungen der Chromatinstruktur beobachtet wurden (Abbildung 10).

Bisher gibt es für Trypanosomatida nur wenige Studien, die sich mit Veränderungen der Chromatinstruktur im Zusammenhang mit der Stadiendifferenzierung beschäftigen. Am besten untersucht wurde die Chromatinkondensation im Kontext der Apoptose in *Leishmania* spp., wobei eine deutliche Kondensierung beobachtet wurde (Dutta et al., 2007; Moreira et al., 1996). Eine der wenigen Studien über Chromatinkondensation im Lebenszyklus von *T. brucei* stellte fest, dass die Differenzierung von prozyklischen Insektenformen zu den in der Blutbahn vorkommenden Trypomastigoten mit einer Verdichtung der Chromatinkondensation einhergeht (Belli, 2000). Veränderungen in der Stadiendifferenzierung konnten in einer späteren Studie in *T. cruzi* bestätigt werden, wo Heterochromatin in infektiösen, nicht proliferierenden Trypomastigoten im Vergleich zu proliferierenden Epimastigoten und Amastigoten vorherrschend war (Elias et al., 2001). Belli (2000) weist außerdem in seinem Review darauf hin, dass Veränderungen der Chromatinkondensation in *L. major* beobachtet wurden, wobei prozyklische Promastigoten *in vivo* ein offeneres Chromatin zeigten als infektiöse, metazyklische Promastigoten, die ebenfalls wachstumsarretiert sind. Später wurde durch *micrococcal nuclease* Analysen gezeigt, dass das Linker-Histon H1 direkt an der Aufrechterhaltung der Chromatinkondensation beteiligt ist (Masina et al., 2007). In dieser Arbeit konnten diese frühen Beobachtungen, dass sich Chromatinstruktur im Lebenszyklus dieser Parasiten verändert, bestätigt werden.

Zudem konnte aufgeklärt werden, dass die in *ribosome profiling*-Analysen beobachtete erhöhte Histonsynthese, die als Folge der HSP90-Hemmung auftrat (Bifeld et al., 2018), auch mit einer dichteren Chromatinstruktur einhergeht (Abbildung 7). Im Zusammenhang mit HSP90 wurde in anderen Eukaryoten gezeigt, dass dieses Chaperon direkt an

Signaltransduktionsprozessen zur Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur beteiligt ist und molekulare Chaperone generell wichtig für die Chromatindynamik sind (Cook et al., 2011; Echtenkamp et al., 2016). HSP90 und p23 sind in *Saccharomyces cerevisiae* für die Aufrechterhaltung der Funktion von Chromatin-Remodelern verantwortlich (Echtenkamp et al., 2016). Darüber hinaus kontrolliert das Histon-Chaperon NASP das Gleichgewicht zwischen HSP90 und Hsc70 und hält den löslichen H3-H4-Histonpool im Gleichgewicht, da der H3-H4-Abbau durch HSP90 und Hsc70 vermittelt wird (Cook et al., 2011). In *Candida albicans* ist HSP90 dafür verantwortlich, dass Promotorregionen als Reaktion auf Stress von Nukleosomen freigehalten werden, wodurch die Transkription aufrechterhalten wird. (Leach et al., 2016). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die dichtere Chromatinstruktur unter HSP90-Hemmung auch eine Folge der gestörten Signaltransduktionsprozesse ist und nicht nur auf die Differenzierung zu Amastigoten zurückzuführen ist.

#### **4.1.2 Veränderungen in der Chromatinstruktur zeigen sich in Bereichen der Transkriptionsinitiation**

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Bereiche im Genom von *L. donovani* von einer veränderten Chromatinzugänglichkeit betroffen sind. Dafür habe ich ATAC-seq (Buenrostro et al., 2015a) in *L. donovani* etabliert, was nach unseren Informationen die erste Anwendung dieser Methode in *Leishmania* spp. darstellt (Grunebast et al., 2021). ATAC-seq ist eine Methode zur genomweiten Erfassung der Chromatinzugänglichkeit und wurde ursprünglich im Jahr 2013 als Alternative zu DNase-seq und FAIRE-seq angewandt (Buenrostro et al., 2013). ATAC-seq kann außerdem mit MNase-seq verglichen werden, wobei die durch Nukleosomen besetzten Regionen in offenen Bereichen des Genoms sequenziert werden. Der Vorteil von ATAC-seq im Gegensatz zu den anderen genannten Methoden ist, dass eine geringere Zellzahl benötigt wird und ATAC-seq schnell und sensitiv ist (Buenrostro et al., 2013). Es gibt darüber hinaus bereits etablierte Ansätze für *single-cell* ATAC-seq (Buenrostro et al., 2015b). In *Trypanosomatida* wurde ATAC-seq erstmals in Kombination mit Hi-C, der genomweiten Erfassung der Chromosomenkonformation und *single-cell* RNA-Sequenzierung zur Analyse eines Zusammenhangs zwischen der Genomorganisation, Chromatinstruktur und Antigen Variation in *T. brucei* verwendet (Muller et al., 2018).

In dieser Arbeit konnte durch die Anwendung von ATAC-seq gezeigt werden, dass Regionen der Transkriptionsinitiation, also divergente SSRs und 5' Telomerregionen, in axenischen Amastigoten und unter HSP90-Hemmung eine dichtere Chromatinstruktur im Vergleich zu Promastigoten aufweisen (Abbildung 15 A, B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Chromatinstruktur in dSSRs von Promastigoten etwa 2 kb vor Beginn der stromabwärtsliegenden PTU offener wird (Abbildung 16). Die Veränderungen zu einer dichteren Chromatinstruktur im Zuge der Differenzierung konnte nicht für Regionen der Transkriptionstermination beobachtet werden (Abbildung 15 C, D). Auch Bereiche der

polycistronischen Transkriptionseinheiten waren nicht von signifikanten Veränderungen betroffen (Abbildung 14). Eine Studie, die parallel zu den hier durchgeführten ATAC-seq Analysen erschien, untersuchte mit MNase-seq die Nukleosomen-belegung in *T. cruzi* im Hintergrund der Stadiendifferenzierung (Lima et al., 2021). Analysiert wurden Veränderungen zwischen *T. cruzi* Epimastigoten, die im Mitteldarm der *Triatominae* Insekten vorkommen, und aus Gewebekulturen stammende Trypomastigoten, die extrazellulär im Säugetierwirts leben. Es wurden deutliche Unterschiede in der Nukleosomenbelegung zwischen den zwei Lebensformen identifiziert, wobei diese vor allem in Regionen der dSSRs auftraten. Es wurde beobachtet, dass die Nukleosomen in dSSRs dynamischer sind als in anderen Regionen und dass die dSSRs in Trypomastigoten eine höhere Nukleosomenbelegung aufweisen als in Epimastigoten, d. h. in dSSRs ist das Chromatin in Parasiten, die im Säugetierwirt leben, dichter. Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein, dass dSSRs bei chemischer und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung eine dichtere Chromatinstruktur aufweisen. Zudem wurden in Bereiche der PTUs in *T. cruzi* keine signifikanten Veränderungen in der Nukleosomenbelegung festgestellt, was ebenfalls mit unseren Beobachtungen einhergeht. Aufgrund der spezifischen Verdichtung des Chromatins in Bereichen der Transkriptionsinitiation wie dSSRs, stellte sich uns die Frage, inwiefern die Transkription der angrenzenden PTUs davon betroffen ist.

#### 4.1.3 Der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Transkriptionsinitiation

Alle Phasen der Transkriptionsinitiation in Eukaryoten werden epigenetisch durch Veränderungen der Chromatinstruktur reguliert. Dazu zählt die Bindung von Aktivatoren stromaufwärts von Promotorbereichen, die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Rekrutierung von RNA Pol II (Ekanayake and Sabatini, 2011). In Trypanosomatida jedoch fehlen Promotoren und Transkriptionsfaktoren, und die Transkription initiiert mit Ausnahme der SL-RNA Gene ohne RNA Pol II-abhängige Promotoren (Clayton, 2016). Welchen Einfluss eine veränderte Chromatinstruktur auf die Transkriptionsinitiation in Trypanosomatida hat, ist bisher nicht verstanden. Um einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Chromatinstruktur und Transkriptionsinitiation in *L. donovani* herzustellen, wurde die Transkription mit PRO-seq analysiert. Die Etablierung der Methode und die genauen Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2 diskutiert. An dieser Stelle ist wichtig, dass gezeigt werden konnte, dass eine dichtere Chromatinstruktur in den dSSRs von axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten keinen Einfluss auf die Transkriptionsinitiation der stromabwärts liegenden PTUs hat. Die PTUs wurden sowohl in Promastigoten als auch unter chemisch und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung weiterhin konstitutiv transkribiert (Abbildung 20). Die Belegung der PTUs mit *reads* war in allen drei untersuchten Stadien auf einem vergleichbaren Level (Abbildung 21 B). Auch die detaillierte Analyse der dSSRs zeigte für Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten keine Veränderungen in der Position der RNA Polymerase-Komplexe (Abbildung 23). Warum in axenischen Amastigoten und RAD-behandelten

Promastigoten eine dichtere Chromatinstruktur in den dSSRs und Telomerregionen vorherrscht, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Die kombinierte Analyse aus ATAC-seq und PRO-seq in *L. donovani* zeigte allerdings, dass Transkriptionsinitiation nicht von Chromatinstruktur allein, sondern möglicherweise von anderen epigenetischen Faktoren abhängt.

Eine Studie in *T. cruzi* zeigte, dass Chromatinstruktur und RNA Pol II Transkription durch ein Zusammenspiel aus DNA- und Histonmodifikationen und der Organisation und Abundanz von Histonen reguliert werden (Ekanayake and Sabatini, 2011). In *T. cruzi* gehen unterschiedliche Transkriptionsraten mit der Anpassung des Heterochromatins und Modifikationen der Kernstruktur einher (Elias et al., 2001). Auch Histonvarianten spielen eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation und -termination in Trypanosomatida. In *T. brucei* sind die Histonvarianten H2A.Z und H2B.V an potentiellen Transkriptionsstarts lokalisiert, während H3.V und H4.V vor allem in Regionen der Transkriptionstermination angereichert sind (Siegel et al., 2009). In *L. major* scheint H3.V keinen Einfluss auf die Termination der Transkription zu haben (Anderson et al., 2013). Eine spätere Studie zeigte allerdings, dass H3.V und H4.V eine Schlüsselrolle bei der durch RNA Pol I vermittelten Antigen Expression in *T. brucei* einnehmen, indem die Zugänglichkeit der DNA am entsprechenden Genlokus durch die Histonvarianten reguliert und dadurch die Expression der VSGs kontrolliert wird (Muller et al., 2018). Nukleosomen mit Histonvarianten sind zudem instabiler, wodurch die Nukleosomenbelegung in Bereichen mit Histonvarianten dynamischer wird (Siegel et al., 2009). In *T. cruzi* konnte außerdem festgestellt werden, dass sich die Nukleosomenbelegung in Regionen der Transkriptionsinitiation und an Spleiß-Akzeptorstellen zwischen Epimastigoten und Trypomastigoten unterscheidet. Es wird vermutet, dass durch die Nukleosomenbelegung an Spleiß-Akzeptorstellen die Effizienz des *trans*-Spleißens und dadurch die Prozessierung der mRNAs reguliert wird (Lima et al., 2021). Außerdem sind aktive VSG-Gene in *T. brucei* und der Promoter der durch RNA Pol II transkribierten SL-RNA-Gene in *L. tarentolae* frei von Nukleosomen (Figueiredo and Cross, 2010; Hitchcock et al., 2007; Stanne and Rudenko, 2010). Auch der RNA Pol I-abhängige rRNA-Promotor in *L. major* ist nicht von Nukleosomen besetzt, während die intergenische *spacer* Region eine dichte Nukleosomenbelegung aufweist (Vizuet-de-Rueda et al., 2016). In *T. cruzi* sind dSSRs frei von Nukleosomen und Histone in den dSSRs acetyliert, was durch die DNA-Modifikation Base J reguliert wird (Ekanayake and Sabatini, 2011). Histon-Acetylierung am Histon H3 wurde auch in *L. major* mit Transkriptionsinitiation in Verbindung gebracht, da hier ebenfalls Histone der dSSRs acetyliert sind (Thomas et al., 2009). Base J wiederum spielt eine zentrale Rolle in der Transkriptionstermination in *L. major* (van Luenen et al., 2012). Anhand der oben diskutierten Studien lässt sich jedoch erkennen, dass auf dem Gebiet der epigenetischen Regulation der Transkription in Trypanosomatida noch viel Forschungsbedarf besteht. Vor allem in Leishmanien ist bisher nicht viel bekannt, da sich die überwiegende Anzahl an epigenetischen Studien mit der RNA Pol I-abhängigen Transkription der VSGs in *T. brucei* beschäftigen. Mit dem Wissen, dass Regionen der Transkriptionsinitiation von einer

veränderten Chromatinstruktur in den verschiedenen Stadien betroffen sind, wäre eine detailliertere Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen in *L. donovani* interessant. Vor allem die Identifizierung von eu- und heterochromatischen Histonmodifikationen, deren Einfluss auf *reader*-Elemente und die Rekrutierung von DNA-bindenden Proteinen in Regionen der Transkriptionsinitiation sollte in zukünftigen Analysen untersucht werden. Auch Histonvarianten sollten im Hintergrund der Stadiendifferenzierung in *L. donovani* näher analysiert werden, da diese die Chromatinstruktur direkt beeinflussen. Weitere Analysen in dem Gebiet der Epigenetik werden hoffentlich Aufschluss darüber geben, welche Mechanismen im Hinblick auf die polycistronische Transkription in *Leishmania* spp. von Bedeutung sind.

## 4.2 PRO-seq als Methode zur Analyse der Transkription in

### *L. donovani*

In vielen Eukaryoten erfolgt die Anpassung der Genexpression an unterschiedliche Umweltbedingungen durch eine regulierte Transkription abhängig von *cis*-Promotor-Elementen und *trans*-aktivierenden Transkriptionsfaktoren. Daher wird Genexpression in der Regel mit Hilfe von RNA-seq-Experimenten analysiert, wobei das Transkriptom, d. h. die zum jeweiligen Zeitpunkt durch mRNA repräsentierten Gene, mittels genomweiter Hochdurchsatz-Sequenzierung untersucht wird. In *Leishmania* spp. ist das Genom in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert und bisher sind keine RNA Pol II-abhängigen Promotoren mit Ausnahmen eines Promoters des SL-RNA Gens bekannt (Clayton, 2016; Gilinger and Bellofatto, 2001). Durch diese besondere Organisation des Genoms wird die Genexpression in Trypanosomatida nicht über eine regulierte Transkription gesteuert, sondern durch eine Vielzahl anderer Mechanismen. Die mRNA-Menge in der Zelle wird in *Leishmania* spp. zum einen durch die Anzahl von Genkopien beeinflusst und zum anderen durch die Stabilität der mRNA (Iantorno et al., 2017; Larreta et al., 2004; Zilka et al., 2001). RNA-seq ist in *Leishmania* spp. trotz einer Genexpressionskontrolle über mRNA-Stabilität und Translationseffizienz eine weit verbreitete Methode zur Analyse der Genexpression. Allerdings sollten RNA-seq Ergebnisse in *Leishmania* spp. mit Vorsicht betrachtet werden, da RNA-seq lediglich eine Übersicht über die mRNA Abundanz in der Zelle, aber nicht über aktiv translatierte Gene gibt, da die mRNA Abundanz in *Leishmania* quantitativ nicht mit der anschließenden Proteinsynthese korreliert (Bifeld et al., 2018).

Die ATAC-Analysen zeigten, dass im Zuge der Stadiendifferenzierung Veränderungen in der Chromatinstruktur auftreten. Vor allem Bereiche der Transkriptionsinitiation waren in axenischen Amastigoten und in RAD-behandelten Promastigoten geschlossener. Um die Auswirkungen der dichteren Chromatinstruktur auf die aktive Transkription zu analysieren, habe ich PRO-seq (Mahat et al., 2016) in *L. donovani* etabliert. Der Zusammenhang zwischen Chromatinstruktur und Transkription wurde bereits in Abschnitt 4.1.3 diskutiert. PRO-seq ist eine hochempfindliche, genomweite *nuclear run-on* Reaktion mit

anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung, die erstmals in *Drosophila melanogaster* angewandt wurde (Kwak et al., 2013). Dabei ist es möglich, naszierende RNAs durch eine *nuclear run-on*-Reaktion mit Biotin-NTPs zu markieren und nach anschließender Streptavidin Aufreinigung zu analysieren. Dadurch, dass der Einbau eines Biotin-markierten NTPs zum Abbruch der Transkription führt, kann mit PRO-seq darüber hinaus Rückschlüsse auf die Position der RNA Polymerasen gezogen werden. In dieser Arbeit wurde die *nuclear run-on* Reaktion in Gegenwart von Detergenz (Sarkosyl) durchgeführt, wodurch zusätzlich zu der aktiv transkribierten RNA auch Biotin-markierte Transkripte von pausierten RNA Polymerase Komplexe mit aufgereinigt und sequenziert wurden. Darauf wird in Abschnitt 4.2.3 näher eingegangen.

Neben PRO-seq gibt es noch andere Methoden zur Analyse der Transkription und der Position von RNA Polymerase Komplexen. PRO-seq ist eine Weiterentwicklung von GRO-seq (*Global Run-On sequencing*), bei der Bromuridin-markierte, naszierende RNAs über Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend sequenziert werden (Core et al., 2008). Der Vorteil von PRO-seq gegenüber GRO-seq ist, dass die Verwendung von Biotin zum Abbruch der Transkription führt, während der Einbau von Bromuridin keinen Einfluss auf die Transkriptionselongation hat und die RNA Pol II noch weitere Basen einbauen kann. Dadurch ist die Positionsbestimmung der RNA Pol II durch GRO-seq nur auf ~10 bis 20 nt genau, während beim PRO-seq die RNA Polymerase Komplexe Nukleotid-genau lokalisiert werden können (Kwak et al., 2013). Eine andere Alternative zu PRO-seq ist NET-seq (*Native Elongating Transcript sequencing*), bei dem über eine Immunopräzipitation des RNA Pol II Elongationskomplexes die naszierenden RNAs aufgereinigt und sequenziert werden. Dies gibt wie beim PRO-seq die Möglichkeit einer Nukleotid-genauen Auflösung der RNA Pol II-Komplexe. Allerdings kann es bei der Immunopräzipitation durch unspezifische Antikörperbindungen auch zur Präzipitation anderer Komplexe kommen und zudem müssen die naszierenden RNAs mindestens eine Länge von 18 nt aufweisen (Churchman and Weissman, 2011, 2012). Aufgrund der oben genannten Gründe wurde für diese Arbeit PRO-seq etabliert. Im Folgenden soll die Etablierung von PRO-seq und die Besonderheiten der *Leishmania* Transkription näher diskutiert werden.

#### **4.2.1 Etablierung von PRO-seq**

Aufgrund der polycistronischen Transkription und der im Vergleich zu anderen Eukaryoten unterschiedlich ablaufenden RNA-Prozessierung musste für die Anwendung des PRO-seq in Trypanosomatida Modifikationen zum ursprünglichen Protokoll (Mahat et al., 2016) vorgenommen werden. Der größte Unterschied ist die Cap-Struktur am 5' Ende und der Zeitpunkt des *cappings*, weshalb die naszierenden RNAs zum Zeitpunkt des *nuclear run-ons* noch nicht mit einer Cap-Struktur versehen sind (Clayton, 2016). Dadurch ist ein Entfernen der Cap-Struktur während der Herstellung der *librarys* nicht notwendig. Generell stellt diese Arbeit die erste Anwendung von PRO-seq in Trypanosomatida dar, weshalb vor der

Analyse der Daten die Qualität der *librarys* überprüft wurde. Erste Hinweise auf eine hohe Qualität der *librarys* lieferten bereits die PAGE-Aufreinigungen nach der finalen Amplifikation in der Herstellung der *librarys* (Abbildung 25), die mit denen in Mahat et al., 2016 zu vergleichen sind. Da in dieser Arbeit vor allem die aktive Transkription der naszierenden RNAs analysiert werden sollte und die Position der RNA Pol II dafür nicht Nukleotid-genau bestimmt werden muss, wurde die *nuclear run-on* Reaktion nur mit einem Biotin-markierten NTP durchgeführt. Dafür wurde Biotin-markiertes CTP gewählt, da *Leishmania* spp. ein GC-reiches Genom haben (Ivens et al., 2005). Da Biotin zum Abbruch der Transkription führt, sollte das eingebaute NTP das 3' Ende der Sequenzen darstellen. In Kwak et al., 2013 wurde das 3' Ende für *librarys* mit vier verschiedenen Biotin-markierten NTPs überprüft, wobei zu 67 bis 88 % die Substrat-spezifische Base in den Sequenzen identifiziert werden konnte. In dieser Arbeit wurde mit 72 bis 80 % ein ähnliches Level erreicht, was für eine erfolgreiche Herstellung der *librarys* spricht (Abbildung 19 A). Darüber hinaus konnte für alle *librarys* eine gute Qualität festgestellt werden, da über die Analyse der Längen der *reads* keine Degradation der *librarys* festzustellen war (Abbildung 19 B).

#### 4.2.2 Konstitutive Transkription in *L. donovani*

Es gab schon früh Hinweise darauf, dass die Transkription in *Leishmania* spp. konstitutiv erfolgt, nicht reguliert ist und Veränderungen der Genexpression auf einer posttranskriptionellen Ebene gesteuert werden (Brandau et al., 1995; Button et al., 1989; Flinn and Smith, 1992; Hunter et al., 1984; Miller, 1988; Shapira et al., 2001). So konnte mit frühen *nuclear run-on* Analysen gezeigt werden, dass die Transkription der Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 in *L. major* und *L. donovani* als Reaktion auf einen Hitzeschock bei 37 °C nicht erhöht war (Brandau et al., 1995). Eine spätere Microarray Studie in *L. major*, die vor dem Hintergrund der Stadiendifferenzierung durchgeführt wurde, bestätigte diese konstitutive Expression der mRNAs (Leifso et al., 2007). Im Allgemeinen ist das Level der unterschiedlichen mRNA-Abundanz zwischen Promastigoten und Amastigoten mit 0,2 bis 5 % gering (Cohen-Freue et al., 2007). Auch dass einige Gene polycistronisch transkribiert werden, wurde schon Ende der 1980er/ Anfang der 1990er Jahre vermutet (Button et al., 1989; Flinn and Smith, 1992). In *L. donovani* wurde durch *nuclear run-on* Analysen im HSP100 Genlokus die polycistronische Transkription näher analysiert und eine einheitliche Verteilung der RNA Pol II beobachtet (Wiesgigl and Clos, 1999). Im HSP70 Lokus in *L. major* hingegen, wurde eine geringere Transkription in den intergenischen Bereichen festgestellt (Dresel and Clos, 1997). Im Zuge des Genomprojektes in *Leishmania* spp. wurde zudem eine Genomorganisation in polycistronischen Transkriptionseinheiten gezeigt (Ivens et al., 2005; Myler and Stuart, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern den endgültigen Beweis für eine polycistronische Transkription in *L. donovani*. Die PTUs waren in Transkriptionsrichtung in allen Replikaten durchgehend mit PRO-seq *reads* bedeckt (Abbildung 20 & 21 C). Zudem wurde in der allgemeinen Belegung der PTUs zwischen Promastigoten und chemisch bzw. Temperatur/pH-induzierten

Amastigoten kaum Unterschiede beobachtet (Abbildung 21 A, B), woraus sich schließen lässt, dass die veränderten Umweltbedingungen nicht zu einer veränderten Transkription in *L. donovani* führen. Aber nicht nur veränderte Umweltbedingungen allgemein zeigten keinen Einfluss auf die Transkription, sondern auch der durch RAD-induzierte Wachstumsarrest der Promastigoten ändert das Niveau der Transkription nicht. Diese Ergebnisse des PRO-seq bestätigen somit eine konstitutive Transkription des Genoms von *L. donovani*.

Da in Proteomanalysen (Rosenzweig et al., 2008b) und *ribosome profiling* Analysen (Bifeld et al., 2018) aber durchaus Unterschiede im Zuge der Stadiendifferenzierung auftreten, bekräftigen meine PRO-seq Ergebnisse eine posttranskriptionelle Regulation der Genexpression. Die Rolle der mRNA-Stabilität in Bezug auf die mRNA-Abundanz kann zukünftig ebenfalls mit Hilfe dieser PRO-seq Daten analysiert werden, jedoch werden dafür zugehörige RNA-seq Daten benötigt (Blumberg et al., 2021). Auch eine durchgehende Transkription der PTUs konnte durch meine Ergebnisse bestätigt werden, da das Level der Transkription in intergenischen Regionen zwischen den mRNA-kodierenden Bereichen aufrecht erhalten wird. Im Vergleich zu einer ~35 bis 40-fachen Belegung der mRNA-kodierenden Bereiche zeigten die intergenischen Bereiche immer noch eine 30-fache Belegung mit *reads* (Abbildung 21 B). Des Weiteren zeigten die Alignments der PRO-seq *reads* (Abbildung 20), dass die Zuordnung der *reads* auf den Chromosomen innerhalb der PTUs Strang-spezifisch entsprechend des transkribierten Stranges erfolgte und innerhalb der SSRs wechselte.

### 4.2.3 Transkriptionsinitiation in *L. donovani*

Bisher ist wenig bekannt über die Regulation der Transkriptionsinitiation der RNA Pol II-abhängigen PTUs in *Leishmania* spp. Ein Promoter für die Transkription durch RNA Pol II wurde in *Leishmania* bisher nur für den SL-RNA-Gen Locus identifiziert, wobei die Positionen der Transkriptionsinitiation stromaufwärts der PTUs bisher unklar sind (Gilinger and Bellofatto, 2001). In *L. major* konnte auf zwei Chromosomen gezeigt werden, dass die Transkription innerhalb der dSSRs in einer bestimmten Region initiiert (Martinez-Calvillo et al., 2004; Martínez-Calvillo et al., 2003). Genomweite Studien wurden in *Leishmania* spp. bisher jedoch nicht durchgeführt. In dieser Arbeit wurden alle 62 dSSRs in *L. donovani* analysiert und dadurch die Bereiche der Transkriptionsinitiation innerhalb der dSSRs genomweit eingegrenzt (Tabelle 35). Dabei konnte bestätigt werden, dass die Transkription mit Ausnahme von vier PTUs innerhalb der dSSRs initiiert. Allerdings initiiert die Transkription nicht in allen dSSRs in einer Region, teilweise konnte in den dSSRs ein Bereich mittig beobachtet werden, in denen keine Transkription stattfand. Zu betonen ist an dieser Stelle jedoch, dass anhand der PRO-seq Daten nicht unterschieden werden kann, welche *reads* tatsächlich von aktiv transkribierenden RNA Pol II Komplexen stammen und welche von pausierten RNA Pol II Komplexen, sodass die Position der Transkriptionsinitiation mit diesen PRO-seq Daten nicht Nukleotid-genau eingegrenzt werden kann.

Die größte Anzahl von Analysen bezüglich der Transkriptionsinitiation in Trypanosomatida wurde bisher in *T. brucei* durchgeführt. Eine Studie aus dem Jahr 2017 (Wedel et al., 2017) beschäftigte sich mit der Identifikation von Promotorelementen in *T. brucei* und konnte zeigen, dass in Regionen von potentieller Transkriptionsinitiation vor allem GT-reiche Sequenzen vorkommen. Zudem führte die Insertion eines 210 nt bzw. 416 nt langen, synthetisch hergestellten GT-reichen Fragmenten in einer Region, in der normalerweise keine Transkription initiiert wird zu einer Initiation der Transkription. Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2022 beschäftigt sich ebenfalls mit Promotoren in *T. brucei* (Cordon-Obras et al., 2022). Hier wurden die von RNA Pol II besetzten Bereiche durch ChIP-seq (*Chromatin immunoprecipitation and sequencing*) detaillierter analysiert, um Promotorelemente zu identifizieren. Die Transkription initiiert nicht immer an einem Promoter, sondern teilweise an zwei in der dSSR auseinander liegenden Promotoren. Dies wurde auch in unseren PRO-seq Daten in *L. donovani* beobachtet. Zur Identifikation von Promotoren wurde in *T. brucei* anschließend eine dSSR auf Chromosom 7 mit Luciferase-Assays näher analysiert, wobei ein 75 bp langes Promotorelement, das für die Transkriptionsinitiation essentiell ist, identifiziert wurde. Nachfolgende Motiv-Analysen zeigten zwei verschiedene konservierte DNA-Elemente in den dSSRs, die entweder überwiegend T-reiche oder GT-reiche Sequenzen beinhalteten (Cordon-Obras et al., 2022). Die Transkription initiiert in Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten immer in der gleichen Region, weshalb solche Elemente wie auf Chromosom 7 vermutlich auch im Genom von *L. donovani* eine Rolle spielen.

Teilweise waren in den analysierten dSSRs unterschiedlich stark ausgeprägte Peaks zwischen Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten zu beobachten (Tabelle 35). Die Experimente sollten ohne Zugabe von Sarkosyl in der *nuclear run-on* Reaktion wiederholt werden, um festzustellen, ob es sich bei diesen Peaks um pausierende RNA Pol II handelt. *Promoter-proximal pausing* ist ein bekannter Mechanismus zur Regulation der Transkription und weit verbreitet in Metazoen. RNA Pol II pausiert in der Promotor-proximalen Region kurz nach den Transkriptionsstarts, wodurch Transkriptions-elongation schneller aufgenommen werden kann (Adelman and Lis, 2012). Ob *promoter-proximal pausing* auch in *Leishmania* spp. auftritt und ein relevanter Mechanismus ist, kann an dieser Stelle noch nicht beantwortet werden. Cordon-Obras et al., 2022 liefern Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus auch in Trypanosomatida existiert. Eine weitere Studie in *L. major* postuliert darüber hinaus, dass pausierende RNA Pol II mit Replikationsursprüngen in Bereichen mit niedriger Nukleosomen-Belegung korrelieren könnten (Lombrana et al., 2016). Allerdings wurden in der Studie einzig die Replikationsursprünge genomweit identifiziert und potentielle RNA Pol II *pausing sites* nur vermutet.

#### 4.2.4 Transkriptionstermination in *L. donovani*

Transkriptionstermination ist in Eukaryoten bisher nicht komplett verstanden und es gibt verschiedene Theorien, wie die Transkription terminiert (Porrúa and Libri, 2015). Auch die Transkriptionstermination stellt einen wichtigen Mechanismus der Genexpressionskontrolle dar, da es bei einer fehlenden Termination zur *read through* Transkription kommt, wodurch die Transkription nachfolgender Gene beeinflusst werden kann. In *Leishmania* spp. ist Base J dafür verantwortlich, eine *read through* Transkription zu verhindern (Reynolds et al., 2014; van Luenen et al., 2012). Kürzlich wurde gezeigt, dass ein Base J-bindendes Protein, JBP3, mit drei in anderen Eukaryoten für die Transkriptionsregulation bedeutenden Proteinkomplexen assoziiert ist und dass geringere Expression ebenfalls zu einer *read through* Transkription führt (Jensen et al., 2021). Diese Proteinkomplexe wurden als Chromatin-assoziierte Proteine identifiziert, da die Proteine typische Domänen, wie eine SET-Domäne, eine Chromo-Domäne oder eine Chromoshadow-Domäne enthielten. In *T. brucei* wurde diese zentrale Rolle für Base J und JBP3 in der Transkriptionstermination ebenfalls gezeigt (Kieft et al., 2020). Meine ATAC-seq Daten konnten zudem zeigen, dass Bereiche der Transkriptionstermination häufig eine Präferenz für offenes Chromatin hatten (Abbildung 15 C, D). Diese offenen Chromatinbereiche in Regionen der Transkriptionstermination traten auch in ATAC-seq Analysen in *Arabidopsis thaliana* auf (Lu et al., 2017).

Transkription terminiert in *Leishmania* spp. in den konvergenten SSRs zwischen den PTUs (Clayton, 2016). Eine Analyse aller 48 cSSRs in *L. donovani* konnten eine Termination der Transkription innerhalb cSSRs bis auf wenige Ausnahmen bestätigen (Tabelle 37). Für die Termination der Transkription muss die RNA Pol II die Transkription verlangsamen oder pausieren (Chen et al., 2018). In unseren PRO-seq Daten wurde in vielen cSSRs ein Peak beobachtet, was das Pausieren der RNA Pol II am Ende der Transkription widerspiegeln könnte (Tabelle 37). Allerdings sind in einigen cSSRs auch tRNA-Gene lokalisiert, die mit hohen Peaks belegt sind. Hier kann aktuell nicht unterschieden werden, welche Peaks RNA Pol II und welche RNA Pol III zugeordnet werden können. Um die verschiedenen RNA Polymerasen unterscheiden zu können, sollte z.B. mit ChIP-seq analysiert werden, um welche RNA Pol es sich handelt oder PRO-seq Experimente mit  $\alpha$ -Amanitin durchgeführt werden, um die RNA Pol II Transkription zu inhibieren. Die hohe Belegung mit *reads* von tRNA-Genen, aber auch von rRNA-Genen und dem SL-RNA Genlokus lässt sich dadurch erklären, dass eine Vielzahl von tRNAs, rRNAs und SL-RNAs für die mRNA-Prozessierung und Translation in der Zelle benötigt werden und deswegen viel transkribiert werden. Die ATAC-seq Ergebnisse zeigten zudem, dass alle tRNA-, rRNA- und SL-RNA-Gene in offenen Chromatinbereichen in *L. donovani* lokalisiert sind.

## 4.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Hochdurchsatz-Sequenziermethoden, ATAC-seq und PRO-seq, in *L. donovani* etabliert und dadurch neue Erkenntnisse im Bereich der Chromatinverpackung und Transkription gewonnen werden. Mit ATAC-seq wurden Veränderungen in der Chromatinstruktur im Hintergrund der Stadiendifferenzierung analysiert, wobei in den Regionen der Transkriptionsinitiation in axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten im Vergleich zu Promastigoten ein dichteres Chromatin vorherrschend war. Diese Ergebnisse grenzten die bereits in *micrococcal nuclease* Assays beobachtete dichtere Chromatinstruktur in chemisch und Temperatur/pH-induzierter Differenzierung auf bestimmte Bereiche des Genoms ein.

Nachfolgend sollte analysiert werden, inwiefern die dichtere Chromatinstruktur in Regionen der Transkriptionsinitiation einen Einfluss auf die aktive Transkription in *L. donovani* hat. Dafür wurde die aktive Transkription mit PRO-seq genomweit analysiert. Es konnten jedoch keine großen Veränderungen in der Transkription in Promastigoten, axenischen Amastigoten und RAD-behandelten Promastigoten beobachtet werden, was eine konstitutive Transkription des Genoms von *L. donovani* bestätigt. Allerdings gaben die PRO-seq Daten genomweit Aufschluss über die Regionen der Transkriptionsinitiation und -termination, wobei die Regionen in allen drei analysierten Stadien übereinstimmten. Dies lässt vermuten, dass auch in *L. donovani* möglicherweise *cis*-Elemente in der DNA-Sequenz an der Initiation der Transkription beteiligt sind. Außerdem gab die genaue Analyse der dSSRs und cSSRs erste Hinweise auf pausierende RNA Pol II Komplexe in *L. donovani*. Ob *promoter-proximal pausing* eine Rolle in der Transkription in *Leishmania* spp. spielt, sollte mit weiteren PRO-seq Experimenten, in denen nur die aktive Transkription untersucht wird, aufgelöst werden. Darüber hinaus wurde eine durchgehende Transkription der PTUs auch in intergenischen Bereichen gezeigt, was das Konzept einer polycistronischen Transkription erstmals auf RNA-Synthese-Ebene genomweit bestätigt. Auch die Regulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene wurde bekräftigt, da offensichtlich auf Transkriptionsebene keine Regulation erfolgt. Eine zukünftige, vergleichende Analyse aus PRO-seq und RNA-seq können zudem Aufschluss über die Rolle von mRNA-Stabilität als posttranskriptioneller Mechanismus liefern und identifizieren welche mRNAs davon betroffen sind. Inwiefern epigenetische Mechanismen und die Chromatinstruktur eine Rolle in der Transkriptionskontrolle spielen konnte nicht abschließend beantwortet werden.

## Bibliografie

- Adelman, K., and Lis, J.T. (2012). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet* 13, 720-731.
- Afrin, F., Khan, I., and Hemeg, H.A. (2019). Leishmania-Host Interactions-An Epigenetic Paradigm. *Front Immunol* 10, 492.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Alsford, S., and Horn, D. (2012). Cell-cycle-regulated control of VSG expression site silencing by histones and histone chaperones ASF1A and CAF-1b in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research* 40, 10150-10160.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and Team, W.H.O.L.C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
- Alves, F., Bilbe, G., Blesson, S., Goyal, V., Monnerat, S., Mowbray, C., Muthoni Ouattara, G., Pecoul, B., Rijal, S., Rode, J., *et al.* (2018). Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. *Clin Microbiol Rev* 31.
- Anderson, B.A., Wong, I.L., Baugh, L., Ramasamy, G., Myler, P.J., and Beverley, S.M. (2013). Kinetoplastid-specific histone variant functions are conserved in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 191, 53-57.
- Azizi, H., Dumas, C., and Papadopoulou, B. (2017). The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in *Leishmania*. *RNA* 23, 1874-1885.
- Barak, E., Amin-Spector, S., Gerliak, E., Goyard, S., Holland, N., and Zilberstein, D. (2005). Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol* 141, 99-108.
- Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., and Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56, 711-721.
- Bates, P.A. (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* 108, 1-9.
- Bates, P.A., Robertson, C.D., Tetley, L., and Coombs, G.H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105 (Pt 2), 193-202.

- Bates, P.A., and Rogers, M.E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 4, 601-609.
- Beere, H.M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117, 2641-2651.
- Bekhit, A.A., El-Agroudy, E., Helmy, A., Ibrahim, T.M., Shavandi, A., and Bekhit, A.E.A. (2018). *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. *Eur J Med Chem* 160, 229-244.
- Belli, S.I. (2000). Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* 30, 679-687.
- Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., Clos, J., and Bruchhaus, I. (2003). Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3, 1811-1829.
- Berlowitz, L. (1974). Chromosomal inactivation and reactivation in mealy bugs. *Genetics* 78, 311-322.
- Bhattacharya, S.K., and Dash, A.P. (2017). Elimination of Kala-Azar from the Southeast Asia Region. *Am J Trop Med Hyg* 96, 802-804.
- Bifeld, E., Lorenzen, S., Bartsch, K., Vasquez, J.J., Siegel, T.N., and Clos, J. (2018). Ribosome Profiling Reveals HSP90 Inhibitor Effects on Stage-Specific Protein Synthesis in *Leishmania donovani*. *mSystems* 3.
- Blumberg, A., Zhao, Y., Huang, Y.F., Dukler, N., Rice, E.J., Chivu, A.G., Krumholz, K., Danko, C.G., and Siepel, A. (2021). Characterizing RNA stability genome-wide through combined analysis of PRO-seq and RNA-seq data. *BMC Biol* 19, 30.
- Bogdan, C., and Rollinghoff, M. (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28, 121-134.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M., and Papadopoulou, B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277, 19511-19520.
- Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J. (1995). High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J* 310 ( Pt 1), 225-232.
- Bringaud, F., Muller, M., Cerqueira, G.C., Smith, M., Rochette, A., El-Sayed, N.M., Papadopoulou, B., and Ghedin, E. (2007). Members of a large retroposon family are

determinants of post-transcriptional gene expression in Leishmania. *PLoS Pathog* 3, 1291-1307.

Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* 10, 1213-1218.

Buenrostro, J.D., Wu, B., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2015a). ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr Protoc Mol Biol* 109, 21 29 21-21 29 29.

Buenrostro, J.D., Wu, B., Litzenger, U.M., Ruff, D., Gonzales, M.L., Snyder, M.P., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2015b). Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* 523, 486-490.

Button, L.L., Russell, D.G., Klein, H.L., Medina-Acosta, E., Karess, R.E., and McMaster, W.R. (1989). Genes encoding the major surface glycoprotein in Leishmania are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. *Mol Biochem Parasitol* 32, 271-283.

Carpenter, B.G., Baldwin, J.P., Bradbury, E.M., and Ibel, K. (1976). Organisation of subunits in chromatin. *Nucleic Acids Res* 3, 1739-1746.

Carper, S.W., Duffy, J.J., and Gerner, E.W. (1987). Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res* 47, 5249-5255.

Chandra, U., Yadav, A., Kumar, D., and Saha, S. (2017). Cell cycle stage-specific transcriptional activation of cyclins mediated by HAT2-dependent H4K10 acetylation of promoters in Leishmania donovani. *PLoS Pathog* 13, e1006615.

Chen, F.X., Smith, E.R., and Shilatifard, A. (2018). Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 464-478.

Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J.Y., and Chien, S. (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng* 19, 195-219.

Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* 18, 5355-5363.

Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368-373.

Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2012). Native elongating transcript sequencing (NET-seq). *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 4, Unit 4 14 11-17.

Cintron, N.S., and Toft, D. (2006). Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J Biol Chem* 281, 26235-26244.

Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21, 1881-1888.

Clayton, C.E. (2016). Gene expression in Kinetoplastids. *Curr Opin Microbiol* 32, 46-51.

Clos, J., Brandau, S., and Hoyer, C. (1998). Chemical Stress does not Induce Heat Shock Protein Synthesis in *Leishmania donovani*. *Protist* 149, 167-172.

Cloutier, S., Laverdiere, M., Chou, M.N., Boilard, N., Chow, C., and Papadopoulou, B. (2012). Translational control through eIF2alpha phosphorylation during the *Leishmania* differentiation process. *PLoS One* 7, e35085.

Cohen-Freue, G., Holzer, T.R., Forney, J.D., and McMaster, W.R. (2007). Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37, 1077-1086.

Cook, A.J., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I., and Almouzni, G. (2011). A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain. *Molecular cell* 44, 918-927.

Cordon-Obras, C., Gomez-Linan, C., Torres-Rusillo, S., Vidal-Cobo, I., Lopez-Farfan, D., Barroso-Del Jesus, A., Rojas-Barros, D., Carrington, M., and Navarro, M. (2022). Identification of sequence-specific promoters driving polycistronic transcription initiation by RNA polymerase II in trypanosomes. *Cell Rep* 38, 110221.

Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845-1848.

Croft, S.L., Sundar, S., and Fairlamb, A.H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.

Cuyppers, B., Dumetz, F., Meysman, P., Laukens, K., De Muylder, G., Dujardin, J.C., and Domagalska, M.A. (2020). The Absence of C-5 DNA Methylation in *Leishmania donovani* Allows DNA Enrichment from Complex Samples. *Microorganisms* 8.

D'Souza, S.M., and Brown, I.R. (1998). Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress Chaperones* 3, 188-199.

Das, V.N.R., Bimal, S., Siddiqui, N.A., Kumar, A., Pandey, K., Sinha, S.K., Topno, R.K., Mahentesh, V., Singh, A.K., Lal, C.S., *et al.* (2020). Conversion of asymptomatic infection to symptomatic visceral leishmaniasis: A study of possible immunological markers. *PLoS Negl Trop Dis* 14, e0008272.

- David, C.V., and Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy* 22, 491-502.
- Denninger, V., Fullbrook, A., Bessat, M., Ersfeld, K., and Rudenko, G. (2010). The FACT subunit TbSpt16 is involved in cell cycle specific control of VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology* 78, 459-474.
- Descoteaux, A., Avila, H.A., Zhang, K., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2002). Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J* 21, 4458-4469.
- Dhalia, R., Reis, C.R., Freire, E.R., Rocha, P.O., Katz, R., Muniz, J.R., Standart, N., and de Melo Neto, O.P. (2005). Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140, 23-41.
- Dias-Lopes, G., Zabala-Penafiel, A., de Albuquerque-Melo, B.C., Souza-Silva, F., Menaguali do Canto, L., Cysne-Finkelstein, L., and Alves, C.R. (2021). Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. *Acta Trop* 220, 105956.
- Dresel, A., and Clos, J. (1997). Transcription of the *Leishmania major* Hsp70-I gene locus does not proceed through the noncoding region. *Exp Parasitol* 86, 206-212.
- Dumetz, F., Cuypers, B., Imamura, H., Zander, D., D'Haenens, E., Maes, I., Domagalska, M.A., Clos, J., Dujardin, J.C., and De Muylder, G. (2018). Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in *Leishmania donovani* on the Indian Subcontinent. *mSphere* 3.
- Duraisingh, M.T., and Horn, D. (2016). Epigenetic Regulation of Virulence Gene Expression in Parasitic Protozoa. *Cell Host Microbe* 19, 629-640.
- Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., and Chatterjee, M. (2007). Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 56, 629-636.
- Echtenkamp, F.J., Gvozdenov, Z., Adkins, N.L., Zhang, Y., Lynch-Day, M., Watanabe, S., Peterson, C.L., and Freeman, B.C. (2016). Hsp90 and p23 Molecular Chaperones Control Chromatin Architecture by Maintaining the Functional Pool of the RSC Chromatin Remodeler. *Molecular cell* 64, 888-899.
- Ekanayake, D., and Sabatini, R. (2011). Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in *Trypanosoma cruzi*: modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation. *Eukaryot Cell* 10, 1465-1472.
- Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E., and Schenkman, S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol* 112, 79-90.

- Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., and Shaw, J.J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology* 145, 430-442.
- Figueiredo, L.M., and Cross, G.A. (2010). Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. *Eukaryot Cell* 9, 148-154.
- Figueiredo, L.M., Cross, G.A., and Janzen, C.J. (2009). Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol* 7, 504-513.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29-36.
- Flinn, H.M., and Smith, D.F. (1992). Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 20, 755-762.
- Gilinger, G., and Bellofatto, V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic acids research* 29, 1556-1564.
- Gossage, S.M., Rogers, M.E., and Bates, P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33, 1027-1034.
- Graefe, S.E.B., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., and Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryotic Cell* 1, 936-943.
- Grunebast, J., and Clos, J. (2020). *Leishmania*: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. *Comput Struct Biotechnol J* 18, 4016-4023.
- Grunebast, J., Lorenzen, S., Zummack, J., and Clos, J. (2021). Life Cycle Stage-Specific Accessibility of *Leishmania donovani* Chromatin at Transcription Start Regions. *mSystems* 6, e0062821.
- He, W.T., Xue, W., Gao, Y.G., Hong, J.Y., Yue, H.W., Jiang, L.L., and Hu, H.Y. (2017). HSP90 recognizes the N-terminus of huntingtin involved in regulation of huntingtin aggregation by USP19. *Sci Rep* 7, 14797.
- Hecker, H., and Gander, E.S. (1985). The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. *Biol Cell* 53, 199-208.
- Hitchcock, R.A., Thomas, S., Campbell, D.A., and Sturm, N.R. (2007). The promoter and transcribed regions of the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene array are devoid of nucleosomes. *BMC Microbiol* 7, 44.

- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M., and Clos, J. (2013). The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell Microbiol* 15, 585-600.
- Hunter, K.W., Cook, C.L., and Hayunga, E.G. (1984). Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 125, 755-760.
- Iantorno, S.A., Durrant, C., Khan, A., Sanders, M.J., Beverley, S.M., Warren, W.C., Berriman, M., Sacks, D.L., Cotton, J.A., and Grigg, M.E. (2017). Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. *mBio* 8.
- Ikeogu, N.M., Akaluka, G.N., Edechi, C.A., Salako, E.S., Onyilagha, C., Barazandeh, A.F., and Uzonna, J.E. (2020). *Leishmania* Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. *Microorganisms* 8.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218-223.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- Jackson, S.E. (2013). Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem* 328, 155-240.
- Jensen, B.C., Phan, I.Q., McDonald, J.R., Sur, A., Gillespie, M.A., Ranish, J.A., Parsons, M., and Myler, P.J. (2021). Chromatin-Associated Protein Complexes Link DNA Base J and Transcription Termination in *Leishmania*. *mSphere* 6.
- Jha, P.K., Khan, M.I., Mishra, A., Das, P., and Sinha, K.K. (2017). HAT2 mediates histone H4K4 acetylation and affects micrococcal nuclease sensitivity of chromatin in *Leishmania donovani*. *PLoS One* 12, e0177372.
- Karmakar, S., Ismail, N., Oliveira, F., Oristian, J., Zhang, W.W., Kaviraj, S., Singh, K.P., Mondal, A., Das, S., Pandey, K., *et al.* (2021). Preclinical validation of a live attenuated dermatotropic *Leishmania* vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. *Commun Biol* 4, 929.
- Kaur, P., Garg, M., Hombach-Barrigah, A., Clos, J., and Goyal, N. (2017). MAPK1 of *Leishmania donovani* interacts and phosphorylates HSP70 and HSP90 subunits of foldosome complex. *Scientific reports* 7, 10202.
- Kelly, F.D., Yates, P.A., and Landfear, S.M. (2021). Nutrient sensing in *Leishmania*: Flagellum and cytosol. *Mol Microbiol* 115, 849-859.

- Kieft, R., Zhang, Y., Marand, A.P., Moran, J.D., Bridger, R., Wells, L., Schmitz, R.J., and Sabatini, R. (2020). Identification of a novel base J binding protein complex involved in RNA polymerase II transcription termination in trypanosomes. *PLoS Genet* 16, e1008390.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46, 931-954.
- Kröber-Boncardo, C., Grünebast, J., and Clos, J. (2020). Heat Shock Proteins in Leishmania Parasites. *Heat Shock Proteins Springer, Dordrecht*.
- Kumar, D., Rajanala, K., Minocha, N., and Saha, S. (2012). Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. *Microbiology (Reading)* 158, 328-337.
- Kumar, D., and Saha, S. (2015). HAT3-mediated acetylation of PCNA precedes PCNA monoubiquitination following exposure to UV radiation in *Leishmania donovani*. *Nucleic acids research* 43, 5423-5441.
- Kwak, H., Fuda, N.J., Core, L.J., and Lis, J.T. (2013). Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science* 339, 950-953.
- Laffitte, M.N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res* 5, 2350.
- Lahav, T., Sivam, D., Volpin, H., Ronen, M., Tsigankov, P., Green, A., Holland, N., Kuzyk, M., Borchers, C., Zilberstein, D., *et al.* (2011). Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB J* 25, 515-525.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10, R25.
- Larreta, R., Soto, M., Alonso, C., and Requena, J.M. (2000). *Leishmania infantum*: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Exp Parasitol* 96, 108-115.
- Larreta, R., Soto, M., Quijada, L., Folgueira, C., Abanades, D.R., Alonso, C., and Requena, J.M. (2004). The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* 5, 3.
- Lawrence, F., and Robert-Gero, M. (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4414-4417.

Leach, M.D., Farrer, R.A., Tan, K., Miao, Z., Walker, L.A., Cuomo, C.A., Wheeler, R.T., Brown, A.J., Wong, K.H., and Cowen, L.E. (2016). Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans*. *Nat Commun* 7, 11704.

LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., and Beverley, S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7, 996-1007.

Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A., and McMaster, W.R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152, 35-46.

Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987-2993.

Liang, G., Lin, J.C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J.C., Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Egger, G., Takai, D., and Gonzales, F.A. (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 7357-7362.

Lima, A.R.J., de Araujo, C.B., Bispo, S., Patane, J., Silber, A.M., Elias, M.C., and da Cunha, J.P.C. (2021). Nucleosome landscape reflects phenotypic differences in *Trypanosoma cruzi* life forms. *PLoS Pathog* 17, e1009272.

Lindoso, J.A.L., Moreira, C.H.V., Cunha, M.A., and Queiroz, I.T. (2018). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV AIDS (Auckl)* 10, 193-201.

Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.

Littau, V.C., Burdick, C.J., Allfrey, V.G., and Mirsky, S.A. (1965). The role of histones in the maintenance of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 1204-1212.

Lombrana, R., Alvarez, A., Fernandez-Justel, J.M., Almeida, R., Poza-Carrion, C., Gomes, F., Calzada, A., Requena, J.M., and Gomez, M. (2016). Transcriptionally Driven DNA Replication Program of the Human Parasite *Leishmania major*. *Cell Rep* 16, 1774-1786.

Lu, Z., Hofmeister, B.T., Vollmers, C., DuBois, R.M., and Schmitz, R.J. (2017). Combining ATAC-seq with nuclei sorting for discovery of cis-regulatory regions in plant genomes. *Nucleic Acids Res* 45, e41.

Mahat, D.B., Kwak, H., Booth, G.T., Jonkers, I.H., Danko, C.G., Patel, R.K., Waters, C.T., Munson, K., Core, L.J., and Lis, J.T. (2016). Base-pair-resolution genome-wide mapping of active RNA polymerases using precision nuclear run-on (PRO-seq). *Nat Protoc* 11, 1455-1476.

- Manuelidis, L. (1990). A view of interphase chromosomes. *Science* 250, 1533-1540.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011 17, 3.
- Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., and Myler, P.J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3, 506-517.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., and Myler, P.J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region. *Molecular cell* 11, 1291-1299.
- Masina, S., Zangger, H., Rivier, D., and Fasel, N. (2007). Histone H1 regulates chromatin condensation in *Leishmania* parasites. *Exp Parasitol* 116, 83-87.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., and Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* 255, 11992-11996.
- McCarthy, B.J., Nishiura, J.T., and Farquhar, M.N. (1974). Chromatin structure and gene expression in eukaryotes. *Adv Exp Med Biol* 44, 71-93.
- McNicoll, F., Muller, M., Cloutier, S., Boilard, N., Rochette, A., Dube, M., and Papadopoulou, B. (2005). Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 280, 35238-35246.
- Miller, J. (1988). Effects of temperature elevation on mRNA and protein synthesis in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 30, 175-184.
- Moreira, M.E., Del Portillo, H.A., Milder, R.V., Balanco, J.M., and Barcinski, M.A. (1996). Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 167, 305-313.
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J.E., Kaye, P.M., and Chatterjee, M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends Parasitol* 30, 65-74.
- Muller, L.S.M., Cosentino, R.O., Forstner, K.U., Guizetti, J., Wedel, C., Kaplan, N., Janzen, C.J., Arampatzi, P., Vogel, J., Steinbiss, S., *et al.* (2018). Genome organization and DNA accessibility control antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 563, 121-125.
- Myler, P.J., and Stuart, K.D. (2000). Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Curr Opin Microbiol* 3, 412-416.
- Okwor, I., and Uzonna, J. (2016). Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 94, 489-493.

Olinski, R., Starczak, M., and Gackowski, D. (2016). Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? *Mutat Res Rev Mutat Res* 767, 59-66.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105-116.

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* 17, 4829-4836.

Passelli, K., Billion, O., and Tacchini-Cottier, F. (2021). The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by Leishmania Infection. *Front Immunol* 12, 649348.

Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nature genetics* 39, 839-847.

Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P., and Spath, G.F. (2011). Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt Leishmania donovani for axenic and intracellular proliferation. *Cell Microbiol* 13, 978-991.

Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59, 1640-1648.

Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.C., Barrett, M.P., Lopez-Velez, R., Garcia-Hernandez, R., Pountain, A.W., Mwenechanya, R., and Papadopolou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0006052.

Porrua, O., and Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 190-202.

Prodromou, C., Nuttall, J.M., Millson, S.H., Roe, S.M., Sim, T.S., Tan, D., Workman, P., Pearl, L.H., and Piper, P.W. (2009). Structural basis of the radicicol resistance displayed by a fungal hsp90. *ACS Chem Biol* 4, 289-297.

Quijada, L., Soto, M., Alonso, C., and Requena, J.M. (2000). Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in Leishmania infantum. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110, 79-91.

Requena, J.M. (2011). Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in Leishmania. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 2069-2085.

Reynolds, D., Cliffe, L., Forstner, K.U., Hon, C.C., Siegel, T.N., and Sabatini, R. (2014). Regulation of transcription termination by glucosylated hydroxymethyluracil, base J, in Leishmania major and Trypanosoma brucei. *Nucleic Acids Res* 42, 9717-9729.

- Reynolds, D., Hofmeister, B.T., Cliffe, L., Alabady, M., Siegel, T.N., Schmitz, R.J., and Sabatini, R. (2016). Histone H3 Variant Regulates RNA Polymerase II Transcription Termination and Dual Strand Transcription of siRNA Loci in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Genet* 12, e1005758.
- Rittig, M.G., and Bogdan, C. (2000). Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16, 292-297.
- Rochette, A., Raymond, F., Corbeil, J., Ouellette, M., and Papadopoulou, B. (2009). Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 165, 32-47.
- Rogers, M.B., Hilley, J.D., Dickens, N.J., Wilkes, J., Bates, P.A., Depledge, D.P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., *et al.* (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* 21, 2129-2142.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P.J., Olafson, R.W., and Zilberstein, D. (2008a). Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 8, 1843-1850.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R.W., and Zilberstein, D. (2008b). Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22, 590-602.
- Rougvie, A.E., and Lis, J.T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54, 795-804.
- Ruiz-Postigo, J.A., Grouta, I., & Jaina, S. (2018). Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Weekly epidemiological Record* 25, 265-280.
- Ruiz-Postigo, J.A., Jain, S., Maia-Elkhoury, A. M. A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Yajima, A., & Gasimov, E. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une periode de reference pour la feuille de route a l'horizon 2030. *Weekly Epidemiological Record* 35, 401+.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S.J., and Zilberstein, D. (1998). Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 95, 9-20.
- Sacks, D.L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 3, 189-196.

Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2000). The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 406-411.

Sacks, D.L., Pimenta, P.F., McConville, M.J., Schneider, P., and Turco, S.J. (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 181, 685-697.

Saunders, E.C., Ng, W.W., Kloehn, J., Chambers, J.M., Ng, M., and McConville, M.J. (2014). Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. *PLoS Pathog* 10, e1003888.

Scheibel, T., and Buchner, J. (1998). The Hsp90 complex--a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem Pharmacol* 56, 675-682.

Shapira, M., Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Dahan, I., and Yavesky, V. (2001). Post transcriptional control of gene expression in *Leishmania*. *Med Microbiol Immunol* 190, 23-26.

Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyó, D., Wang, X., Dewell, S., and Cross, G.A. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23, 1063-1076.

Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., *et al.* (2010). *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 185, 5011-5022.

Smith, J.P., Dutta, A.B., Sathyan, K.M., Guertin, M.J., and Sheffield, N.C. (2021). PEPPRO: quality control and processing of nascent RNA profiling data. *Genome Biol* 22, 155.

Soto, M., Iborra, S., Quijada, L., Folgueira, C., Alonso, C., and Requena, J.M. (2004). Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* 379, 617-625.

Soto, M., Quijada, L., Alonso, C., and Requena, J.M. (2000). Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem J* 346 Pt 1, 99-105.

Soto-Serna, L.E., Diupotex, M., Zamora-Chimal, J., Ruiz-Remigio, A., Delgado-Dominguez, J., Cervantes-Sarabia, R.B., Mendez-Bernal, A., Escalona-Montano, A.R., Aguirre-Garcia, M.M., and Becker, I. (2020). *Leishmania mexicana*: Novel Insights of Immune Modulation through Amastigote Exosomes. *J Immunol Res* 2020, 8894549.

- Stanne, T.M., and Rudenko, G. (2010). Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryot Cell* 9, 136-147.
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12, 599-606.
- Sullivan, W.P., Owen, B.A., and Toft, D.O. (2002). The influence of ATP and p23 on the conformation of hsp90. *J Biol Chem* 277, 45942-45948.
- Szentirmay, M.N., and Sawadogo, M. (1994). Sarkosyl block of transcription reinitiation by RNA polymerase II as visualized by the colliding polymerases reinitiation assay. *Nucleic Acids Res* 22, 5341-5346.
- Tejera Nevado, P., Bifeld, E., Hohn, K., and Clos, J. (2016). A Telomeric Cluster of Antimony Resistance Genes on Chromosome 34 of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 5262-5275.
- Thoma, F., and Koller, T. (1977). Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell* 12, 101-107.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A., and Myler, P.J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 10, 152.
- Van der Ploeg, L.H., Giannini, S.H., and Cantor, C.R. (1985). Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228, 1443-1446.
- van Luenen, H.G., Farris, C., Jan, S., Genest, P.A., Tripathi, P., Velds, A., Kerkhoven, R.M., Nieuwland, M., Haydock, A., Ramasamy, G., *et al.* (2012). Glucosylated hydroxymethyluracil, DNA base J, prevents transcriptional readthrough in *Leishmania*. *Cell* 150, 909-921.
- Varga-Weisz, P.D., and Becker, P.B. (2006). Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors. *Curr Opin Genet Dev* 16, 151-156.
- Verdone, L., Agricola, E., Caserta, M., and Di Mauro, E. (2006). Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5, 209-221.
- Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Padilla-Mejia, N.E., Manning-Cela, R., Hernandez-Rivas, R., and Martinez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure. *Protist* 167, 121-135.
- Volf, P., and Myskova, J. (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol* 23, 91-92.

Wedel, C., Forstner, K.U., Derr, R., and Siegel, T.N. (2017). GT-rich promoters can drive RNA pol II transcription and deposition of H2A.Z in African trypanosomes. *EMBO J* 36, 2581-2594.

Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358, 169-170.

Wiesgigl, M., and Clos, J. (1999). Uniform distribution of transcription complexes over the entire *Leishmania donovani* clpB (hsp 100) gene locus. *Protist* 150, 369-373.

Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.

Yadav, A., Chandra, U., and Saha, S. (2016). Histone acetyltransferase HAT4 modulates navigation across G2/M and re-entry into G1 in *Leishmania donovani*. *Scientific reports* 6, 27510.

Zeiner, G.M., Sturm, N.R., and Campbell, D.A. (2003). The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *J Biol Chem* 278, 38269-38275.

Zhang, K., Sridhar, V.V., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.K. (2007). Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2, e1210.

Zijlstra, E.E., Alves, F., Rijal, S., Arana, B., and Alvar, J. (2017). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian subcontinent: A threat to the South-East Asia Region Kala-azar Elimination Programme. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005877.

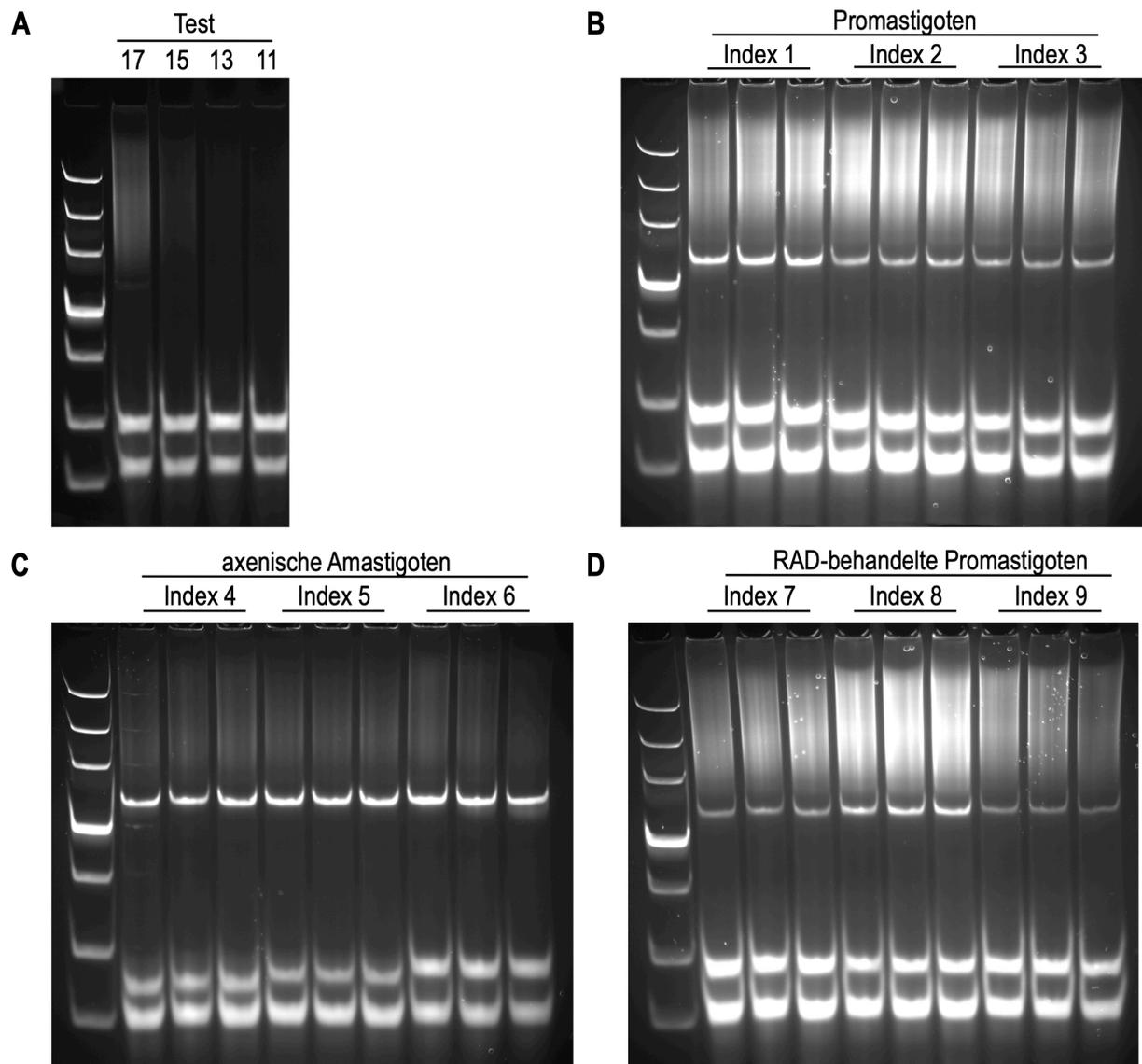
Zilberstein, D., and Nitzan Koren, R. (2019). Host-Free Systems for Differentiation of Axenic *Leishmania*. *Methods Mol Biol* 1971, 1-8.

Zilberstein, D., and Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48, 449-470.

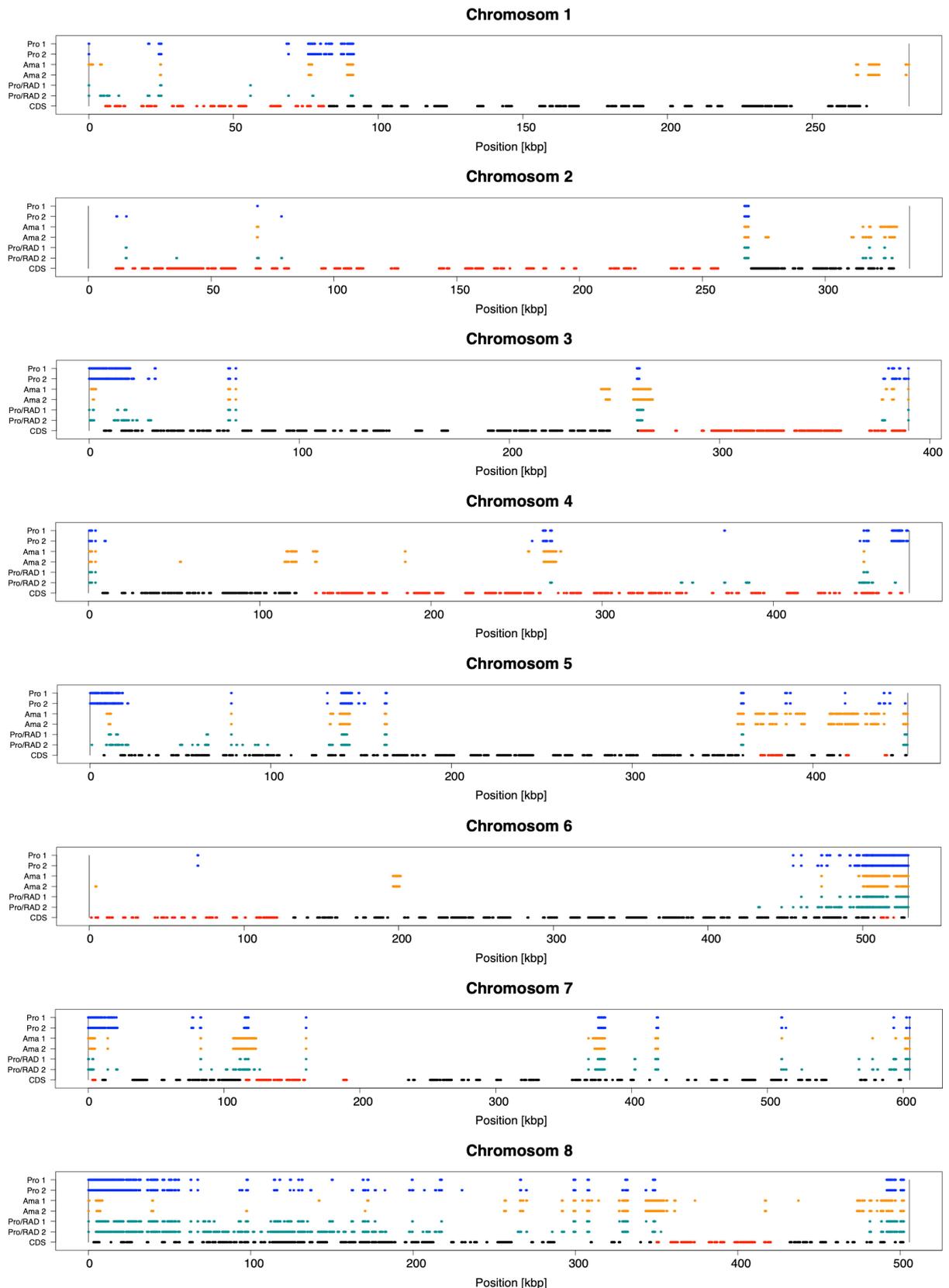
Zilka, A., Garlapati, S., Dahan, E., Yaolsky, V., and Shapira, M. (2001). Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 276, 47922-47929.

Zinoviev, A., Leger, M., Wagner, G., and Shapira, M. (2011). A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic acids research* 39, 8404-8415.

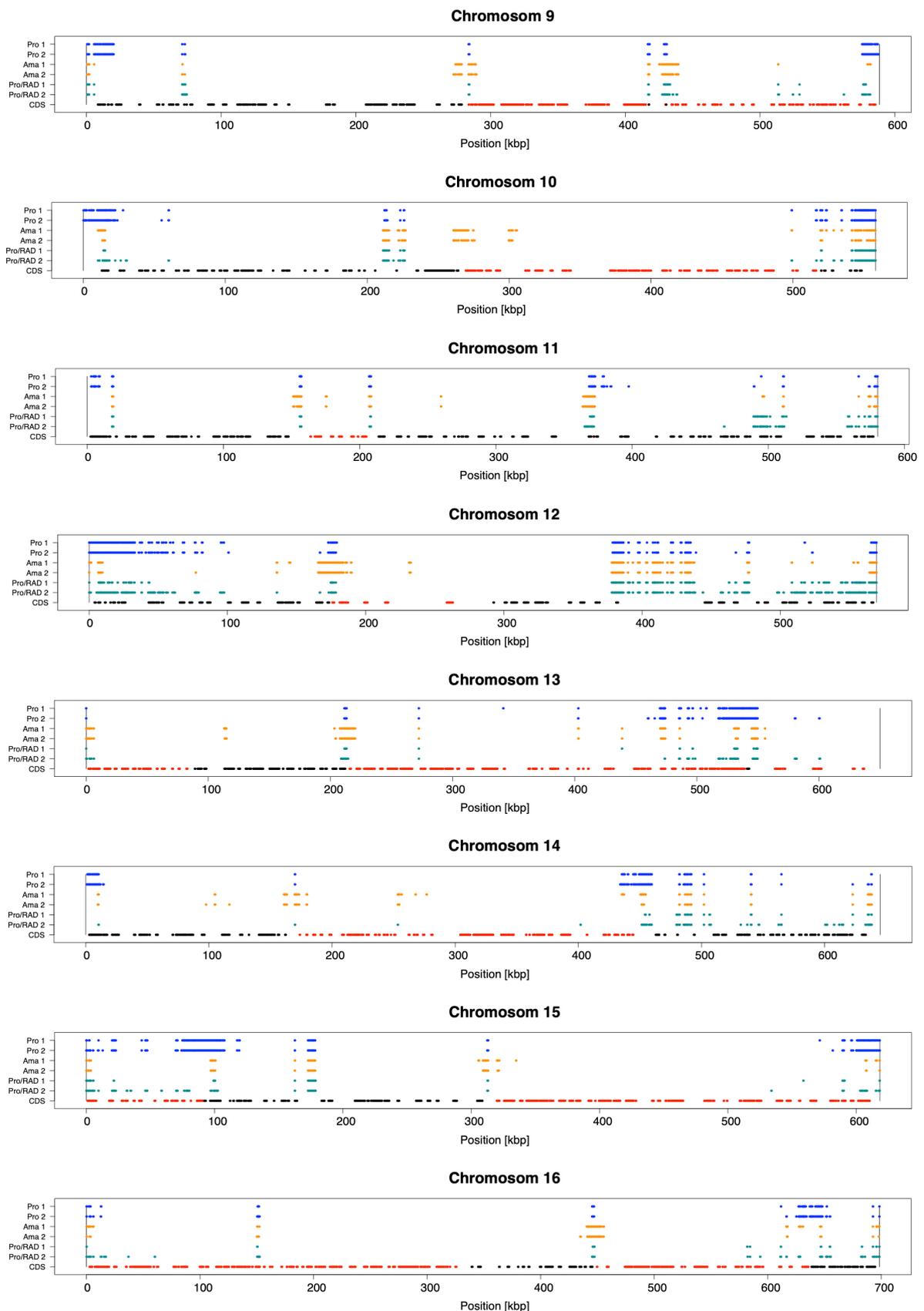
# Anhang



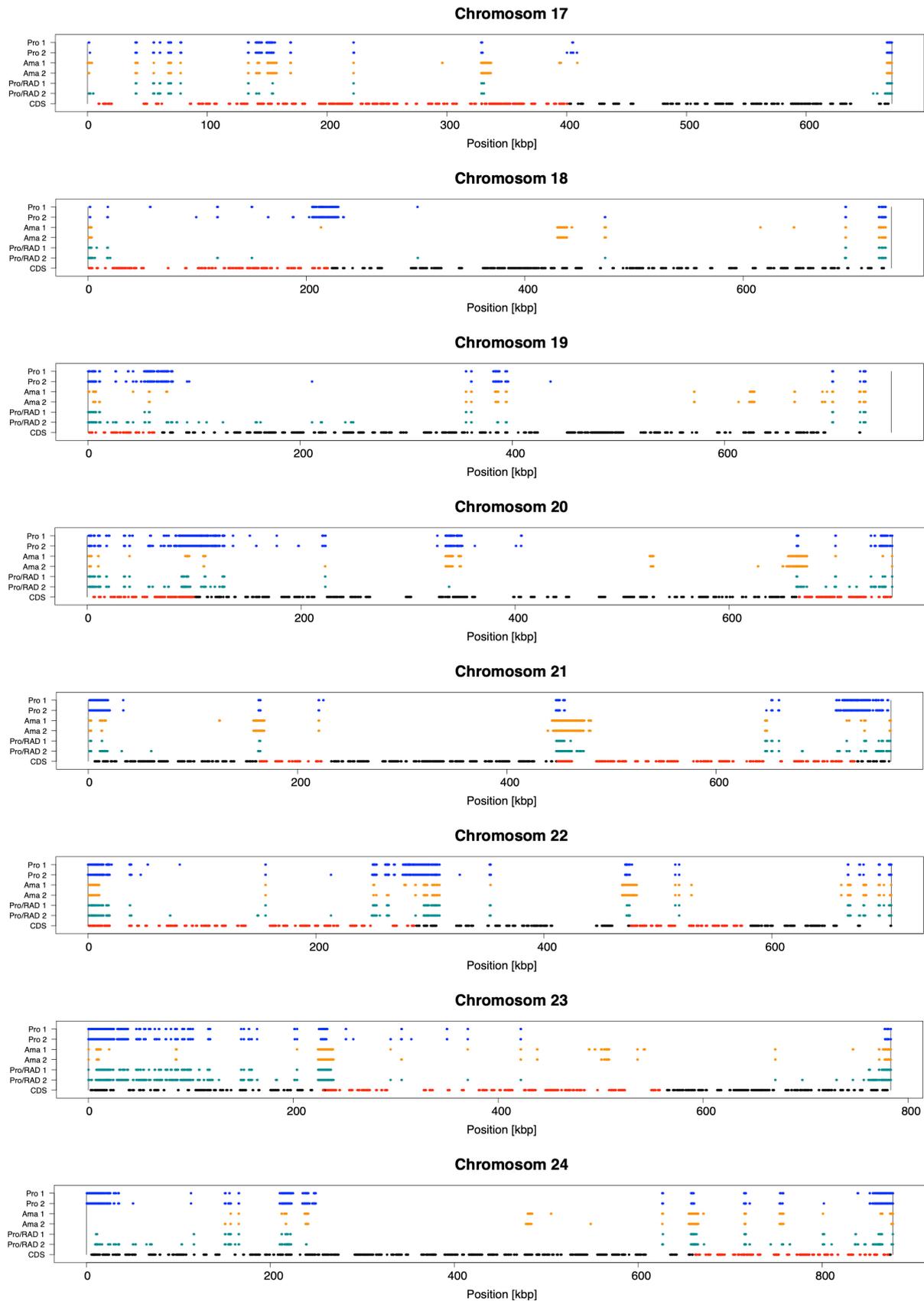
**Abbildung 25: Amplifikation der PRO-seq *library*.** (A) Test-Amplifikation einer Promastigoten *library* mit 11, 13, 15 und 17 PCR-Zyklen, um die optimale Zyklenzahl zu bestimmen. (B-D) Finale Amplifikation der PRO-seq *library* mit 17 Zyklen für Promastigoten, Index Primer 1-3 (B), axenische Amastigoten, Index Primer 4-6 (C) und RAD-behandelten Promastigoten, Index Primer 7-9 (D). Ein PCR-Ansatz wurde über drei Bahnen verteilt auf einem 8%igen Polyacrylamidgel mit Ultra Low Range DNA Ladder aufgetragen. Die Bande bei ~120 bp entspricht Primerdimeren. Der Schmier oberhalb entspricht der *library* und wurde aufgereinigt.



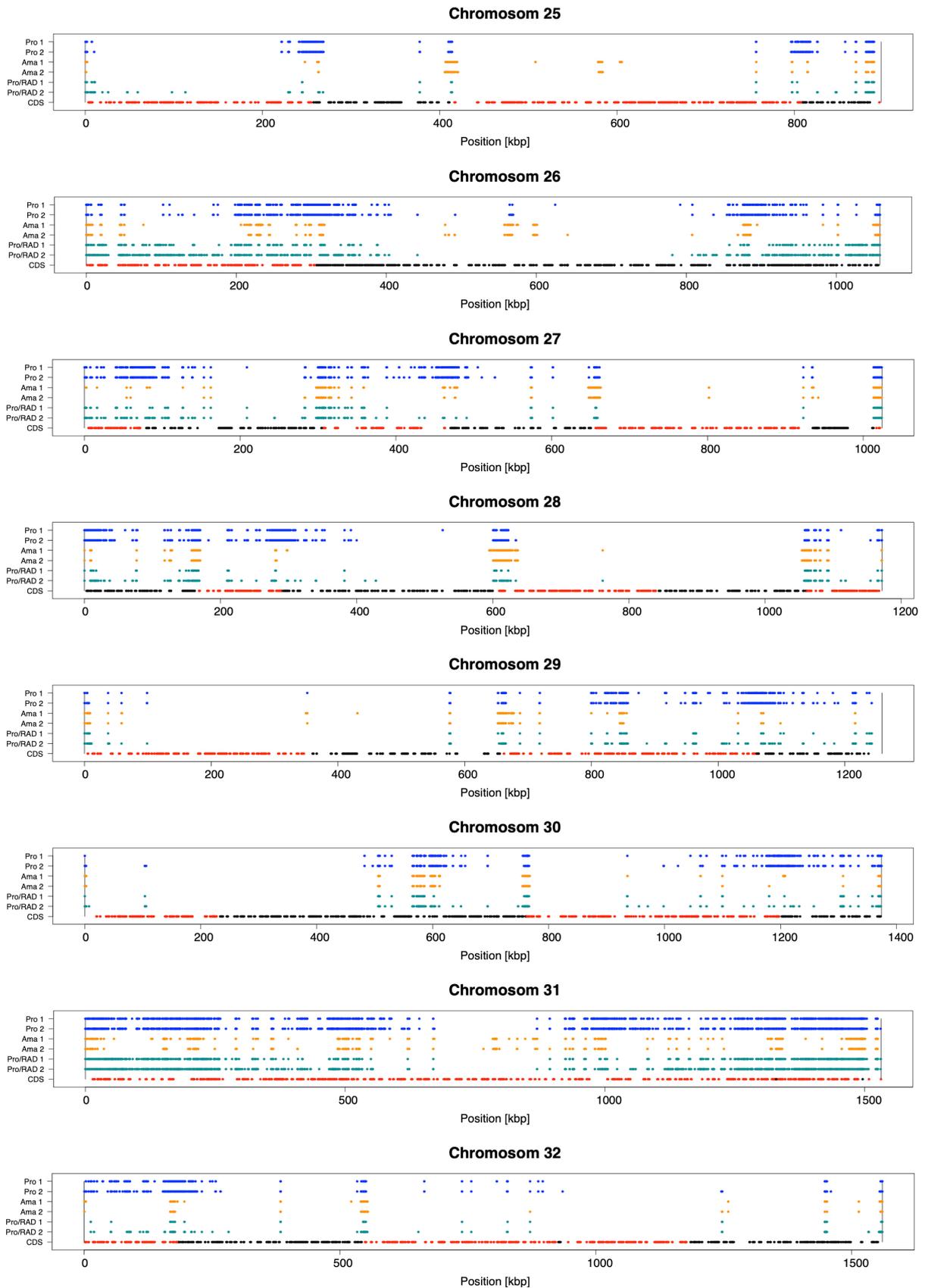
**Abbildung 26: Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 1-8.** Die mit Genrich generierten Peaks wurden für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet, n=2. Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3', rote Punkte = 3' → 5'). Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



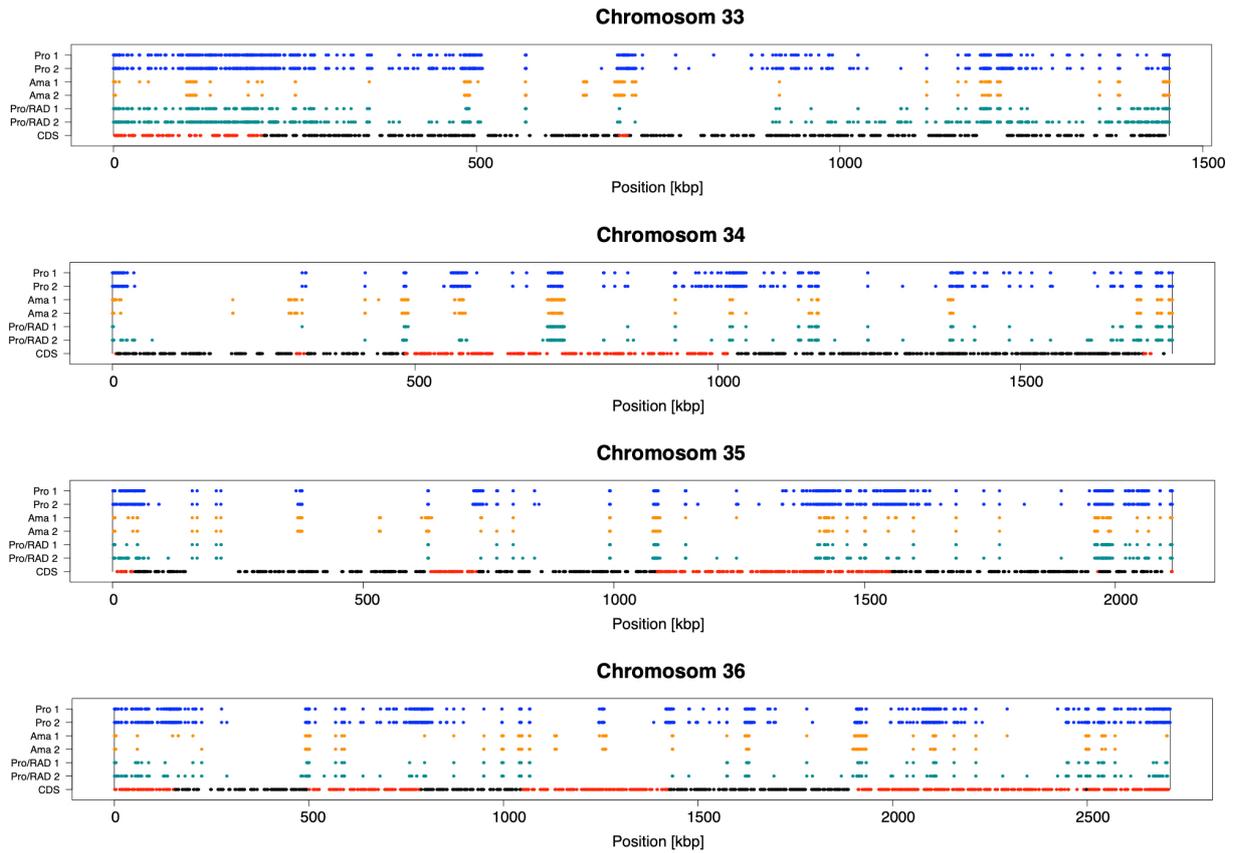
**Abbildung 27: Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 9-16.** Die mit Genrich generierten Peaks wurden für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet,  $n=2$ . Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte =  $5' \rightarrow 3'$ , rote Punkte =  $3' \rightarrow 5'$ ). Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



**Abbildung 28: Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 17-24.** Die mit Genrich generierten Peaks wurden für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet,  $n=2$ . Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte =  $5' \rightarrow 3'$ , rote Punkte =  $3' \rightarrow 5'$ ). Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).

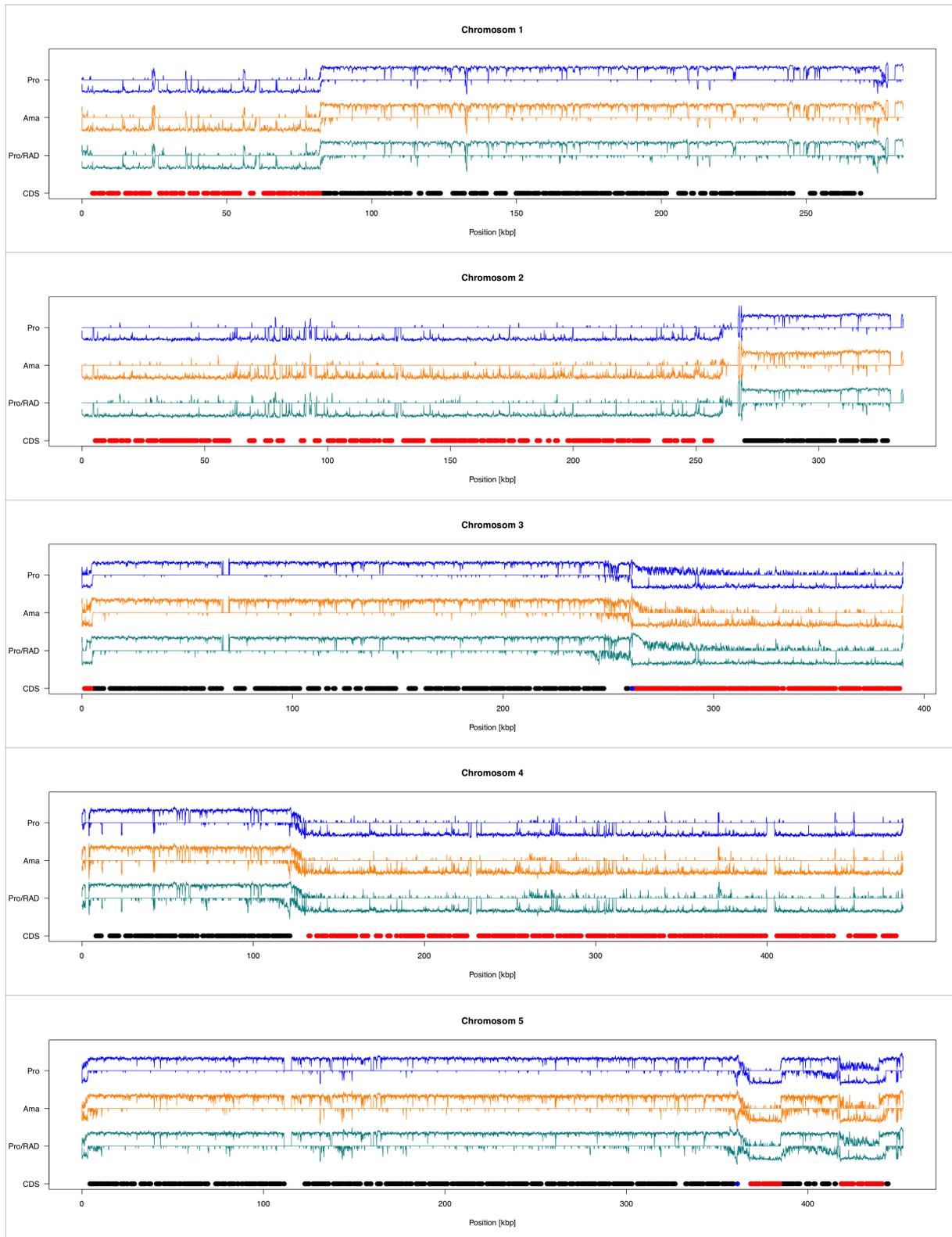


**Abbildung 29: Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 25-32.** Die mit Genrich generierten Peaks wurden für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet, n=2. Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3', rote Punkte = 3' → 5'). Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).

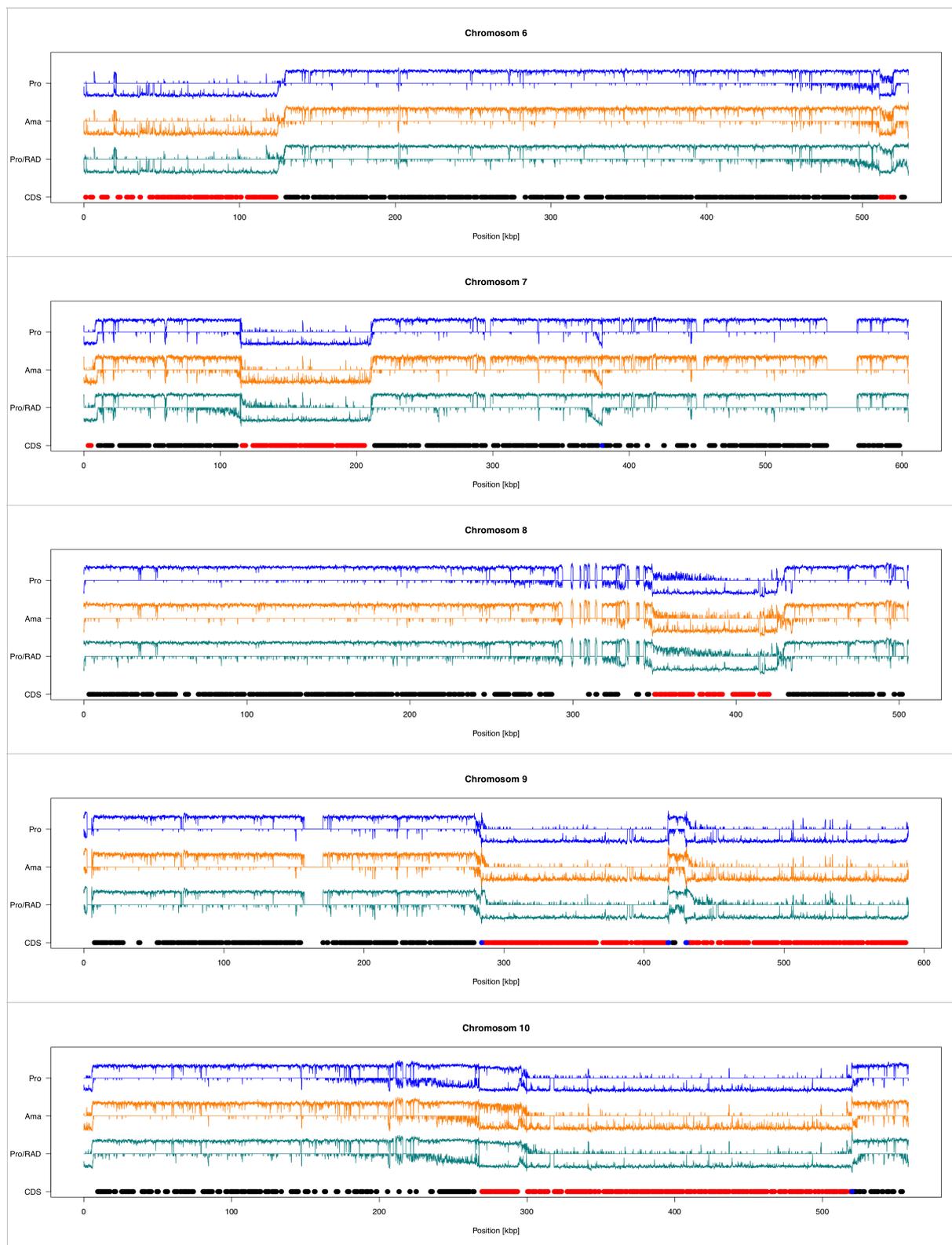


**Abbildung 30: Alignment der ATAC Peaks von Chromosom 33-36.** Die mit Genrich generierten Peaks wurden für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) geplottet,  $n=2$ . Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte =  $5' \rightarrow 3'$ , rote Punkte =  $3' \rightarrow 5'$ ). Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).

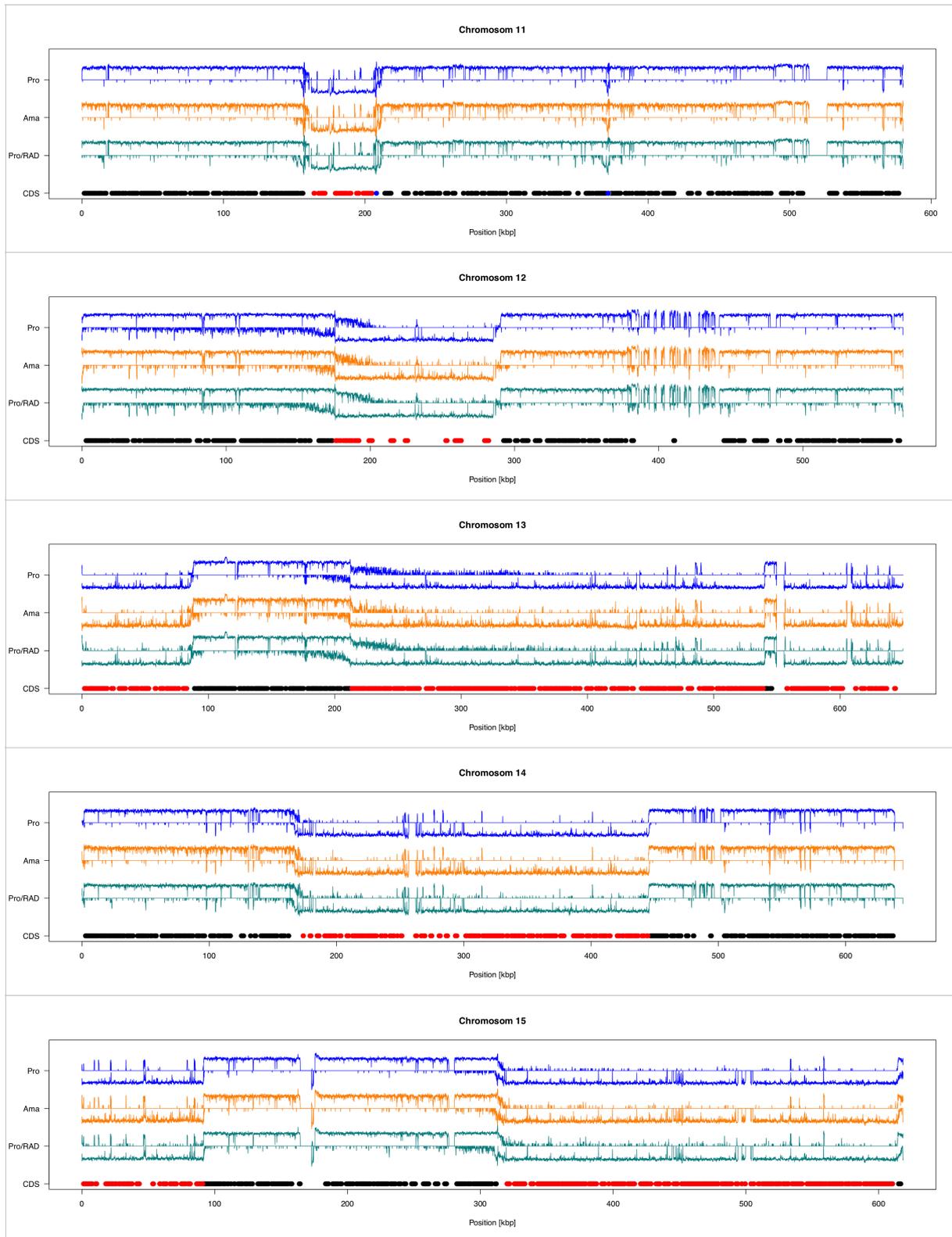
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus-Strang*), rote Punkte = 3' → 5' (*minus-Strang*)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



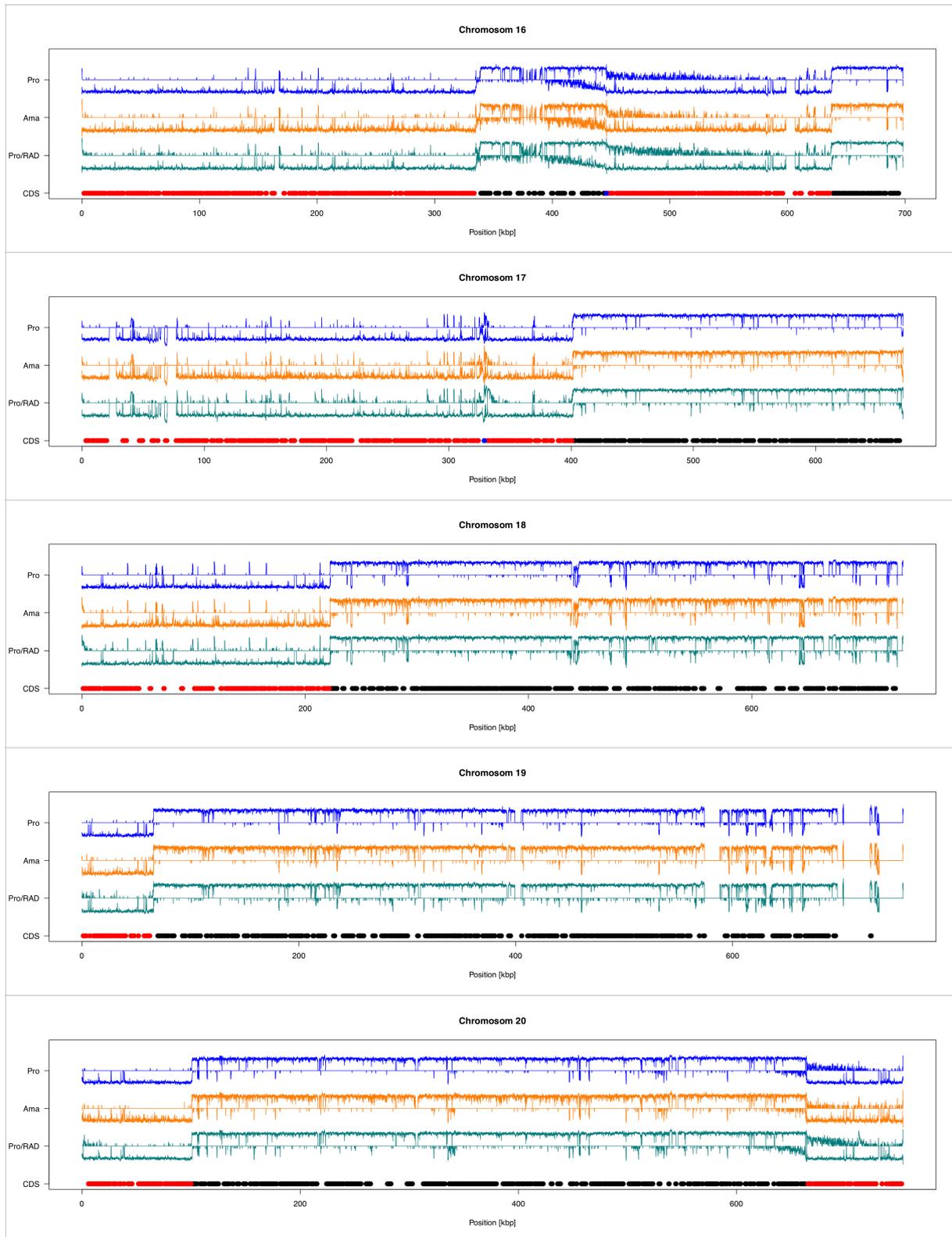
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus-Strang*), rote Punkte = 3' → 5' (*minus-Strang*)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



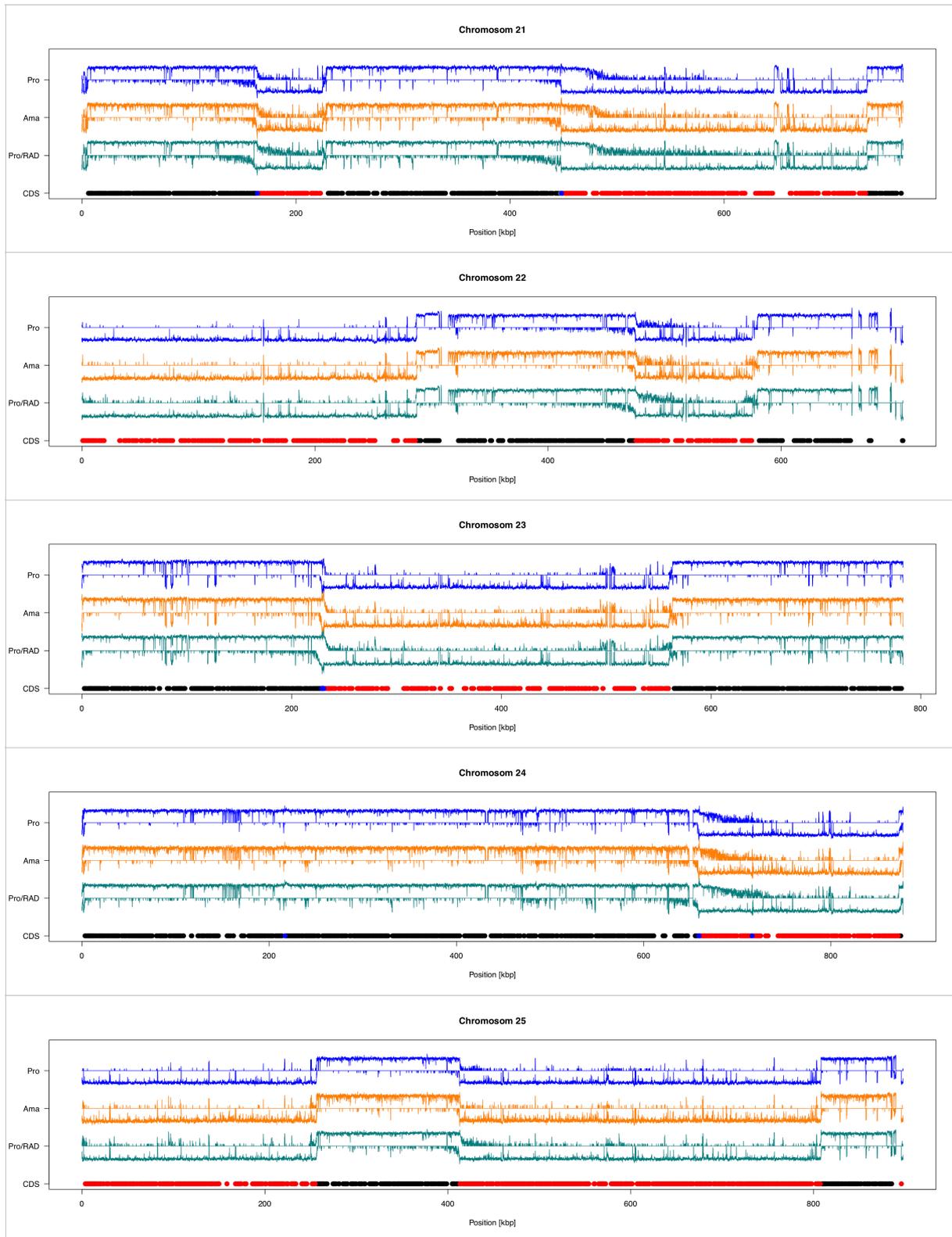
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus-Strang*), rote Punkte = 3' → 5' (*minus-Strang*)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



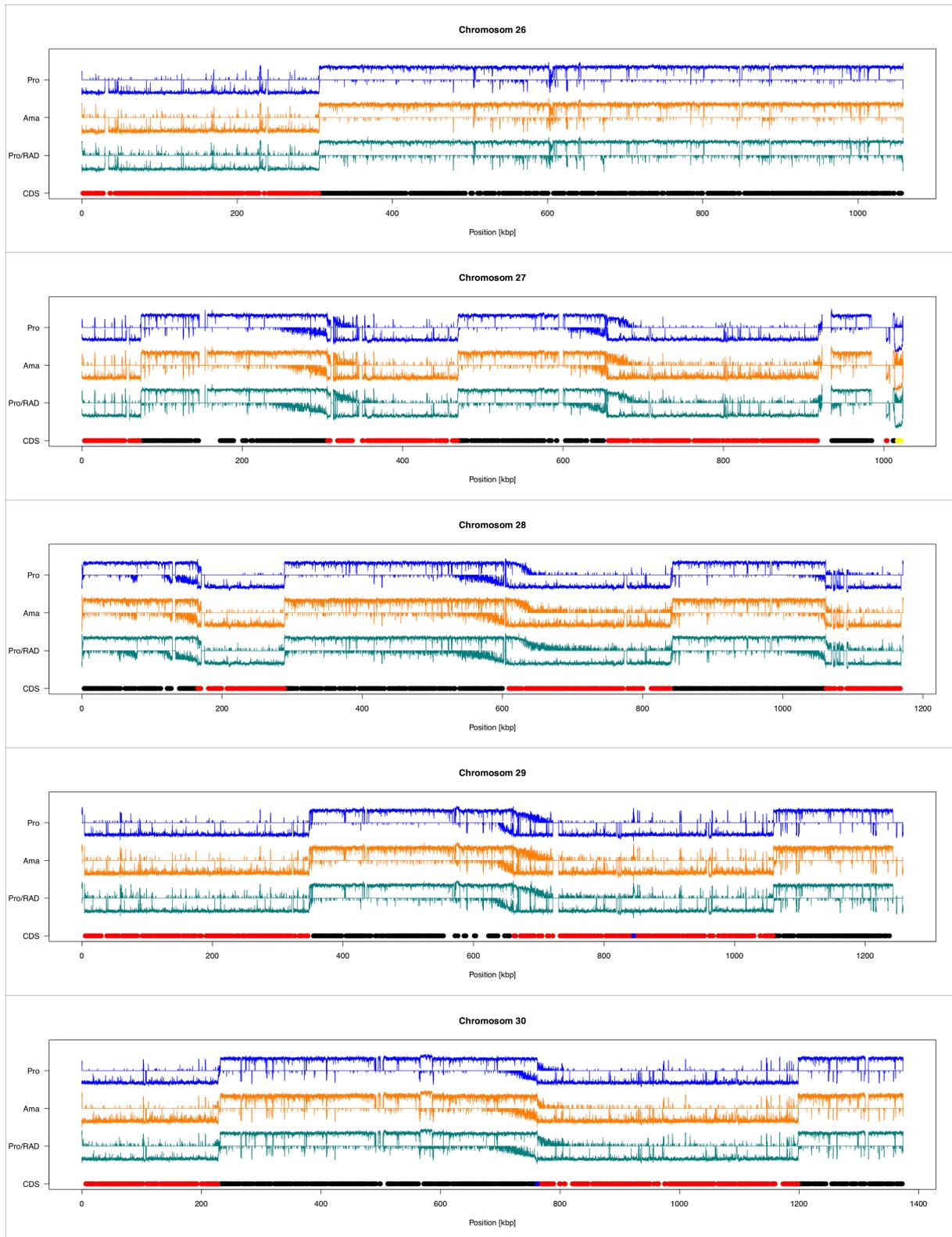
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus*-Strang), rote Punkte = 3' → 5' (*minus*-Strang)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



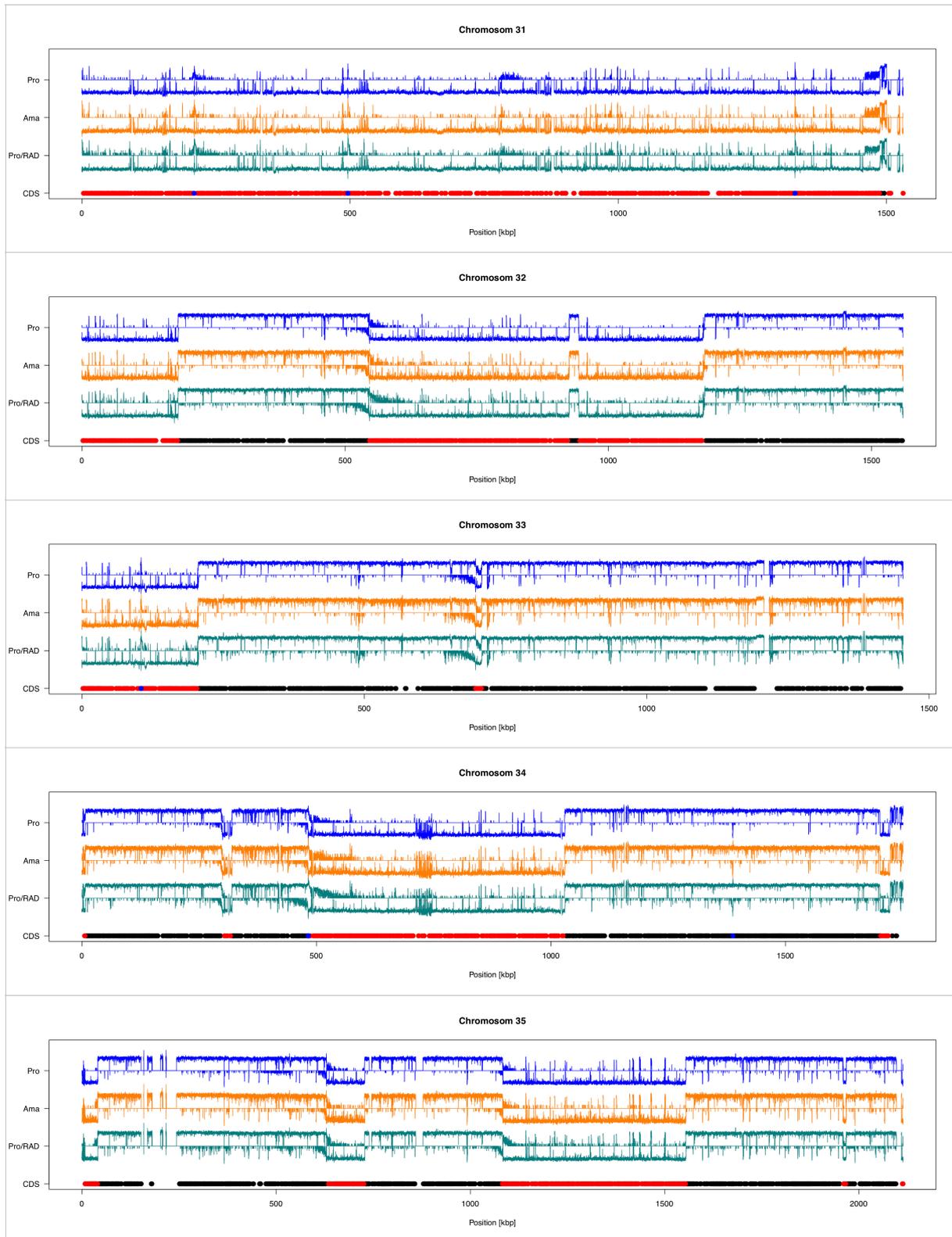
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus-Strang*), rote Punkte = 3' → 5' (*minus-Strang*)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



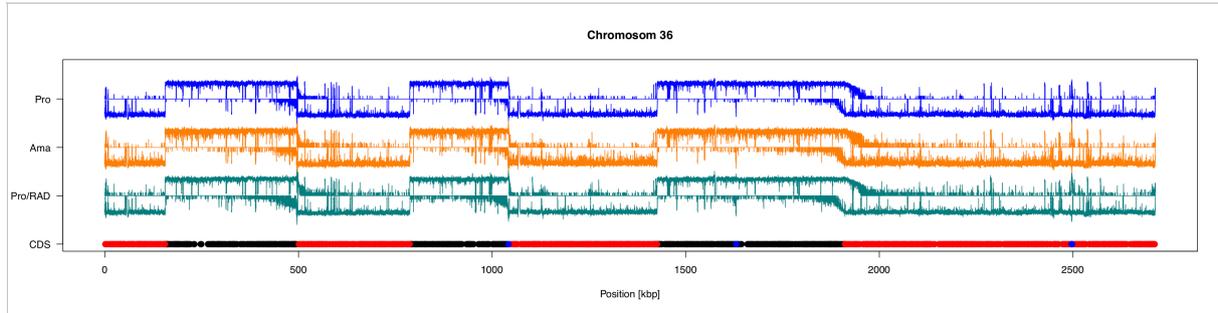
**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus*-Strang), rote Punkte = 3' → 5' (*minus*-Strang)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an reads wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus*-Strang), rote Punkte = 3' → 5' (*minus*-Strang)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



**Tabelle 33: Alignment der PRO-seq reads aller 36 Chromosomen in *L. donovani*.** Die totale Anzahl an *reads* wurde für Promastigoten (Pro, blau), axenische Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün) logarithmisch geplottet, n=3 (Mittelwert). Die kodierenden Sequenzen (CDS) sind in zwei verschiedenen Richtungen aufgetragen (schwarze Punkte = 5' → 3' (*plus*-Strang) , rote Punkte = 3' → 5' (*minus*-Strang)). tRNA-Gene sind mit blauen Punkten dargestellt, rRNA-Gene mit gelben. Größe der Chromosomen = Kilobasenpaare (kbp).



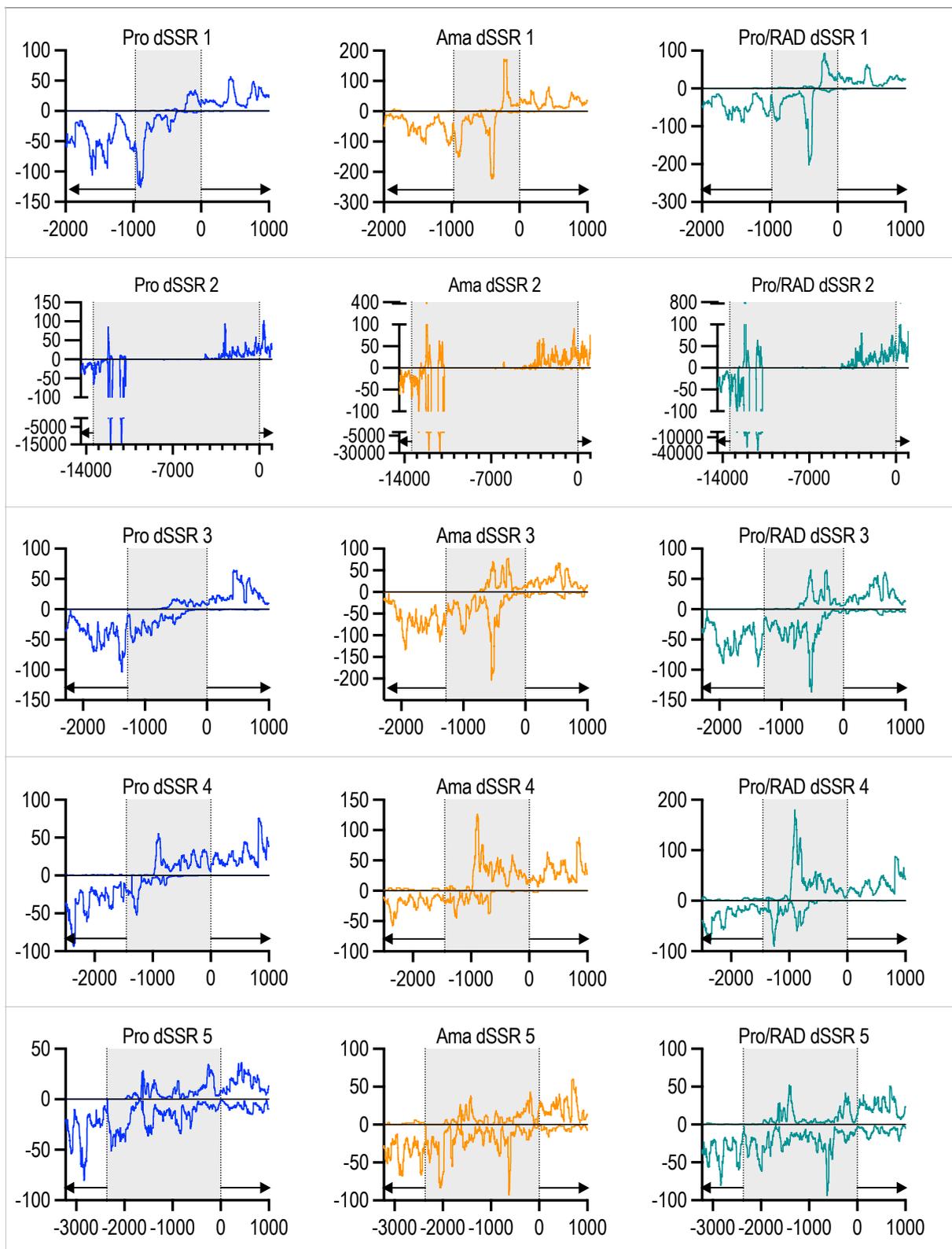
**Tabelle 34: Übersicht der Positionen der dSSRs im Genom von *L. donovani*.** Die zugehörigen Chromosomen der dSSRs und die Position (bp) der Startcodons der PTU1 und PTU2 sind angegeben. Außerdem wurde die Anzahl an tRNA-Genen innerhalb der dSSR angegeben.

| dSSR | Chromosom  | Startcodon (0 bp) PTU 1<br>(Position) | Startcodon PTU 2<br>(Position) | tRNA |
|------|------------|---------------------------------------|--------------------------------|------|
| 1    | Ld01_v01s1 | 82032                                 | 83004                          | 0    |
| 2    | Ld02_v01s1 | 256402                                | 269831                         | 0    |
| 3    | Ld03_v01s1 | 4241                                  | 5523                           | 0    |
| 4    | Ld05_v01s1 | 384448                                | 385904                         | 0    |
| 5    | Ld05_v01s1 | 440954                                | 443323                         | 0    |
| 6    | Ld06_v01s1 | 123365                                | 129705                         | 0    |
| 7    | Ld06_v01s1 | 520153                                | 525112                         | 0    |
| 8    | Ld07_v01s1 | 5320                                  | 10518                          | 0    |
| 9    | Ld07_v01s1 | 205854                                | 213261                         | 0    |
| 10   | Ld08_v01s1 | 420294                                | 432032                         | 0    |
| 11   | Ld09_v01s1 | 416581                                | 420223                         | 3    |
| 12   | Ld10_v01s1 | 519234                                | 520477                         | 3    |
| 13   | Ld11_v01s1 | 205037                                | 213982                         | 1    |
| 14   | Ld12_v01s1 | 282119                                | 292452                         | 0    |
| 15   | Ld13_v01s1 | 82903                                 | 89030                          | 0    |
| 16   | Ld13_v01s1 | 539116                                | 540958                         | 0    |
| 17   | Ld14_v01s1 | 444590                                | 446799                         | 0    |
| 18   | Ld15_v01s1 | 91049                                 | 92099                          | 0    |
| 19   | Ld15_v01s1 | 610451                                | 614918                         | 0    |
| 20   | Ld16_v01s1 | 333569                                | 339241                         | 0    |
| 21   | Ld16_v01s1 | 635758                                | 638611                         | 0    |
| 22   | Ld17_v01s1 | 400622                                | 402227                         | 0    |
| 23   | Ld18_v01s1 | 221579                                | 223392                         | 0    |
| 24   | Ld19_v01s1 | 62438                                 | 69989                          | 0    |
| 25   | Ld20_v01s1 | 100044                                | 101365                         | 0    |
| 26   | Ld21_v01s1 | 222815                                | 230061                         | 0    |
| 27   | Ld21_v01s1 | 732397                                | 733999                         | 0    |
| 28   | Ld22_v01s1 | 286151                                | 288122                         | 0    |
| 29   | Ld22_v01s1 | 574791                                | 581272                         | 0    |
| 30   | Ld23_v01s1 | 559514                                | 564864                         | 0    |
| 31   | Ld24_v01s1 | 871863                                | 873103                         | 0    |
| 32   | Ld25_v01s1 | 255028                                | 257580                         | 0    |
| 33   | Ld25_v01s1 | 807409                                | 808777                         | 0    |
| 34   | Ld26_v01s1 | 305288                                | 306757                         | 0    |

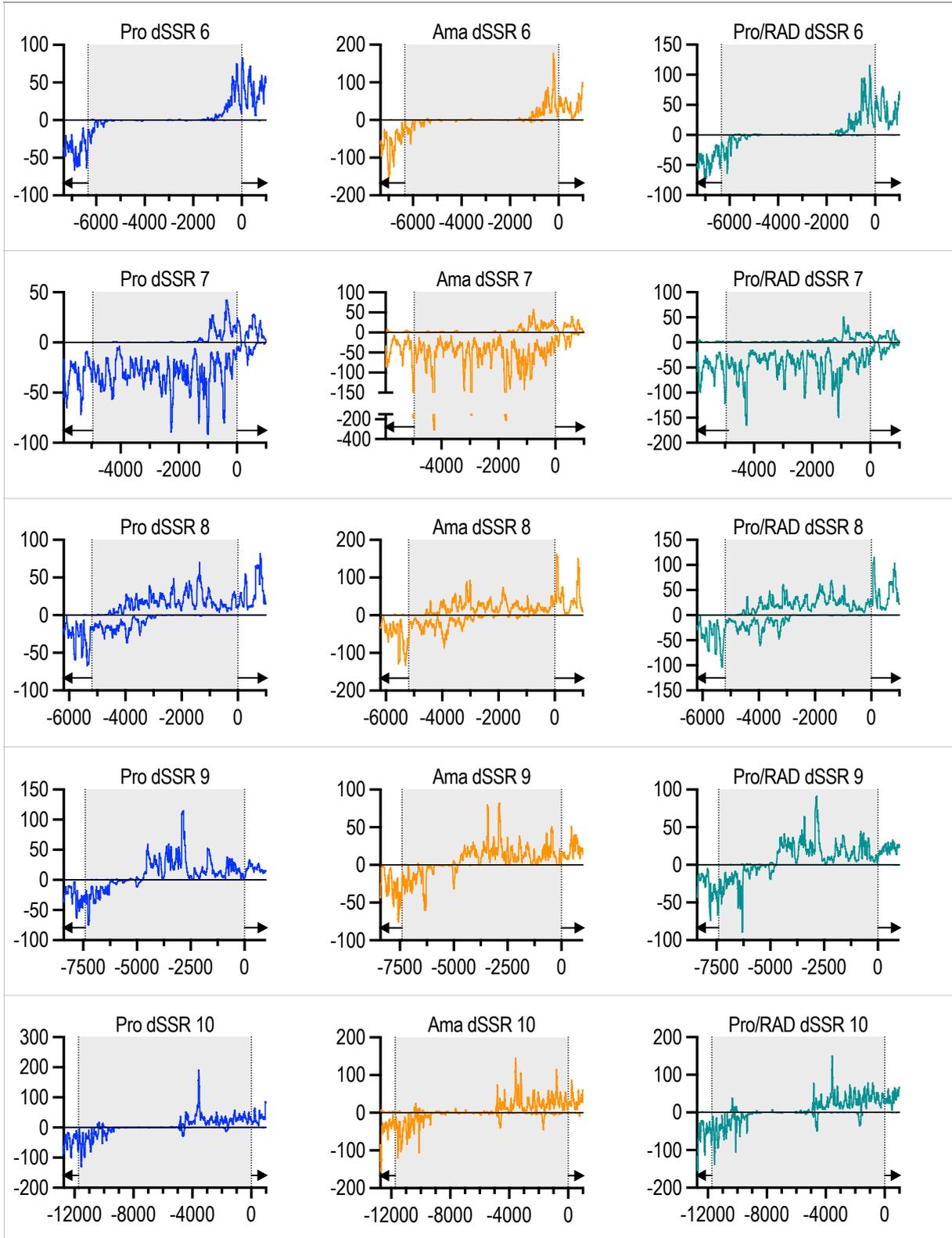
**Tabelle 34: Übersicht der Positionen der dSSRs im Genom von *L. donovani*.** Die zugehörigen Chromosomen der dSSRs und die Position (bp) der Startcodons der PTU1 und PTU2 sind angegeben. Außerdem wurde die Anzahl an tRNA-Genen innerhalb der dSSR angegeben.

| dSSR | Chromosom  | Startcodon (0 bp) PTU 1<br>(Position) | Startcodon PTU 2<br>(Position) | tRNA |
|------|------------|---------------------------------------|--------------------------------|------|
| 35   | Ld27_v01s1 | 71604                                 | 75276                          | 0    |
| 36   | Ld27_v01s1 | 468349                                | 470064                         | 0    |
| 37   | Ld27_v01s1 | 917267                                | 935165                         | 0    |
| 38   | Ld27_v01s1 | 1004104                               | 1011630                        | 0    |
| 39   | Ld28_v01s1 | 288445                                | 289509                         | 0    |
| 40   | Ld28_v01s1 | 839428                                | 843948                         | 0    |
| 41   | Ld29_v01s1 | 346318                                | 354846                         | 0    |
| 42   | Ld29_v01s1 | 1059260                               | 1060792                        | 0    |
| 43   | Ld30_v01s1 | 227349                                | 232193                         | 0    |
| 44   | Ld30_v01s1 | 1198091                               | 1201974                        | 0    |
| 45   | Ld31_v01s1 | 331255                                | 332223                         | 0    |
| 46   | Ld31_v01s1 | 1487267                               | 1488941                        | 0    |
| 47   | Ld32_v01s1 | 181743                                | 183632                         | 0    |
| 48   | Ld32_v01s1 | 922922                                | 926693                         | 0    |
| 49   | Ld32_v01s1 | 1177833                               | 1185075                        | 0    |
| 50   | Ld33_v01s1 | 203576                                | 206984                         | 0    |
| 51   | Ld33_v01s1 | 707326                                | 708479                         | 0    |
| 52   | Ld34_v01s1 | 6363                                  | 7937                           | 0    |
| 53   | Ld34_v01s1 | 316738                                | 320599                         | 0    |
| 54   | Ld34_v01s1 | 1026000                               | 1032274                        | 0    |
| 55   | Ld34_v01s1 | 1719152                               | 1727574                        | 0    |
| 56   | Ld35_v01s1 | 40153                                 | 42552                          | 0    |
| 57   | Ld35_v01s1 | 725883                                | 728904                         | 0    |
| 58   | Ld35_v01s1 | 1553883                               | 1555473                        | 0    |
| 59   | Ld35_v01s1 | 1966393                               | 1969234                        | 0    |
| 60   | Ld36_v01s1 | 155523                                | 156616                         | 0    |
| 61   | Ld36_v01s1 | 787238                                | 788323                         | 0    |
| 62   | Ld36_v01s1 | 1426115                               | 1426941                        | 0    |

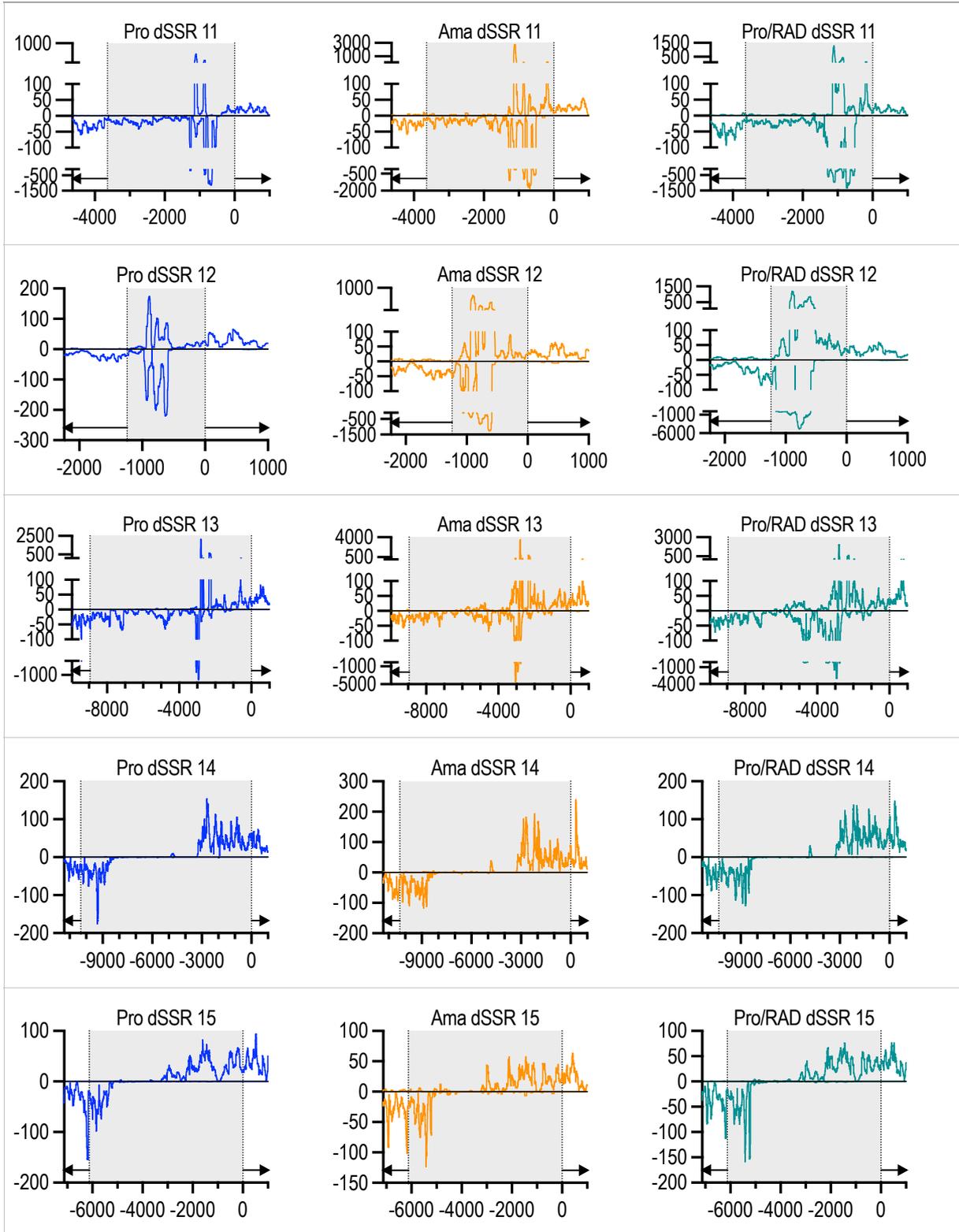
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



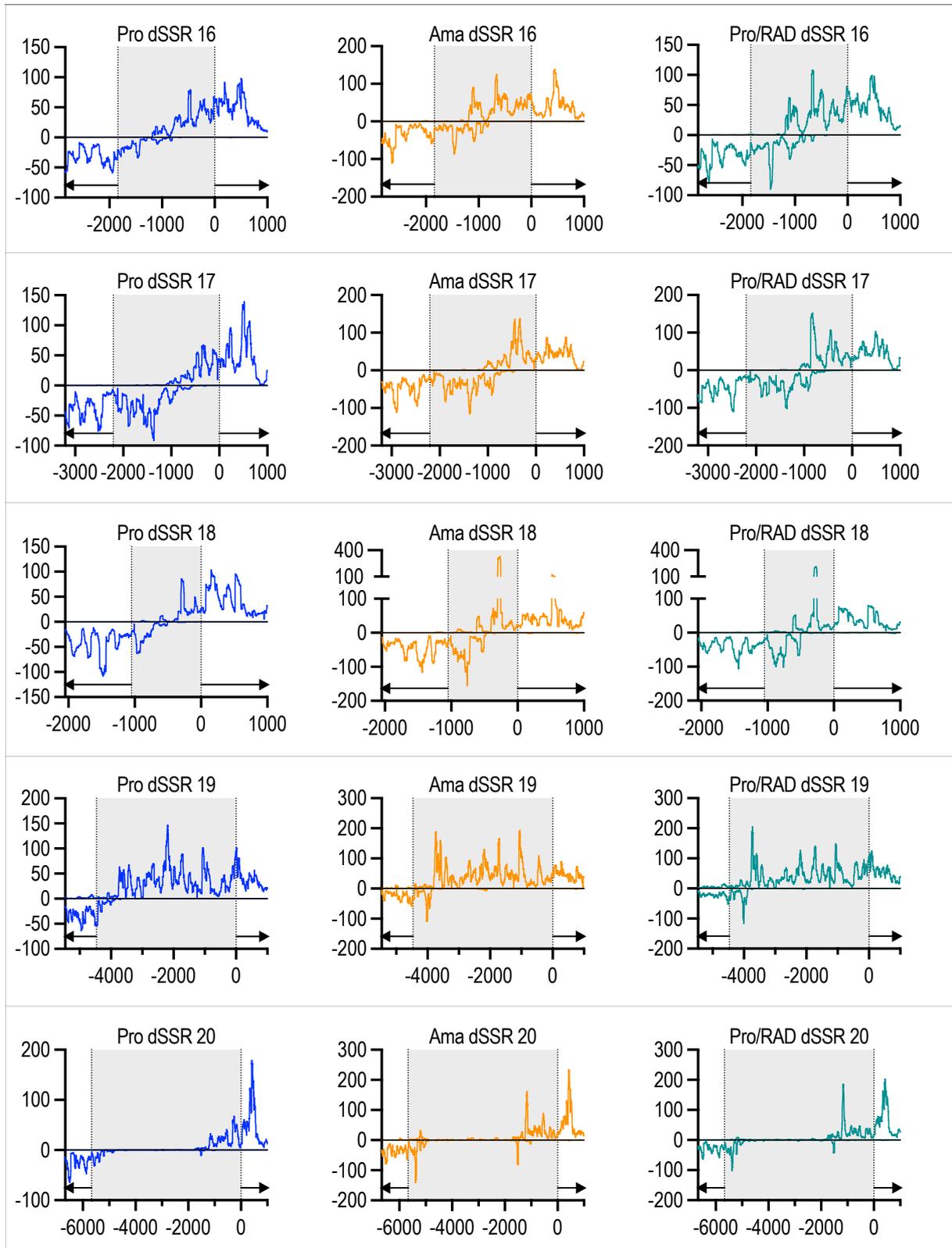
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



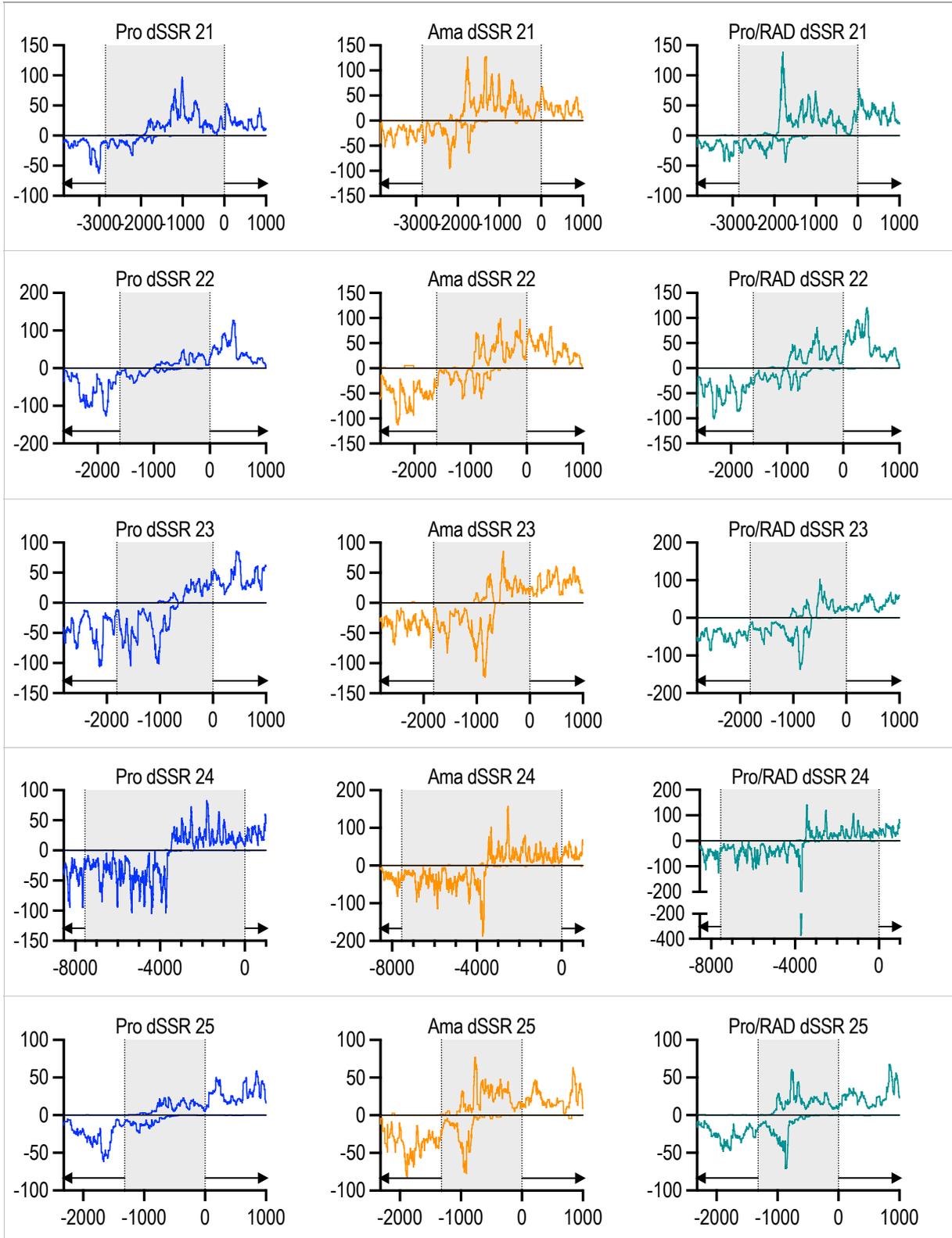
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



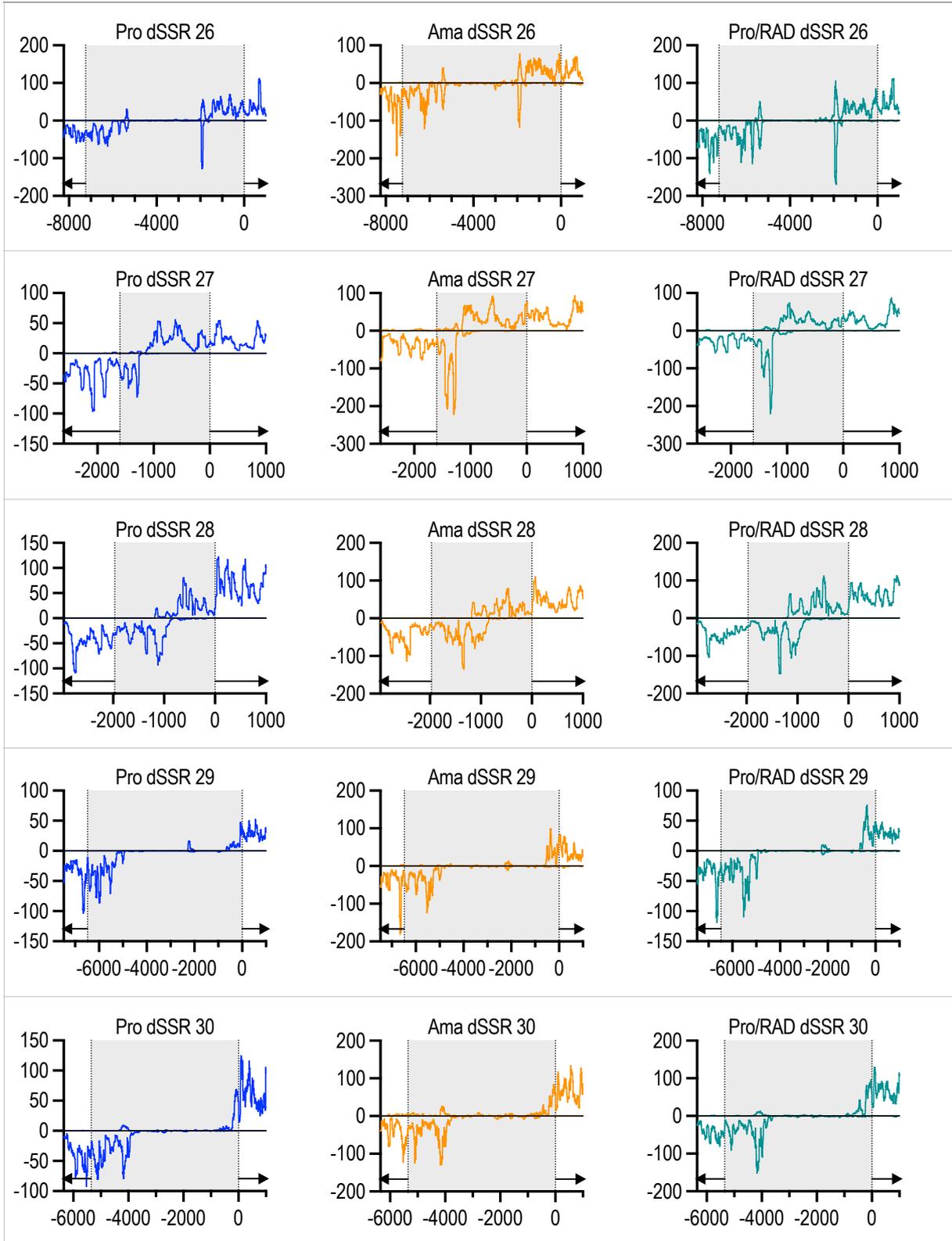
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



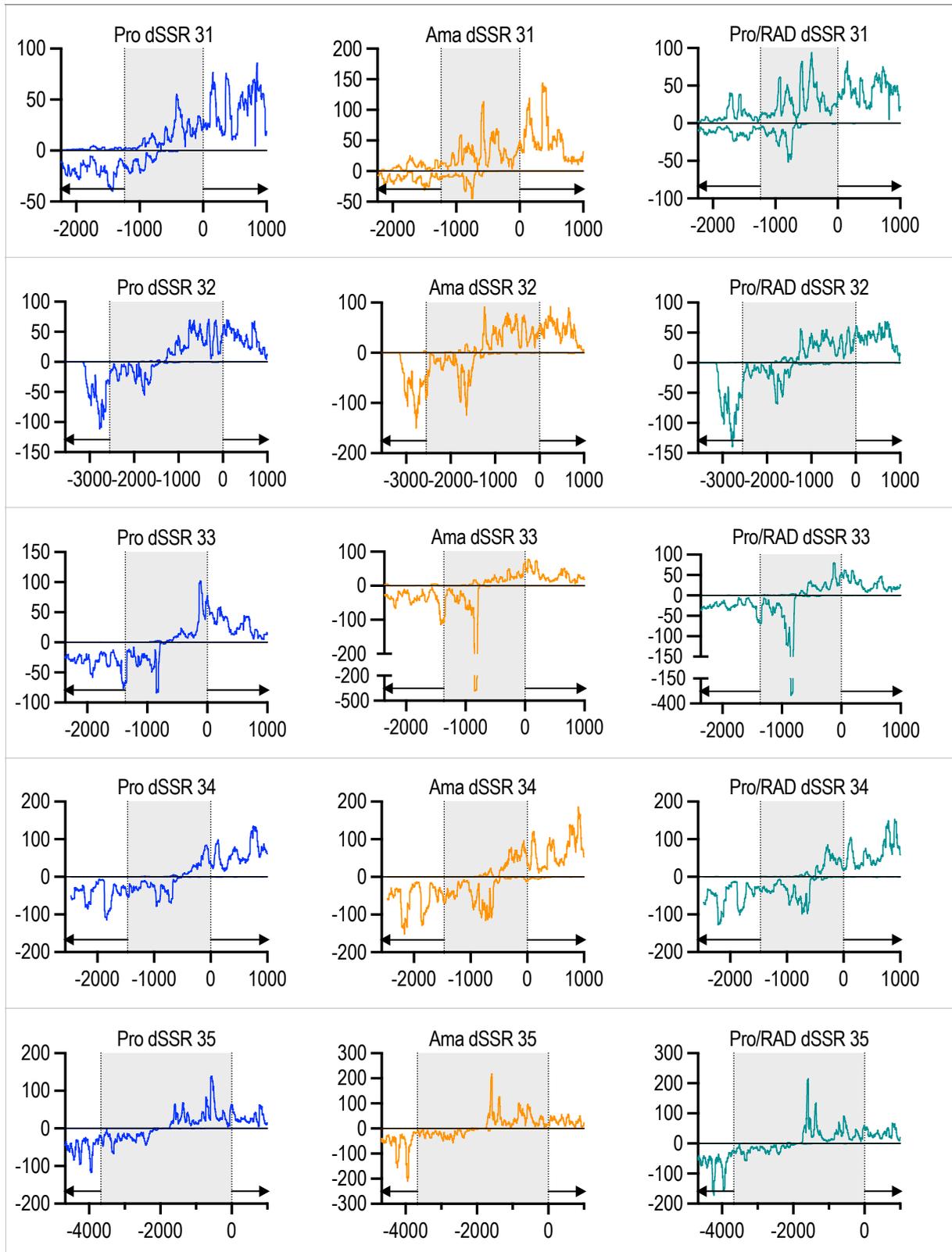
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



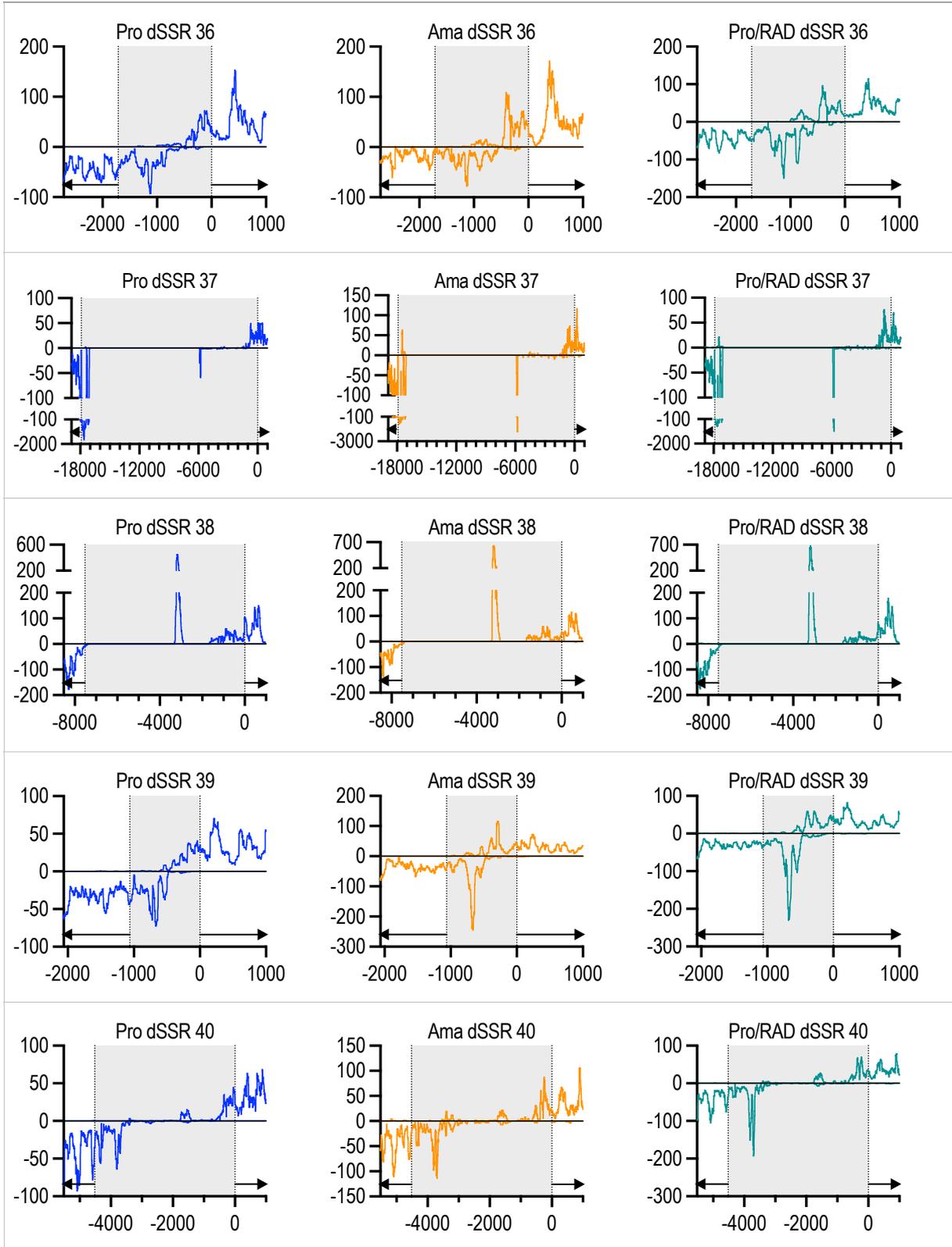
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



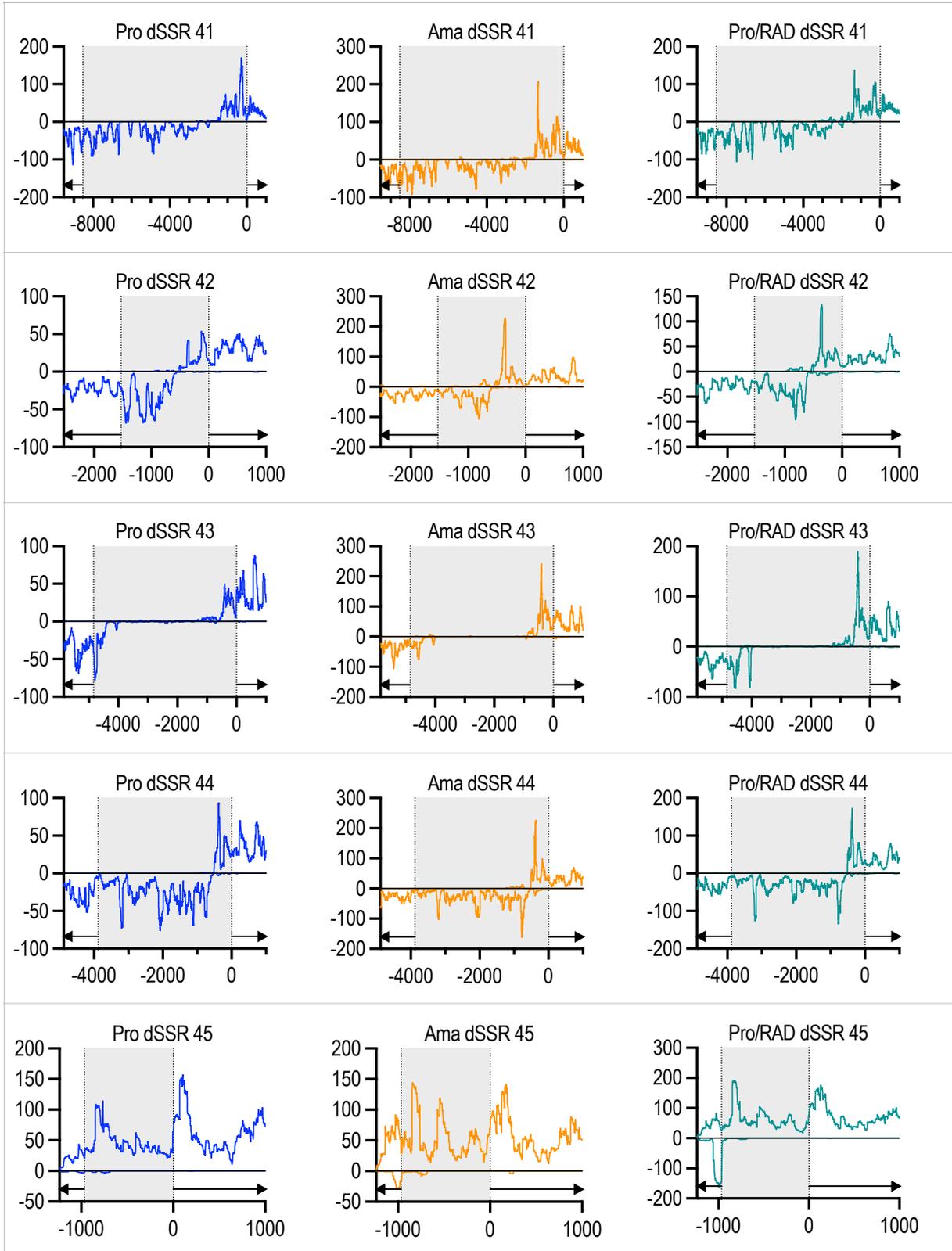
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



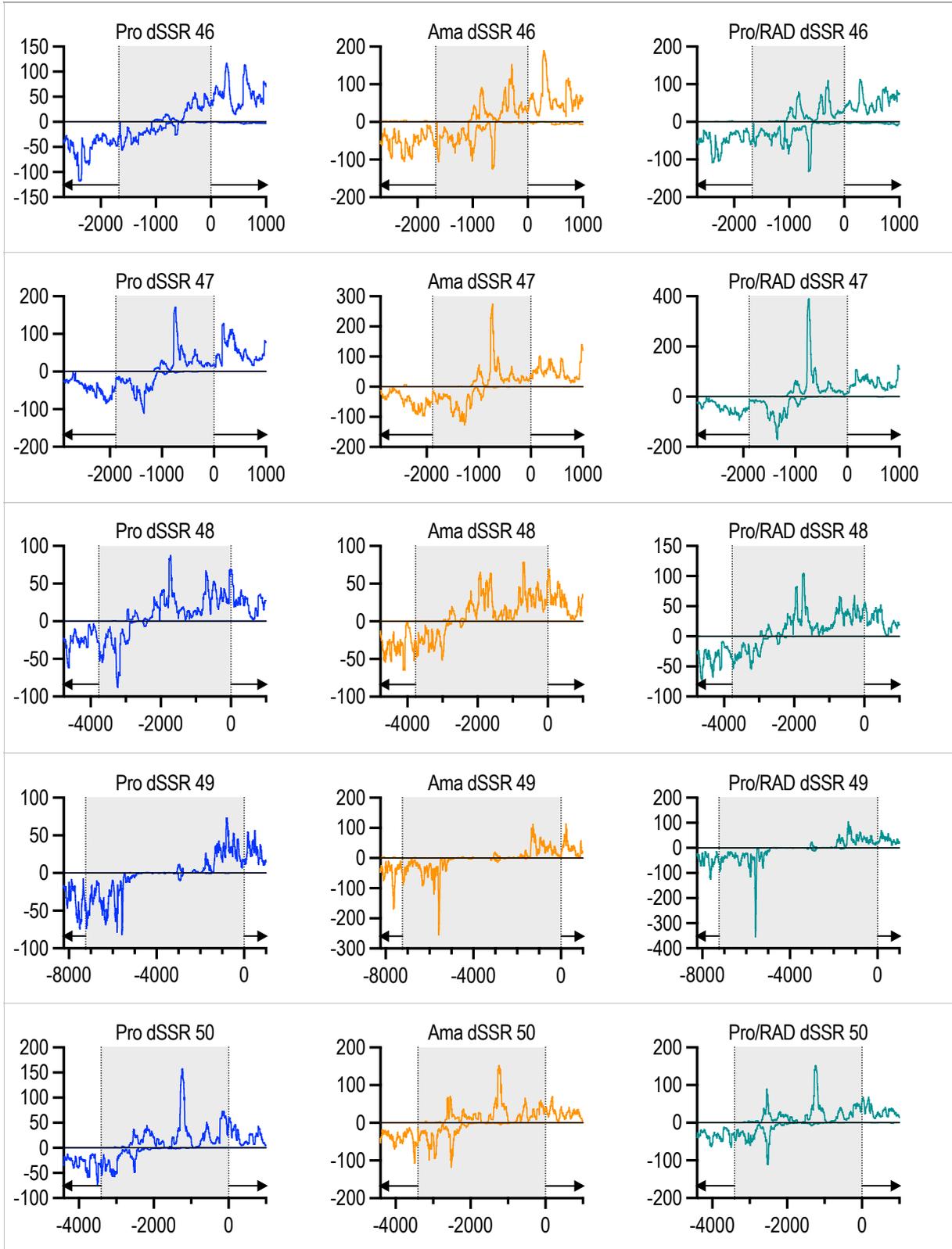
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



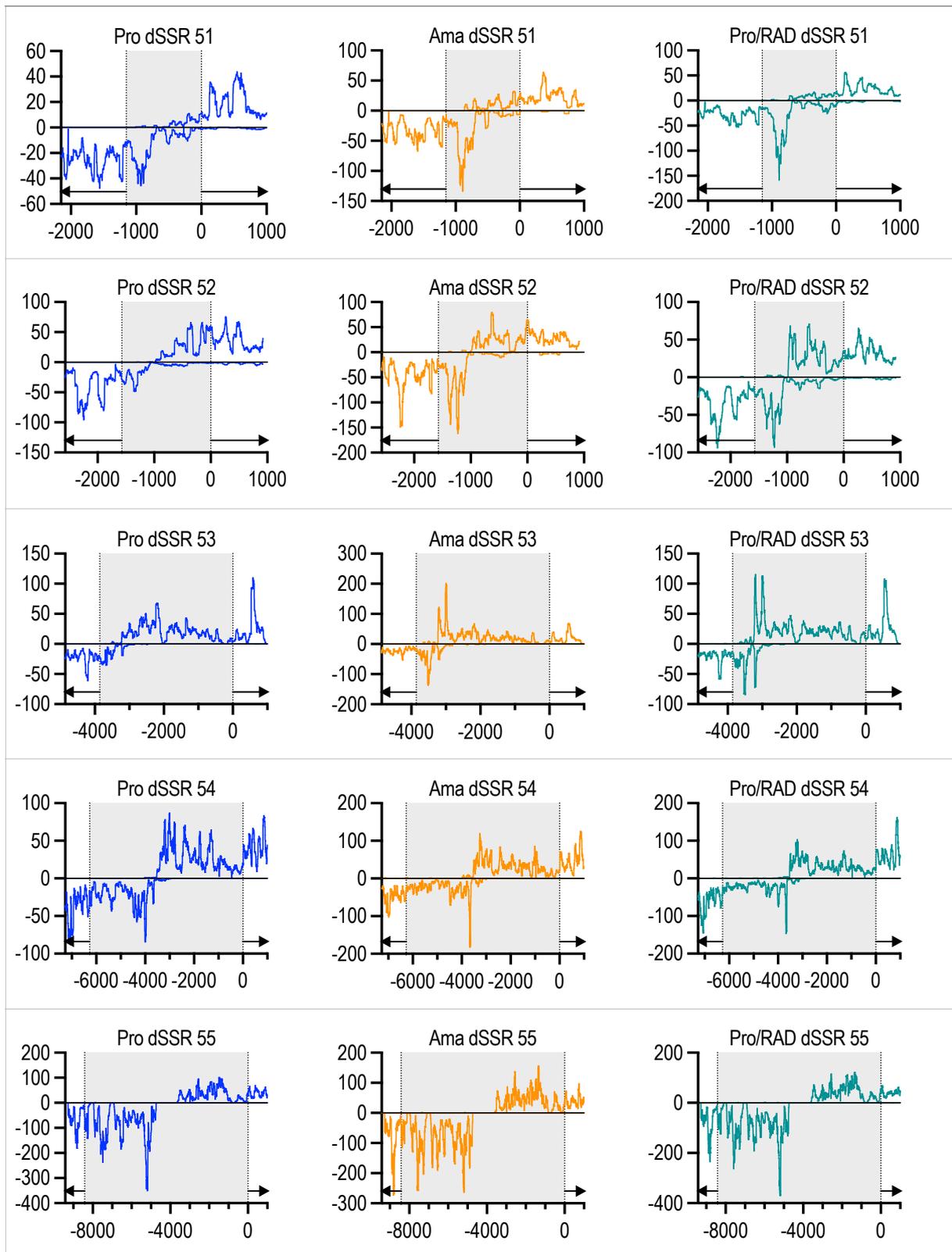
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



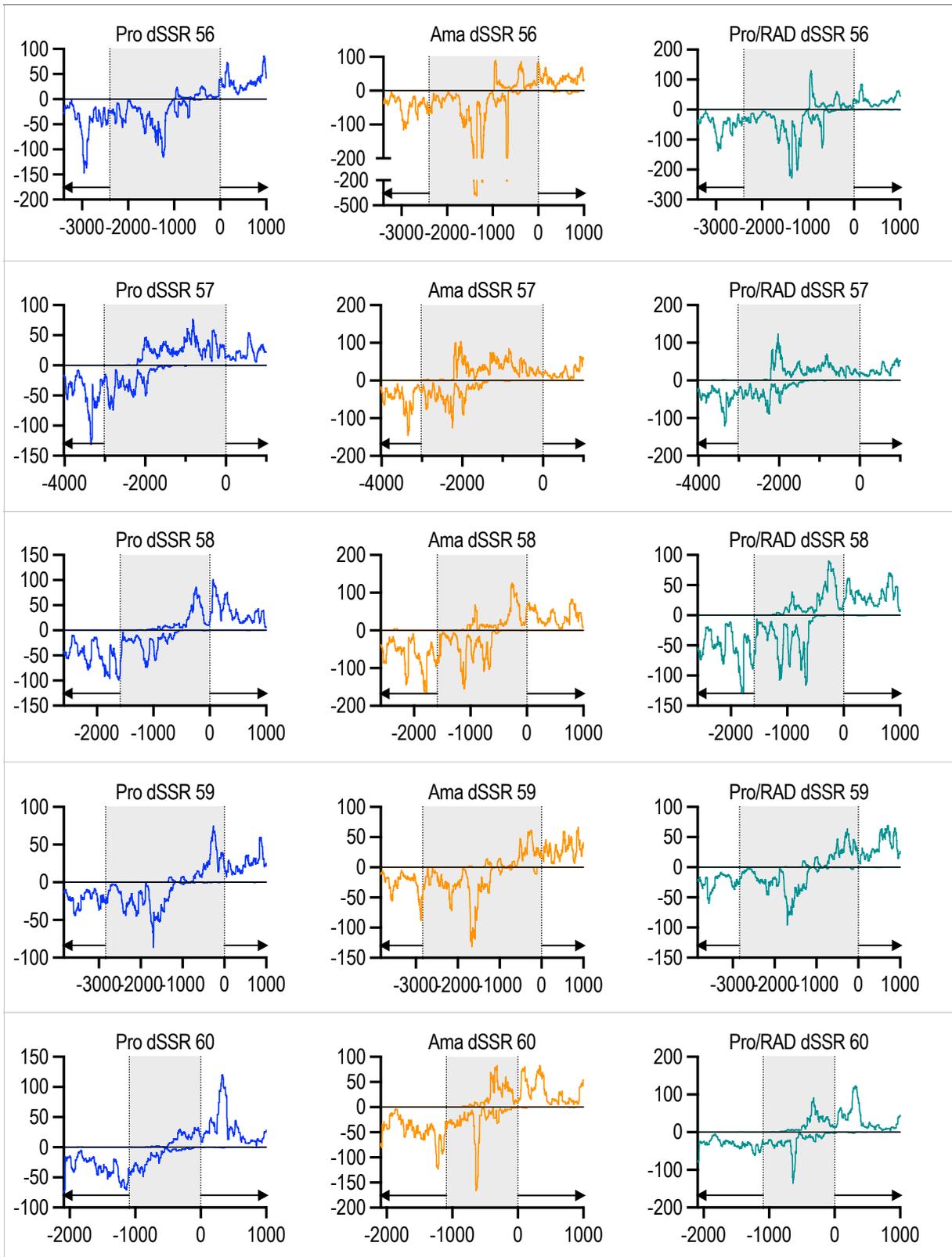
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



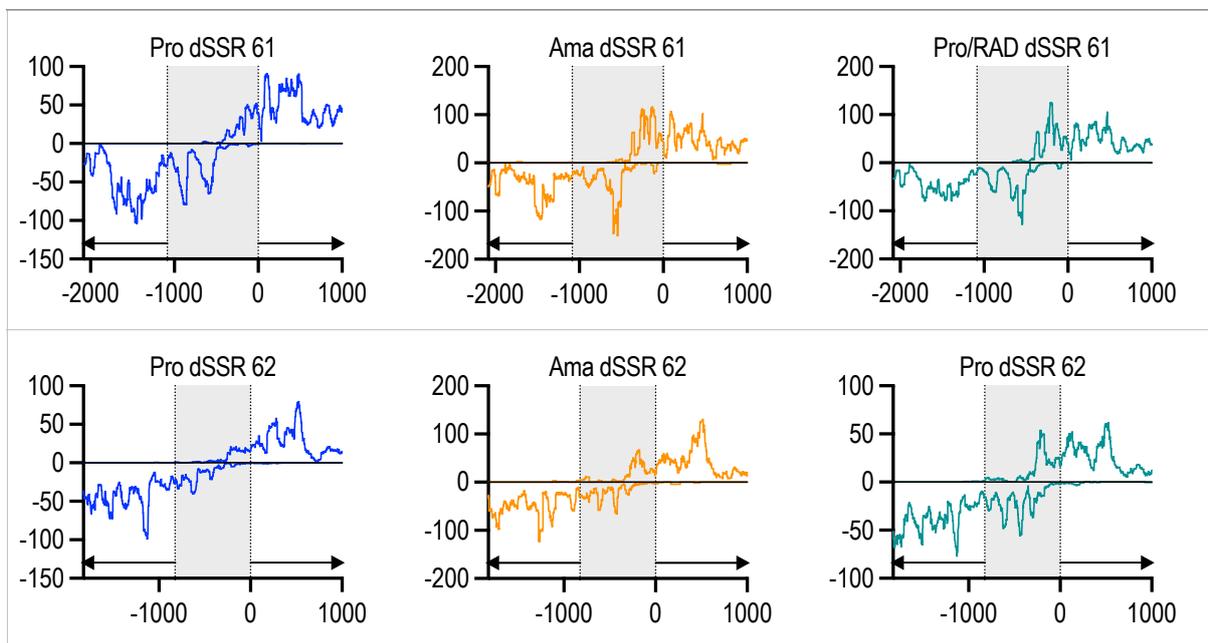
**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



**Tabelle 35: Genomweite Transkriptionsinitiation innerhalb von dSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 62 dSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp den Beginn der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie den Beginn der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der dSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils die ersten 1000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



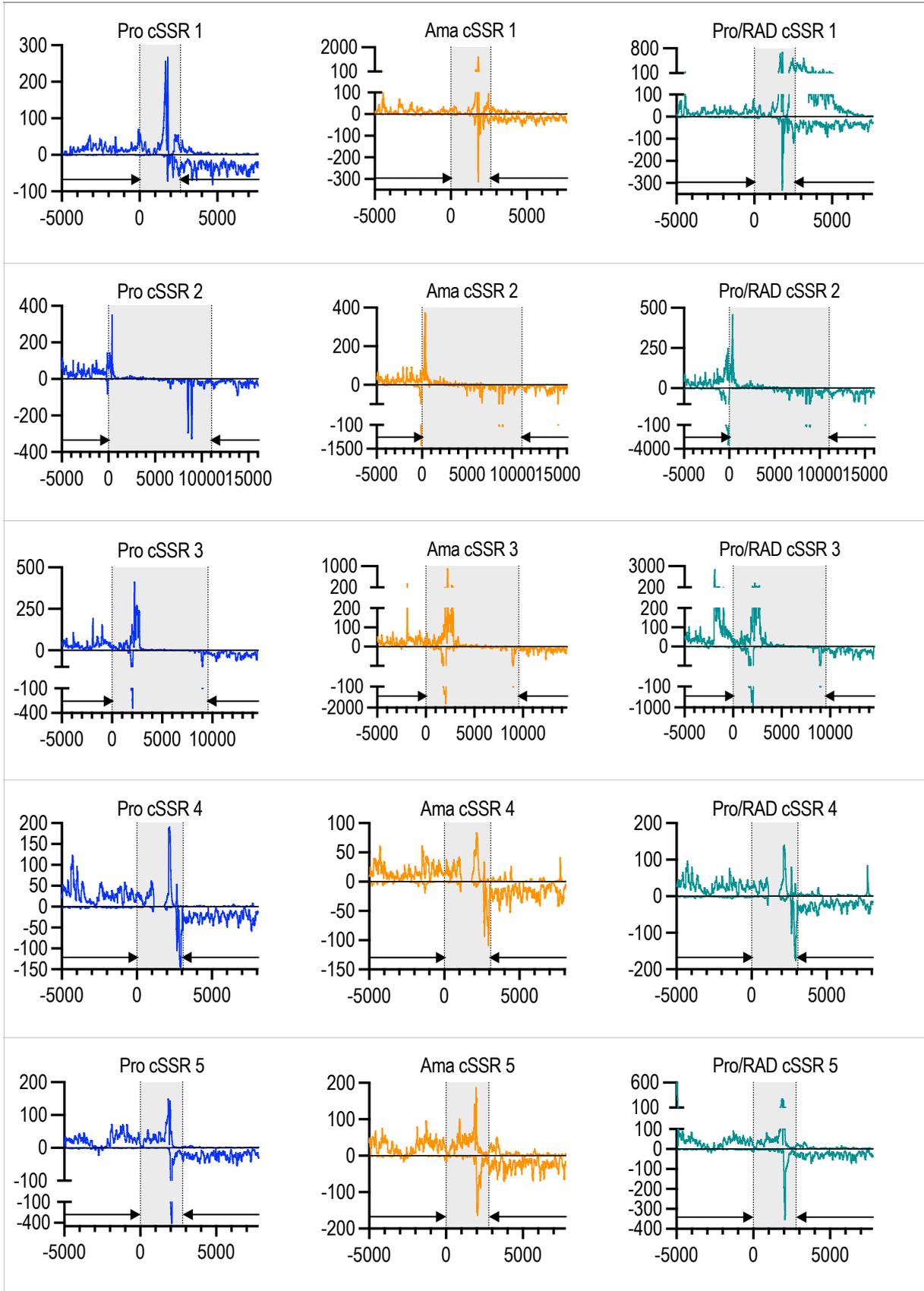
**Tabelle 36: Übersicht der Positionen der cSSRs im Genom von *L. donovani*.** Die zugehörigen Chromosomen der dSSRs und die Position (bp) der Stopcodons der PTU1 und PTU2 sind angegeben. Außerdem wurde die Anzahl an tRNA-Genen innerhalb der cSSR angegeben.

| cSSR | Chromosom  | Stopcodon (0 bp) PTU 1 (Position) | Stopcodon PTU 2 (Position) | tRNA |
|------|------------|-----------------------------------|----------------------------|------|
| 1    | Ld03_v01s1 | 259354                            | 261977                     | 1    |
| 2    | Ld04_v01s1 | 121412                            | 132458                     | 0    |
| 3    | Ld05_v01s1 | 358882                            | 368442                     | 1    |
| 4    | Ld05_v01s1 | 415179                            | 418259                     | 0    |
| 5    | Ld06_v01s1 | 508969                            | 511760                     | 0    |
| 6    | Ld07_v01s1 | 111810                            | 116105                     | 0    |
| 7    | Ld08_v01s1 | 346473                            | 350076                     | 0    |
| 8    | Ld09_v01s1 | 278604                            | 285298                     | 2    |
| 9    | Ld09_v01s1 | 422071                            | 431458                     | 4    |
| 10   | Ld10_v01s1 | 264187                            | 269432                     | 0    |
| 11   | Ld11_v01s1 | 156118                            | 163901                     | 0    |
| 12   | Ld12_v01s1 | 173607                            | 176010                     | 0    |
| 13   | Ld13_v01s1 | 212121                            | 213494                     | 0    |
| 14   | Ld13_v01s1 | 545831                            | 557715                     | 0    |
| 15   | Ld14_v01s1 | 162412                            | 173709                     | 0    |

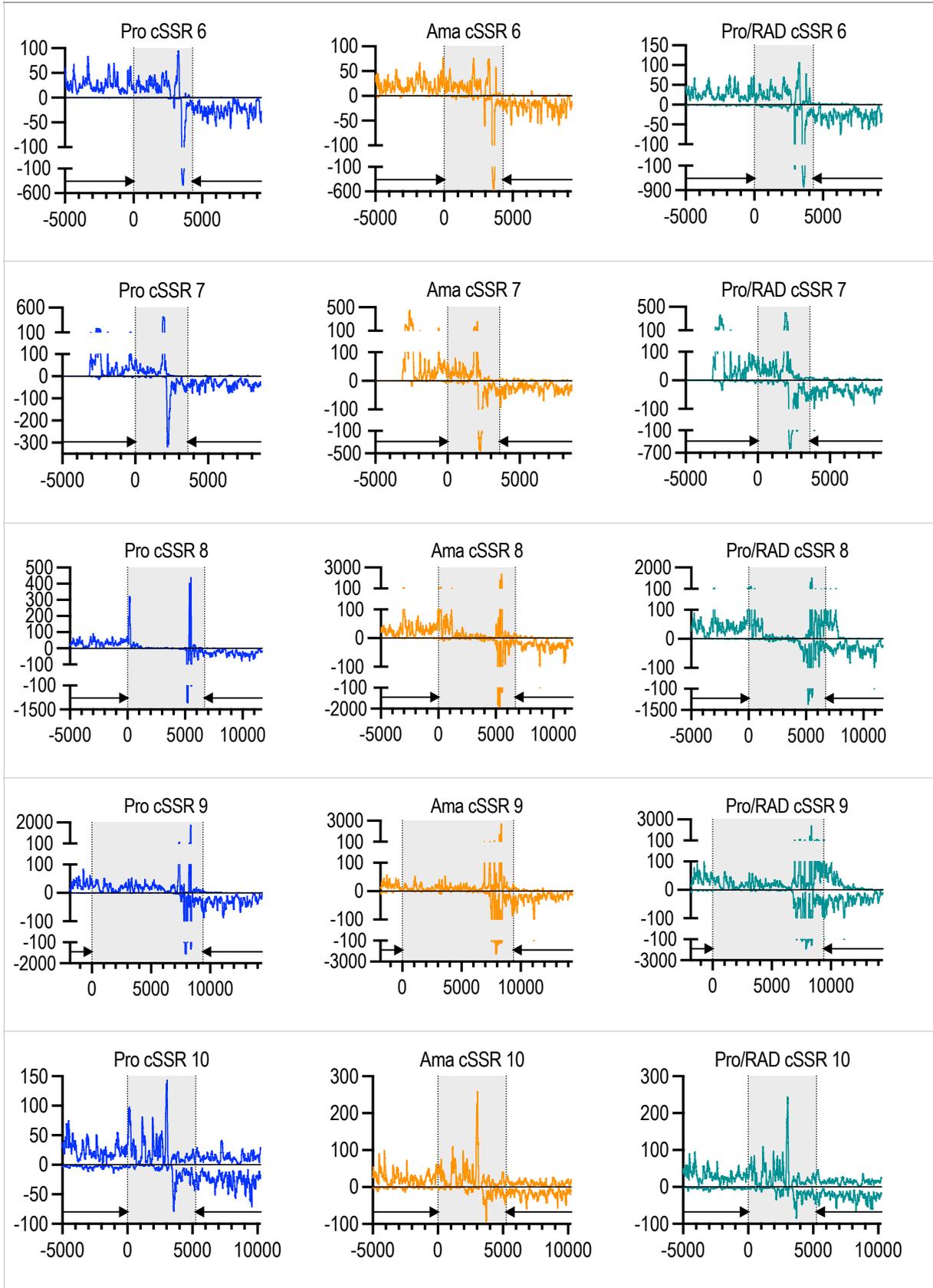
**Tabelle 36: Übersicht der Positionen der cSSRs im Genom von *L. donovani*.** Die zugehörigen Chromosomen der dSSRs und die Position (bp) der Stopcodons der PTU1 und PTU2 sind angegeben. Außerdem wurde die Anzahl an tRNA-Genen innerhalb der cSSR angegeben.

| cSSR | Chromosom  | Stopcodon (0 bp) PTU 1<br>(Position) | Stopcodon PTU 2<br>(Position) | tRNA |
|------|------------|--------------------------------------|-------------------------------|------|
| 16   | Ld15_v01s1 | 311997                               | 320020                        | 0    |
| 17   | Ld16_v01s1 | 445590                               | 446458                        | 1    |
| 18   | Ld20_v01s1 | 662899                               | 665390                        | 0    |
| 19   | Ld21_v01s1 | 162750                               | 164635                        | 0    |
| 20   | Ld21_v01s1 | 446690                               | 448341                        | 0    |
| 21   | Ld22_v01s1 | 474492                               | 475400                        | 0    |
| 22   | Ld23_v01s1 | 228469                               | 231675                        | 10   |
| 23   | Ld24_v01s1 | 656784                               | 659800                        | 3    |
| 24   | Ld25_v01s1 | 410861                               | 413312                        | 0    |
| 25   | Ld25_v01s1 | 885361                               | 895911                        | 0    |
| 26   | Ld27_v01s1 | 304853                               | 306194                        | 0    |
| 27   | Ld27_v01s1 | 650308                               | 656373                        | 0    |
| 28   | Ld27_v01s1 | 984901                               | 1003132                       | 0    |
| 29   | Ld28_v01s1 | 164547                               | 165189                        | 0    |
| 30   | Ld28_v01s1 | 599887                               | 609351                        | 0    |
| 31   | Ld28_v01s1 | 1060924                              | 1061686                       | 0    |
| 32   | Ld29_v01s1 | 655503                               | 661812                        | 0    |
| 33   | Ld30_v01s1 | 761399                               | 762325                        | 1    |
| 34   | Ld31_v01s1 | 332493                               | 336849                        | 0    |
| 35   | Ld31_v01s1 | 1496106                              | 1504597                       | 0    |
| 36   | Ld32_v01s1 | 542514                               | 546351                        | 0    |
| 37   | Ld32_v01s1 | 942398                               | 945751                        | 0    |
| 38   | Ld33_v01s1 | 696508                               | 696944                        | 0    |
| 39   | Ld34_v01s1 | 295475                               | 303726                        | 0    |
| 40   | Ld34_v01s1 | 481776                               | 483842                        | 5    |
| 41   | Ld34_v01s1 | 1702219                              | 1703182                       | 0    |
| 42   | Ld35_v01s1 | 628298                               | 634673                        | 0    |
| 43   | Ld35_v01s1 | 1081304                              | 1082110                       | 0    |
| 44   | Ld35_v01s1 | 1950334                              | 1960664                       | 0    |
| 45   | Ld35_v01s1 | 2095259                              | 2112029                       | 0    |
| 46   | Ld36_v01s1 | 494489                               | 500830                        | 0    |
| 47   | Ld36_v01s1 | 1041254                              | 1045966                       | 1    |
| 48   | Ld36_v01s1 | 1909564                              | 1911020                       | 0    |

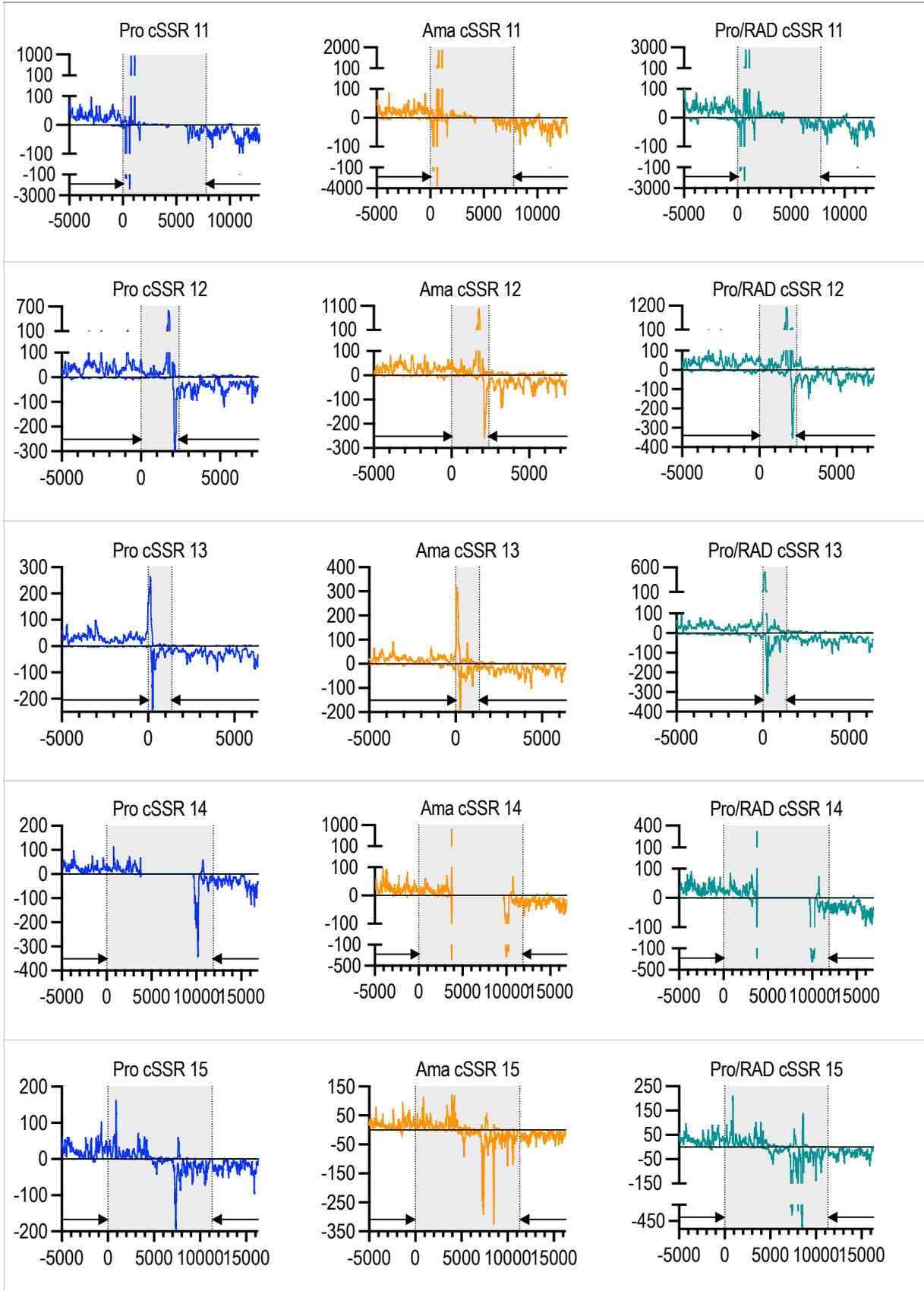
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



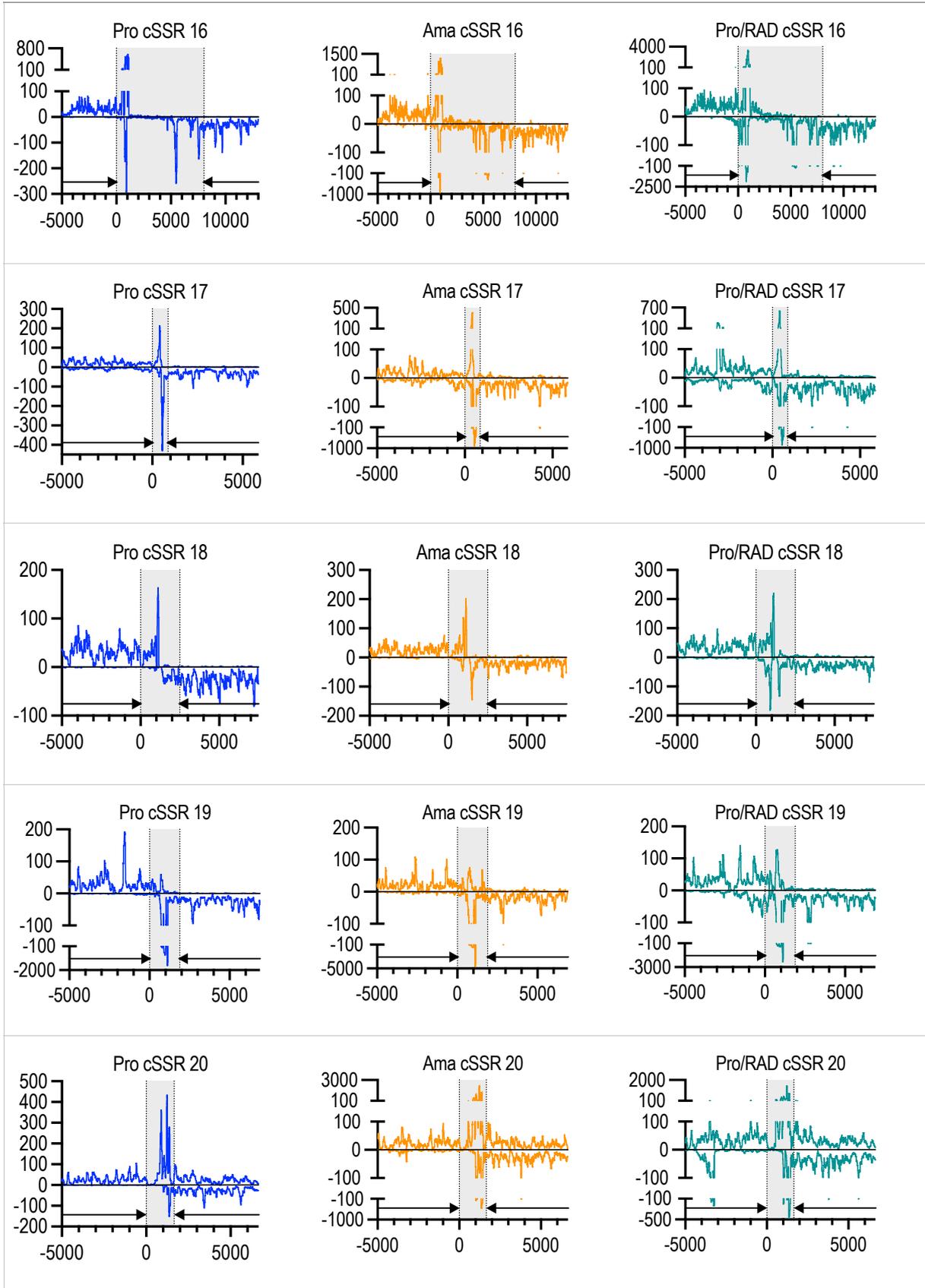
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



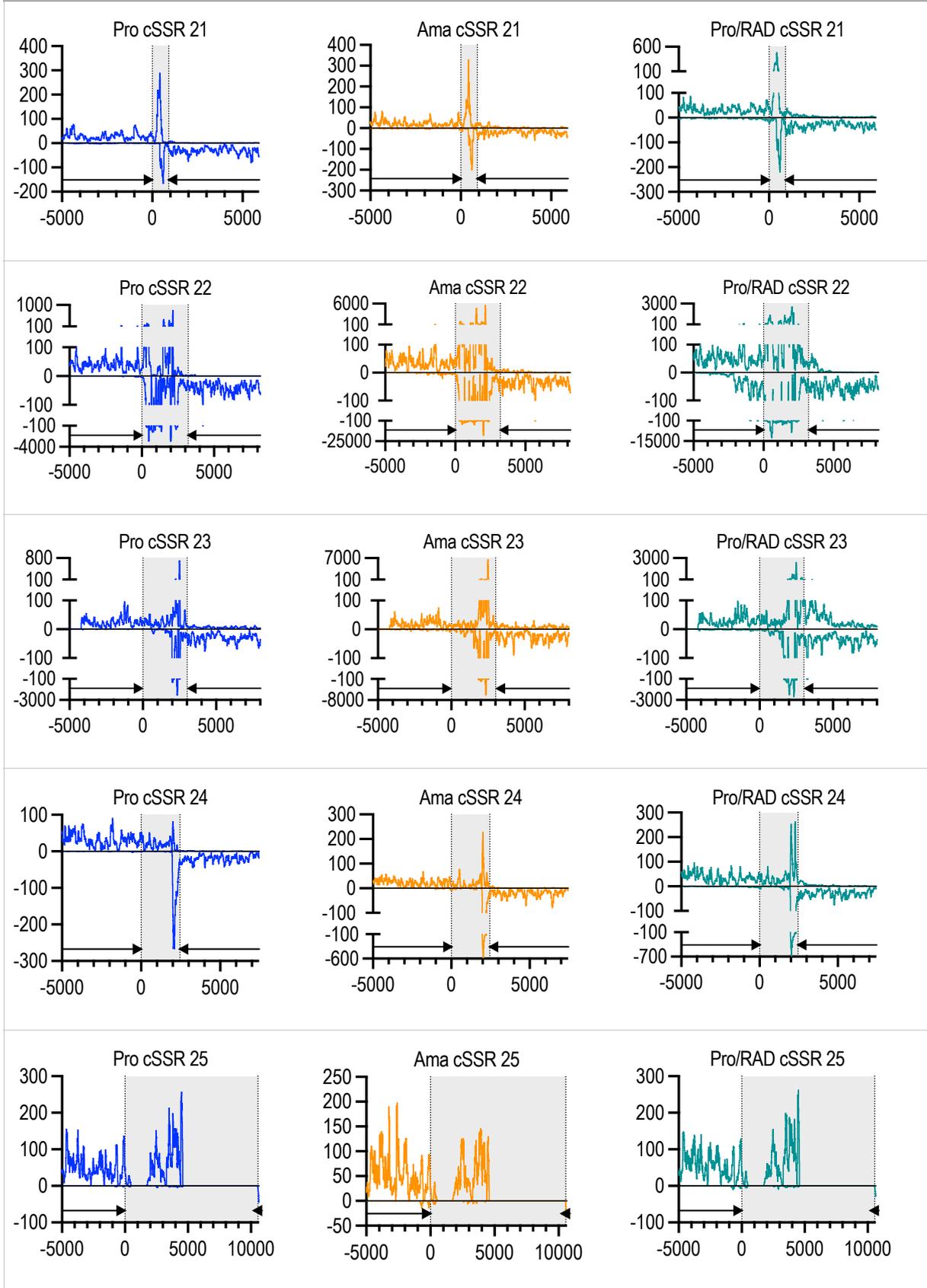
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



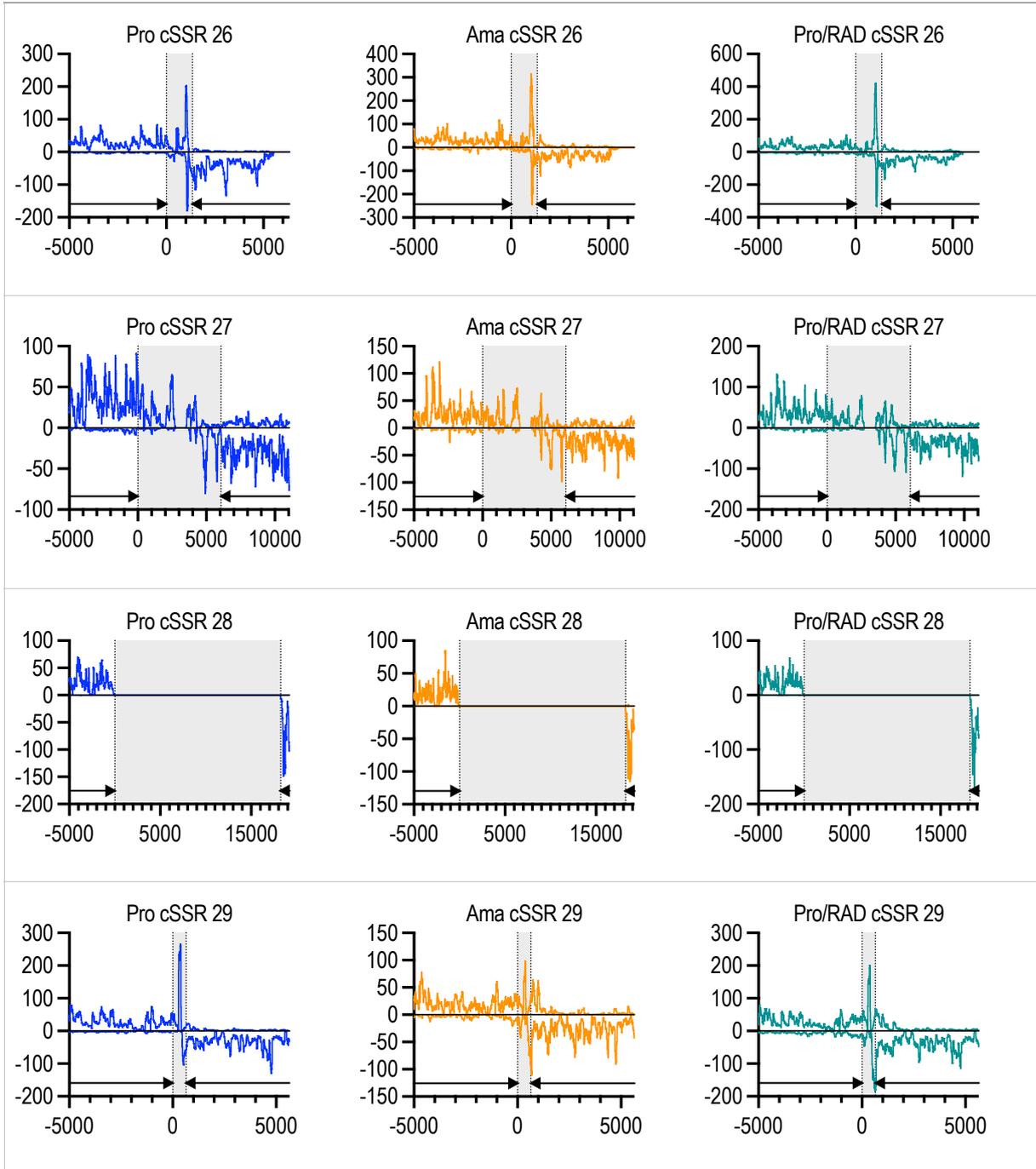
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



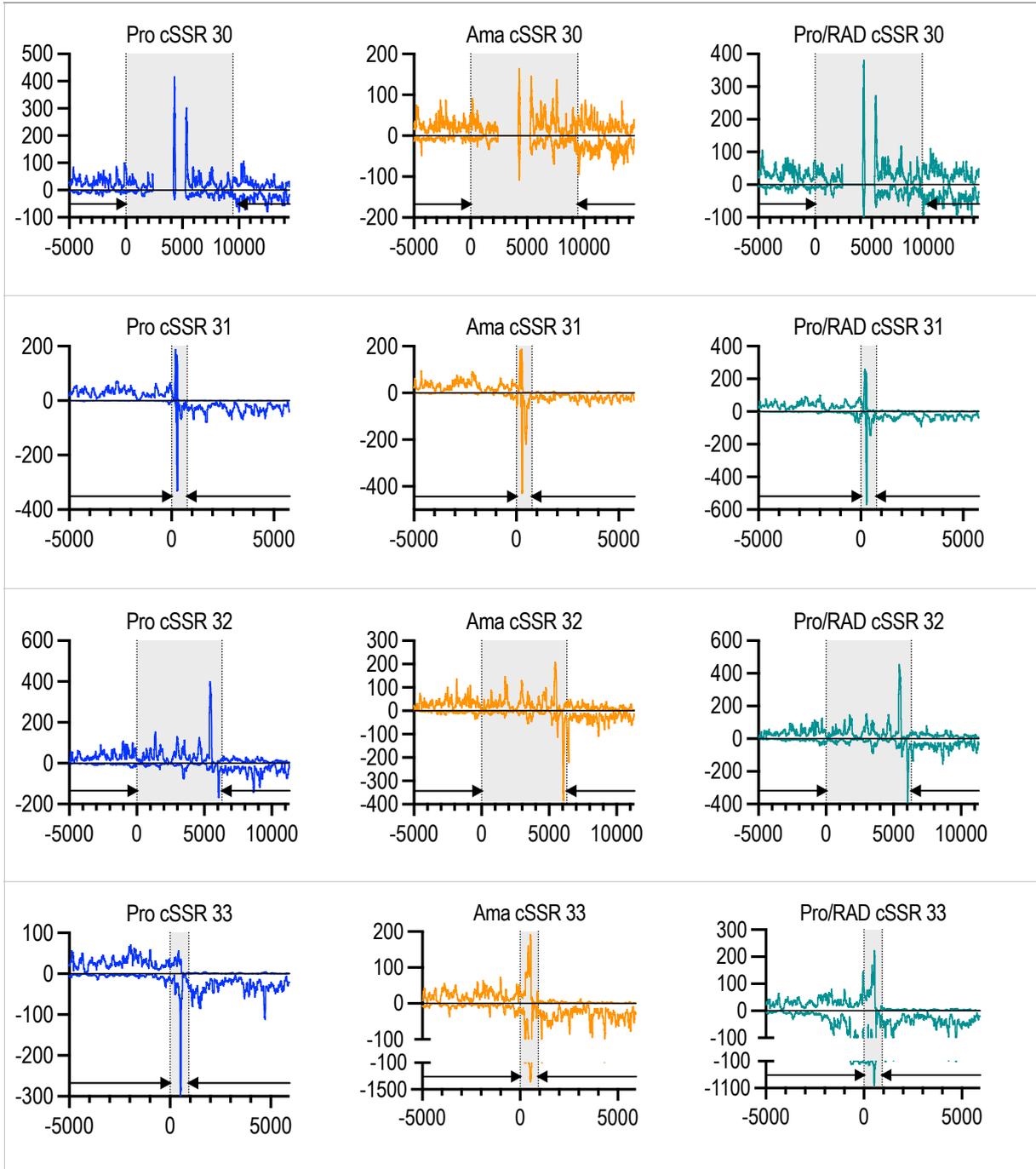
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



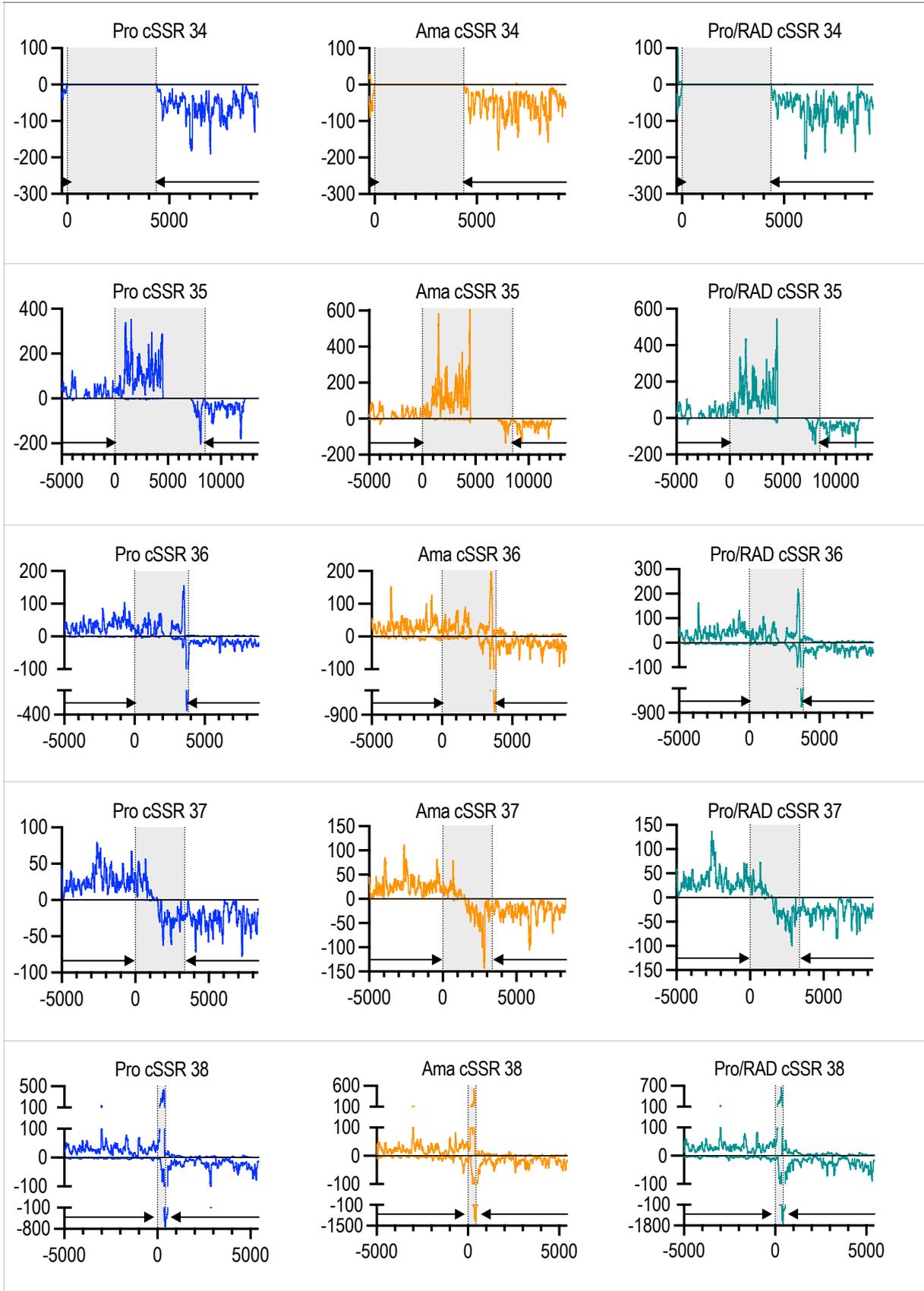
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



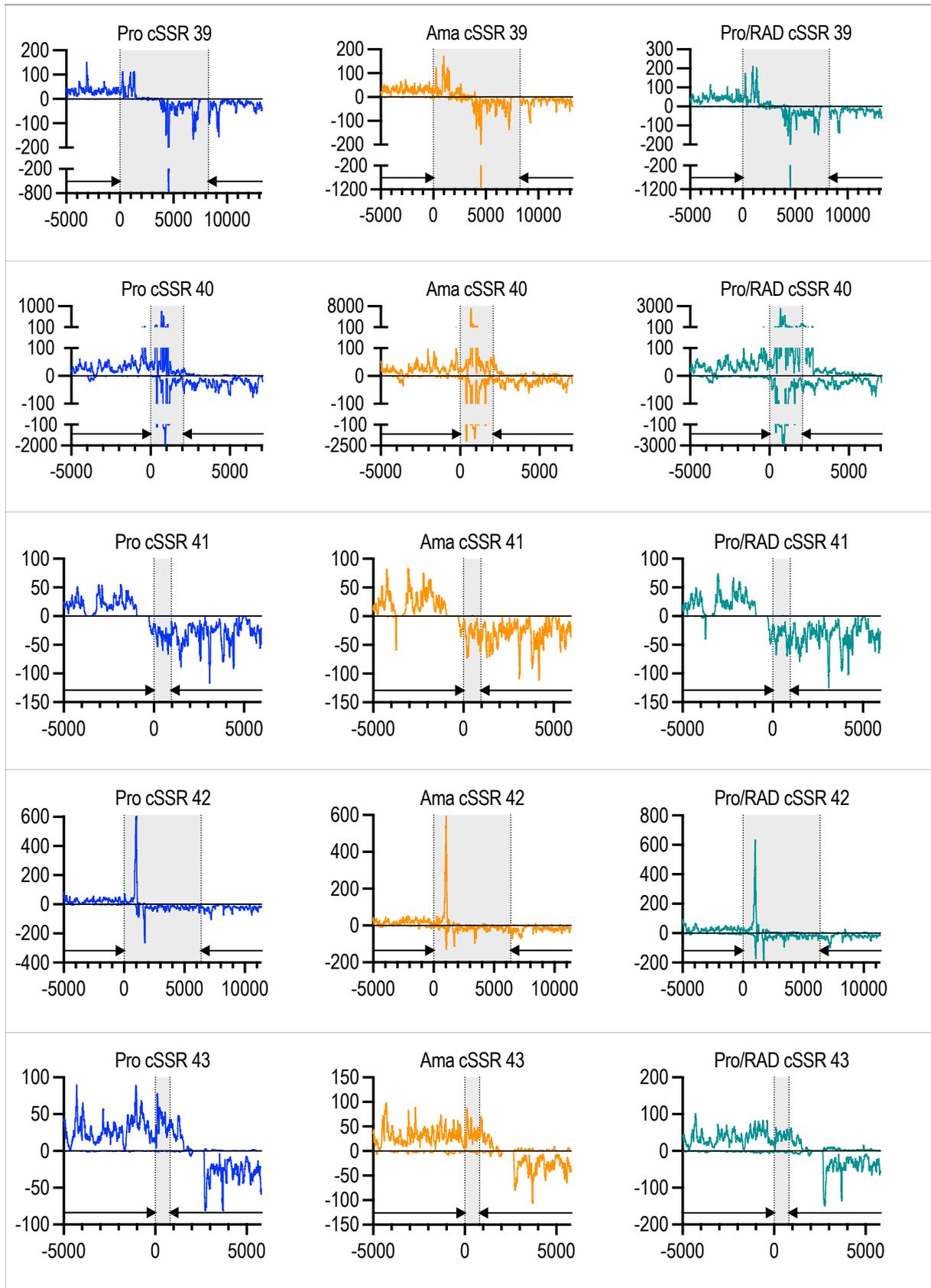
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



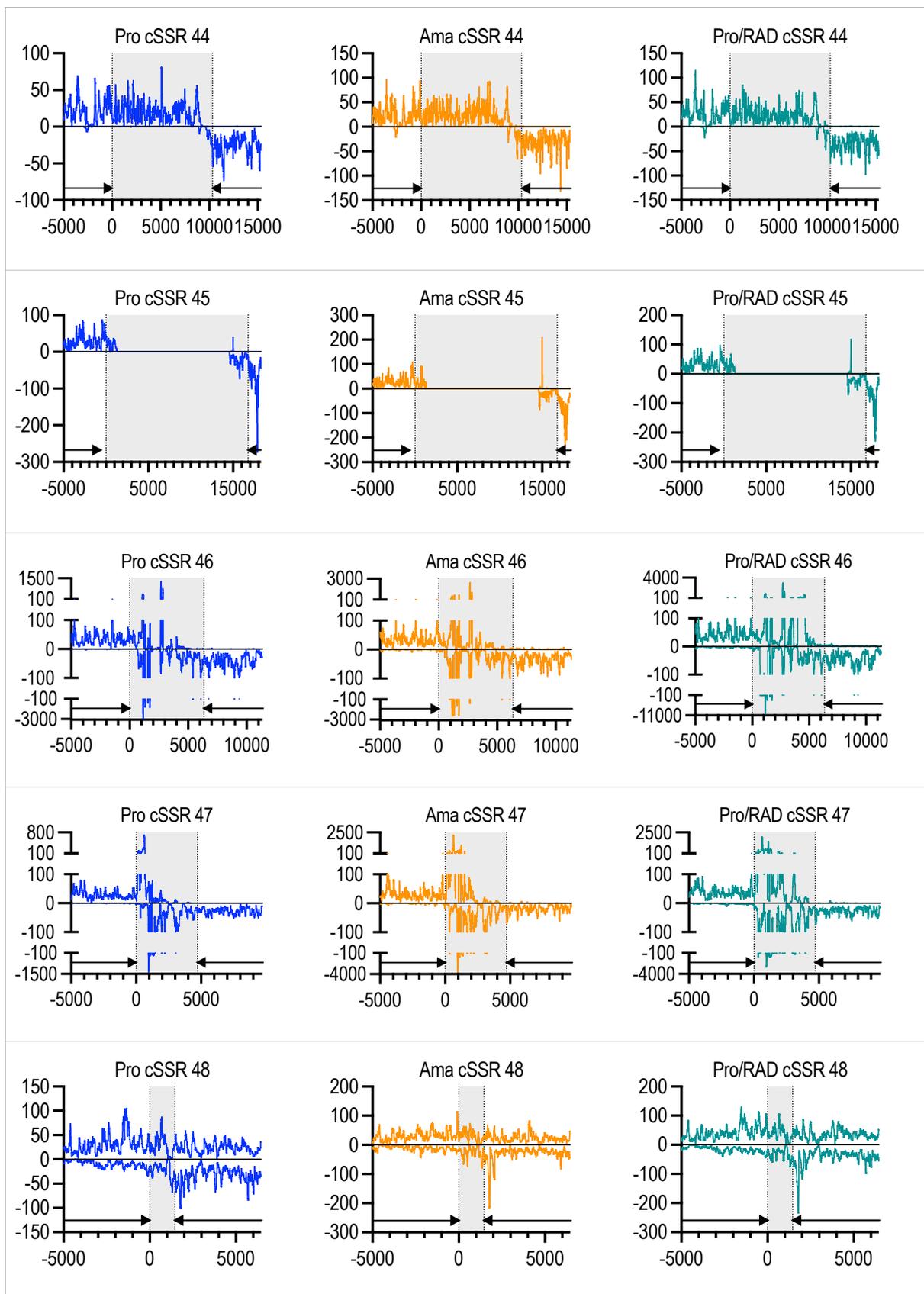
**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



**Tabelle 37: Genomweite Transkriptionstermination innerhalb von cSSRs in *L. donovani*.** Dargestellt sind alle 48 cSSRs in Promastigoten (Pro, blau), axenischen Amastigoten (Ama, orange) und RAD-behandelten Promastigoten (Pro/RAD, grün). Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der *reads* und auf der X-Achse die Position in bp, wobei die gestrichelte Linie bei 0 bp das Ende der PTU1 markiert und die andere gestrichelte Linie das Ende der PTU2. Grau hinterlegt sind die Bereiche der cSSRs. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. Abgebildet wurden jeweils 5000 bp einer PTU. n=3 (Mittelwert).



## Publikationen

Kröber-Boncardo, C., **Grünebast, J.**, and Clos, J. (2020). Heat Shock Proteins in Leishmania Parasites. Heat Shock Proteins Springer, Dordrecht.

**Grünebast, J.**, and Clos, J. (2020). Leishmania: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. Comput Struct Biotechnol J 18, 4016-4023.

**Grünebast, J.**, Lorenzen, S., Zummack, J., and Clos, J. (2021). Life Cycle Stage-Specific Accessibility of Leishmania donovani Chromatin at Transcription Start Regions. mSystems, e0062821.

# Danksagung

Ich möchte Danke sagen. Ohne die wunderbare Unterstützung verschiedener Personen, wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Ein riesiges Dankeschön geht an meinen Doktorvater PD Dr. Joachim Clos. Vielen Dank Joachim, dass du es mir ermöglicht hast, dieses spannende Projekt bearbeiten zu dürfen und mich dabei unterstützt hast. Deine Tür stand immer offen und unsere gemeinsamen Diskussionen haben dazu beigetragen mein Projekt voranzubringen. Ich habe viel von dir lernen können und du hast immer die richtigen Worte gefunden, um mich zu motivieren.

Ich möchte mich außerdem ganz herzlich bei Prof. Dr. Tim Gilberger für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Auch danke ich dir für die Zusammenarbeit im Rahmen der BNITM Graduiertenschule und deiner tollen Art uns Doktoranden am BNI Freude an der Wissenschaft zu vermitteln.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Co-Betreuer Dr. Stephan Lorenzen und Dr. Nicole Gilberger. Ich danke euch für eure hilfreichen Anmerkungen zu meinem Projekt im Rahmen der PhD Seminare.

Bei Dr. Stephan Lorenzen möchte ich mich auch für die tolle Zusammenarbeit in der bioinformatischen Auswertung der ATAC-seq und PRO-seq Daten bedanken. Dr. Daniel Cadar und seinem Team mit Alexandra Bialonski und Heike Baum danke ich für die Sequenzierung meiner ATAC-seq und PRO-seq *libraries*.

Ich danke Dr. Constanze Kröber-Boncardo für die wunderbare gemeinsame Zeit im Büro und die tollen Gespräche, wenn wir beide mal keine Lust mehr hatten. Auch im Labor konnte ich vieles von dir lernen und dich vor allem in meiner Anfangszeit immer mit Fragen löchern.

An dieser Stelle geht ein riesiges Dankeschön an Christine Brinker und Annika Bea, die mich über die drei Jahre im Labor begleitet haben und immer für mich da waren. Ihr habt alle Höhen und Tiefen meiner Promotion miterlebt und mich immer wieder aufgebaut, wenn Experimente einmal nicht so klappen wollten wie geplant. Dank euch und Conny, sind die drei Jahre eine super tolle, spaßige Zeit gewesen.

Und nicht zu vergessen möchte ich allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Clos danken. Ihr habt diese Zeit so einzigartig gemacht, jeder auf seine/ihre eigene Weise: Anne MacDonald, Annemarie Dresbach, Dr. Dolores Jiménez Antón, Dorothea Zander-Dinse, Julia Zummack, Lars Scheer, Maximilian Holz, Miriam Ohlhagen, Myrine Holm, Nala Blenck, Sophia Goldmann, Valerie Bornholdt und Dr. Vanessa Adai. Besonders hervorheben möchte ich die Mitarbeit von Julia, Lars, Maxi, Miriam und Sophia, die mir mit MNase Verdauen, RNA-Isolationen oder bei Nebenprojekte geholfen haben.

Und zuallerletzt bedanke ich mich von Herzen für die Unterstützung während dieser Zeit bei meiner Familie und meinen Freunden. Danke, dass ihr alle immer für mich da seid und ihr zu meinem Leben gehört! Danke Mama und Papa, dass ihr mir das Studium ermöglicht und nie aufgehört habt an mich zu glauben.