

Alternative Modellorganismen

Mehr Diversität für die Zellbiologie – Trypanosomen als Vorreiter

BROOKE MORRISWOOD, MARKUS ENGSTLER
THEODOR-BOVERI-INSTITUT, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Molecular cell biology is overwhelmingly focused on a small number of organisms, most of which are found in a single taxonomic supergroup. Consequently, our knowledge of cellular biodiversity in terms of both behaviour and morphology is extremely limited. The African trypanosome, *Trypanosoma brucei*, is an outstanding laboratory organism, a causative agent of human and livestock disease, and a good example of the wealth of extreme cell biology that can be found in these more unexplored taxa.

DOI: 10.1007/s12268-019-1068-0
© Springer-Verlag 2019

■ Von den fünf eukaryotischen Supergruppen waren bislang nur die Ophistokonta im Fokus der molekularen und zellulären Biologie. Das ist kein Wunder, denn zu ihnen gehören sowohl die Metazoen als auch die Pilze, das heißt in dieser systematischen Schublade befinden sich die *mainstream*-Modellsysteme, wie Bäckerhefe, *Caenorhabditis*, *Drosophila* oder die Maus (**Abb. 1**). Gleichzeitig impliziert das aber auch, dass wir einen Großteil des eukaryotischen Lebens vernachlässigen. Die Taxonomie hat sich mittels moderner Genomik auch den weit entfernten Ästen des eukaryotischen Baums genähert. Nun ist es an der Zeit, dass die Zellbiologie nachzieht.

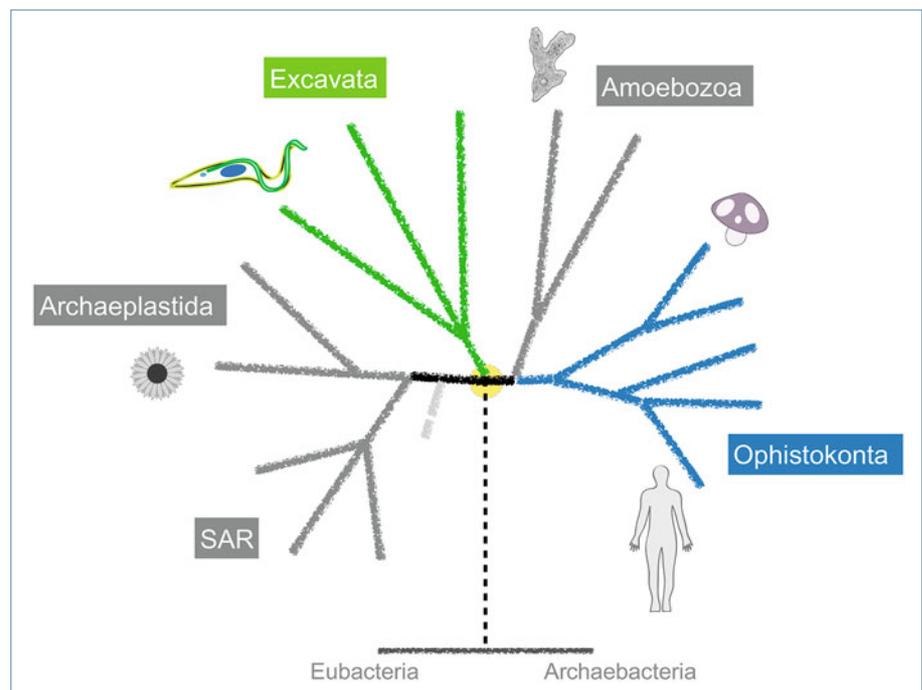
Die Excavata gehören sicherlich zu den am wenigsten untersuchten eukaryotischen Gruppen. Dabei stehen sie an der Wurzel des Stammbaums und müssen somit als unsere entferntesten Verwandten angesehen werden. Wie wenig wir über die Excavata wissen, zeigt die erst kürzlich gemachte Entdeckung, dass eine einzige Art von Diplonemen in den Meeren häufiger vorkommt, als alle marinen Ciliaten zusammen [1]. Der biochemische Baukasten der Protista ist weitgehend vergleichbar mit dem der Metazoen, aber die Evolution hat die Protista mit teilweise bizarren zellbiologischen Bauplänen versehen, die die gesamte Bandbreite des Möglichen erst sichtbar machen. Was der Parasit *Giardia intestinalis* aus Mikrotubuli „baut“, nämlich z. B. einen sehr effektiven Saugnapf, ist verblüf-

fend – und die molekularen Mechanismen dieser Konstrukte sind kaum verstanden [2]. Das Studium von Architektur, Struktur und Verhalten divergenter Eukaryoten, idealerweise unter Berücksichtigung der nativen Mikroumwelten, ist essenziell für ein Verständnis der Evolution der Zelle. Das ist kein

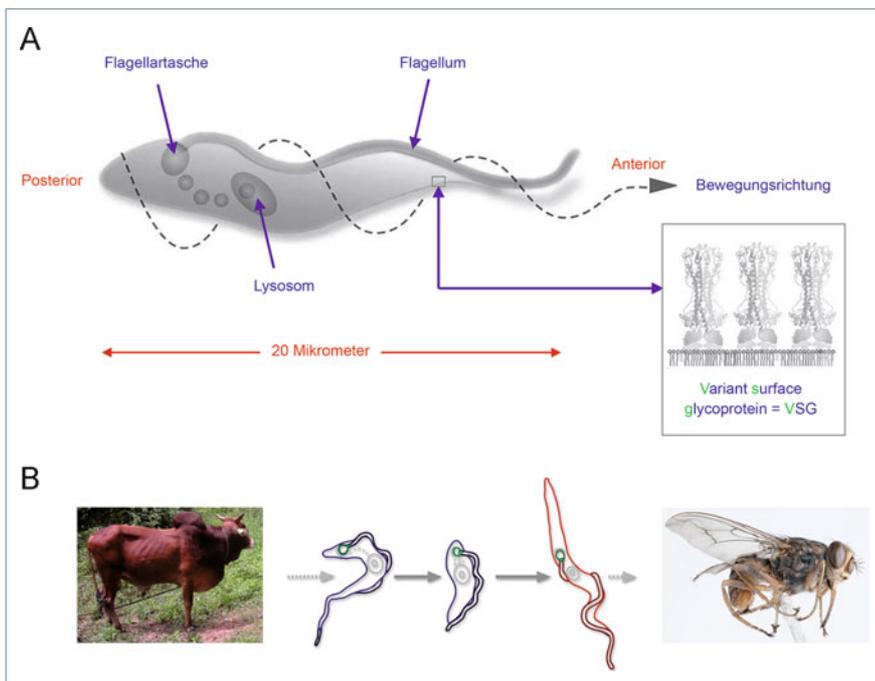
rein akademisches Ansinnen, denn zu den „vernachlässigten“ Eukaryoten gehören auch die Erreger vieler Erkrankungen von Mensch und Tier.

Warum Trypanosomen?

Die wahrscheinlich bekanntesten unter diesen Erregern sind die Trypanosomatiden. Sie rufen drei von 20 der WHO-gelisteten vernachlässigten Tropenkrankheiten hervor, die zusammen weit mehr als eine Milliarde Menschen bedrohen. Die afrikanische Schlafkrankheit, die Chagas-Krankheit und Leishmaniosen sind typische Armutsseuchen. Trypanosomen sind zudem für katastrophale Viehseuchen verantwortlich, die pro Jahr mehr als zwei Milliarden Euro Schaden verursachen. Aufgrund ihrer medizinischen Bedeutung wurde den Trypanosomen wesentlich mehr Aufmerksamkeit geschenkt als allen anderen Excavata. Das gilt in besonderem Maße für den Parasiten *Trypanosoma brucei*, dem Erre-



▲ **Abb. 1:** Der grob skizzierte eukaryotische Stammbaum verdeutlicht, dass die Excavata, zu denen auch die Trypanosomen gehören, phylogenetisch weit entfernt von den Ophistokonta sind.



▲ **Abb. 2:** Im Lebenszyklus entwickeln Trypanosomen eine Reihe von Variationen eines grundlegenden Bauplans. **A,** Trypanosomen haben eine spindelförmige Zellarchitektur. Das Flagellum ist am Zellkörper angeheftet, der von einem dichten Mantel aus variablen Oberflächen-glykoproteinen bedeckt ist. Die meisten Zellorganellen liegen in Trypanosomen singularär vor. **B,** Trypanosomen werden von der Tsetsefliege übertragen. Der Lebenszyklus der Parasiten in der Fliege und im Säugetier verläuft über eine Vielzahl von Entwicklungsstadien, die alle eine charakteristische Morphologie und Motilität aufweisen.

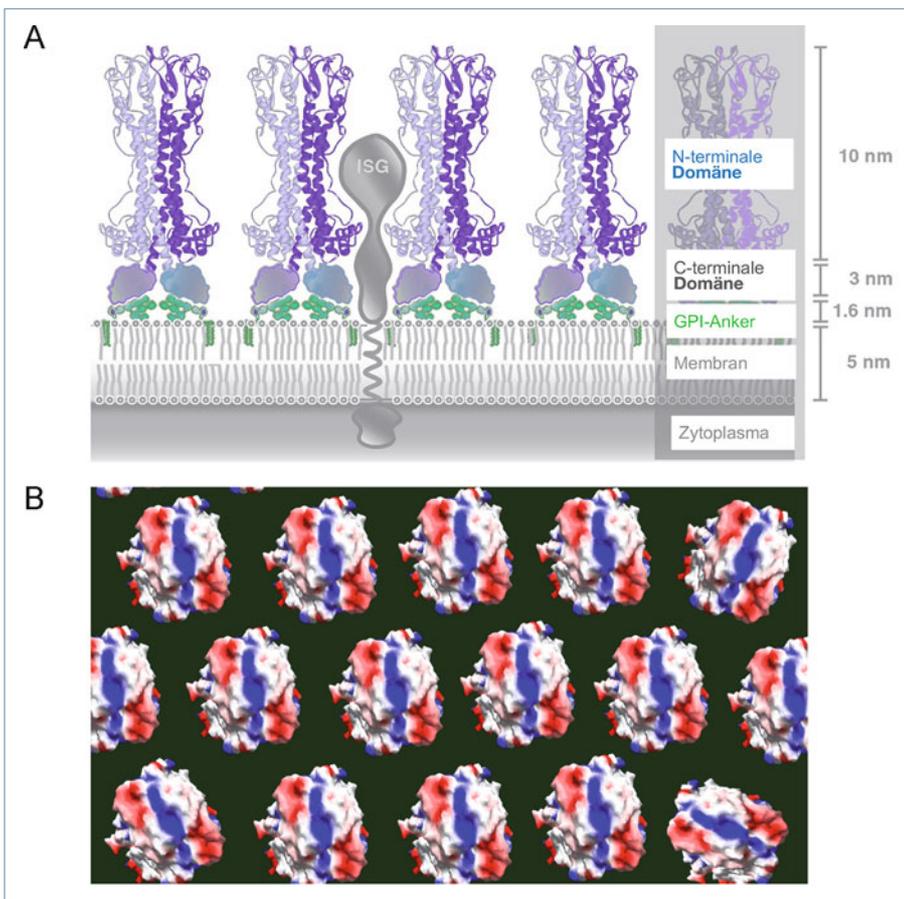
ger der afrikanischen Rinderseuche Nagana (**Abb. 2**). Die Liste der Entdeckungen, die mit *T. brucei* gemacht wurden, ist lang und beeindruckend. Die Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Verankerung von Membranproteinen wurde genauso in Trypanosomen entdeckt wie die RNA-Editierung oder das *trans*-Spleißen [3]. Die ausgeklügelten molekularen Mechanismen, die der Immunevasion der Trypanosomen im Säugetier zugrunde liegen, sind paradigmatisch. Die Endocytose und der endosomale Fluss sind in *T. brucei* auf kinetischem Niveau besser charakterisiert als in wahrscheinlich jedem anderen System, einschließlich Säugetierzellen [4]. Der Parasit recycelt seine gesamte Zelloberfläche alle zwölf Minuten, das heißt viel schneller als beispielsweise ein Makrophage. Dieser Membranfluss ist umso bemerkenswerter, als die Endo- und Exocytose in Trypanosomen nur innerhalb eines kleinen, abgeschlossenen Areals stattfindet, der flagellaren Tasche (**Abb. 2A**). Dieses geheimnisvolle „extrazelluläre Organell“ macht nur fünf Prozent der Zelloberfläche aus. Die Tasche liegt am posterioren Ende der Zelle, genau dort, wo sich die Basis des singularären Flagellums des Parasiten befin-

det. Die flagellare Tasche ist das Schweizer Taschenmesser der Trypanosomen: Dort finden nicht nur Membran- und Stoffaustausch statt, sondern hier wird auch die Zellteilung orchestriert [3].

Betrachtet man die basale Zellarchitektur der Trypanosomen, fallen sofort weitere Besonderheiten auf: Die meisten Organellen liegen als Einzelkopie vor, und zwar stets an der gleichen Stelle im Cytoplasma. Das Mitochondrium ist im Blutstadium degeneriert und metabolisch nur rudimentär aktiv. Die Parasiten decken ihren Energiebedarf im Säugetier allein durch Glykolyse, die in spezifischen Organellen stattfindet, den Glykosomen. Später im Lebenszyklus entwickelt sich in kürzester Zeit ein voll aktives Mitochondrium.

Antigenvariation und Antikörperentfernung

Die trypanosomale Zelloberfläche ist die evolutionäre Antwort auf den kontinuierlichen Immunangriff des Wirtes. Sie ist von einem dichten Mantel bedeckt, der zu 95 Prozent aus einem einzigen Protein besteht, dem GPI-verankerten variablen Oberflächenglykoprotein VSG (*variant surface glycoprotein*;



▲ **Abb. 3:** Der Mantel der *variant surface glycoproteins* (VSGs) bei Trypanosomen. **A,** Die Plasmamembran der Trypanosomen wird von VSGs dominiert – homodimeren, GPI-verankerten Membranproteinen. Trypanosomen verfügen über Hunderte von VSGs, die monoallel exprimiert werden und die molekulare Basis für die Antigenvariation der Parasiten darstellen. VSGs bedecken auch invariante Proteine (ISGs), wie Transporter und Rezeptoren. **B,** Eine simulierte Aufsicht auf den VSG-Mantel verdeutlicht die dichte, aber auch flexible Packung der VSGs auf der trypanosomalen Zelloberfläche. Die Ladung der Moleküle ist farbcodiert (azidisch: rot; basisch: blau).

Abb. 3. VSGs sind Homodimere mit N- und C-terminalen Domänen. Erst kürzlich haben wir die Struktur mehrerer kompletter VSGs gelöst und die Dynamik des VSG-Mantels auf Einzelmolekülebene vermessen [5]. Während man bislang von einem starren Schutzschild aus VSGs ausgegangen war, der den Parasiten quasi wie eine Rüstung von der Umwelt abschirmt, zeigen unsere Arbeiten nun, dass der Mantel hoch dynamisch ist [5]. Er operiert dabei an der Grenze des physikalisch Möglichen. VSGs können spontan zwischen zwei C-terminalen Konformationen wechseln, was eine komplette Abschirmung der Plasmamembran bei optimaler Mobilität der VSGs und maximaler, adaptiver Proteindichte erlaubt. Diese bemerkenswerte zellbiologische Lösung ist vielfach funktionell, insbesondere während der Zellteilung, wenn das gesamte VSG-Komplement verdoppelt werden muss, ohne dabei die protektive Funktion einzubüßen.

Die Antigenvariation der trypanosomalen Zelloberfläche war mit ausschlaggebend für den evolutionären Erfolg der Parasiten. VSGs werden, wie sonst nur ribosomale RNAs, von der RNA-Polymerase I transkribiert, und zwar in langen, polycistronischen Transkriptionseinheiten. Die Prä-mRNAs werden durch 5'-*trans*-Spleißen prozessiert [6].

Stets wird nur ein einziges VSG-Gen exprimiert, und zwar von einer subtelomeren *expression site* (ES). Es gibt 15 ES mit unterschiedlichen VSG-Genen, von denen aber nur eine aktiv ist. Die anderen 14 sind reprimiert, was *T. brucei* zu einem Paradigma für monoallele Exklusion gemacht hat. Die Antigenvariation in Trypanosomen ist faszinierend und komplex. Es gibt Tausende von VSG-Genen auf nicht-transkribierten Minichromosomen, die spontan in eine ES rekombinieren können.

Die Antigenvariation ist die Langzeit-Verteidigungsstrategie gegen das Immunsystem

des Säugerwirts. Auf kürzeren Zeitskalen greift ein raffiniertes Zusammenspiel von lokalisierter Endocytose und zellulärer Motilität. Binden Antikörper an die Oberfläche der Trypanosomen, werden sie aufgrund des hydrodynamischen Widerstands der VSG-Antikörper-Komplexe entgegen der Schwimmrichtung zur Flagellartasche transportiert. Dort werden sie rasch endocytotiert [7]. Für den Prozess der Antikörperentfernung sind gerichtete Motilität und die besondere Zellarchitektur der Trypanosomen essenziell. Das Flagellum entspringt in der Flagellartasche und verläuft entlang des spindelförmigen Zellkörpers. Mit jedem Schlag des Flagellums wird somit die gesamte Zelle deformiert, was die Fortbewegungsweise der Trypanosomen einzigartig macht. Wir konnten zeigen, dass die Amplitude der trypanosomalen Schwimmbewegung ideal an die jeweilige Mikroumwelt angepasst ist, unter anderem an das dicht gepackte Milieu im Blut des Wirts [8].

Die Chancen von Lebenszyklen

Trypanosomen durchlaufen, wie viele andere Parasiten auch, einen Lebenszyklus. Es gibt eine Reihe von genetisch identischen, aber morphologisch und metabolisch durchaus sehr unterschiedlichen Lebensstadien. Die Parasiten werden von der Tsetsefliege übertragen. Die Passage durch die Fliege dauert viele Wochen, in denen die Trypanosomen mehrere, sehr unterschiedliche Formen ausbilden, die perfekt an die jeweilige Umwelt angepasst sind. Mittels Fluoreszenzlichtblatt-Mikroskopie haben wir die komplexen Organstrukturen der Tsetsefliege vermessen. Durch Hochgeschwindigkeitsfluoreszenzmikroskopie konnten wir die komplexe Dynamik und Navigation der Parasiten im Fliegenkörper verfolgt. Dabei haben wir besonders die Transitionen zwischen solitärer und kollektiver Bewegung analysiert sowie das Schwimmen entlang von Oberflächen [9]. Beide Phänomene werden aktuell in der Physik intensiv diskutiert.

Wir entwickeln künstliche Hautmodelle, die von den blutsaugenden Tsetsefliegen akzeptiert werden und die es uns erlauben, die frühe Zellentwicklung nach dem Biss des Insektes auf molekularer und metabolischer Ebene zu untersuchen. Das ist wichtig, da Mäuse und Ratten keine natürlichen Wirte darstellen. Das zeigt sich daran, dass der Verlauf der Infektion untypisch ist und die Erreger nicht persistieren. Persistenz zeichnet aber einen Parasiten aus, und Trypanosomen haben dafür viele zellbiologische Strategien

entwickelt. *T. brucei* limitiert die eigene Populationsgröße im Wirt durch *Quorum sensing*. Bei erhöhter Zelldichte entwickelt sich aus der profilierenden *slender*-Form das Zellzyklus-arretierte *stumpy*-Stadium. Dieses Ruhestadium kann die Tsetsefliege mit großer Effizienz infizieren [10].

Zeit für die Biodiversität?

Ein großer Vorteil, über den etablierte Modellsysteme verfügen, ist ihr molekularer Werkzeugkasten. Viele Laboratorien haben über Dekaden hinweg Techniken entwickelt und optimiert. Die ersten eukaryotischen Genmanipulationen wurden entsprechend an Hefen und Säugerzellen durchgeführt. Die ersten vollständig sequenzierten Genome waren die von Modellorganismen. Die wichtigsten Entdeckungen in der Zellbiologie wurden mit Modell-Eukaryoten gemacht. Das könnte man so unterschreiben, wenn es denn stimmte. In der Tat basierten bahnbrechende Erkenntnisse häufig auch auf dem Studium von „exotischen“ Organismen. Die Entdeckung von Clathrin-vermittelter Endocytose oder der cAMP-Signaltransduktion sind Beispiele dafür. RNA-Interferenz wurde zeitgleich in *C. elegans* und in *T. brucei* entdeckt, der Nobelpreis ging aber nur an den Modell-Nematoden.

Heute sind alle molekularen und zellbiologischen Werkzeuge in Trypanosomen und anderen Protista etabliert. Viele Arten und Stämme sind sequenziert, und genetische Manipulation ist kein Problem. Nun ist es Zeit für die nächsten Schritte: Die molekulare Analyse von Wirt-Pathogen-Interaktionen und die

Untersuchung der zellbiologischen Adaptation an dynamische Umwelten sind heute möglich. Das bedeutet vielleicht, dass wir nun den Blick weg von den wenigen Modellen, hin auf die große zellbiologische Diversität der Eukaryoten lenken können. ■

Literatur

- [1] Flegontova O, Flegontov P, Malviya S et al. (2016) Extreme diversity of diplomonid eukaryotes in the ocean. *Curr Biol* 26:3060–3065
- [2] Nosala C, Hagen KD, Dawson SC (2018) ‘Disc-o-fever’: getting down with *Giardia*’s groovy microtubule organelle. *Trends Cell Biol* 28:99–112
- [3] Morriswood B, Engstler M (2017) Let’s get fISSical: fast *in silico* synchronization as a new tool for cell division cycle analysis. *Parasitology* 7:1–14
- [4] Overath P, Engstler M (2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol* 53:735–744
- [5] Bartossek T, Jones NG, Schafer C et al. (2017) Structural basis for the shielding function of the dynamic trypanosome variant surface glycoprotein coat. *Nat Microbiol* 2:1523–1532
- [6] Goos C, Dejung M, Wehman AM et al. (2019) Trypanosomes can initiate nuclear export co-transcriptionally. *Nucleic Acids Res* 47:266–282

- [7] Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S et al. (2007) Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131:505–515
- [8] Bargul JL, Jung J, McOdimba FA et al. (2016) Species-specific adaptations of trypanosome morphology and motility to the mammalian host. *PLoS Pathog* 12:12:e1005448
- [9] Schuster S, Kruger T, Subota I et al. (2017) Developmental adaptations of trypanosome motility to the tsetse fly host environments unravel a multifaceted *in vivo* microswimmer system. *Elife* 6, doi: 10.7554/eLife.27656
- [10] Zimmermann H, Subota I, Batram C et al. (2017) A quorum sensing-independent path to stumpy development in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 13:e1006324

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Markus Engstler
 Dr. Brooke Morriswood
 Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie
 Theodor-Boveri-Institut
 Biozentrum
 Universität Würzburg
 Am Hubland
 D-97074 Würzburg
 Tel.: 0931-31-80060 (M. Engstler);
 -83556 (B. Morriswood)
 markus.engstler@biozentrum.uni-wuerzburg.de
 brooke.morriswood@uni-wuerzburg.de
 www.zeb.biozentrum.uni-wuerzburg.de

AUTOREN



Brooke Morriswood

1998–2002 Biochemiestudium an der Universität Cambridge, UK. 2006 Promotion im Bereich Molekulare Zellbiologie bei Dr. J. Kendrick-Jones am Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. 2007–2014 Postdoc bei Prof. Dr. G. Warren an der Universität Yale, USA, und Max F. Perutz Laboratories, Wien, Österreich. Seit 2015 Nachwuchsgruppenleiter am Lehrstuhl für Zell und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg.



Markus Engstler

1986–1991 Biologiestudium an der Universität Kiel. 1994 Promotion in Biochemie. 1994–1998 Postdoc an der Rockefeller Universität, New York, USA, bei Prof. Dr. G. A. M. Cross und am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei Prof. Dr. M. Boshart. 1998–2001 Projektleiter an der FU Berlin. 2001–2004 Gruppenleiter an der LMU München. Dort 2004 Habilitation im Fach Genetik. 2006–2009 Professor am Institut für Genetik und Mikrobiologie der TU Darmstadt. Seit 2009 Professor und Leiter des Lehrstuhls Zell- und Entwicklungsbiologie am Biozentrum der Universität Würzburg.