

***Trypanosoma brucei*: Untersuchungen
zum Lebenszyklus, zur Differenzierung
und zur Wachstumshemmung durch den
Eisenchelator Deferoxamin unter
besonderer Berücksichtigung der
Ribonukleotid-Reduktase**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

D386

vorgelegt von
Tanja Breidbach

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15.02.2002

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2002

***Trypanosoma brucei*: Untersuchungen
zum Lebenszyklus, zur Differenzierung
und zur Wachstumshemmung durch den
Eisenchelator Deferoxamin unter
besonderer Berücksichtigung der
Ribonukleotid-Reduktase**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

D386

vorgelegt von
Tanja Breidbach

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15.02.2002

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2002

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden in der Zeit von September 1998 bis April 2001 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dietmar Steverding (Hygiene-Institut der Universitätsklinik Heidelberg, Abteilung Parasitologie) und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Luise Krauth-Siegel (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) durchgeführt.

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Niedner-Schatteburg

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. R. L. Krauth-Siegel

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. R. Luise Krauth-Siegel und PD Dr. Dietmar Steverding für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der finanziellen Mittel, die zahlreichen praktischen Hilfen und die angeregten Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Dissertation zu begutachten und für sein reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Niedner-Schatteburg danke ich für die Übernahme des Promotionsvorsitzes.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Afrikanische Trypanosomen	1
1.2	Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.3	Eisenabhängige Enzyme von <i>Trypanosoma brucei</i>	6
1.3.1	Ribonukleotid-Reduktase	7
1.3.2	Superoxid-Dismutase	12
1.3.3	Alternative Oxidase	13
1.3.4	Aconitase	16
1.4	Ziele	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien	18
2.2	Antikörper	19
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Häufig verwendete Puffer	20
2.5	Stammlösungen der Testsubstanzen	20
2.6	Verbrauchsmaterialien	21
2.7	Geräte	22
2.8	Zellkultur	23
2.8.1	Kultivierung von <i>T. b. brucei</i> TC221	23
2.8.2	Gewinnung und Kultivierung prozyklischer <i>T. b. brucei</i> AnTat 1.1	23
2.8.3	Auftauen von Trypanosomen	24
2.8.4	Einfrieren von Trypanosomen	24

2.8.5	Bestimmung der Zelldichte	25
2.8.6	Wachstumsversuche	25
2.9	Gewinnung von Bluttrypanosomen aus infizierten Mäusen	25
2.9.1	Infektion von Mäusen	25
2.9.2	Isolierung und Aufreinigung von Trypanosomen	26
2.10	Proteinanalytik	27
2.10.1	Herstellung von Zellysaten	27
2.10.2	Proteinbestimmung	27
2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.10.3.1	Herstellung der Gele und Durchführung der Elek- trophorese	28
2.10.3.2	Silberfärbung	29
2.11	Immunologische Methoden	30
2.11.1	Western Blotting	30
2.11.2	Affinitätsreinigung von Antiserum	31
2.11.3	Produktion von VSG AnTat 1.1 Antikörpern	32
2.11.3.1	Reinigung von <i>T. b. brucei</i> VSG	32
2.11.3.2	Immunisierung von Mäusen	33
2.12	Analytische Durchflusszytometrie	33
2.12.1	Fixierung und Färbung der Trypanosomen	33
2.12.2	Analyse des DNA-Gehalts mit dem Durchflusszytometer	34
2.13	Molekularbiologische Methoden	34
2.13.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>T. b. brucei</i>	35
2.13.2	Quantifizierung von RNA	36
2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.13.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.13.4.1	Durchführung der RT-PCR	37
2.13.4.2	Herstellung von R1- und R2-spezifischen DIG-mar- kierten Sonden	38
2.13.5	Southern Blotting	39
2.14	Enzymtests	41
2.14.1	Alternative Oxidase	41

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	3
2.14.2 Ribonukleotid-Reduktase	42
2.14.3 Superoxid-Dismutase	44
2.14.4 Diaphorase-Assay	45
2.14.5 Dihydroliponamid-Dehydrogenase	46
2.15 Messung der DNA-Synthese	46
3 Ergebnisse	48
3.1 Untersuchungen zur Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von <i>T. b. brucei</i>	48
3.1.1 Die Ribonukleotid-Reduktase im Lebenszyklus von <i>T. b. brucei</i>	48
3.1.2 Die Ribonukleotid-Reduktase im Zellzyklus von <i>T. b. brucei</i>	51
3.2 Untersuchungen zur Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf Sauerstoffverbrauch, DNA-Synthese und Superoxid-Dismutase-Aktivität von kulturadaptierten Bluttrypanosomen	54
3.2.1 Wirkung von Deferoxamin auf den Sauerstoffverbrauch von <i>T. b. brucei</i> Bluttrypanosomen	54
3.2.2 Wirkung von Deferoxamin auf die DNA-Synthese und die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase von <i>T. b. brucei</i> . .	57
3.2.3 Wirkung von Deferoxamin auf die Aktivität der Superoxid-Dismutase von <i>T. b. brucei</i>	59
3.3 Untersuchungen zur <i>in vitro</i> -Differenzierung von monomorphen, kulturadaptierten Bluttrypanosomen mit dem membranpermeablen cAMP-Derivat 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP	60
3.3.1 Wirkung von pCPTcAMP auf die Proliferation kulturadaptierter Bluttrypanosomen	60
3.3.2 Morphologische und biochemische Veränderungen pCPTcAMP-behandelter kulturadaptierter Bluttrypanosomen	61
3.3.3 Induzierte Differenzierung pCPTcAMP-behandelter, kulturadaptierter Bluttrypanosomen zur prozyklischen Insektenform	66
4 Diskussion	69
4.1 Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von <i>T. b. brucei</i>	69

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	4
4.2 Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf kulturadaptierte Bluttrypanosomen	72
4.3 <i>In vitro</i> -Differenzierung kulturadaptierter, schlanker Bluttrypanosomen zur gedrungenen Form	74
5 Zusammenfassung	76
Literaturverzeichnis	78
Veröffentlichungen	89
A Chemische Strukturen	90
A.1 Medikamente gegen die afrikanische Schlafkrankheit	90
A.2 Deferoxamin und Eisen-Deferoxamin	91
A.3 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP	92

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ALD	Aldolase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Base
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BPGA	1,3-Bisphosphoglycerat
BSA	Albumin aus Rinderserum
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CCA	Citrat/cis-Aconitat
cDNA	<i>copy</i> DNA
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Becquerel)
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DF	Deferoxamin
DFMO	DL- α -Difluormethylornithin
dGDP	Desoxyguanosindiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
DTE	Dithierythrit
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMEM	<i>Earle's modified Eagle medium</i>

EP	<i>glutamic acid repeat protein</i>
E-64	N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid
FAC	Eisen-Ammonium-Citrat
iFCS	(inaktiviertes) Fötale Kälberserum
FeDF	Eisen-Deferoxamin
F-1,6-P ₂	Fructose-1,6-bisphosphat
GA-3-P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
gp	<i>glycoprotein</i>
GLYK	Glycerin-Kinase
GPEET	<i>pentapeptide repeat protein</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathiondisulfid
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	2-(4-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HU	Hydroxyharnstoff
HXK	Hexokinase
LipDH	Dihydroliponamid-Dehydrogenase
LS	<i>long slender</i> Bluttrypanosomen
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MW	Molekulargewicht
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NDP	Nukleosiddiphosphat
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC-Puffer	Phosphat-Citrat-Puffer
pCPTcAMP	8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
PGA	Phosphoglycerat
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PRO	Prozyklische Insektenform-Trypanosomen

PYK	Pyruvat-Kinase
R1 & R2	Untereinheiten einer Klasse I-Ribonukleotid-Reduktase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription von RNA mit anschließender PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat
SHAM	Salicylhydroxamsäure
SIF	<i>stumpy-induction-factor</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SS	<i>short stumpy</i> Bluttrypanosomen
<i>T. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure Natriumsalz
TDB	<i>Trypanosoma dilution buffer</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLCK	N _α -p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon
TPI	Triosephosphat-Isomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS ₂	Trypanothiondisulfid
T(SH) ₂	Trypanothion (reduziert)
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Afrikanische Trypanosomen

Trypanosomen sind in mehr als 30 Ländern Afrikas auf einer Fläche von etwa 10 Mio. km² für schwere neurologische Erkrankungen beim Menschen und bei Nutztieren verantwortlich. Die Erreger sind eingeißelige parasitische Protozoen, die zur Ordnung der *Kinetoplastida* und der Familie der *Trypanosomatidae* gehören. Die wichtigste Spezies in Afrika ist *Trypanosoma brucei*, die sich in drei morphologisch und biochemisch nicht zu unterscheidende Unterarten (*T. b. brucei*; *T. b. gambiense*; *T. b. rhodesiense*) gliedern lässt. Eine Abgrenzung ist jedoch bzgl. des Wirtsspektrums, der Pathogenität und der geographischen Verbreitung möglich. Überträger der Parasiten sind Stechfliegen der Gattung *Glossina* (Tsetsefliegen), die entlang von Flussläufen und in Regenwäldern beheimatet sind. Da die Verbreitung der Trypanosomen an Tsetsefliegen gebunden ist, kommen sie nur im sog. Tsetse-Gürtel Afrikas zwischen 14° nördlicher und 29° südlicher Breite vor (Kuzoe, 1993).

T. b. brucei ist einer der Erreger der Rinderseuche *Nagana*, die die Haltung der meisten Milch- und Fleischrinderrassen in Zentralafrika beeinträchtigt. *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* sind die Erreger der Schlafkrankheit, die für mehr als 60 Mio. Menschen in Afrika eine Bedrohung darstellt. Jedes Jahr werden über 40.000 Neuerkrankungen registriert, wobei die Dunkelziffer in die Hunderttausende geht (WHO, 2001¹). Durch den Stich einer infizierten Tsetsefliege gelangen mit dem Speichel Trypanosomen in das Bindegewebe der Haut, wo sich eine entzündliche Schwellung (*Trypanosomenschanke*) bildet. Ein bis drei Wochen später treten die Parasiten in das Blut- und Lymphsystem über. Dieses Stadium ist u. a. durch Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen gekennzeichnet. Obwohl die Trypanosomen als extrazelluläre Parasiten ständig der Immunantwort des Men-

¹<http://www.who.int/health-topics/aftryps.htm>

schen ausgesetzt sind, können einige wenige Erreger durch antigene Variation der Immunabwehr entgehen und sich weiter vermehren. Diese sind dann wieder Ausgangspunkt für eine neue Parasitämiewelle. Nach einigen Wochen bis Monaten dringen die Trypanosomen ins zentrale Nervensystem ein und rufen u. a. neurologische Störungen hervor. Unbehandelt führt die Schlafkrankheit über Koma zum Tod des Infizierten. Die in West- und Zentralafrika vorherrschende Form der Schlafkrankheit (Erreger: *T. b. gambiense*) zeigt im Gegensatz zur akut verlaufenden ost- und südafrikanischen Variante (Erreger: *T. b. rhodesiense*) einen sich über Monate und Jahre hinziehenden chronischen Verlauf.

Für die Behandlung der Schlafkrankheit stehen nur fünf Medikamente ² zur Verfügung, die alle mehr oder minder starke Nebenwirkungen hervorrufen:

- *Suramin* (seit 1920) ist ein polysulfonierter Naphthylharnstoff, der nur in den frühen Stadien der Schlafkrankheit verwendet werden kann. Suramin inhibiert zahlreiche Enzyme von *T. brucei*, darunter die Glycerin-3-Phosphat-Oxidase (Fairlamb & Bowman, 1977a), die eine bedeutende Rolle bei der Atmung der Bluttrypanosomen spielt (s. 1.3.3).
- *Pentamidin* (seit 1940) ist ein aromatisches Diamidin und findet im frühen Stadium einer *T. b. gambiense*-Infektion Verwendung. Die Wirkung von Pentamidin beruht u. a. auf einer Hemmung der trypanosomalen S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (Bitonti et al., 1986), die essentiell für die Polyamin-Synthese ist.
- *Melarsoprol* (seit 1949) ist eine aromatische Arsen(III)-Verbindung. Sie überwindet die Blut-Hirnschranke und wird aus diesem Grund beim Liquorbefall mit Trypanosomen angewendet. Die trypanozide Wirkung von Melarsoprol beruht u. a. auf einer Komplexierung des parasitären Trypanothions (Fairlamb et al., 1989), dem eine besondere Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress zukommt. Problematisch ist einerseits die hohe Toxizität des Medikamentes, die bei 3-10 % der behandelten Patienten zum Tod führt, andererseits ist in Gebieten von Zentralafrika eine zunehmende Resistenz (bis zu 30 %; WHO, 2001³) der Parasiten gegen das Medikament zu beobachten.
- *Eflornithin* (seit 1990) ist DL- α -Difluormethylornithin (DFMO), das ursprünglich für die Behandlung des Mammakarzinoms entwickelt wurde. Das vergleichsweise teure Medikament inhibiert die Ornithin-Decarboxylase, die für die Polyamin-Synthese wichtig ist. Die Substanz zeigt eine gute Wirkung im frühen und späten Stadium einer *T. b. gambiense*-Infektion.

²Chemische Struktur s. Anhang; die Daten stammen aus: Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections (Abdi et al., 1995)

³<http://www.who.int/health-topics/aftryps.htm>

- *Nifurtimox* (seit Mitte der 70er Jahre), ein 5-Nitrofuran, wird zur Behandlung der südamerikanischen *Chagas-Krankheit* (Erreger: *Trypanosoma cruzi*) eingesetzt, hat sich aber auch bei der Behandlung der fortgeschrittenen westafrikanischen Schlafkrankheit als nützlich erwiesen. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt, könnte jedoch auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen sein. Nifurtimox wird u. a. wegen seiner schlechten Verfügbarkeit in Afrika und aufgrund der wenigen Erfahrungen bei der Behandlung der Schlafkrankheit nur bei einer Melarsoprol-Resistenz der Krankheitserreger verwendet.

1.2 Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

Der Lebenszyklus von *T. brucei* ist durch einen Wirtswechsel zwischen Insekt und Säugetier, einhergehend mit einer Änderung der Morphologie charakterisiert (s. Abb. 1.1).

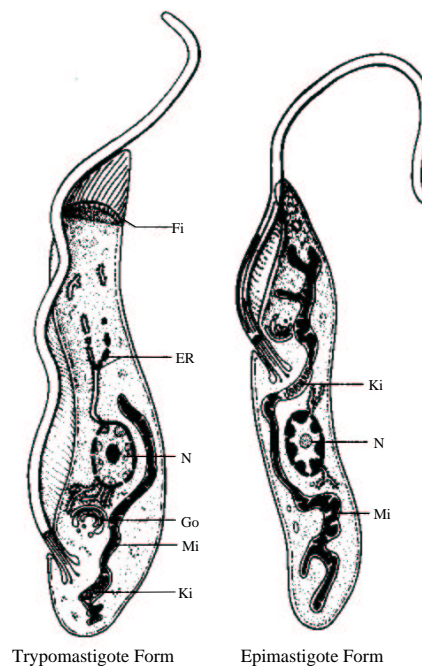


Abbildung 1.1: **Ultrastruktur von *T. brucei* (nach Dönges, 1988)**. Links ist die trypomastigote, rechts die epimastigote Form dargestellt. ER = endoplasmatisches Reticulum; Fi = Fibrillen; Go = Golgi-Apparat; Ki = Kinetoplast; Mi = Mitochondrium; N = Zellkern

Auffallend ist insbesondere die Lage der Geißel relativ zum Zellkern. Bei der trypomastigoten Form entspringt die Geißel hinter dem Zellkern und zieht sich

entlang der Zelloberfläche nach vorn. Epimastigote Trypanosomen besitzen den Geißelursprung kurz vor dem Zellkern. In der Nähe des Geißelursprungs befindet sich der für die Familie der *Trypanosomatidae* charakteristische Kinetoplast. Dieses Organell ist Bestandteil des einzigen Mitochondriums und beinhaltet die mitochondriale DNA.

T. brucei durchläuft einen komplexen Lebenszyklus (s. Abb. 1.2). Dabei treten morphologisch und biochemisch große Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien des Parasiten auf. Am auffälligsten sind dabei die Veränderungen der Mitochondrienaktivität und der Aufbau der Zelloberfläche.

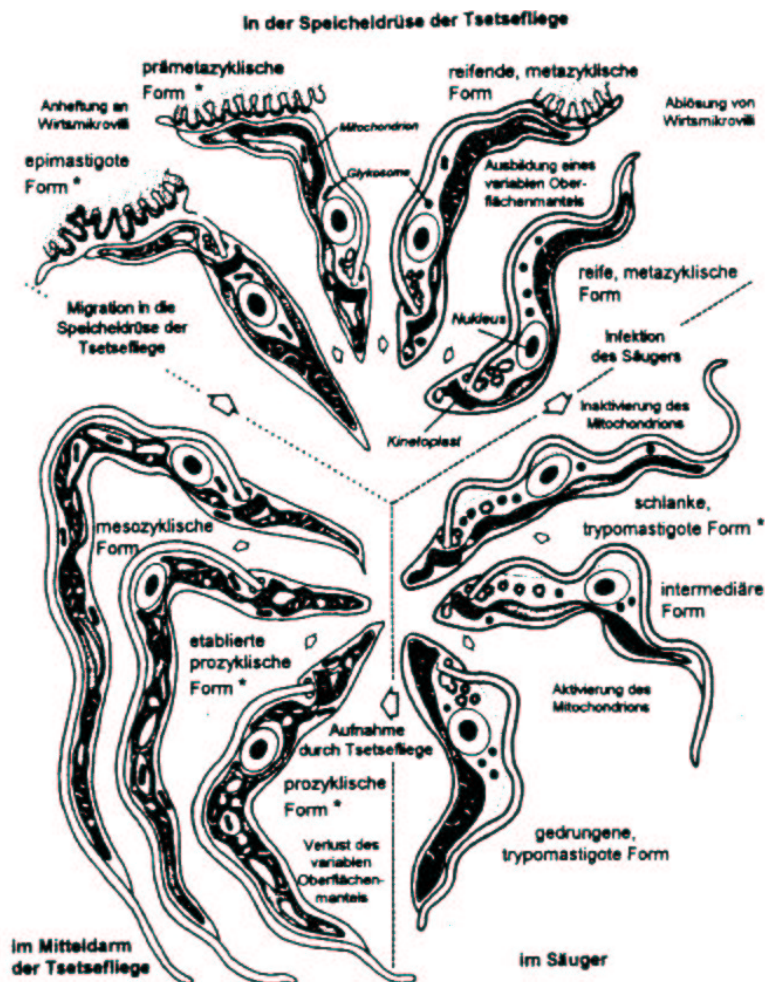


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. brucei* im Säugetier und in der Tsetsefliege (nach Vickerman, 1985). Gezeigt sind insbesondere stadienspezifische Veränderungen der Zelloberfläche und des Mitochondriums.

Mit dem Stich einer Tsetsefliege gelangen einige hundert metazyklische trypomastigote Parasiten in die Haut des Säugetierwirtes. In ca. ein bis drei Wochen

vermehren sich die Infektionsstadien durch Längsteilung in der Nähe der Einstichstelle, ehe sie in das Lymphgefäßsystem und von dort in die Blutzirkulation gelangen. Die trypomastigoten Parasiten sind zunächst schlank und teilungsaktiv. Die 20-30 μm langen Trypanosomen werden auch als *long slender*-Form bezeichnet. Ist eine hohe Parasitendichte (max. 10^6 Zellen/ml; Ziegelbauer, 1994) erreicht, differenziert sich die schlanke Form zur intermediären und schließlich zur gedrunghenen Blutform, die auch als *short stumpy*-Form bezeichnet wird. Diese 15-20 μm langen Trypanosomen sind nicht mehr teilungsaktiv und für den Übergang in die Tsetsefliege präadaptiert. Dieser Transformationsprozess wird durch einen von den schlanken Bluttrypanosomen freigesetzten cAMP-vermittelten Signalstoff (*stumpy-induction-factor*; SIF) hervorgerufen (Vassella et al., 1997). Pleomorphe Trypanosomen-Stämme sind durch die Fähigkeit charakterisiert, sich ausgehend von der sich schnell vermehrenden schlanken Blutform in die sich nicht mehr teilende gedrunghene Blutform zu differenzieren. Monomorphe Trypanosomenstämme, die durch fortwährende Übertragung pleomorpher Stämme von einem Labortier zum nächsten entstanden sind, haben diese Fähigkeit verloren. Wahrscheinlich ist dies auf einen Defekt des cAMP-Signaltransduktionsweges zurückzuführen (Vassella et al., 1997). Monomorphe Trypanosomen erreichen innerhalb kurzer Zeit hohe Zelldichten von bis zu 10^9 Zellen/ml (Ziegelbauer, 1994) und töten ihren Wirt in nur wenigen Tagen.

Von der Tsetsefliege bei der Blutmahlzeit aufgenommene gedrunghene Trypanosomen differenzieren sich im Mitteldarm des Insekts zur langgestreckten prozyklischen trypomastigoten Form, die sich wieder vermehrt. *In vitro* kann diese Transformation bei 27°C und durch Zugabe von Citrat und cis-Aconitat zum Kulturmedium simuliert werden (Czichos et al., 1986; Overath et al., 1986; Ziegelbauer et al., 1990). Nach wenigen Tagen durchbrechen die Parasiten die peritrophische Membran und siedeln sich im ektoperitrophischen Raum an. Hier nimmt die Länge der Trypanosomen nochmal deutlich zu. Diese mesozyklischen Parasiten wandern schließlich in das Lumen der Speicheldrüsen, wo sie sich zunächst zu epimastigoten und letztlich zu trypomastigoten metazyklischen Trypanosomen entwickeln, die wieder infektiös für Säugetiere sind.

Im Blut des Säugetierwirtes gewinnen die Trypanosomen ihre Energie ausschließlich aus der Glykolyse, die größtenteils in bestimmten Zellorganellen, den Glykosomen (Opperdoes, 1987), und nicht im Cytoplasma stattfindet. Das bei der Glykolyse entstehende Pyruvat und Glycerin werden an das Blut des Wirtes abgegeben. Die mitochondriale Aktivität ist bei Bluttrypanosomen stark reduziert. Die NADH-Diaphorase-Aktivität im Mitochondrium zeigt deutliche Unterschiede zwischen der gedrunghenen (hohe Aktivität) und schlanken (keine Aktivität) Blutform auf (Vickerman, 1965). Bluttrypanosomen besitzen keinen funktionierenden Citratzyklus und aufgrund fehlender Cytochrome auch keine oxidative Phosphorylierung. Prozyklische Trypanosomen haben gegenüber den Blutformen ein stark vergrößertes Mitochondrium und gewinnen ihre Energie aus dem oxi-

dativen Stoffwechsel. Als vorwiegende Energiequelle dient den Insektenformen die Aminosäure Prolin (für eine Übersicht zum Energiestoffwechsel s. Clayton & Michels, 1996).

Wie schon erwähnt (s. 1.1), entgehen die Bluttrypanosomen der Immunantwort ihres Wirtes durch antigene Variation. Verantwortlich dafür ist ein 12-15 nm dicker „Mantel“, der die Oberfläche jedes Parasiten umgibt. Jede Zelle besitzt ca. 10^7 Moleküle des variablen Oberflächenglykoproteins (*variant surface glycoprotein*; VSG; Cross, 1975), das über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden ist (Ferguson et al., 1988). Bluttrypanosomen besitzen ein Repertoire von ca. 1000 verschiedenen VSG-Genen, von denen jeder Parasit immer nur eines exprimiert. Mit einer geringen Rate können die Trypanosomen jedoch die Expression auf ein anderes VSG-Gen „umschalten“ und zu einer neuen Population heranwachsen, während sich die Immunabwehr gegen das vorherrschende Oberflächenglykoprotein richtet. Die im Mitteldarm der Fliege vorkommenden prozyklischen Trypanosomen besitzen einen invariannten Oberflächenmantel, das sog. *Prozyklin*. Es werden dabei zwei Proteinklassen, EP (*glutamic acid-proline dipeptide repeat protein*) und GPEET (*pentapeptide repeat protein*), unterschieden, die von 4 Genen kodiert werden (zur Nomenklatur s. Roditi & Clayton, 1999). Die für das Säugetier infektiösen metazyklischen Formen besitzen wieder eine VSG-Oberfläche. Allerdings haben die metazyklischen Parasiten ihr eigenes Repertoire an VSG-Genen, das ca. 27 Gene umfasst (Turner et al., 1988).

Die Transkription und RNA-Prozessierung verlaufen bei *T. brucei* anders als bei höheren Eukaryonten. Ähnlich wie bei Bakterien werden alle mRNAs diskontinuierlich synthetisiert. Nach Polyadenylierung am 3'-Ende wird an die mRNA durch *trans-splicing* eine 39 Nukleotide lange „Kappe“ (Miniexonsequenz, *spliced leader*) am 5'-Ende angefügt. Die Regulation der meisten trypanosomalenen Proteine verläuft posttranskriptional (Vanhamme & Pays, 1995).

1.3 Eisenabhängige Enzyme von *Trypanosoma brucei*

Wie alle lebenden Organismen benötigen Bluttrypanosomen Eisen zum Wachstum (Schell et al., 1991; Steverding, 1998). Als Eisenquelle dient den Parasiten das Transferrin aus dem Blut des Säugetierwirtes. Zu diesem Zweck besitzen die Trypanosomen einen Rezeptor, der keine Homologie zum Transferrin-Rezeptor des Wirtes zeigt (Chaudhri et al., 1994; Ligtenberg et al., 1994; Steverding et al., 1994; Steverding et al., 1995) und nur von Bluttrypanosomen exprimiert wird. Rezeptorgebundenes Transferrin wird endozytiert und der Rezeptor-Transferrin-Komplex ins Endosom transportiert. Der hier herrschende saure pH-Wert bewirkt

die Freisetzung des Eisens aus dem Transferrin und dessen Übertritt ins Cytoplasma (Steверding et al., 1995). Das Apotransferrin (eisenfreies Transferrin) dissoziiert anschließend vom Rezeptor (Maier & Steверding, 1996). Das Transferrin wird ins Lysosom transportiert, und dort protolytisch abgebaut. Die Abbauprodukte werden von den Trypanosomen ausgeschieden (Steверding et al., 1995). *In vitro* Untersuchungen mit dem Eisenchelator Deferoxamin zeigten, dass Bluttrypanosomen unter Eisenmangelbedingungen den Transferrin-Rezeptor vermehrt exprimieren (Fast et al., 1999). Gleichzeitig wird die Proliferation und Vitalität der Trypanosomen herabgesetzt. Der Fe^{3+} -Deferoxamin-Komplex zeigt hingegen keine Wirkung (Scory, 1999).

In den cytochromfreien Bluttrypanosomen wurden bisher vier eisenabhängige Enzyme nachgewiesen: Aconitase (Overath et al., 1986), Alternative Oxidase (Fairlamb & Bowman, 1977b; Clarkson et al., 1989), Ribonukleotid-Reduktase (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997) und Superoxid-Dismutase (Le Trant et al., 1983). Diese Enzyme werden im Folgenden im Hinblick auf deren Funktion im Stoffwechsel von *T. brucei* eingehend beschrieben.

1.3.1 Ribonukleotid-Reduktase

Ribonukleotid-Reduktasen sind die einzigen Enzyme, die aus den Ribonukleotiden die Desoxyribonukleotide für die DNA-Synthese zur Verfügung stellen. Vereinfacht stellt sich die katalytische Reaktion folgendermaßen dar:

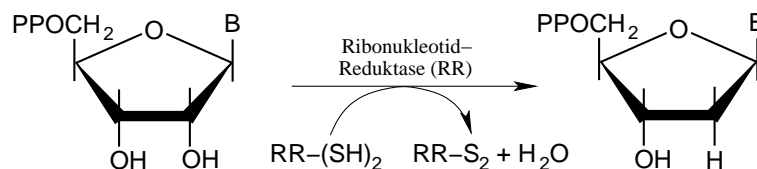


Abbildung 1.3: Die Ribonukleotid-Reduktase-Reaktion⁴

Ribonukleotid-Reduktasen werden in drei Klassen eingeteilt, die sich insbesondere bzgl. ihrer Metall-Cofaktoren (s. Abb. 1.4) und ihrer dreidimensionalen Struktur gegeneinander abgrenzen lassen. Die Cofaktoren wirken als Radikalstarter und generieren ein Thiylradikal, das die Nukleotid-Reduktion initiiert.

⁴Die Reduktion von NTP findet nur bei Klasse II- oder III-Enzymen statt (Sjöberg, 1995)

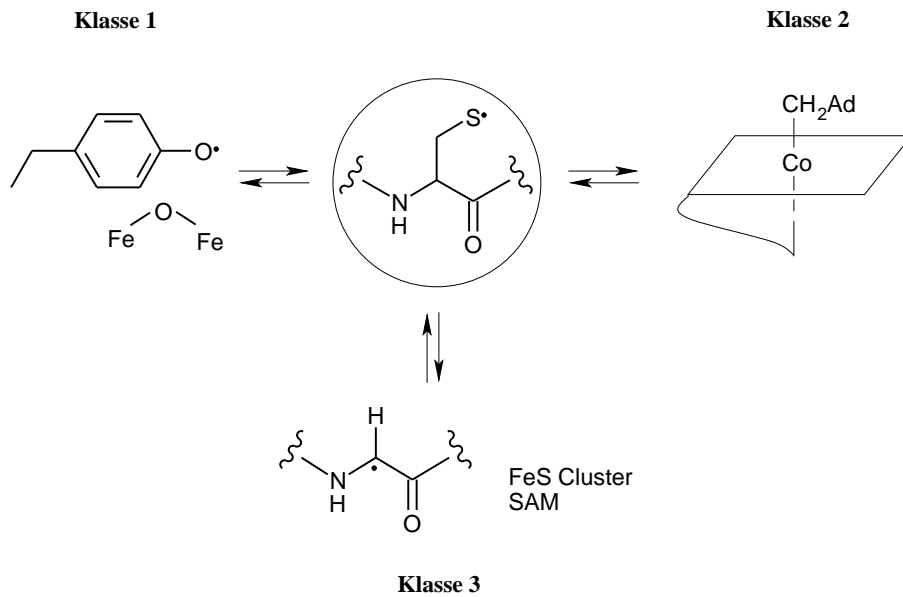


Abbildung 1.4: **Die verschiedenen Klassen der Ribonukleotid-Reduktasen (nach Stubbe & Van der Donk, 1995).** Gezeigt sind die unterschiedlichen Metall-Cofaktoren der Enzymklassen, die an der Bildung des Thiylradikals (s. Mitte) beteiligt sind. SAM = S-Adenosylmethionin

Klasse I-Enzyme lassen sich in zwei Unterklassen, Ia und Ib, aufteilen, die u. a. Unterschiede in ihren reduzierenden Proteinen erkennen lassen (Reichard, 1997). Bis auf wenige Einzeller besitzen alle Eukaryonten eine Klasse Ia-Ribonukleotid-Reduktase, die auch bei den Prokaryonten weit verbreitet ist. Klasse Ib-Enzyme konnten bisher nur bei Bakterien nachgewiesen werden (Jordan et al., 1994). Ribonukleotid-Reduktasen der Klasse II, die bestimmte anaerob oder aerob lebende Prokaryonten besitzen, verwenden Adenosylcobalamin als Cofaktor (s. Abb. 1.4) und sind mono- oder homodimere Enzyme (Reichard, 1997). Demgegenüber besitzen Klasse III-Enzyme, die erstmals bei anaerob lebenden *E. coli* nachgewiesen wurden (Fontecave et al., 1989), eine den Klasse I-Enzymen vergleichbare Struktur. S-Adenosylmethionin und ein Eisen-Schwefel-Cluster sind für die Bildung eines Glycylradikals verantwortlich (s. Abb. 1.4), das für die Aktivität des Enzyms benötigt wird (Ollagnier et al., 1996). Zurzeit wird noch diskutiert, ob Mn-abhängige Ribonukleotid-Reduktasen (Willing et al., 1988) eine vierte Enzym-Klasse repräsentieren.

T. brucei besitzt eine Klasse Ia-Ribonukleotid-Reduktase, die kloniert und sequenziert wurde (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997). Im Folgenden sollen daher der Aufbau und die Wirkungsweise der Klasse I-Enzyme ausführlicher erläutert werden.

Klasse I-Ribonukleotid-Reduktasen sind $\alpha_2\beta_2$ -Tetramere, die aus zwei homodimeren Untereinheiten R1 (α) und R2 (β) zusammengesetzt sind (s. Abb. 1.5).

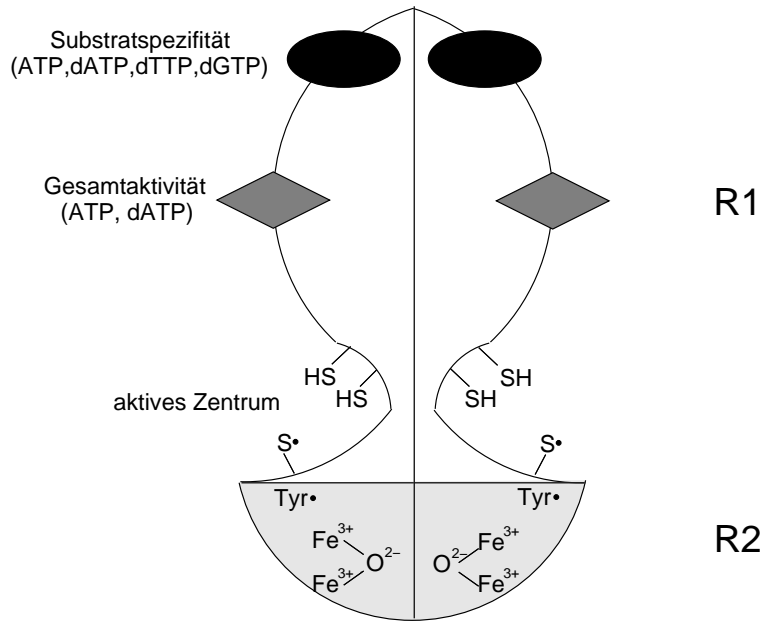


Abbildung 1.5: **Schematische Darstellung einer Klasse I-Ribonucleotid-Reduktase.** Das Enzym besteht aus zwei homodimeren Untereinheiten (R1 und R2). Jedes R1-Protein enthält zwei verschiedene allosterische Zentren. Eines kontrolliert die Gesamtaktivität der Ribonucleotid-Reduktase, das andere die Substratspezifität. Jedes R2-Protein besitzt ein Tyrosylradikal, das durch ein Eisenzentrum stabilisiert wird.

Die große R1-Untereinheit (94 kDa bei *T. brucei*; Hofer et al., 1997) besitzt Bindungsstellen für die Ribonucleotidsubstrate und für allosterische Effektoren. Zudem enthält sie redoxaktive Sulfhydrylgruppen. Die kleinere R2-Untereinheit (39 kDa bei *T. brucei*; Hofer et al., 1997) besitzt zwei Tyrosylradikale, die jeweils durch einen μ -oxo-verbrückten Di-Eisen(III)-Cluster stabilisiert werden (s. Abb.1.6).

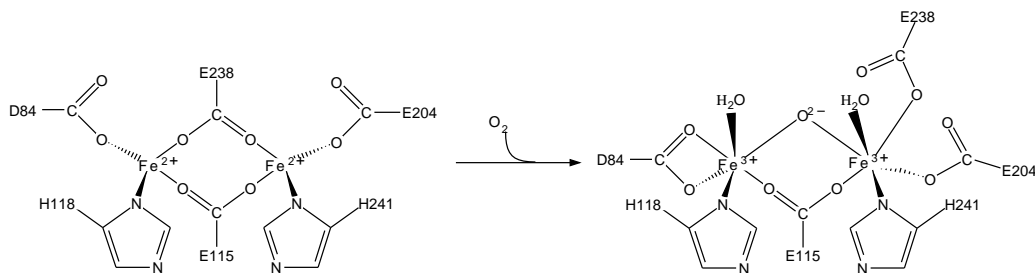


Abbildung 1.6: **Reduzierte und oxidierte Form des Di-Eisen(III)-Clusters der R2-Untereinheit (nach Sjöberg, 1995)**

Der genaue Mechanismus der Ribonucleotid-Reduktion ist noch nicht im Detail geklärt. Aufgrund verschiedener Untersuchungen wurde jedoch für die Ribonucleotid-Reduktase von *E. coli* ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen (s. Abb.

1.7). Nach der Bindung eines Ribonukleotids im aktiven Zentrum der Ribonukleotid-Reduktase wird vermutlich durch den Transfer des freien Radikals vom Tyr122 der R2-Untereinheit zum Cys439 der R1-Untereinheit die Reaktion initiiert (Mao et al., 1992b).

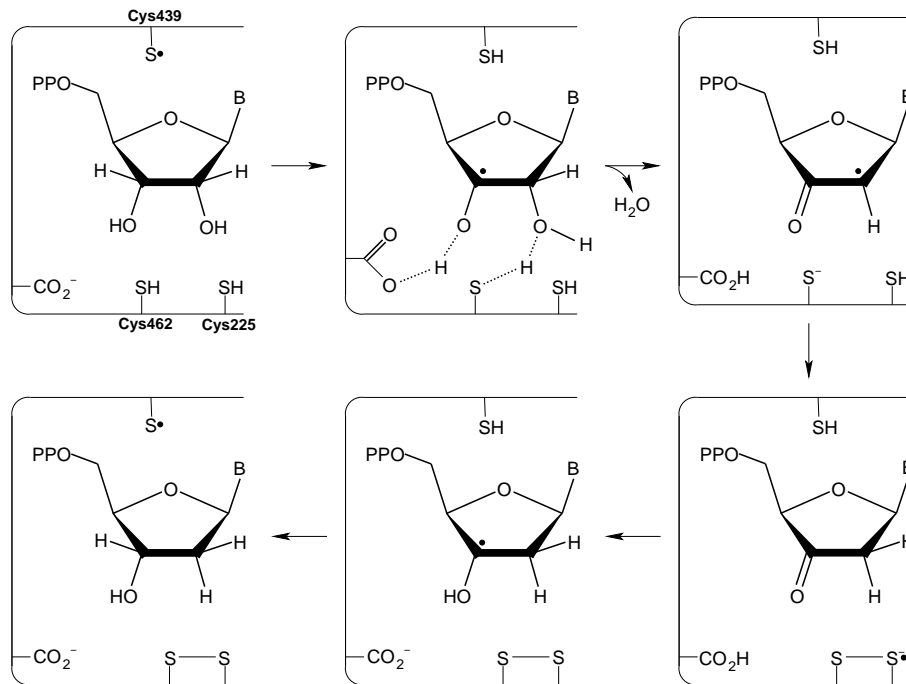


Abbildung 1.7: **Vorgeschlagener Mechanismus einer Klasse I-Ribonukleotid-Reduktase-Reaktion von *E. coli* (nach Stubbe & Van der Donk, 1995).** Gezeigt ist das aktive Zentrum des Enzyms

Das Thiylradikal spaltet im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion das 3'-Wasserstoffatom des Substrates ab (Stubbe et al., 1983). Nach Protonierung der 2'-Hydroxylgruppe wird Wasser abgespalten. Das radikalische Intermediat wird durch die redoxaktiven Cysteine (Cys462, Cys225) reduziert (Mao et al., 1992a & c). Dabei entstehen ein Disulfidradikal-Anion und ein instabiles 3'-Ketodesoxynukleotid, das zum Desoxyribonukleotid reduziert wird. Gleichzeitig wird das Thiylradikal regeneriert. Die redoxaktiven Sulfhydrylgruppen der R1-Untereinheit werden bei der Ribonukleotid-Reduktion zum Disulfid oxidiert.

Damit die katalytische Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase erhalten bleibt, benötigt das Enzym Reduktionsäquivalente. Geliefert werden diese von kleinen Dithiolproteinen wie Thioredoxin und Glutaredoxin (Holmgren, 1989). Das während der Reduktion entstandene oxidierte Thioredoxin wird durch NADPH in einer von der Thioredoxin-Reduktase katalysierten Reaktion wieder reduziert. Oxidiertes Glutaredoxin reagiert spontan mit Glutathion, einem cysteinhaltigen Tri-

peptid. Das entstandene Disulfid wird NADPH-vermittelt durch die Glutathion-Reduktase reduziert (s. Abb.1.8).

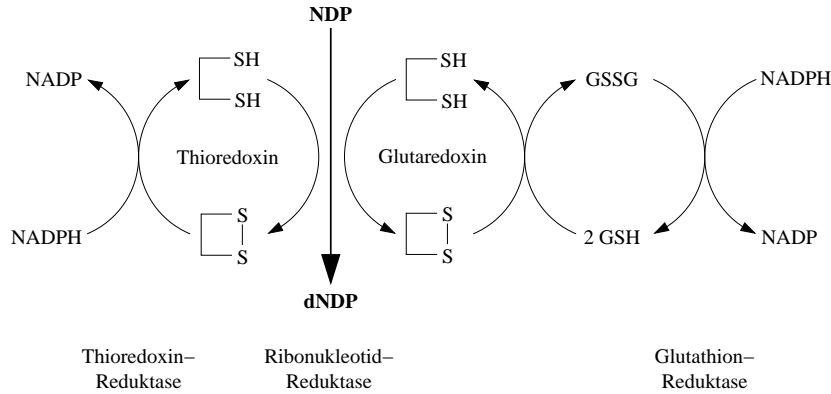


Abbildung 1.8: **Thioredoxin und Glutaredoxin als Donatoren der Reduktionsäquivalente für die Ribonukleotid-Reduktase (nach Dormeyer, 2000)**

T. brucei besitzt einen einzigartigen Thiolstoffwechsel. Die Parasiten haben kein Glutathion/Glutathion-Reduktase-System. Lange Zeit wurde angenommen, dass *T. brucei* auch kein Thioredoxin-System aufweist. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Parasiten ein klassisches Thioredoxin besitzen (Reckenfelderbäumer et al., 2000). Glutathionylspermidin-Konjugate, wie Trypanothion, stellen für *T. brucei* die wichtigsten Thiole dar, die durch das Enzym Trypanothion-Reduktase in reduzierter Form gehalten werden.

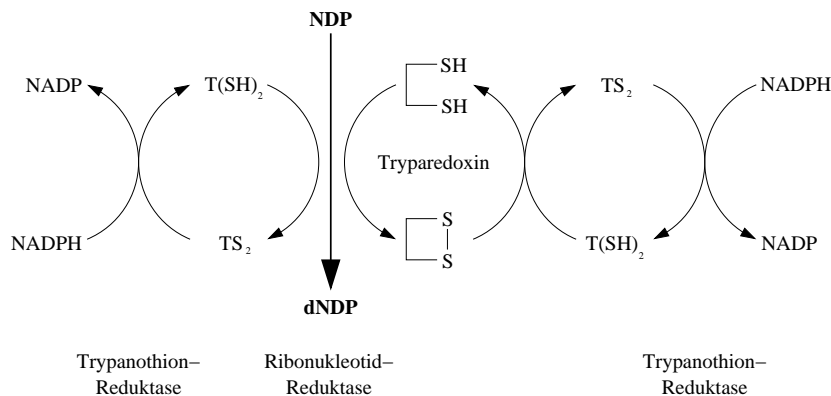


Abbildung 1.9: **Trypanothion-abhängige Reduktion der *T. brucei* Ribonukleotid-Reduktase (nach Dormeyer et al., 2001)**. Links: Spontane Reduktion der Ribonukleotid-Reduktase durch Trypanothion; Rechts: Tryparedoxin-vermittelte Reduktion der Ribonukleotid-Reduktase

In millimolaren Konzentrationen ist Trypanothion direkter Elektronendonator der Ribonukleotid-Reduktase. Bei submikromolarer Konzentration wird die Reaktion durch Tryparedoxin katalysiert (s. 1.9; Dormeyer et al., 2001). Tryparedoxin ist ein 16 kDa Protein, das als Trypanothion-abhängige Thiol-Disulfid Oxidoreduktase fungiert. Seine katalytischen Eigenschaften liegen zwischen denen des klassischen Thioredoxins und Glutaredoxins (Lüdemann et al., 1998).

1.3.2 Superoxid-Dismutase

Bei vielen zellulären Oxidationsprozessen wird molekularer Sauerstoff zum Superoxidradikal-Anion reduziert. Dieses ist nicht besonders reaktiv, dismutiert jedoch unter der katalytischen Wirkung des Enzyms Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Die Enzyme Katalase und Glutathion-Peroxidase dienen zur Beseitigung des Peroxids, das in einer Fenton-Reaktion, katalysiert durch Fe^{2+} , das hochreaktive Hydroxylradikal bilden kann (s. Abb.1.10).

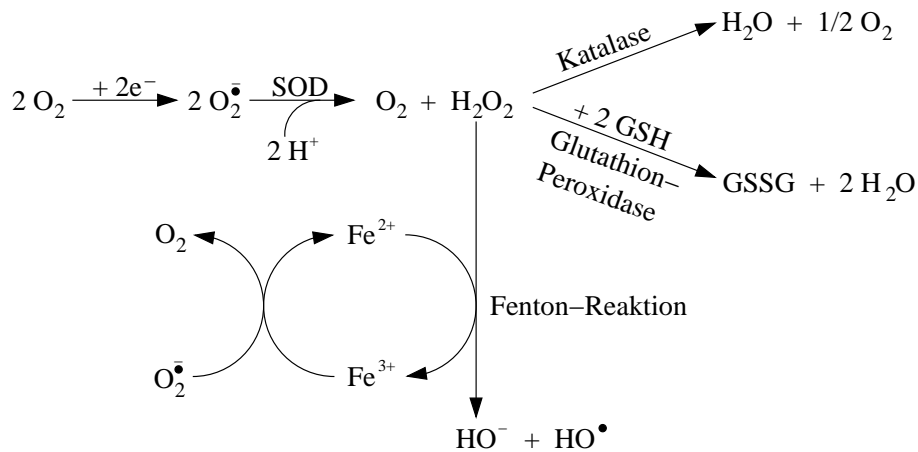


Abbildung 1.10: **Bildung und Weiterreaktion von Superoxidradikal-Anionen (nach Eisenbrand & Metzler, 1994)**

Es werden drei Typen von Superoxid-Dismutasen mit verschiedenen Metallzentren unterschieden (für eine Übersicht s. Bannister et al., 1987):

- Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen
- Mn-Superoxid-Dismutasen
- Fe-Superoxid-Dismutasen

Die verschiedenen Superoxid-Dismutasen zeigen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Cyanid (inhibiert Cu/Zn-haltige Enzyme), Wasserstoffperoxid (inhibiert Cu/Zn- und Fe-haltige Enzyme) und Azid (inhibiert alle Enzyme mit unterschiedlicher Effektivität). *T. brucei* besitzt, wie andere Trypanosomatiden,

keine bei Eukaryonten übliche Cu/Zn-, sondern eine eisenabhängige Superoxid-Dismutase (Le Trant et al., 1983). Genauere Studien über die Superoxid-Dismutase des Trypanosomatids *Crithidia fasciculata* konnten drei Isoenzyme im Cytosol nachweisen. Beim wichtigsten Isoenzym handelt es sich um ein 43 kDa Protein, das sich aus zwei gleichgroßen Untereinheiten zusammensetzt (Le Trant et al., 1983). Interessanterweise haben Trypanosomen keine Glutathion-Peroxidase und keine Katalase, die, wie oben erwähnt, zum Hauptabwehrsystem reaktiver Sauerstoffderivate gehören.

Eine besondere Bedeutung scheinen Superoxid-Dismutasen für die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase zu besitzen. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die an der Bildung des Tyrosylradikals beteiligte NAD(P)H:Oxidoreduktase molekularen Sauerstoff zum Superoxidradikal-Anion reduziert (Fontecave et al., 1987). Dieses kann die R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase irreversibel inaktivieren (Gaudu et al., 1996).

1.3.3 Alternative Oxidase

T. brucei-Blutformen gewinnen ihre Energie ausschließlich aus der Glykolyse, die größtenteils in Glykosomen (Opperdoes, 1987) stattfindet (s. Abb. 1.11). Das dabei entstehende NADH muss reoxidiert werden, damit die Glykolyse fortgeführt werden kann.

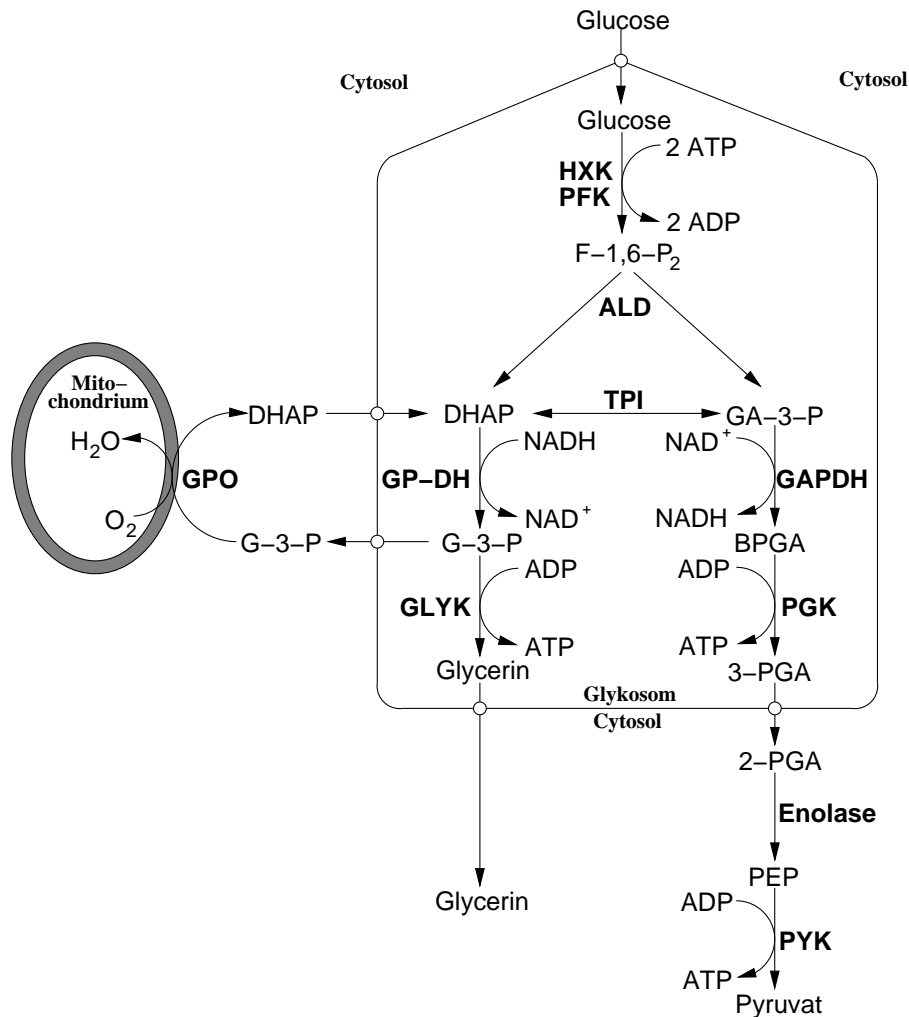


Abbildung 1.11: **Glykolyse bei *T. brucei*-Blutformen (nach Helfert et al. 2001)**. Gezeigt ist eine Zusammenfassung des aeroben glykosomalen Energiestoffwechsels. Dabei entstehen zu 90 % Pyruvat und zu 10 % Glycerin (Helfert et al., 2001). GPO = Glycerin-3-Phosphat-Oxidase; DHAP = Dihydroxyacetonphosphat; G-3-P = Glycerin-3-Phosphat; GP-DH = Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die weiteren Abkürzungen finden sich im Abkürzungsverzeichnis.

Bluttrypanosomen besitzen im Mitochondrium kein Cytochrom-abhängiges Elektronen-Transportsystem, das üblicherweise für die Regeneration von Reduktionsäquivalenten verantwortlich ist. Demgegenüber wird im Glykosom das Gleichgewicht der Reduktionsäquivalente durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GP-DH) aufrecht erhalten, die Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerin-3-Phosphat (G-3-P) reduziert und gleichzeitig NADH reoxidiert. Glycerin-3-Phosphat wird zu einem geringen Teil im Glykosom zu Glycerin umgesetzt. Das meiste Glycerin-3-Phosphat gelangt über das Cytoplasma in die äußere Mitochondrienmembran. Dort wird es von der Glycerin-3-Phosphat-Oxidase (GPO;

Fairlamb & Bowman, 1977b), bestehend aus einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (einem Flavoprotein) und einer trypanosomalen Alternativen Oxidase, wieder zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, das ins Glykosom diffundiert (s. Abb. 1.12; Clarkson et al., 1989).

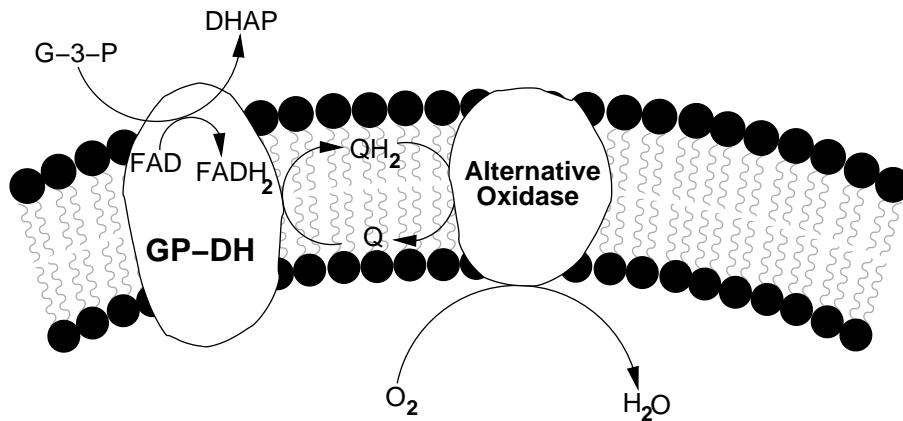


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der mitochondrialen Glycerin-3-Phosphat-Oxidase (GPO) von *T. brucei*-Blutformen (nach Clarkson et al., 1989). Die mitochondriale Regeneration von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) aus Glycerin-3-Phosphat (G-3-P) wird durch eine Elektronentransport-Kette vermittelt. Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GP-DH) oxidiert G-3-P zu DHAP und reduziert gleichzeitig Ubichinon (Q) zu Ubichinol (QH₂). Dieses wird durch die trypanosomale Alternative Oxidase reoxidiert, wobei molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert wird.

Der Elektronentransport zwischen den Enzymen der Glycerin-3-Phosphat-Oxidase (GPO) erfolgt durch das Ubichinon (Q)/Ubichinol (QH₂)-System. Bei der Oxidation von Ubichinol durch die Alternative Oxidase wird molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Gegenüber der cytochromabhängigen Atmung ist die Respiration von Bluttrypanosomen Cyanid-unempfindlich, wird allerdings durch Salicylhydroxamsäure (SHAM) inhibiert (Opperdoes et al., 1976).

Bei der trypanosomalen Alternativen Oxidase handelt es sich um ein 33 kDa großes Protein (Chaudhuri et al., 1995), das von einem *single-copy*-Gen kodiert wird (Chaudhuri & Hill, 1996; Chaudhuri et al., 1998). Alternative Oxidasen sind u. a. auch bei Pflanzen bekannt. Deren genauere Analyse zeigte eine dimere Struktur des Proteins (Umbach & Siedow, 1993) mit einem der R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase vergleichbaren Di-Eisen-Zentrum (Andersson & Nordlund, 1999; vgl. Abb. 1.6).

1.3.4 Aconitase

Die Aconitase ist ein Nicht-Häm-Eisenprotein mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Citrat zu Isocitrat, die in zwei Schritten abläuft:

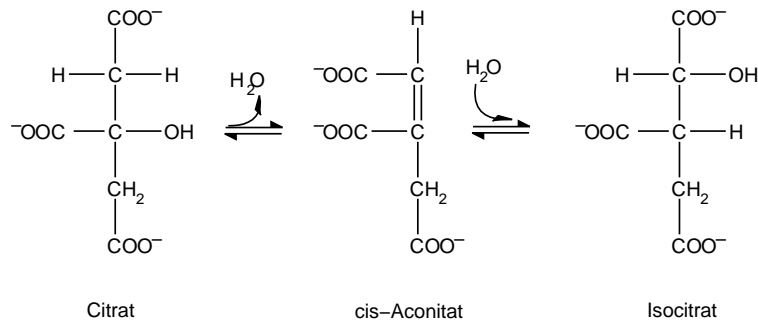


Abbildung 1.13: **Isomerisierung von Citrat.**

Dieser Prozess ist Bestandteil des mitochondrialen Citratzyklus.

Bei der Regulation des Eisenstoffwechsels von Säugerzellen spielen sog. IRE⁵-Binde-Proteine (IRPs⁶) eine entscheidende Rolle. Bei Säugetieren sind zwei verschiedene IRE-Binde-Proteine (IRP-I und IRP-II; Rouault & Klausner, 1997) bekannt. Das IRP-I ist eine cytoplasmatische Aconitase, die nicht mit dem mitochondrialen Protein übereinstimmt. Bei Eisenüberschuss wird Citrat in Isocitrat isomerisiert, bei Eisenmangel hingegen ändert das Enzym seine Konformation und bindet mit hoher Spezifität an bestimmte Stellen der Transferrin-Rezeptor- und Ferritin-mRNA. Dadurch wird die Expression der Rezeptoren erhöht und die Synthese der Eisenspeichermoleküle (Ferritin) reduziert.

T. brucei besitzt eine Aconitase (Größe: 98 kDa; Saas et al., 2000), die sowohl im Mitochondrium, als auch im Cytoplasma vorkommt. Diese Aconitase wurde kloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich u. a. eine große Übereinstimmung mit der Sequenz des humanen IRP-I (Saas et al., 2000). Bei Bluttrypanosomen konnte mit Hilfe von knock-out-Mutanten jedoch kein Einfluss der Aconitase auf die Expression und Regulation des trypanosomalen Transferrin-Rezeptors nachgewiesen werden (Fast et al., 1999). Über die Bedeutung der Aconitase im Cytoplasma des Parasiten wird somit noch spekuliert.

⁵IRE = iron response element

⁶IRP = iron regulatory protein

1.4 Ziele

Seit einigen Jahren ist wieder ein Ansteigen der durch *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* hervorgerufenen Schlafkrankheit in Afrika zu verzeichnen. In manchen Gebieten ist die Schlafkrankheit mittlerweile Todesursache Nummer eins, noch vor der Immunschwächekrankheit AIDS (WHO, 2001⁷). Trotzdem sind nach wie vor die therapeutischen Mittel zur Behandlung der Schlafkrankheit beschränkt und beruhen auf z. T. vor Jahrzehnten entwickelten Medikamenten. Grundlagenforschung, die neue Ansätze für eine Chemotherapie liefern könnte, ist daher dringend notwendig. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Desoxyribonukleotid-Synthese, der Eisenstoffwechsel und die Differenzierung des Parasiten näher untersucht:

- Alle Organismen sind auf die Bildung von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Synthese angewiesen. Die Ribonukleotid-Reduktase ist das einzige Enzym, das die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert. Mit immunologischen und molekularbiologischen Methoden sollte die Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von *T. brucei* untersucht werden.
- Bluttrypanosomen benötigen Eisen zum Wachstum. Mit Hilfe des Eisenchelators Deferoxamin⁸ sollte der Einfluss eines Eisenmangels auf die DNA-Synthese und die Atmung der Parasiten untersucht werden. Ferner sollte die Aktivität der eisenabhängigen Enzyme Ribonukleotid-Reduktase, Superoxid-Dismutase und Alternative Oxidase bei einer Störung des Eisenhaushaltes gemessen werden.
- Die Differenzierung pleomorpher Bluttrypanosomen ist ein cAMP-vermittelter Prozess. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung von 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP)⁸, einem membranpermeablen cAMP-Derivat, auf die Differenzierung von kulturadaptierten, monomorphen Bluttrypanosomen untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Regulation der Ribonukleotid-Reduktase bei cAMP-behandelten Trypanosomen genauer analysiert werden.

⁷<http://www.who.int/health-topics/aftryps.htm>

⁸Struktur s. Anhang

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Produkt	Bezugsquelle
cis-Aconitsäure	Serva, Heidelberg
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP)	Sigma, Deisenhofen
Cruz-Marker (MW-Standard)	Santa Cruz, Heidelberg
Deferoxamin Mesylat	Sigma, Deisenhofen
DIG-markierte MW-Standards III und VI	Roche Diagnostics, Mannheim
Dihydroliponsäure	Sigma, Deisenhofen
EMEM (+ L-Glutamin, +Phenolrot)	Biowhittaker Europe, Verviers (Belgien)
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Häminchlorid	Sigma, Deisenhofen
Medium 199 (2x) (Earles modifizierte Salze, + L-Glutamin, + Aminosäuren, - Phenolrot)	Life Technologies, Karlsruhe
MEM 1x (- L-Glutamin, -Phenolrot)	Life Technologies, Karlsruhe
MEM 50x (essentielle Aminosäuren)	Biowhittaker Europe, Verviers (Belgien)
Milchpulver (Blotting grade Blocker, non-fat dry milk)	Bio-Rad Laboratories, München
NEAA 100x (nicht-essentielle Aminosäuren)	Biowhittaker Europe, Verviers (Belgien)
Penicillin/Streptomycin (100x;	Biowhittaker Europe, Verviers (Belgien)
Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml)	
Pferdeserum	Life Technologies, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien waren von der höchsten verfügbaren Reinheit und wurden von Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die Produkte von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Die Radiochemikalien stammten von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

2.2 Antikörper

Produkt	Bezugsquelle
Kaninchen-Antiserum gegen <i>T. b. brucei</i> Aldolase	C. Clayton, ZMBH, Heidelberg
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das lysosomale Membranprotein CB1 von <i>T. b. brucei</i> (Klon: CB1)	Cedarlane Laboratories, Ontario (Kanada)
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen <i>T. cruzi</i> Liponamid-Dehydrogenase	R. L. Krauth-Siegel, BZH, Heidelberg
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen <i>T. b. brucei</i> Procyclin (Klon: TBRP/247)	Cedarlane Laboratories, Ontario (Kanada)
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die rekombinante R1-Untereinheit der <i>T. b. brucei</i> Ribonukleotid-Reduktase	Eurogentec, Herstal (Belgien)
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die rekombinante R2-Untereinheit der <i>T. b. brucei</i> Ribonukleotid-Reduktase	Eurogentec, Herstal (Belgien)
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen VSG von <i>T. b. brucei</i> TC221	Eurogentec, Herstal (Belgien)
Peroxidase-konjugiertes anti-Kaninchen IgG der Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgG der Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Peroxidase-konjugierte anti-DIG Fab Fragmente des Schafs	Roche Diagnostics, Mannheim

2.3 Oligonukleotide

Name	5'-N_x-3'
<i>spliced leader</i>	TAG AAC AGT TTC TGT ACT ATA TTG
R1	TGA TGA TCG CAC ACT GTT TGA GT
R2	CAT CGC AAA TGA ACT CTC GTT CAA
R1 →	ATG TTG GAA ACG GTG AAG
R1 ←	GGA AAC CAA AGA TAT CCG
R2 →	ATG CCA CCC AAA TCT CAC
R2 ←	CTA GAA ATC TGC GTC CAG

Die Oligonukleotide wurden von Roth (Karlsruhe) hergestellt.

2.4 Häufig verwendete Puffer

PBS

137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄ × 12H₂O, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,2

SB-Medium

60 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O, 50 mM Glucose-Monohydrat, 45 mM NaCl, 3 mM KH₂PO₄; pH 8,2

Lyse-Puffer (nach Steverding et al., 1994)

50 mM HEPES, 2,5 mM EDTA, 2 mM EGTA; pH 7 mit NaOH eingestellt

2.5 Stammlösungen der Testsubstanzen

Die Stammlösungen wurde für die Versuche stets frisch angesetzt und sterilfiltriert (Porengröße des Membranfilters: 0,2 μm).

Deferoxamin

5 mM in eiskaltem ddH₂O

Eisen-Deferoxamin

Deferoxamin-Stammlösung wurde zur Eisen-Sättigung mit FeCl_3 im molaren Verhältnis 1:1,1 gemischt

Eisen-Ammonium-Citrat

10 mM in ddH₂O

8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP)

10 mM in eiskaltem PBS

2.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
Centricon 30	Millipore, Eschborn
Filterpapier (Dicke: 0,3 mm)	Whatman Biometra, Göttingen
Gewebekulturflaschen (T-25, T-75, T-182)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (24 und 96 Loch)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Hämatokritkapillare	Brand, Freiburg
Injektionskanülen Sterican (R) (0,6 x 25 mm)	Braun, Melsungen
Membran für Clark-Elektrode	YSI-Instruments, Ohio (USA)
Membranfilter, steril (Porengröße 0,2 μm)	Sartorius, Göttingen
Nylon Membran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger (markiert)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Szintillationsgefäße	Packard, Meriden (USA)

2.7 Geräte

Produkt	Bezugsquelle
CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Easy cast Model B1A (für die Agarose-Gelelektrophorese)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Kühlzentrifuge RC-5B, Rotor SM24	Sorvall, Conneticut (USA)
Kühlzentrifuge 5412R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leitz, Wetzlar
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Neubauer-Hämozytometer (improved)	Fischer Scientific, Nidderau
Ultrazentrifuge RCM 120GX, Rotor S120 AT3	Sorvall, Conneticut (USA)

Weitere verwendete Geräte werden an entsprechender Stelle im Methodenteil erwähnt.

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung von *T. b. brucei* TC221

Baltz-Medium (nach Baltz et al., 1985)

Zu 500 ml EMEM wurden 3 g HEPES, 0,5 g Glucose-Monohydrat, 100 mg Natriumpyruvat, 7 mg Hypoxanthin, 2 mg Thymidin, 10,7 mg Adenosin und 14,1 mg Bathocuproindisulfonat gegeben. Nach dem Lösen der Substanzen wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert und mit 5 ml NEAA (100x) versetzt.

Baltz Medium komplett (nach Baltz et al., 1985)

Zu 100 ml Baltz Medium wurden 20 ml iFCS (durch 30minütige Inkubation bei 56°C inaktiviertes fötales Kälberserum), 1 ml Penicillin/Streptomycin (100x) und 1 ml 2-Mercaptoethanol-Stammlösung (20 mM in ddH₂O) gegeben. Die Flüssigkeiten wurden gemischt und das komplettierte Medium sterilfiltriert.

Kulturadaptierte Bluttrypanosomen der *T. b. brucei*-Zelllinie TC221 vom Stamm 427 (Hirumi et al., 1980), wurden in Gewebekulturflaschen mit Filterdeckel (Dauerkulturen) oder auf Gewebekulturplatten (Wachstumsversuche) in Baltz Medium komplett bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Innerhalb von 24 h hatten sich die Zellen etwa verzehnfacht. Bei Zelldichten zwischen 1-2×10⁶ Zellen/ml wurden die Trypanosomen verdünnt und mit einer Dichte von 1×10³ bis 1×10⁴ Zellen/ml eingesät.

2.8.2 Gewinnung und Kultivierung prozyklischer *T. b. brucei* AnTat 1.1

SDM-79 Medium (nach Brun & Schönenberger, 1979)

Zu 661 ml MEM (1x) wurden 94 ml Medium 199 (2x), 8 ml MEM (50x), 6 ml NEAA (100x), 1 g Glucose-Monohydrat, 8 g HEPES, 5 g MOPS, 2 g NaHCO₃, 100 mg Natriumpyruvat, 200 mg L-Alanin, 592 mg L-Glutamin, 100 mg L-Arginin, 70 mg L-Methionin, 80 mg L-Phenylalanin, 600 mg L-Prolin, 60 mg L-Serin, 160 mg Taurin, 350 mg L-Threonin, 100 mg L-Tyrosin, 10 mg Adenosin, 10 mg Guanosin, 50 mg Glucosamin-HCl, 4 mg Folsäure, 2 mg p-Aminobenzoesäure und 0,2 mg Biotin gegeben. Nach dem Lösen der Substanzen wurde mit NaOH (s) ein pH-Wert von 7,3 eingestellt und das Medium mit ddH₂O auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Medium wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20°C

eingefroren.

SDM-79 Medium komplett (nach Brun & Schönenberger, 1979)

Zu 100 ml SDM-79 Medium wurden 10 ml iFCS (s. o.), 1 ml Penicillin/Streptomycin (100x) und 300 μ l Hämichlorid-Stammlösung (3,8 mM in 0,05 M NaOH, autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min)) gegeben. Die Flüssigkeiten wurden gemischt und das komplettierte Medium sterilfiltriert.

Gedrungene Bluttrypanosomen des pleomorphen Stamms *T. b. brucei* AnTat 1.1 (van Meirvenne et al., 1975) wurden aus dem Blut von NMRI-Mäusen 5 Tage nach der Infektion mittels DEAE-Cellulose-Chromatographie (Lanham & Godfrey, 1970) steril isoliert (s. 2.9). Zur Differenzierung in prozyklische Insektenformen wurden die Trypanosomen mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml in SDM-79 Medium (komplett) mit 3 mM Citrat/cis-Aconitat (CCA) eingesät und bei 27°C in geschlossenen Gewebekulturflaschen inkubiert (Czichos et al., 1986; Overath et al., 1986; Ziegelbauer et al., 1990). Etablierte prozyklische Trypanosomen wurden in SDM-79 Medium (komplett) ohne CCA weiterkultiviert. Spätestens beim Erreichen einer Zelldichte von $2-3 \times 10^7$ Zellen/ml wurden die Trypanosomen verdünnt und mit mindestens 10^5 Zellen/ml wieder eingesät.

2.8.3 Auftauen von Trypanosomen

Das Auftauen, der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, muss zügig erfolgen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch ist. Die schon aufgetaute, aber noch kalte Zellsuspension wurde in einem 10fachen Überschuss Baltz bzw. SDM-79 Medium komplett aufgenommen und 10 min bei 4°C und $1600 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf ca. 1 ml mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden im übriggebliebenen Medium resuspendiert. Bluttrypanosomen von *T. b. brucei* TC221 wurden in einer Kulturflasche (T-25, Filterdeckel) in Baltz Medium komplett mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml eingesät. Etablierte prozyklische Trypanosomen des Stamms *T. b. brucei* AnTat 1.1 wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in SDM-79 Medium komplett (Kulturflasche T-25) eingesät.

2.8.4 Einfrieren von Trypanosomen

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Trypanosomen wurden abzentrifugiert ($1600 \times g$, 4°C, 10 min) und zu einer Dichte von 5×10^5 (TC221) bzw. 5×10^6 (etablierte prozy-

klische AnTat 1.1) Zellen/ml mit Einfriermedium (90 % (v/v) iFCS, 10 % (v/v) DMSO, steril) resuspendiert. Über einen Zeitraum von 24 h wurden die Trypanosomen bei -80°C langsam eingefroren, ehe sie in flüssigen Stickstoff überführt und darin gelagert wurden.

2.8.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einem Neubauer-Hämozytometer (improved). Bei zu erwartenden Zellzahlen von mehr als $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Trypanosomen 1:5 oder 1:10 im entsprechenden Kulturmedium vorverdünnt.

2.8.6 Wachstumsversuche

Für Wachstumsversuche wurden nur kulturadaptierte Bluttrypanosomen von *T. b. brucei* TC221, deren Zelldichte nicht mehr als 1×10^6 Zellen/ml betrug (logarithmische Wachstumsphase), verwendet. Dadurch sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gesichert werden. Die untersuchten Zellen wurden 96 h in Baltz Medium komplett in Gegenwart der Testsubstanz unter Standardbedingungen (s. 2.8.1) in 24-Loch-Platten kultiviert. Zu Beginn wurden die Trypanosomen mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml eingesät. Jeder einzelne Versuchsansatz hatte ein Endvolumen von 1 ml. Die Konzentration des jeweils für die Testsubstanz verwendeten Lösungsmittels war in allen Einzelansätzen gleich. Alle 24 h wurden die Ansätze vorsichtig resuspendiert und unmittelbar danach die Zelldichte bestimmt. Es wurden mindestens zwei unabhängige Zählungen vorgenommen, bei Zelldichten von maximal 1×10^5 Zellen/ml wurde viermal gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den Zählergebnissen berechnet.

2.9 Gewinnung von Bluttrypanosomen aus infizierten Mäusen

2.9.1 Infektion von Mäusen

TDB

80 mM NaCl, 20 mM Glucose-Monohydrat, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 2 mM $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7 mit HCl eingestellt

Für die Anzucht von *T. b. brucei* AnTat 1.1 wurden in flüssigem Stickstoff gelagerte Stabilate verwendet. Die Zellen befanden sich in Hämatokritkapillaren in einem 1:1 Gemisch aus Mäuseblut und TDB/20 % (v/v) Glycerin. Die Kapillare (Inhalt: ca. 50 μ l Stabilat) wurden an beiden Enden aufgebrochen und der Inhalt mit 1 ml eiskaltem TDB in ein auf Eis gestelltes, steriles Becherglas gespült. Nachdem die Vitalität der Trypanosomen im Lichtmikroskop überprüft worden war, wurden weibliche NMRI- oder BALB/c-Mäuse¹ mit 300 μ l der Zellsuspension intraperitoneal infiziert.

2.9.2 Isolierung und Aufreinigung von Trypanosomen

CGA (nach Steverding, persönliche Mitteilung)

100 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat, 40 mM Glucose-Monohydrat; pH 7,7 mit NaOH eingestellt

DEAE-Säulenmaterial

DE 52-Cellulose (Whatman Biometra, Göttingen) wurde mit SB-Medium (s. 2.4) im Verhältnis 1:1 gemischt. Danach wurde pH 8 mit H₃PO₄ eingestellt.

Schlanke (*long slender*) und gedrungene (*short stumpy*) Bluttrypanosomen wurden 3 bzw. 5 Tage nach der Infektion aus dem Blut der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Tiere mit CO₂ getötet und der Brustraum freigelegt. Nach Durchtrennung der Vena cava posterior wurde das austretende Blut sofort mit wenigen Tropfen eines gerinnungshemmenden Citrat-Glucose-Antikoagulans (CGA) versetzt und mit einer Pipette möglichst quantitativ in ein Plastikröhrchen überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation (400×g, 4°C, 15 min) waren drei Fraktionen unterscheidbar. Zu unterst die tiefrote Erythrozytenschicht, darüber das weiße Trypanosomenpellet und oben das schwach rötlich gefärbte Blutplasma. Letzteres wurde vorsichtig abgenommen. Das Trypanosomenpellet wurde in 1 ml eiskaltem SB-Medium resuspendiert und mit möglichst wenig Erythrozyten in ein neues Plastikröhrchen überführt. Das Pellet wurde nun zweimal durch Resuspendieren und Pelletieren (400×g, 4°C, 10 min) in je 1 ml eiskaltem SB-Medium (s. 2.4) gewaschen. Zum Schluss folgte eine Reinigung der Trypanosomen durch eine DEAE-Cellulose-Chromatografie bei 4°C (Lanham & Godfrey, 1970). Zu diesem Zweck wurden ca. 2×16 cm große konventionelle Chromatographie-Säulen (Glasbläserei Heidelberg), die etwa 10 cm hoch mit DEAE-Säulenmaterial gepackt waren, verwendet. Die ungeladenen Trypanosomen passierten die Anionenaustauschersäule ungehindert, während die in der Zellsuspension noch enthalte-

¹Die Mäuse stammten aus der Tierversuchsanstalt Heidelberg und waren ca. 10 Wochen alt.

nen Erythrozyten wegen ihrer negativen Oberflächenladung vom Säulenmaterial zurückgehalten wurden.

2.10 Proteinanalytik

2.10.1 Herstellung von Zellysaten

Protease-Inhibitoren	Konzentration der Stammlösung
N _α -p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon (TLCK)	100 mM in ddH ₂ O
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	200 mM in Isopropanol
Leupeptin	10 mM in ddH ₂ O
N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucin-4-guanidinobutylamid (E-64)	2,8 mM in ddH ₂ O
Pepstatin A	1,5 mM in ddH ₂ O

Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Die Trypanosomen (6×10^7 Zellen/ml) wurden in Lyse-Puffer (s. 2.4) mit Protease-Inhibitoren (200 μ M TLCK, 400 μ M PMSF, 10 μ M Leupeptin, 2 μ M E-64 und 1 μ M Pepstatin A) resuspendiert und solange auf Eis lysiert, bis im Lichtmikroskop keine intakte Zelle mehr zu erkennen war. Danach wurde 10%iges (w/v) SDS zum Zellysate gegeben (Endkonzentration: 1 % (v/v)), der gesamte Ansatz gut gemischt und das Lysat bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.10.2 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinmenge der Lysate wurde mit dem **BCA-Protein-Assay**, einer Kombination der Proteinbestimmung nach Biuret mit einem stabilen und selektiven Detektionsreagenz für Kupfer(I)-Ionen, der Bicinchoninsäure (BCA), bestimmt.

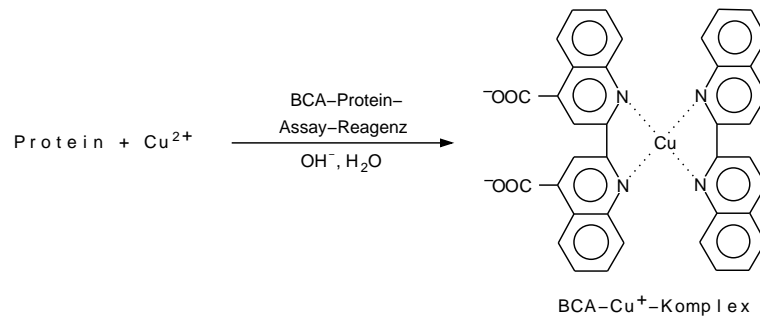


Abbildung 2.1: **BCA-Protein-Assay (aus: Manual der Firma Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (USA))**

Der Test wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit den BCA-Reagenzien A und B von Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu 10 μl des unverdünnten Lysates wurden 200 μl der BCA-Arbeitslösung (Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1) gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die in der alkalischen Arbeitslösung enthaltenen Cu^{2+} -Ionen werden durch die in der Testlösung enthaltenen Proteine zu Cu^{+} -Ionen reduziert. Diese bilden mit der BCA einen farbigen Komplex, der bei 550 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Für den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,9 mg Protein/ml wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) eine Eichgerade erstellt. Von jeder Probe (Lysate bzw. Eichlösungen) wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die photometrische Auswertung erfolgte mit einem ELISA-Plate-Reader MR 5000 (Dynatech, Denkendorf).

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.10.3.1 Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese

Trenngelpuffer 4x

1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8 mit HCl eingestellt

Trenngel (10 % (w/v) Acrylamid)

1625 μl Rotiphorese Gel A (Roth, Karlsruhe), 650 μl Rotiphorese Gel B (Roth, Karlsruhe), 1250 μl Trenngelpuffer 4x, 1475 μl ddH₂O, 25 μl Ammoniumperoxidisulfat (APS; 10 % (w/v), frisch angesetzt), 2,5 μl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Das Gel wurde mit 167 μl wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet.

Sammelgelpuffer 4x

0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8 mit HCl eingestellt

Sammelgel (4,5 % (w/v) Acrylamid)

440 μ l Rotiphorese Gel A (Roth, Karlsruhe), 176 μ l Rotiphorese Gel B (Roth, Karlsruhe), 750 μ l Sammelgelpuffer 4x, 1634 μ l ddH₂O, 27 μ l Ammoniumperoxidisulfat (APS; 10 % (w/v), frisch angesetzt), 9 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Probenpuffer 4x

0,25 M Tris, 40 % (v/v) Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 mit HCl. Vor Gebrauch wurde 1,4-Dithiothreitol (DTT; Endkonzentration: 100 mM) dazugegeben.

Elektrophoresepuffer

19,2 mM Glycin, 2,5 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970). Sammelgel (4,5 % (w/v) Acrylamid) und Trenngel (10 % (w/v) Acrylamid) mit einer Dicke von 1 mm wurden in einem Minigel-Gießstand von Bio-Rad (München) hergestellt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 1:4 in Probenpuffer 4x verdünnt und 3 min im Wasserbad gekocht. Die Elektrophorese erfolgte etwa 1 h bei 180 V in einer Mini-PROTEAN II-Zelle von Bio-Rad (München).

2.10.3.2 Silberfärbung**Fixierlösung**

30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Conditioner

0,4 M Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol. Vor Gebrauch wurden Glutaraldehyd (Endkonzentration: 0,5 % (v/v)) und Na₂S₂O₃ × 5H₂O (Endkonzentration: 0,1 % (w/v)) frisch dazugegeben.

Silberlösung

0,1 % (w/v) Silbernitrat, 0,01 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler

2,5 % (w/v) Na₂CO₃, 0,02 % (v/v) Formaldehyd

Mit einer Silberfärbung können bis zu 0,1 ng Protein in einem SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Die Färbung wird bei RT durchgeführt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Polyacrylamidgele mindestens 1 h in Fixierlösung geschwenkt. Danach wurden sie 16 min in Conditioner inkubiert und 3×5 min mit ddH₂O gewaschen. Nun wurden die Gele 20 min in Silberlösung geschwenkt und kurz mit ddH₂O abgespült. Zum Schluss wurden die Gele wenige Minuten in Entwicklerlösung gegeben. Waren die Proteinbanden gut sichtbar, wurde der Entwickler entfernt und die Reaktion mit 50 mM EDTA gestoppt.

2.11 Immunologische Methoden

2.11.1 Western Blotting

Diskontinuierliches Puffersystem

Anodenpuffer I: 300 mM Tris
Anodenpuffer II: 25 mM Tris
Kathodenpuffer: 40 mM 6-Aminohexansäure

Ponceau S-Färbelösung

1 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Ponceau S

TBST

150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05 % (v/v) Tween 20; pH 8

Blockierungspuffer

TBST, 5 % (w/v) Magermilchpulver

Inkubations-TBST

TBST, 5 % (v/v) Pferdeserum, 0,1 % (w/v) Magermilchpulver

Die in den SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry Verfahren auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran (Immobilon-P; Millipore, Eschborn) transferriert. Das Blotting wurde in einer Multiphor II Nova Blot Unit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (Anodenpuffer I und II, Kathodenpuffer) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde 55 min bei 41 mA ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) pro Minigel geblottet. Der Transfer der Proteine auf die Membran (Blot) wurde mit dem reversibel an Proteine bindenden Farbstoff Ponceau S überprüft. Dazu wurde die Membran wenige Sekunden in Ponceau S-Färbelösung geschwenkt, anschließend in 1%iger (v/v) Essigsäure entfärbt und zur Neutralisierung kurz in TBST gewaschen. Die Blots wurden über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer aufbewahrt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Membranen bei RT 3×5 min mit TBST gewaschen. Es folgte dann eine einstündige Inkubation bei RT mit dem gewünschten Erstantikörper, der in Inkubations-TBST verdünnt wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen (je 5 min) der Blots mit TBST, wurde der jeweilige Zweitantikörper (Peroxidase-konjugiertes anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG der Ziege) 1:5000 in Inkubations-TBST verdünnt und die Membranen 1 h bei RT darin geschwenkt. Zum Schluss wurden die Blots nochmals, wie oben beschrieben, gewaschen. Die Entwicklung der Western Blots erfolgte mit den ECLplus-Reagenzien und einem Hyperfilm ECL (beides von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers.

Die densitometrische Auswertung von Western Blots wurde mit dem Programm LumiAnalyst Version 3.0 (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

2.11.2 Affinitätsreinigung von Antiserum**PBST**

PBS (s. 2.4), 0,2 % (v/v) Tween 20

Blockierungslösung

PBST, 5% (w/v) Magermilchpulver

Das zur Affinitätsreinigung verwendete Protein wurde zuerst gelelektrophoretisch

gereinigt. Hierzu wurden 50 μg Protein in einem präparativen Gel mit nur 2 Taschen (eine kleine für ca. 25 μl , eine große für mehr als 250 μl) aufgetrennt (vgl. 2.10.3.1). Nach der Elektrophorese wurde das Protein auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit Ponceau S angefärbt (s. 2.11.1). Die Proteinbande wurde in kleine Stücke zerschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mindestens 30 min bei RT mit Blockierungslösung auf einem Rotator inkubiert. Danach wurden die Blotstücke 2 \times 5 min mit PBST gewaschen und 1 h mit einer 1:40 Verdünnung des Antiserums in Blockierungslösung bei RT rotiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit PBST wurden die spezifisch an den Blot gebundenen Antikörper mit 1 ml eiskalter 0,1 M Glycinlösung (pH 2,8) durch 5minütiges Schütteln eluiert. Das Eluat wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und mit 0,1 ml Tris-HCl (1 M, pH 8) mit BSA (1 mg/ml) neutralisiert. Bis zur Verwendung wurde der gereinigte Antikörper bei - 20°C aufbewahrt.

Die Blotstücke konnten insgesamt mindestens dreimal zur Aufreinigung von Serum ohne Verlust der Spezifität des Antikörpers verwendet werden. Dazu wurden die Blotstücke nach Entfernung des Eluats durch zweimaliges kurzes Waschen mit PBST neutralisiert und wie beschrieben blockiert und inkubiert.

Für die Inkubation von Western Blots mit affinitätsgereinigten Antikörpern, wurde das Eluat 1:10, 1:25 oder 1:50 in Inkubations-TBST verdünnt.

2.11.3 Produktion von VSG AnTat 1.1 Antikörpern

2.11.3.1 Reinigung von *T. b. brucei* VSG

Bluttrypanosomen des pleomorphen Stamms AnTat 1.1 wurden fünf Tage nach der Infektion (s. 2.9.1) aus dem Blut von 6 NMRI-Mäusen isoliert und mittels DEAE-Chromatographie (Lanham & Godfrey, 1970) gereinigt. Die Aufreinigung des variablen Oberflächenglykoproteins (VSG) erfolgte nach der Methode von Steverding und Kremp (1998). Die Trypanosomen (10^8 Zellen/ml) wurden in Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitoren (s. 2.10.1) in Gegenwart von 10 mM p-Chlormercuribenzoat zur Inaktivierung der endogenen GPI-spezifischen Phospholipase C (Gurnett et al., 1986) 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat 1 h bei 114000 $\times g$ und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge RCM 120 GX; Sorvall, Connecticut (USA)). Das Membranpellet wurde in PBS mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 durch Beschallen (3 \times 2 min, Modus: continued, 20 % Maximalleistung; Branson Sonifier cell disruptor B 15; Heinemann, Schwäbisch Gmünd) unter Eiskühlung solubilisiert und nach Zugabe von DTT (1 mM) und EDTA (2,5 mM) für 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. DTT bewirkt dabei die Reaktivierung der GPI-spezifischen Phospholipase C. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 114000 $\times g$ und 4°C war das gesamte VSG im Überstand. Die Reinheit des isolierten VSG wurde in einem Silbergel (s. 2.10.3.2) überprüft.

2.11.3.2 Immunisierung von Mäusen

Das gereinigte VSG wurde mit Centricon 30 nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert und mit Titermax Gold Adjuvans (Sigma, Deisenhofen), wie in der Produktinformation vorgegeben, gemischt. Drei BALB/c-Mäusen wurden je 20 μg VSG injiziert. Die Immunisierung wurde im Abstand von jeweils drei Wochen insgesamt viermal durchgeführt. Drei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Mäuse mit CO_2 getötet. Das Blut wurde wie beschrieben (s. 2.9.2), jedoch ohne CGA-Zugabe, entnommen und mindestens 1 h bei RT stehen gelassen. Danach wurde 10 min bei $1600\times g$, 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt und erneut zentrifugiert ($15000\times g$, 4°C , 10 min). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Überstand (Antiserum) wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.12 Analytische Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Einzelzellsuspension mit etwa 10^6 Partikeln/ml. Zur Analyse wird die im Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Die Zellen werden beim Eintreten in die Messkammer durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit (PBS) stark beschleunigt. Dadurch werden die Zellen aufgetrennt und wandern aneinandergereiht zum Analysenpunkt. Dieser Vorgang wird als **hydrodynamische Fokussierung** bezeichnet. Am Analysenpunkt werden die Zellen mit einem Argon-Ionenlaser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert, in Bruchteilen einer Sekunde analysiert. Es können die Lichtstreuung der Zellen und deren Fluoreszenz (nach Inkubation mit Farbstoffen, die bei 488 nm angeregt werden) bestimmt werden. Für jede Zelleigenschaft (Lichtstreuung, Fluoreszenz) wird der Messbereich in eine Anzahl von Kanälen eingeteilt. Der Wert eines gemessenen Impulses wird einem Kanal zugeordnet. Bei DNA-Analysen werden diese Signale linear verstärkt. Das Messen verschiedener Impulsformen, wie Pulshöhe, -fläche und -breite dient bei der DNA-Analyse zum Herausfiltern (Diskriminierung, „Gating“) von G_0/G_1 , S, G_2/M -Multiplets und G_0/G_1 -Duplets.

2.12.1 Fixierung und Färbung der Trypanosomen

PC-Puffer

0,2 M Na_2HPO_4 , 0,1 M Zitronensäure; pH 7,8 mit HCl eingestellt

RNase-Stammlösung

15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5 mit NaOH eingestellt; vor Gebrauch mit 10 mg/ml RNase im Wasserbad 15 min kochen

Färbelösung

10 ml HBSS (Life Technologies, Karlsruhe), 500 μ l RNase-Stammlösung, 50 μ l Propidiumjodid (0,1 mg/ml H₂O)

Zur Fixierung wurden mindestens 1×10^6 , maximal 1×10^7 Zellen/ml abzentrifugiert ($1600 \times g$, 4°C, 8 min). Die Trypanosomen wurden mit 1 ml eiskaltem SB-Medium (s. 2.4) gewaschen und erneut zentrifugiert ($700 \times g$, 4°C, 8 min). Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol versetzt, gut gemischt und bis zur Färbung der DNA, jedoch mindestens 2 h, bei -20°C gelagert. Danach wurden die Zellen bei $300 \times g$, 4°C für 10 min zentrifugiert und mit Phosphatpuffer (HBSS; Life Technologies, Karlsruhe) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Trypanosomen in 0,9 ml HBSS und 0,3 ml PC-Puffer aufgenommen und 5 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert ($300 \times g$, 4°C, 8 min) und nach dem Dekantieren des Überstandes mit 200 μ l Färbelösung versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei RT konnte der DNA-Gehalt der Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmt werden.

2.12.2 Analyse des DNA-Gehalts mit dem Durchflusszytometer

Die Untersuchung der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACScan unter Verwendung der Software CELLQuest (beides von Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Zellmultiplets und -duplets wurden diskriminiert (s. 2.12). Die übrigen Daten wurden in Histogrammen dargestellt.

2.13 Molekularbiologische Methoden

Alle zur Aufreinigung, Auftrennung oder Analyse von RNA verwendeten wässrigen Lösungen wurden zur Inaktivierung möglicher RNasen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die Endkonzentration von DEPC in den Lösungen betrug 0,1 % (v/v). Nach gründlichem Schütteln der behandelten Lösungen wurden diese mindestens 12 h bei RT stehen gelassen und anschließend autoklaviert.

2.13.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. b. brucei*

Denaturierungslösung

Stammlösung:

Zu 293 ml ddH₂O, 17,6 ml Natriumcitrat (0,75 M, pH 7, Endkonzentration: 25 mM) und 26,4 ml N-Lauroylsarcosin (10 % (w/v), Endkonzentration: 0,5 %) wurden 250 g Guanidinisothiocyanat (Endkonzentration: 4 M) gegeben und bei 60°C gelöst. Die Lösung war 3 Monate bei RT haltbar.

Arbeitslösung:

Stammlösung mit 0,1 M 2-Mercaptoethanol versetzt

Gesamt-RNA wurde aus schlanken und gedrunenen Bluttrypanosomen und aus der prozyklischen Insektenform des pleomorphen Stamms *T. b. brucei* AnTat 1.1 isoliert. Für die Gewinnung von schlanken bzw. gedrunenen Trypanosomen wurden 10 bzw. 5 weibliche NMRI-Mäuse wie beschrieben (s. 2.9.1) mit *T. b. brucei* AnTat 1.1 infiziert und die Zellen nach 3 bzw. 5 Tagen post infectionem isoliert (s. 2.9.2). Die RNA prozyklischer Trypanosomen wurde aus der etablierten Insektenform (s. 2.8.2) bei Zelldichten von maximal 6×10^6 Zellen/ml gewonnen. Die Präparation totaler RNA erfolgte mit Guanidinisothiocyanat und Phenolextraktion. Zunächst wurden von den verschiedenen Trypanosomenstadien je 1×10^8 Zellen abzentrifugiert ($1600 \times g$, 4°C, 10 min), in 1 ml Denaturierungslösung aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Dann wurde jeder Ansatz mit 50 μ l Natriumacetat (2 M) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 600 μ l eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) wurden die Proben 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei $10000 \times g$ und 4°C wurde von jeder Probe die obere wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette entfernt und in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Die wässrige Phase enthielt die gewünschte RNA. DNA und Proteine befanden sich in der organischen Phase. Die RNA wurde durch die Zugabe von 800 μ l 2-Propanol zur wässrigen Phase ausgefällt. Die Proben wurden nun mindestens 60 min bei -20°C inkubiert und anschließend 30 min bei $10000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde jedes RNA-Pellet in 150 μ l Denaturierungslösung gelöst. Durch Zugabe von 150 μ l 2-Propanol und eine nachfolgende Inkubation der Proben bei -20°C für 30 min, wurde die RNA erneut präzipitiert. Danach wurden die Proben 10 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die RNA-Pellets mit 100 μ l Ethanol (70 % (v/v)) versetzt. Die Proben wurden kurz gevortext und 10-15 min bei RT inkubiert um restliches Guanidin aus den Pellets zu entfernen. Anschließend wurden die Proben 10 min bei $10000 \times g$, 4°C zentrifugiert und nach dem Dekantieren der Überstände die

RNA bei 55°C im Heizblock nahezu getrocknet. Vollständiges Trocknen würde die Löslichkeit der RNA stark herabsetzen. Jedes RNA-Pellet wurde zum Schluss in 50 μl DEPC-behandeltem ddH₂O aufgenommen, durch Erwärmen für 10 min bei 55°C im Heizblock vollständig gelöst und mit einem Ribonuklease-Inhibitor (E00311; 35 U/ μl ; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers versetzt. Die RNA-Lösungen wurden bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

2.13.2 Quantifizierung von RNA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8 mit NaOH eingestellt

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA-Lösungen erfolgte photometrisch (Spektrophotometer DU 7400; Beckman, München) bei 260 und 280 nm. Die RNA-Lösungen wurden dazu 80fach in TE-Puffer verdünnt. Ein A_{260} -Wert von 1,0 bei einer Küvettendicke von 1 cm entspricht einer Konzentration von 40 μg RNA/ml. Die Konzentration einer RNA-Lösung berechnet sich demnach wie folgt:

$$c_{RNA}(\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 40 \times 80$$

Der A_{280} -Wert erlaubt eine Aussage über die Verunreinigung der RNA mit Proteinen. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei niedrigeren Werten muss eine zusätzliche Reinigung der RNA durchgeführt werden. Die aus den verschiedenen Stadien von *T. b. brucei* isolierte RNA besaß eine Konzentration von 700-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der A_{260}/A_{280} -Wert lag bei 1,8-1,9.

2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer 50x

2 M Tris-HCl, 1 M Natriumacetat, 0,1 M EDTA; pH 8,3

Gelladepuffer 10x

1 mM EDTA, 60 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; pH 8,3 mit NaOH eingestellt

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde die Agarose (Endkonzentration: 1-1,2 % (w/v)) durch Aufkochen im entsprechenden Volumen TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60°C wurde im Gelträger ein 5-10 mm dickes Gel mit 10 Probentaschen gegossen. Nach dem Gelieren des Gels wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Gelladepuffer 10x versetzt und bei 70-100 V in ca. 2 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einer 0,05%igen (v/v) Ethidiumbromid-Lösung (in TAE-Puffer) inkubiert und die DNA-Banden durch UV-Illumination (Wellenlänge: 254 nm) detektiert. Sollte das Gel danach noch weiterverwendet werden (Southern Blotting), wurde durch mehrmaliges Waschen des Gels in ddH₂O bei RT überschüssiges Ethidiumbromid entfernt.

2.13.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA-Molekül. Die Möglichkeiten der PCR beschränken sich nicht auf die Vermehrung von DNA-Matrizen. Auch RNA-Moleküle können vervielfältigt werden, wenn sie mit dem Enzym reverse Transkriptase in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Im Anschluss an diesen Schritt werden Oligonukleotide, die als Primer dienen, und *Taq*-Polymerase zugesetzt. Diese Form der PCR wird als **RT-PCR** bezeichnet. PCR- und RT-PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Minicycler; Biozym, Hessisch Oldendorf) durchgeführt.

2.13.4.1 Durchführung der RT-PCR

Total-RNA (1,5 µg) aus *T. b. brucei* AnTat 1.1 Blutstromformen bzw. der zyklischen Insektenform wurde mit Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Herstellerangaben revers transkribiert und amplifiziert. Eingesetzt wurden dabei ein *spliced leader*-Primer und ein genspezifischer Primer (R1 bzw. R2; s. 2.3). Zur Durchführung der RT-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Reverse Transkription	30 min, 42°C	
Initiation	4 min, 95°C	Initial-Denaturierung
32 Zyklen	1 min, 95°C	Denaturierung
	1 min, 56°C	Annealing
	1 min, 72°C	Amplifikation
Termination	5 min, 72°C	Endpolymerisation

2.13.4.2 Herstellung von R1- und R2-spezifischen DIG-markierten Sonden

Die Herstellung der Sonden erfolgte in zwei Schritten. Der erste diente zur Gewinnung eines möglichst reinen DNA-Fragments für die im zweiten Schritt durchgeführte DIG-Markierung. Zunächst wurde das gewünschte DNA-Fragment mittels PCR unter Verwendung chromosomaler *T. b. brucei*-DNA (freundlicherweise von Nina Reckenfelderbäumer (AK Krauth-Siegel) zur Verfügung gestellt) und genspezifischen Primern (R1[→] & R1[←] bzw. R2[→] & R2[←]; s. 2.3) amplifiziert:

PCR-Ansatz		Endkonzentration
Matrizen (chromosomale)-DNA	2 μ l	50 ng
Oligonukleotide (Primer)	je 1 μ l	0,2 μ M
dNTPs	4 μ l	500 μ M
Reaktionspuffer 10x	5 μ l	
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

Start der Reaktion durch Zugabe von 5 μ l *Taq*-Polymerase (2 U/ μ l).

PCR-Programm

Initiation	2 min, 95°C	Initial-Denaturierung
30 Zyklen	30 s, 95°C	Denaturierung
	30 s, 50-52°C	Annealing
	3 min, 72°C	Amplifikation
Termination	5 min, 72°C	Endpolymerisation

Nach der Initial-Denaturierung wurde die *Taq*-Polymerase zugegeben.

In einem 1%igen Agarosegel (s. 2.13.3) wurde das PCR-Produkt elektrophoretisiert und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde, wie vorgegeben, in einer PCR (gleiches PCR-Programm und gleiche Oligonukleotide wie zuvor) neben den üblichen dNTPs Digoxigenin (DIG)-11-dUTP (s. Abb. 2.2) in das isolierte DNA-Fragment eingebaut.

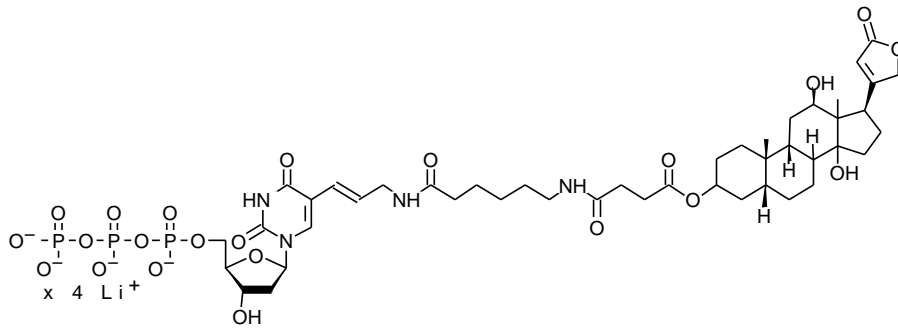


Abbildung 2.2: **Struktur von Digoxigenin (DIG)-11-dUTP** (aus: **DIG application manual for filter hybridization (2000)**; Roche Diagnostics, Mannheim)

Die Konzentration der DIG-markierten Sonde wurde nach einer 1:49 Verdünnung in TE-Puffer (s. 2.13.2) im GENQUANT-Photometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Das Photometer berechnete automatisch die DNA-Konzentration.

2.13.5 Southern Blotting

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer

2 M NaCl, 1 M Tris-HCl; pH 5,5

SSC 20x

3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat; pH 7 mit HCl eingestellt

Hybridisierungslösung

SSC 5x, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Blockingreagenz-Lösung (aus 10%iger (w/v) Blockingreagenz-Stammlösung; Roche Diagnostics, Mannheim)

Waschpuffer 2x

SSC 2x, 0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 0,1x

SSC 0,1x, 0,1 % (w/v) SDS

Puffer I

150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure; pH 7,5 mit NaOH (s) eingestellt

Puffer II

Puffer I, 0,5 % (v/v) Blockingreagenz-Lösung (aus 10%iger (w/v) Blockingreagenz-Stammlösung; Roche Diagnostics, Mannheim)

DNA wurde in 1,2%igen Agarosegelen, wie beschrieben (s. 2.13.3), elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die Gele zur Depurinierung der DNA 10 min bei RT in 0,1 M HCl geschwenkt. Anschließend wurden die Gele kurz mit ddH₂O abgespült und 30 min mit Denaturierungspuffer behandelt, erneut mit Wasser abgespült, 30 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt und mit SSC 20x getränkt. Die denaturierte DNA wurde 1 h bei 50 mbar mit Hilfe eines Vakuumbloiters (Modell 785, Bio-Rad, München), nach Angaben des Herstellers, auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Crosslinker UVC 500; Hoefer, San Francisco (USA)) nach Herstellerangaben wurde die DNA auf der Membran (Blot) fixiert und die Blots bei 68°C getrocknet. Danach wurde jeder Blot in einer Glasröhre plaziert, mit Hybridisierungslösung überschichtet und 1 h bei 68°C im Hybridisierungsöfen (Hybridiser HB-1D; Techne, Cambridge (Großbritannien)) prähybridisiert. Die in Hybridisierungslösung aufgenommenen Sonden (1 µg DIG-markierte DNA/1 ml Hybridisierungslösung) wurden 10 min bei 95°C denaturiert und die Membranen über Nacht bei 68°C mit der jeweiligen Sondenlösung hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Blots zweimal 5 min bei RT mit Waschpuffer 2x und anschließend bei 68°C zweimal 15 min mit Waschpuffer 0,1x gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Jeder Blot wurde nach einer kurzen Äquilibration in Puffer I 1 h in Puffer II blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Peroxidase-konjugierter anti-Digoxigenin Antikörper wurden 1:1000 in Puffer II verdünnt und die Blots 30 min mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach einem 30minütigen Waschen in Puffer I wurden die Blots mit den ECLplus-Reagenzien und einem Hyperfilm ECL (beides von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Herstellerangaben entwickelt.

2.14 Enzymtests

2.14.1 Alternative Oxidase

Messpuffer für zellfreie Lysate

PBS (s. 2.4) mit 20 mM sn-Glycerin-3-Phosphat, 1 mM EDTA; pH 7,2

Die Aktivität der Alternativen Oxidase wurde polarographisch gemessen, in dem der Sauerstoffverbrauch amperometrisch mit einer Clark-Elektrode (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio (USA)) in einer thermostatisierten Messzelle (2,4 ml) bei 37°C aufgezeichnet wurde. Die Elektrode (Abb. 2.3) besteht aus einer Platin-Arbeits-elektrode (Kathode) und einer Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode (Anode). Der Sauerstoff diffundiert aus der Lösung durch eine gaspermeable Membran in die Elektrolytzelle.

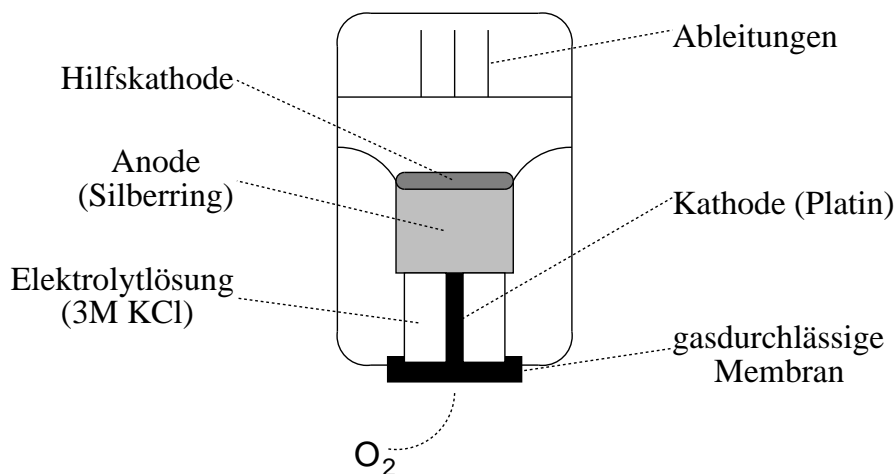


Abbildung 2.3: Clark-Elektrode (nach Otto, 2000)

Zur Messung der Respiration intakter Zellen wurden Kultur-Bluttrypanosomen durch Zentrifugation geerntet ($1600\times g$, 4°C, 10 min) und zweimal mit komplettem Baltz-Medium (s. 2.8.1) gewaschen (ca. 1 ml für 2×10^8 Zellen). Danach wurden die Parasiten in komplettem Medium zu einer Zelldichte von $6,5\times 10^8$ Zellen/ml resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gestellt. Als Messpuffer (2,4 ml) diente auf 37°C vorgewärmtes Baltz Medium komplett. Für den Test wurden 100 μ l Trypanosomensuspension ($6,5\times 10^7$ Zellen) eingesetzt. Der Sauerstoffverbrauch der Trypanosomen wurde 7-10 min aufgezeichnet. Danach wurden 24 μ l Salicylhydroxamsäure (SHAM, 100 mM in DMSO) zugegeben, wodurch innerhalb weniger Sekunden die Atmung der Trypanosomen unterbrochen wurde. SHAM ist ein spezifischer Inhibitor der Alternativen Oxidase (Clarkson et

al., 1989). Um die Nulllinie zu bestimmen, wurde zum Schluss eine Spatelspitze Natriumdithionit zum Verbrauch des gesamten Sauerstoffs ins Medium gegeben.

Zur Bestimmung der Aktivität der Alternativen Oxidase in zellfreien Lysaten, wurden Bluttrypanosomen zu einer Zelldichte von $7,2 \times 10^8$ Zellen/ml in Lyse-Puffer in Gegenwart von Protease-Inhibitoren (s. 2.10.1) resuspendiert. Durch einmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen wurden die Zellen lysiert. Als Messpuffer (2,4 ml) diente auf 37°C vorgewärmtes PBS mit sn-Glycerin-3-Phosphat (20 mM) als Substrat. Für den Test wurden $200 \mu\text{l}$ lysierte Trypanosomen ($1,3 \times 10^7$ Zelläquivalente) eingesetzt. Am Ende der Messung wurden, wie oben beschrieben, SHAM und Natriumdithionit zugegeben.

Für die Auswertung der Messergebnisse wurde eine Sauerstoffkonzentration von $225 \mu\text{M}$ für den auf 37°C temperierten Messpuffer angenommen (vgl. Helfert et al., 2001).

2.14.2 Ribonukleotid-Reduktase

Die Bestimmung der Ribonukleotid-Reduktase-Aktivität erfolgte durch Messung der zeitabhängigen Reduktion von $[^3\text{H}]\text{GDP}$ zu $[^3\text{H}]\text{dGDP}$, entsprechend der von Dormeyer (2000) etablierten Methode.

Für den Assay wurde zuerst ein radioaktives Testgemisch hergestellt. $50 \mu\text{l}$ $[^3\text{H}]\text{GDP}$ (1 mCi/ml, 11 Ci/mmol) wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß im Vakuum zur Trockne eingengt und die weiteren Komponenten, gelöst in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,6), dazugegeben:

Radioaktives Testgemisch	Konzentration
$50 \mu\text{l}$ $[^3\text{H}]\text{GDP}$, eingedampft	
$258 \mu\text{l}$ dTTP	3,1 mM
$100 \mu\text{l}$ MgCl_2	512 mM
$200 \mu\text{l}$ KCl	3,6 M
$442 \mu\text{l}$ HEPES-Puffer	50 mM, pH 7,6
Gesamtvolumen: 1 ml	

Reaktionsgemisch	Endkonzentration
20 μl DTE (50 mM)	5 mM
10 μl GDP (10 mM)	500 μM
7,5 μl R1 (5,6 mg/ml; 57 μM)	2 μM
30 μl R2 (3,6 mg/ml; 92 μM)	13 μM
107,5 μl HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,6)	
25 μl radioaktives Testgemisch:	
dTTP	100 μM
MgCl ₂	6,4 mM
KCl	90 mM
[³ H]GDP	6,25 μCi
Gesamtvolumen: 200 μl	

Für den Assay wurden alle Komponenten gemischt und die Reaktion wurde durch Zugabe des Testgemisches gestartet.

Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Durch 10minütiges Erhitzen auf 100°C wurde die Reaktion gestoppt und das ausgefallene Protein bei RT abzentrifugiert (13000×g, 5 min). Die Überstände wurden in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt und mit 15 U alkalischer Phosphatase in 10 μl HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,6) versetzt, um die Nukleotide zu dephosphorylieren. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Proben 5 min auf 100°C erhitzt, um die Dephosphorylierungsreaktion zu beenden. Die Proben wurden abschließend scharf abzentrifugiert (s. o.).

Guanosin, Desoxyguanosin und Guanin, das als Abbauprodukt in geringem Maße entstand, wurden für die Quantifizierung mittels HPLC voneinander getrennt. Alle eingesetzten Puffer wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 μM) und mindestens 15 min im Ultraschallbad entgast. Die Trennung erfolgte in einem Borsäurepuffer (100 mM Ammoniumborat, pH 8,2) an einer Kationenaustauscher-Matrix mit Sulfonatliganden (Aminex A9; Bio-Rad, München) bei einer Flussrate von 1 ml/min und 37°C. Detektiert wurde bei 253 nm. Von jeder Probe wurden 40 μl in die HPLC injiziert. Nukleosid, Desoxynukleosid und die freie Base verteilten sich nach der Auftrennung auf jeweils zwei Fraktionen mit einem Volumen von je 3 ml. Sie wurden direkt in Szintillationsgefäßen gesammelt, mit 16 ml Szintillationscocktail (Ready Value; Beckman, München) vermischt und im Szintillationszähler (6000 IC; Beckman, München) 2 min vermessen.

2.14.3 Superoxid-Dismutase

Lyse-Puffer

5 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA; pH 7,8

Zur Bestimmung der Aktivität der Superoxid-Dismutase in Zelllysaten wurde eine indirekte Methode verwendet (Beauchamp & Fridovich, 1971). Die Aufarbeitung der Trypanosomen erfolgte nach den Beschreibungen von Ismail et al. (1997). Bluttrypanosomen wurden zu einer Dichte von 10^9 Zellen/ml in Lyse-Puffer in Gegenwart von PMSF (400 μ M) resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Trypanosomen 1 h bei $100000\times g$, 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in 30 μ l Portionen aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Der Nachweis der Superoxid-Dismutase erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel-system unter nativen Bedingungen. **Alle** Puffer (s. 2.10.3.1) wurden daher ohne SDS und DTT angesetzt. Pro Sammelgel-Tasche wurden 3×10^7 Zelläquivalente (30 μ l Überstand plus 10 μ l Probenpuffer 4x) aufgetragen. Als Positivkontrolle diente Fe-Superoxid-Dismutase (200 ng/Tasche) aus Rindererythrozyten (Sigma, Deisenhofen), die ebenfalls in dem Lyse-Puffer mit PMSF und Probenpuffer 4x verdünnt wurde. Die ca. 16 h bei 20 mA dauernde Gelelektrophorese wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, um eine Erwärmung und somit Denaturierung der Superoxid-Dismutase zu verhindern. Danach wurden die Gele 15 min mit Nitroblau-Tetrazolium- (NBT-) Lösung (2 mg NBT/ml ddH₂O) bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte eine 15minütige lichtgeschützte Inkubation (bei RT) in Riboflavin-Lösung (10 μ g Riboflavin/ml ddH₂O) ohne bzw. mit 5 mM H₂O₂, einem Inhibitor von Fe- und Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen. Zum Schluss wurden die Gele kurz mit ddH₂O abgespült, in eine Plastikfolie eingeschweißt und 2 h auf einem Leuchtschirm belichtet. Durch die Lichteinwirkung wurde eine Autoxidation von Riboflavin ausgelöst. Das dabei entstehende Superoxidradikal-Anion reduziert das NBT zum blauen Formazan. Als Folge färbt sich das gesamte Gel blau, bis auf die Stellen, wo sich die Superoxid-Dismutase befindet und das Superoxidradikal-Anion durch Dismutation zerstört.

2.14.4 Diaphorase-Assay

Reaktionslösung

1,3 mg NADH, 0,3 mg NBT in 1 ml PBS

Mowiol 4-88-Lösung

6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol 4-88 wurden gemischt und 5 min bei RT gerührt. Dann wurden 6 ml ddH₂O dazugegeben und die Lösung 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) mit 0,02 % (w/v) NaN₃ dazugegeben und 1-2 h bei 50°C im Wasserbad erwärmt. Zum Schluss wurde die Lösung 15 min bei 7800×g zentrifugiert, der Überstand gesammelt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Der Nachweis der Diaphorase in Trypanosomen wurde nach den Beschreibungen von Vickerman (1965) und Tyler et al. (1997) durchgeführt. Die Trypanosomen wurden bei 1600×g und 4°C, 10 min zentrifugiert und zu einer Zelldichte von 2×10⁷ Zellen/ml in eiskaltem PBS (s. 2.4)/1 % (w/v) Glucose-Monohydrat resuspendiert. Anschließend wurde Glutardialdehyd (5 % (v/v) in PBS; Endkonzentration: 2,5 %) zugegeben und die Zellen 5 min auf Eis fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugieren (700×g, 4°C, 10 min) wurden die Zellen in PBS zu einer Dichte von 10⁷ Zellen/ml resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Ein Objektträger mit acht markierten Untersuchungsfeldern wurde nach der gründlichen Reinigung mit Ethanol p.a. mit 30 µl Poly-L-Lysin-Lösung (100 µg Poly-L-Lysin/ml PBS) pro Untersuchungsfeld 15 min beschichtet. Danach wurde die Lösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und 30 µl fixierte Trypanosomen auf die Untersuchungsfelder pipettiert. Nach einer 3minütigen Inkubation bei RT hatten sich genügend Zellen abgesetzt. Nicht-adhärenente Zellen wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die fixierten Zellen wurden nun mit je 30 µl Reaktionslösung 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 30 µl PBS/Untersuchungsfeld (2 min Einwirkzeit), wurde das Präparat mit wenigen Tropfen Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88 (Rodriguez & Deinhard, 1960) eingedeckelt. Die fixierten Zellen wurden mit dem Axiovert 100 M, LSM 510 Mikroskop von Zeiss (Göttingen) und der gleichnamigen Software ausgewertet. Verwendet wurde ein 100× Ölimmersionsobjektiv.

2.14.5 Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Die Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in Zelllysaten wurde anhand des bei der Oxidation der Dihydroliponsäure zu Liponsäure gebildeten NADH photometrisch bestimmt. Nach dem Ernten und Waschen mit SB-Medium (s. 2.4) wurden 2×10^7 Trypanosomen scharf abzentrifugiert ($15000 \times g$, 4°C , 1 min) und in $100 \mu\text{l}$ PBS/2 % (v/v) Triton-X-100 durch Beschallen im Ultraschallbad (3 min) lysiert. In Einmal-Plastikküvetten (1 ml Volumen) wurden $850 \mu\text{l}$ PBS, $90 \mu\text{l}$ Zelllysate ($1,8 \times 10^7$ Zelläquivalente), $50 \mu\text{l}$ NAD^+ (40 mM in PBS, Endkonzentration: 2 mM) und $10 \mu\text{l}$ Dihydroliponsäure (200 mM in DMSO, Endkonzentration: 2 mM) miteinander gut durchgemischt. Nach 3 min wurde die Absorption bei 340 nm in einem zeitlichen Abstand von 5 min über einen Zeitraum von 18 min mit einem Photometer (Spectrophotometer Ultrospec II; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemessen. Längere Messungen waren wegen des schnellen Umsatzes der Dihydroliponsäure und NAD^+ nicht nötig. Aus der Anfangsrate der Umsetzung wurde die Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase berechnet.

2.15 Messung der DNA-Synthese

Zur Messung der DNA-Synthese wurden Trypanosomen zunächst zweimal mit Baltz Medium komplett ohne Thymidin gewaschen und zentrifugiert ($700 \times g$, 4°C , 10 min). Danach wurden pro Loch einer 24-Loch-Gewebekulturplatte 2×10^7 Parasiten in Baltz Medium komplett (s. 2.8.1) ohne Thymidin eingesät. Jeder Versuchsansatz hatte ein Endvolumen von 1 ml. Nach kurzem Resuspendieren der Zellen wurden $5 \mu\text{Ci}$ (0,21 nmol) $[6\text{-}^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ dazupipettiert und der Ansatz vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Die Trypanosomen wurden 2 h unter Standardbedingungen (s. 2.8.1) inkubiert. Auf der Kulturplatte wurde zusätzlich eine Negativkontrolle, die nur aus dem verwendeten Medium und dem radioaktiv-markierten Thymidin bestand, mitgeführt. Diese Kontrolle wurde im gesamten Versuchsverlauf wie die Ansätze mit Trypanosomen behandelt. Nach der Inkubation wurden alle Versuchsansätze resuspendiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert ($700 \times g$, 4°C , 10 min). Die Überstände wurden abpipettiert und die Zellen mit 1 ml eiskaltem SB-Medium (s. 2.4) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($700 \times g$, 4°C , 10 min) wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ SB-Medium (eiskalt) mit $50 \mu\text{g}$ Heringssperma-DNA (Roche Diagnostics, Mannheim) resuspendiert und mit $200 \mu\text{l}$ TCA (20 % (w/v)) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis, wurden die Präzipitate bei $15000 \times g$, 4°C , 2 min zentrifugiert. Zu den Pellets wurden $200 \mu\text{l}$ 0,1 M NaOH/2 % (w/v) SDS gegeben und im Heizblock bei 60°C in ca. 30 min aufgelöst. Die Reaktionsgefäße wurden 30 s bei $15000 \times g$ zentrifugiert und der Inhalt quantitativ in Szintillationsgefäße überführt. Jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde mit $100 \mu\text{l}$ 1 M NaOH/2 %

(w/v) SDS gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das entsprechende Szintillationsgefäß pipettiert. Zum Schluss wurden zu jeder Probe 4 ml Szintillationscocktail (Rotiszint 22; Roth, Karlsruhe) gegeben und die Proben gut geschüttelt. Anschließend wurde die Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler (6000 IC; Beckman, München) für 10 min gemessen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von *T. b. brucei*

Alle Organismen sind auf die Bildung von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Synthese angewiesen. Das einzige Enzym, das die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert, ist die Ribonukleotid-Reduktase. Die Ribonukleotid-Reduktase stellt somit ein attraktives Ziel für eine Chemotherapie aller sich schnell vermehrenden Zellen und Organismen dar.

Wie die meisten Eukaryonten besitzen Trypanosomen eine Klasse I-Ribonukleotid-Reduktase (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997), die aus zwei homodimeren Untereinheiten (R1 und R2) besteht. Die Aktivität des Enzyms ist nur durch die Interaktion der R1- und R2-Untereinheit gewährleistet. Der Nachweis dieser Untereinheiten in verschiedenen Lebensstadien und im Zellzyklus der Trypanosomen sollte Aussagen über die Regulation der Ribonukleotid-Reduktase des Parasiten liefern.

3.1.1 Die Ribonukleotid-Reduktase im Lebenszyklus von *T. b. brucei*

Schlanke (*long slender*, LS) und gedrungene (*short stumpy*, SS) Bluttrypanosomen wurden aus infizierten Mäusen gewonnen (s. 2.9). *In vitro* konnte eine Differenzierung der gedrungenen Form zur prozyklischen Insektenform induziert werden (s. 2.8.2). Dieses Stadium entspricht der Vermehrungsform im Darm der Tsetse-Fliege. Die Trypanosomen wurden lysiert (s. 2.10.1) und gleiche Proteinmengen (6 μg) im Western Blot mit Antikörpern gegen die R1- und R2-Proteine

analysiert. Wie Abb. 3.1 zeigt, kommt das R1-Protein (Größe: 94 kDa; Hofer et al., 1997) in allen untersuchten Lebensstadien, jedoch in unterschiedlicher Menge, vor. Im Gegensatz dazu ist das R2-Protein (Größe: 39 kDa; Hofer et al., 1997) nur in der proliferierenden schlanken Blutform und prozyklischen Insektenform nachweisbar, nicht jedoch in den sich im Zellarrest befindlichen gedrungenen Bluttrypanosomen.

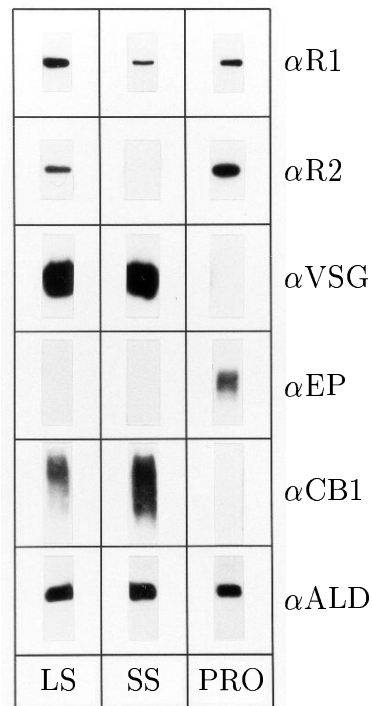


Abbildung 3.1: **Vorkommen der R1- und R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase und stadienspezifischer Proteine im Lebenszyklus von *T. b. brucei*.** Lysate der schlanken Blutform (LS), der gedrungenen Blutform (SS) und der prozyklischen Insektenform (PRO) der pleomorphen *T. b. brucei* Variante AnTat 1.1 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.10) und im Western Blot mit Antikörpern gegen R1 (α R1; 1:10), R2 (α R2; 1:5000), VSG AnTat 1.1 (α VSG; 1:50), Prozyklin (α EP; 1:2000), CB1-gp (α CB1; 1:3000) und Aldolase (α ALD; 1:1000) analysiert (s.2.11.1). Antiseren gegen VSG AnTat 1.1 und R1-Protein wurden vor der Verwendung affinitätsgereinigt (s. 2.11.2). Es ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Eine densitometrische Auswertung der Western Blots (s. 2.11.1) mit rekombinanten R1- und R2-Proteinen als Standards ermöglichte eine Abschätzung der Menge an R1- und R2-Untereinheiten pro Zelle in den verschiedenen Lebensstadien des Parasiten. Schlanke Bluttrypanosomen besitzen demnach ungefähr 46000 R1- und 15000 R2-Moleküle/Zelle, gedrungene Trypanosomen 16000 R1-Moleküle/Zelle und die prozyklische Insektenform 27000 R1- und 31000 R2-Moleküle/Zelle.

Die Homogenität der Parasiten im jeweiligen Lebensstadium wurde mit Antikörpern gegen bekannte stadienspezifische Proteine überprüft (Abb. 3.1). Dazu wurden im SDS-Gel 300 ng (für den Nachweis von VSG), 1,2 μ g (für den Nachweis von Prozyklin), 600 ng (für den Nachweis von CB1-gp) bzw. 1,2 μ g Gesamtprotein (für den Nachweis von Aldolase) aufgetrennt.

Das variable Oberflächenglykoprotein (VSG) wurde nur von den Bluttrypanosomen, das Oberflächenglykoprotein Prozyklin (EP) lediglich von der prozyklischen Insektenform exprimiert. Das CB1-Glykoprotein (CB1-gp), Hauptbestandteil der Membran von Flagellartasche, Endosom und Lysosom bei Bluttrypanosomen, wurde von der gedrunghenen Blutform am stärksten exprimiert (Brickman & Balber, 1994). Das Enzym Aldolase kommt in allen Lebensstadien der Trypanosomen in vergleichbarer Menge vor (Mutomba & Wang, 1998). Der Antikörper gegen Aldolase diente im Western Blot als Nachweis, dass gleiche Proteinmengen von allen Lebensstadien des Parasiten untersucht wurden.

Die meisten Proteine werden in Trypanosomen auf posttranskriptionaler Ebene reguliert. Um zwischen transkriptionaler und posttranskriptionaler Regulation der parasitären Ribonukleotid-Reduktase unterscheiden zu können, wurde die Expression der R1- und R2-Gene im Lebenszyklus von *T. b. brucei* untersucht (Abb. 3.2). Interne Fragmente der R1- und R2-Transkripte wurden mittels RT-PCR amplifiziert. Durch Southern Blot-Hybridisierung mit R1- und R2-spezifischen Sonden konnten anschließend Fragmente der erwarteten Größe (760 und 800 bp) in allen drei untersuchten Lebensstadien des Parasiten nachgewiesen werden. Eine stadienspezifische Regulation der Menge an R1- und R2-mRNA wurde nicht beobachtet. Somit liegt eine posttranskriptionale Regulation der Ribonukleotid-Reduktase vor.

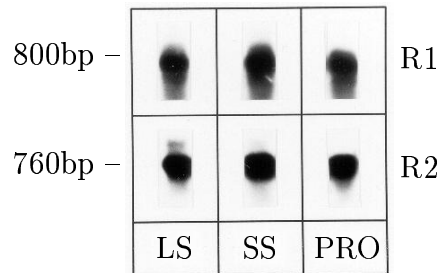


Abbildung 3.2: **Transkription der R1- und R2-Gene im Lebenszyklus von *T. b. brucei*.** Gesamt RNA wurde aus der schlanken Blutform (LS), der gedrungenen Blutform (SS) und der prozyklischen Insektenform (PRO) der pleomorphen *T. b. brucei*-Variante AnTat 1.1 isoliert und quantifiziert (s. 2.13.1 und s. 2.13.2). Anschließend wurde die mRNA (1,5 μ g) in cDNA revers transkribiert. Interne Fragmente der R1- und R2-Gene wurden ausgehend von der cDNA mit einem *spliced leader* und einem genspezifischen Primer amplifiziert (s. 2.13.4.1). Gleiche Mengen PCR-Produkt wurden in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.13.3), auf eine Nylonmembran übertragen und mit DIG-markierten R1- und R2-Sonden hybridisiert übertragen und mit DIG-markierten R1- und R2-Sonden hybridisiert (s. 2.13.4.2 und 2.13.5). Die genspezifische R1-Sonde erstreckte sich über die Codons 1-321, die R2-Sonde umfasste den gesamten kodierenden Bereich des Gens. Fragmente von erwarteter Größe (R1 = 760 bp; R2 = 800 bp) wurden in allen drei Lebensstadien in etwa der gleichen Menge nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

3.1.2 Die Ribonukleotid-Reduktase im Zellzyklus von *T. b. brucei*

Untersuchungen des Zellzyklus können nur mit synchronisierten Zellen durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den meisten Zellsystemen, können Bluttrypanosomen *in vitro* jedoch nicht synchronisiert werden. Aus diesem Grund wurde eine *in vitro*-Differenzierung der gedrungenen Blutform zur prozyklischen Insektenform induziert, die mit dem Durchlaufen eines synchronen Zellzyklus verbunden ist (Czichos et al., 1986; Ziegelbauer et al., 1990; Matthews & Gull 1994).

Gedrungene Bluttrypanosomen wurden 48 h bei 27°C in Gegenwart von Citrat und cis-Aconitat kultiviert, um eine Differenzierung zur prozyklischen Insektenform zu induzieren (s. 2.8.2). In Abb. 3.3 ist das Vorkommen der R1- und R2-Proteine während der Differenzierung gezeigt. Nach 12 h konnte eine Zunahme von R1-Protein beobachtet werden. Gleichzeitig wurde zu diesem Zeitpunkt, das in gedrungenen Bluttrypanosomen nicht vorhandene R2-Protein (vgl. Abb. 3.1), nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der R1- und R2-Proteine. Diese ging mit der Proliferation der Zellen und dem Verschwinden von VSG und CB1-gp einher. Prozyklin konnte 3 h

nach Differenzierungsbeginn nachgewiesen werden. Zwischen 6 h und 12 h war das Signal im Western-Blot am stärksten, wurde dann jedoch wieder schwächer. Nach 48 h hatte die Prozyklin-Expression das Niveau etablierter prozyklischer Trypanosomen erreicht (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 3.3).

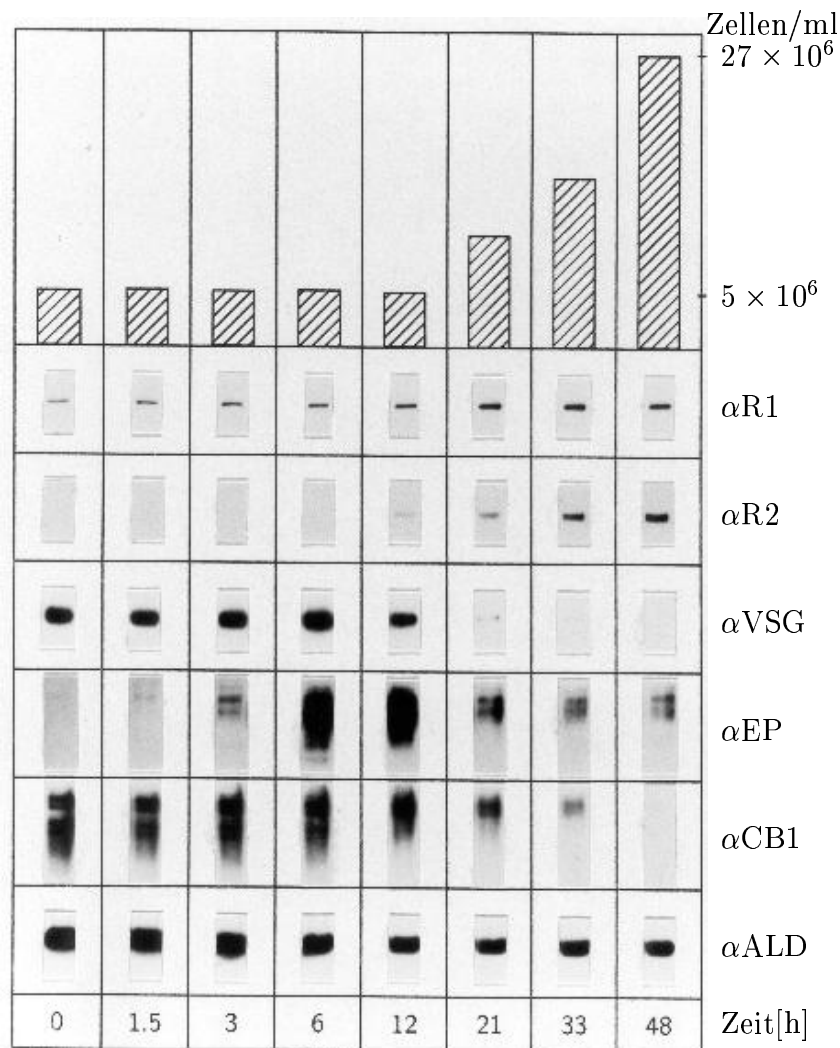


Abbildung 3.3: **Zelldichte und Vorkommen der R1- und R2-Untereinheit während der Differenzierung der gedrunenen Form zur prozyklischen Insektenform.** Gedrunene Blutformen der pleomorphen *T. b. brucei* Variante AnTat 1.1 wurden aus dem Blut infizierter Mäuse gewonnen (s. 2.9). Die Differenzierung der Trypanosomen wurde durch Kultivierung der Zellen mit 3 mM Citrat/cis-Aconitat bei 27°C induziert (s. 2.8.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zelldichte bestimmt (s. 2.8.5) und 3×10^7 Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Trypanosomen wurden lysiert (s. 2.10.1) und gleiche Proteinnengen, wie in Abb. 3.1 beschrieben, analysiert.

Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen wurde eine Zellzyklus-abhängige Regulation der Ribonukleotid-Reduktase untersucht. Dazu wurde das Vorkommen der R1- und R2-Proteine zwischen 10 h und 22 h nach Beginn der induzierten Differenzierung von gedrunenen Bluttrypanosomen zur prozyklischen Insektenform im Western Blot untersucht (Abb. 3.4). Im gleichen Zeitraum wurde die Synchronität des ersten Zellzyklus durch die Bestimmung des DNA-Gehalts der Parasiten mit der analytischen Durchflusszytometrie überprüft. Nach zehnstündiger Kultivierung der Trypanosomen bei 27°C konnte das R2-Protein nachgewiesen werden. Die Proteinmenge nahm nach weiteren 2 h deutlich zu, änderte sich aber danach nicht mehr signifikant, obwohl sich die Zellen nach 14 h und 20 h teilten. Dieses Ergebnis deutet somit auf keine Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Zellzyklus von *T. b. brucei* hin.

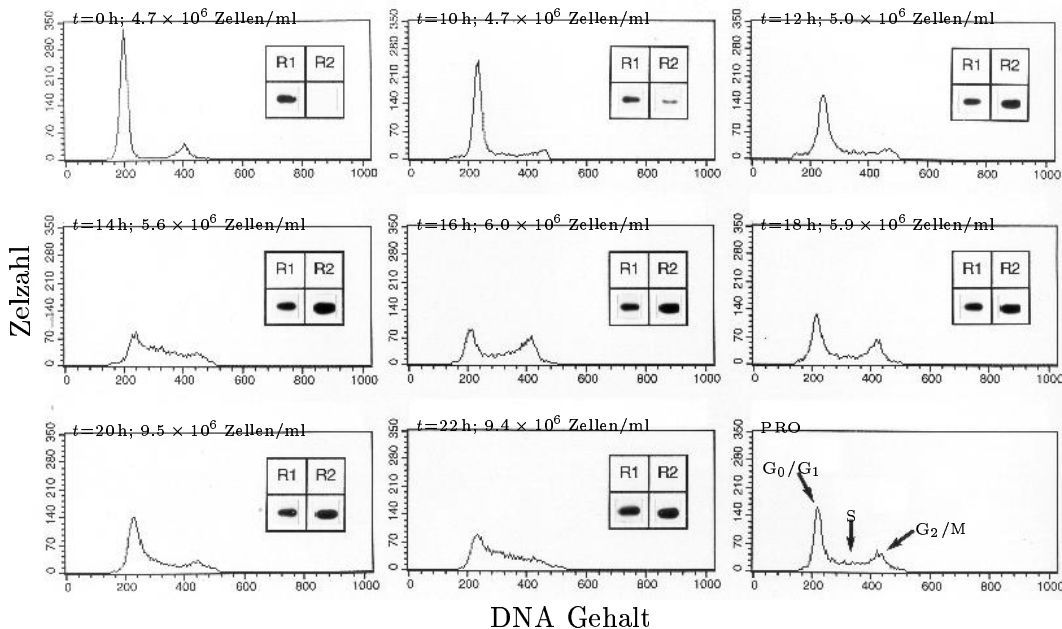


Abbildung 3.4: DNA-Gehalt und Vorkommen der R1- und R2-Untereinheit in differenzierenden Trypanosomen während des ersten synchronen Zellzyklus. Die Differenzierung gedrunener Blutformen des pleomorphen *T. b. brucei* Variante AnTat 1.1 wurde, wie in Abb. 3.3 beschrieben, induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zelldichte bestimmt (s. 2.8.5) und die Zellen gerettet. Ein Teil der Zellen wurde lysiert und im Western Blot mit Antikörpern gegen R1- und R2-Protein analysiert (vgl. Abb. 3.1). Die übrigen Trypanosomen wurden mit Ethanol fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt mittels analytischer Durchflusszytometrie bestimmt (s. 2.12). Die relative Propidiumjodid-Fluoreszenz, die zum DNA-Gehalt der Zellen direkt proportional ist, wurde gegen die Anzahl der Ereignisse pro Messkanal, die mit der Zellzahl äquivalent ist, aufgetragen. Jedes Histogramm zeigt die Daten von 10000 Ereignissen. Die Positionen von G_0/G_1 -, S- und G_2/M -Phasen sind zum Vergleich für asynchrone etablierte prozyklische Trypanosomen (PRO) gezeigt.

3.2 Untersuchungen zur Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf Sauerstoffverbrauch, DNA-Synthese und Superoxid-Dismutase-Aktivität von kulturadaptierten Bluttrypanosomen

Wie alle lebenden Organismen benötigen Bluttrypanosomen Eisen zum Wachstum. Als Eisenquelle nehmen die Parasiten eisenbeladenes Transferrin (Holotransferrin) aus dem Blut ihres Wirtes auf (Schell et al. 1991; Steverding, 1998). Die Bedeutung des Eisens für das Wachstum der Trypanosomen zeigt sich u. a. in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Deferoxamin. Dieser Eisenchelator inhibiert *in vitro* das Wachstum der Parasiten. Für Deferoxamin wurde ein ED₅₀-Wert von 2,5 μM bestimmt, während der Eisen-Deferoxamin-Komplex ungiftig ist (Scory, 1999). Trypanosomen zeigen bzgl. der Vitalität und der Proliferation eine zehnfach höhere Empfindlichkeit gegenüber Deferoxamin als Säugerzellen (Scory, 1999). Trotz der hohen Affinität des Chelators zu dreiwertigem Eisen, scheint Deferoxamin nicht in der Lage zu sein, Fe³⁺-Ionen aus Transferrin-Eisen-Komplexen zu binden (Scory, 1999). Die Wirkung des Chelators beruht vielleicht auf einer Inaktivierung eisenabhängiger Enzyme des trypanosomalen Stoffwechsels.

Bluttrypanosomen besitzen keine Cytochrome, benötigen aber Eisen für die katalytische Aktivität der Alternativen Oxidase (Fairlamb & Bowman, 1977b; Clarkson et al., 1989), der Ribonukleotid-Reduktase (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997) und der Superoxid-Dismutase (Le Trant et al., 1983).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Deferoxamin auf den Sauerstoffverbrauch, der Aufschluss über die Aktivität der Alternativen Oxidase gibt, auf die DNA-Synthese und auf die Ribonukleotid-Reduktase- und Superoxid-Dismutase-Aktivität von *T. b. brucei*-Blutformen untersucht. Eine hohe Zelldichte ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) und kurze Inkubationszeit (24 h) sicherten, dass die Trypanosomen während der Inkubation mit Deferoxamin (100 μM) nicht abstarben. Während der 24stündigen Inkubation mit Deferoxamin teilten sich die Zellen maximal einmal. Anschließend wurden die Trypanosomen durch Zentrifugation geerntet und für die verschiedenen Untersuchungen aufgearbeitet.

3.2.1 Wirkung von Deferoxamin auf den Sauerstoffverbrauch von *T. b. brucei* Bluttrypanosomen

Der Sauerstoffverbrauch der Bluttrypanosomen wurde polarographisch mit einer Clark-Elektrode bestimmt und gab somit indirekt Aufschluss über die Aktivität der parasitären Alternativen Oxidase (Abb. 3.5). Dieses Enzym spielt bei der

Reoxidation des während der Glykolyse entstehenden NADH eine wichtige Rolle (Fairlamb & Bowman, 1977b; Clarkson et al., 1989).

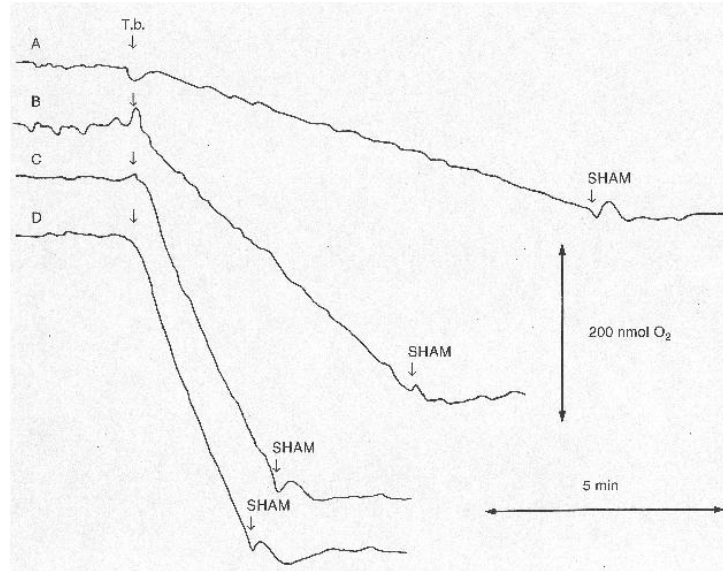


Abbildung 3.5: **Wirkung von Deferoxamin auf die Atmungsrate von *T. b. brucei*.** TC221 Bluttrypanosomen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 24 h unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit $100 \mu\text{M}$ Deferoxamin (A), 24 h in Baltz Medium komplett mit $100 \mu\text{M}$ Deferoxamin und weitere 2 h zusätzlich mit $100 \mu\text{M}$ Eisen-Ammonium-Citrat (B), 24 h in Baltz Medium komplett mit $100 \mu\text{M}$ Eisen-Deferoxamin (C) oder 24 h in Baltz Medium komplett mit der entsprechenden Menge ddH₂O (Spur D) inkubiert. Danach wurden die Trypanosomen geerntet und der Sauerstoffverbrauch bei 37°C mit einer Clark-Elektrode bestimmt (s. 2.14.1). Zum markierten Zeitpunkt („T. b.“) wurden $6,5 \times 10^7$ Zellen in die thermostatisierte Messzelle mit 2,4 ml Baltz Medium komplett injiziert. Der zweite Pfeil (SHAM) markiert die Zugabe von 1 mM Salicylhydroxamsäure (in DMSO; Endkonzentration: 1 % (v/v)) in die Messzelle. Die dargestellten Daten sind repräsentative Ergebnisse aus zwei Messungen zweier unabhängiger Experimente.

Die Atmung Deferoxamin-behandelter Parasiten (Abb. 3.5 A; $2,2 \pm 0,5$ nmol O₂/min/ 10^7 Zellen) entsprach nur 13 % des Sauerstoffverbrauchs der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.5 D; $17,1 \pm 1$ nmol O₂/min/ 10^7 Zellen), deren Atmungsrate mit den Ergebnissen von Helfert et al. (2001) vergleichbar ist. Der Sauerstoffverbrauch Eisen-Deferoxamin-behandelter Trypanosomen (Abb. 3.5 C; $15,3 \pm 0,8$ nmol O₂/min/ 10^7 Zellen) unterschied sich nicht signifikant von dem unbehandelten Parasiten. Eine anschließende zweistündige Inkubation von Deferoxamin-behandelten Trypanosomen, mit $100 \mu\text{M}$ Eisen-Ammonium-Citrat bewirkte eine partielle Wiederherstellung der Atmungsrate (Abb. 3.5 B; $6,5 \pm 0,9$ nmol

O_2 /min/ 10^7 Zellen). In allen Ansätzen wurde die Zellatmung durch Salicylhydroxamsäure (SHAM), einem spezifischen Inhibitor der Alternativen Oxidase (Clarkson et al., 1989), vollständig gehemmt.

Ob Deferoxamin in der Lage ist, enzymgebundenes Eisen zu komplexieren, wurde an zellfreien Lysaten (s. 2.14.1) von Bluttrypanosomen untersucht (Abb. 3.6).

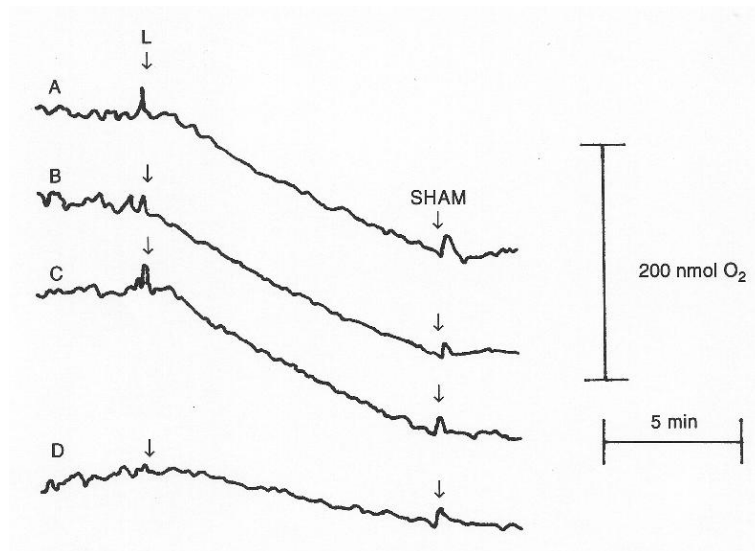


Abbildung 3.6: **Wirkung von Deferoxamin auf den sn-Glycerin-3-Phosphat-abhängigen Sauerstoffverbrauch zellfreier Lysate von *T. b. brucei*.** Lysate von TC221 Bluttrypanosomen (s. 2.14.1) wurden mit 1 mM Deferoxamin (A), mit 1 mM Eisen-Deferoxamin (B) und mit ddH₂O (C) auf Eis inkubiert. Nach 1 h wurde die Aktivität der Alternativen Oxidase mit 20 mM sn-Glycerin-3-Phosphat als Substrat bei 37°C mit einer Clark-Elektrode bestimmt (s. 2.14.1). Der erste Pfeil (L) markiert den Zeitpunkt, zu dem 200 μ l Lysat (entsprechend 1 mg Gesamtprotein) in die mit 2,4 ml Messpuffer gefüllte Kammer injiziert wurden. Der zweite Pfeil (SHAM) markiert die Zugabe von 1 mM Salicylhydroxamsäure (in DMSO; Endkonzentration: 1 % (v/v)). Zum Vergleich wurden Trypanosomen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) 24 h in Baltz Medium komplett mit 100 μ M Deferoxamin inkubiert, anschließend lysiert und der Sauerstoffverbrauch des Zelllysates bestimmt (D). Die dargestellten Daten sind repräsentative Ergebnisse aus zwei Messungen zweier unabhängiger Experimente.

Die Lysate wurden mit 1 mM Deferoxamin (Abb. 3.6 A), 1 mM Eisen-Deferoxamin (Abb. 3.6 B) bzw. mit ddH₂O (Abb. 3.6 C) 1 h auf Eis inkubiert. Der Sauerstoffverbrauch wurde polarographisch mit sn-Glycerin-3-Phosphat als Substrat gemessen (Clarkson et al., 1989). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Atmungsrate der Lysate beobachtet werden (Abb. 3.6; $9,4 \pm 0,9$ (A); $9,6 \pm 0,6$ (B); $9,9 \pm 0,6$ (C) nmol O_2 /min/mg Protein). Eine 24stündige Vorinkubation der Parasiten mit 100 μ M Deferoxamin zeigte hingegen eine Erniedrigung des Sau-

erstoffverbrauchs des zellfreien Lysates auf $4,1 \pm 0,3$ nmol O_2 /min/mg Protein (Abb. 3.6D).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Wirkung von Deferoxamin auf den Sauerstoffverbrauch von Bluttrypanosomen nicht auf einer Komplexierung des im Protein fixierten Eisens der Alternativen Oxidase beruht. Vermutlich erniedrigt der Chelator den intrazellulären Eisenbestand soweit, dass kein Eisen mehr für neu-synthetisiertes Apoenzym zur Verfügung steht.

3.2.2 Wirkung von Deferoxamin auf die DNA-Synthese und die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase von *T. b. brucei*

Die DNA-Synthese kulturadaptierter Bluttrypanosomen wurde durch den Einbau von [3H]Thymidin bestimmt (s. 2.15).

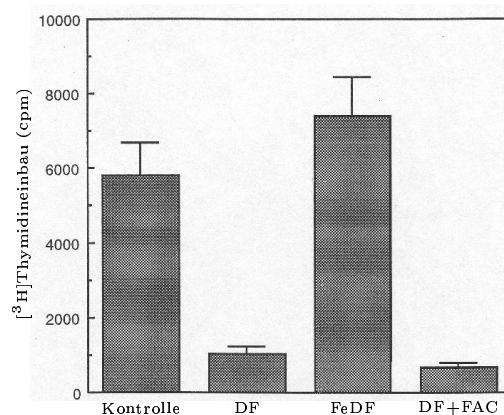


Abbildung 3.7: **Inhibierung der DNA-Synthese durch Deferoxamin in *T. b. brucei*.** TC221 Bluttrypanosomen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 24 h unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit ddH₂O (Kontrolle), 24 h in Baltz Medium komplett mit 100 μ M Deferoxamin (DF), 24 h in Baltz Medium komplett mit 100 μ M Eisen-Deferoxamin (FeDF) und 24 h in Baltz Medium komplett mit 100 μ M Deferoxamin und anschließend mit 100 μ M Eisen-Ammonium-Citrat weitere 2 h inkubiert (DF+FAC). Danach wurden die Trypanosomen geerntet und der Einbau von [3H]Thymidin in der TCA-präzipitierbaren Fraktion bestimmt (s. 2.15). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente, die jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Bei Deferoxamin-behandelten Trypanosomen betrug die DNA-Synthese nur 18 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 3.7). In Gegenwart von eisengesättigtem Chelator war die DNA-Synthese gegenüber der unbehandelten Kontrolle ca. 1,3fach erhöht (Abb. 3.7). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf überschüssigem

freiem Eisen im Inkubationsmedium, bedingt durch die Herstellung des Eisen-Deferoxamins (s. 2.5). Eine anschließende zweistündige Inkubation Deferoxamin-behandelter Trypanosomen mit 100 μM Eisen-Ammonium-Citrat hatte keine Zunahme, sondern eher eine weitere Abnahme der DNA-Synthese zur Folge (Abb. 3.7). Durch eine zweistündige Inkubation unbehandelter Parasiten mit 100 μM Eisen-Ammonium-Citrat wurde dagegen die DNA-Synthese ca. 1,2fach gegenüber der Kontrolle erhöht (Daten nicht gezeigt).

Da die Ribonukleotid-Reduktase ein eisenabhängiges trypanosomales Enzym ist, das für die DNA-Synthese unentbehrlich ist, wurde der Einfluss von Deferoxamin auf das gereinigte Enzym untersucht. Rekombinante *T. b. brucei* Ribonukleotid-Reduktase wurde mit 1 mM Deferoxamin, 1 mM Eisen-Deferoxamin und ddH₂O auf Eis inkubiert. Nach 1 h wurde die Enzymaktivität durch die zeitabhängige Reduktion von [³H]GDP zu [³H]dGDP bestimmt (s. 2.14.2). Es war kein signifikanter Unterschied in den Reduktionsraten festzustellen (Abb. 3.8). In Gegenwart des klassischen Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitors Hydroxyharnstoff (HU; 30 mM) wurde dagegen die Aktivität des Enzyms zu mehr als 90 % gehemmt (Abb. 3.8). Die Wirkung von Deferoxamin auf die DNA-Synthese beruht somit nicht auf einer Komplexierung enzymgebundenen Eisens der Ribonukleotid-Reduktase.

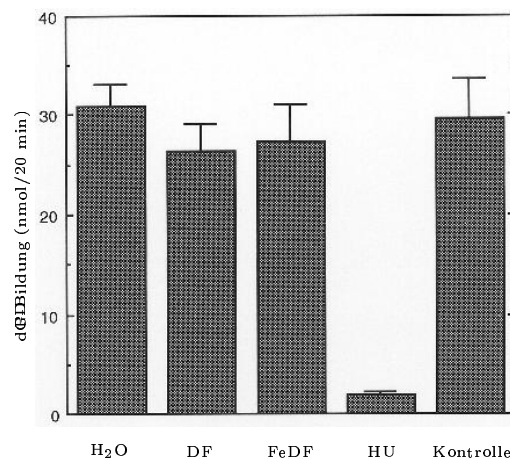


Abbildung 3.8: **Inkubation von *T. b. brucei* Ribonukleotid-Reduktase mit Deferoxamin.** Rekombinante *T. b. brucei* Ribonukleotid-Reduktase wurde mit ddH₂O (H₂O), 1 mM Deferoxamin (DF) und 1 mM Eisen-Deferoxamin (FeDF) auf Eis inkubiert. Nach 1 h wurde die Aktivität des Enzyms bestimmt (s. 2.14.2). Ebenfalls gezeigt sind die Aktivität des Enzyms in Gegenwart des klassischen Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitors Hydroxyharnstoff (HU) und die Aktivität einer unbehandelten Kontrolle (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

3.2.3 Wirkung von Deferoxamin auf die Aktivität der Superoxid-Dismutase von *T. b. brucei*

Während der Bildung des Tyrosylradikal-Kations der R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase entstehen Superoxidradikal-Anionen. Untersuchungen an *Escherichia coli* haben gezeigt, dass diese die Ribonukleotid-Reduktase irreversibel hemmen (Gaudu et al., 1996). Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Umwandlung zweier Superoxidradikal-Anionen in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff. Das Enzym ist somit essentiell für die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase.

Die Aktivität der eisenabhängigen Superoxid-Dismutase von Bluttrypanosomen wurde enzymatisch nach nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Gel untersucht (s. 2.14.3). Lysate Deferoxamin- und Eisen-Deferoxamin-behandelter bzw. unbehandelter Trypanosomen lieferten nach Färbung der Gele achromatische Banden gleicher Intensität (Abb. 3.9). Zugabe von 5 mM H₂O₂, einem Inhibitor eisenabhängiger Superoxid-Dismutasen, während des Färbeprozesses verhinderte die Entstehung achromatischer Banden (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen lässt sich somit kein Einfluss von Deferoxamin auf die Aktivität der Superoxid-Dismutase erkennen.

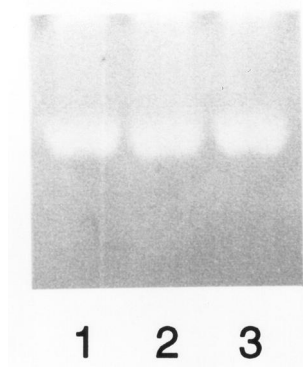


Abbildung 3.9: **Aktivität der Superoxid-Dismutase von *T. b. brucei* in Gegenwart von Deferoxamin.** TC221 Bluttrypanosomen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit zusätzlichem ddH₂O (1), Baltz Medium komplett mit 100 μ M Deferoxamin (2) und Baltz Medium komplett mit 100 μ M eisengesättigtem Deferoxamin (3) kultiviert. Nach 24 h wurden die Trypanosomen geerntet und lysiert. Die löslichen Fraktionen der Zelllysate wurden in einem nicht-denaturierenden 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und gefärbt (s. 2.14.3). Pro Gel-Tasche wurden 3×10^7 Zelläquivalente aufgegeben. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

3.3 Untersuchungen zur *in vitro*-Differenzierung von monomorphen, kulturadaptierten Bluttrypanosomen mit dem membranpermeablen cAMP-Derivat 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP

Der Differenzierungsprozess pleomorpher schlanker Bluttrypanosomen wird durch eine, von den Parasiten freigesetzte, niedermolekulare Verbindung, den sog. *stumpy-induction-factor* (SIF), induziert (Vassella et al. 1997). *In vitro* kann dieser Prozess durch die Inkubation pleomorpher Trypanosomen mit membranpermeablen cAMP-Derivaten nachgeahmt werden. Als besonders geeignet hat sich dabei 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP) erwiesen (Vassella et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit einer pCPTcAMP-vermittelten Differenzierung schlanker Bluttrypanosomen einer kulturadaptierten, monomorphen *T. b. brucei*-Zelllinie untersucht werden.

3.3.1 Wirkung von pCPTcAMP auf die Proliferation kulturadaptierter Bluttrypanosomen

Die Inkubation der monomorphen, kulturadaptierten *T. b. brucei*-Zelllinie TC221 mit verschiedenen pCPTcAMP-Konzentrationen (s. 2.8.6) hatte eine Wachstumshemmung der Parasiten zur Folge (Abb. 3.10). Die Wirkung von pCPTcAMP auf die Zellproliferation war dabei zeit- und dosisabhängig. Mit 1 mM pCPTcAMP behandelte Parasiten erreichten bei einer Zelldichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml die stationäre Wachstumsphase. Unbehandelte Trypanosomen wuchsen etwa 10mal höher.

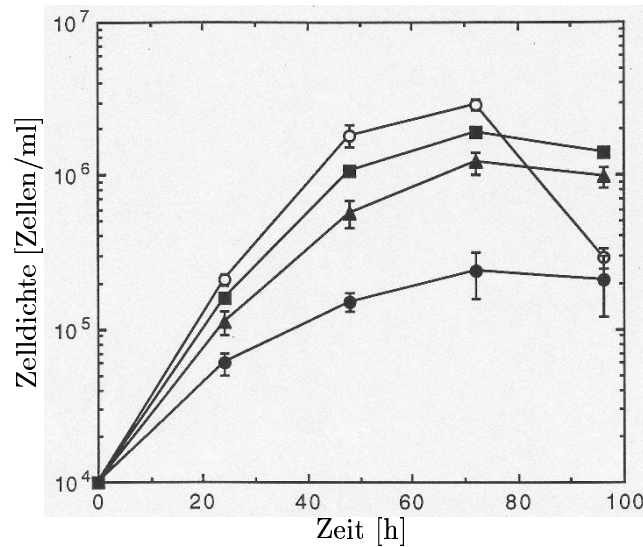


Abbildung 3.10: **Wirkung von pCPTcAMP auf die Proliferation kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^4 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit PBS (Kontrolle; weiße Kreise) oder in Baltz Medium komplett mit 0,1 mM (schwarze Quadrate), 0,5 mM (schwarze Dreiecke) oder 1 mM (schwarze Kreise) pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Anzahl lebender Zellen mit einem Neubauer-Hämozytometer bestimmt (s. 2.8.6). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente.

3.3.2 Morphologische und biochemische Veränderungen pCPTcAMP-behandelter kulturadaptierter Bluttrypanosomen

Die Wachstumsversuche (s. 3.3.1) ließen eine effektive Hemmung der Zellproliferation kulturadaptierter Bluttrypanosomen während der Inkubation mit 1 mM pCPTcAMP erkennen. Vielleicht beruht dies auf einer Differenzierung der Parasiten zur im Zellarrest befindlichen gedrungenen Blutform. Aus diesem Grund wurde die Veränderung der Morphologie, die Expression stadienspezifischer Proteine und die DNA-Synthese der Bluttrypanosomen während der pCPTcAMP-Inkubation untersucht.

Nach einer 72stündigen Inkubation mit 1 mM pCPTcAMP hatten sich die schlanken Trypanosomen zu einer gedrungenen Form transformiert (Abb. 3.11). Gleichzeitig war eine deutliche Veränderung der Mitochondrienaktivität zu erkennen, die sich in einer Zunahme der NADH-Diaphorase-Aktivität zeigte (Vickerman, 1965).

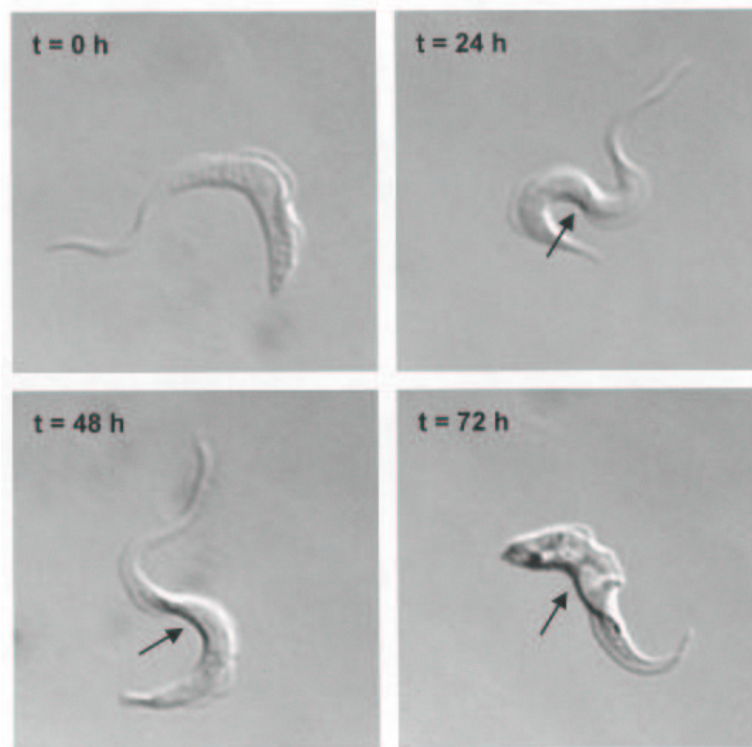


Abbildung 3.11: **Wirkung von pCPTcAMP auf die Morphologie und Diaphorase-Aktivität kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Trypanosomen geerntet und mit Glutaraldehyd fixiert. Die Inkubation der fixierten Zellen mit NADH und NBT diente zum Nachweis der NADH-Diaphorase-Aktivität (s. 2.14.4). Im aktiven Mitochondrium kommt es zu einer Reduktion von NBT zum dunkelblauen Formazan. Mit optischem Phasenkontrast unter Verwendung eines 100x-Ölimmersionsobjektivs wurden Morphologie und NADH-Diaphorase-Aktivität der Trypanosomen untersucht. Die Pfeile zeigen auf die Formazan-Präzipitate im Mitochondrium. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Verantwortlich für die NADH-Diaphorase-Aktivität ist vermutlich die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (Tyler et al., 1997). Im Western Blot wurde die Expression dieses mitochondrialen Enzyms während der pCPTcAMP-Inkubation der Bluttrypanosomen untersucht (Abb. 3.12). 48 h nach Inkubationsbeginn hatte die Proteinmenge deutlich zugenommen.

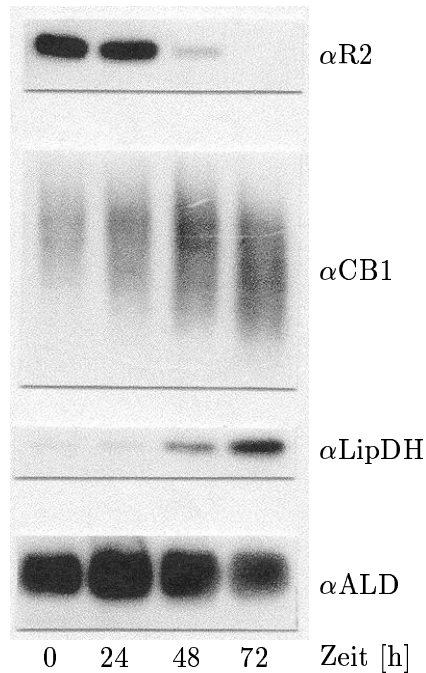


Abbildung 3.12: **Expression stadienspezifischer Proteine während der pCPTcAMP-Inkubation kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Trypanosomen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen (vgl. 3.1.1; für den Nachweis von LipDH wurden $3 \mu\text{g}$ Gesamtprotein verwendet) mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.10). Im Western Blot wurden die Proteine mit Antikörpern gegen R2 ($\alpha R2$; 1:5000), CB1-gp ($\alpha CB1$; 1:3000) und Dihydroliponamid-Dehydrogenase ($\alpha LipDH$; 1:25) analysiert. Die Antikörper gegen LipDH wurde vor der Verwendung affinitätsgereinigt (s. 2.11.2). Eine Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Aldolase (αALD ; 1:2500) wurde zum Nachweis, dass stets gleiche Proteinmengen im SDS-Gel aufgetrennt wurden, durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Um eine quantitative Aussage machen zu können, wurde die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität enzymatisch bestimmt (Abb. 3.13). Wie erwartet, war die Aktivitätsmessung mit dem Ergebnis im Western Blot vergleichbar. Nach einer 72stündigen pCPTcAMP-Inkubation der Bluttrypanosomen war die Aktivität des Enzyms gegenüber der Kontrolle ca. 4,4fach erhöht und erreichte etwa 85 % der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität etablierter prozyklischer Trypanosomen der pleomorphen *T. b. brucei*-Variante AnTat 1.1.

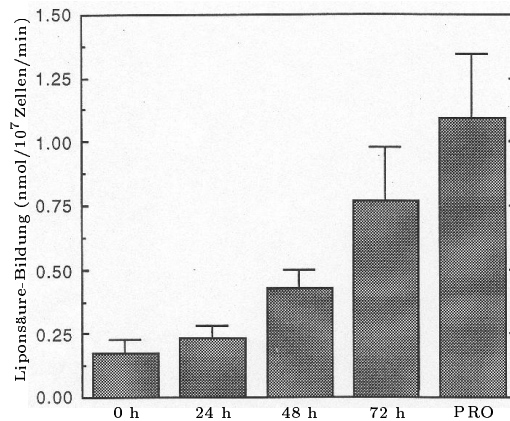


Abbildung 3.13: **Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase während der pCPTcAMP-Inkubation kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Trypanosomen geerntet und lysiert. Die Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase wurde durch die Oxidation von Dihydroliponsäure zur Liponsäure untersucht. Das bei der Reaktion entstandene NADH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt (s. 2.14.5). Zum Vergleich ist die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität etablierter prozyklischer Trypanosomen (PRO) gezeigt. Es wurden drei Experimente durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Einen weiteren Hinweis auf die Differenzierung von pCPTcAMP-behandelten Trypanosomen, lieferten Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (Abb. 3.12). Wie schon gezeigt wurde (s. 3.1.1), haben gedrungene, sich im Zellarrest befindliche Bluttrypanosomen der pleomorphen *T. b. brucei*-Variante AnTat 1.1 kein R2-Protein. Bei pCPTcAMP-behandelten Trypanosomen konnte eine deutliche Abnahme des R2-Proteins bereits 48 h nach Inkubationsbeginn beobachtet werden. Nach 72 h war das Protein nicht mehr nachweisbar.

Um eine Aussage über die DNA-Synthese pCPTcAMP-behandelter Bluttrypanosomen zu erhalten, wurde der [³H]Thymidineinbau der Parasiten bestimmt (Abb. 3.14). Schon nach 24 h betrug die DNA-Synthese vorinkubierter Trypanosomen gegenüber der Kontrolle 40 %, nach 72 h sogar nur noch 10 %, was auf einen Zellarrest der Trypanosomen schließen lässt.

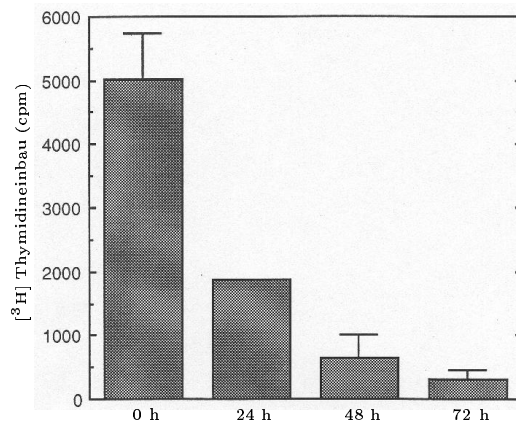


Abbildung 3.14: **DNA-Synthese während der pCPTcAMP-Inkubation kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Trypanosomen geerntet und der Einbau von [³H]Thymidin in der TCA-präzipitierbaren Fraktion bestimmt (s. 2.15). Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente, die jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Ergänzende Informationen lieferte die Bestimmung der Zellzyklus-Phasen unbehandelter und 72 h mit pCPTcAMP inkubierter Bluttrypanosomen mittels analytischer Durchflusszytometrie (Abb. 3.15). Durch die Inkubation erhöhte sich die Zahl der Zellen in der G_0/G_1 -Phase von 52 % auf 70 %, während sie sich in der S-Phase von 18 % auf 6 % verringerte.

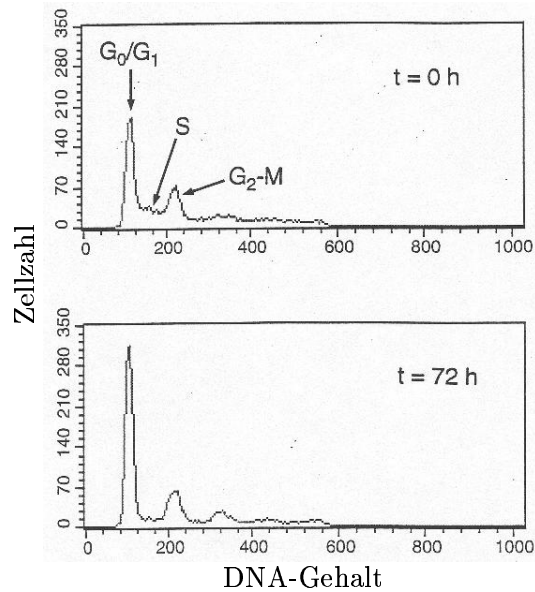


Abbildung 3.15: **DNA-Gehalt während der pCPTcAMP-Inkubation kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen.** TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Trypanosomen geerntet, mit Ethanol fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde mittels analytischer Durchflusszytometrie bestimmt (s. 2.12). Es sind G_0/G_1 , S und G_2/M -Phasen gezeigt. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Schließlich wurde noch die Expression von CB1-gp (vgl. 3.1.1), einem weiteren stadienspezifischen Protein, im Western Blot untersucht (Abb. 3.12). pCPTcAMP-behandelte Trypanosomen ließen 48 h nach Inkubationsbeginn einen deutlichen Anstieg der Proteinmenge erkennen.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen, dass eine pCPTcAMP-induzierte Differenzierung monomorpher, schlanker Bluttrypanosomen zur gedrungenen, im Zellarrest befindlichen, Blutform möglich ist.

3.3.3 Induzierte Differenzierung pCPTcAMP-behandelter, kulturadaptierter Bluttrypanosomen zur prozyklischen Insektenform

In vitro kann eine Differenzierung gedrungenener Bluttrypanosomen zur prozyklischen Insektenform induziert werden (s. 3.1). Es sollte untersucht werden, ob eine solche Transformation auch bei pCPTcAMP-behandelten Trypanosomen möglich ist. Dazu wurden kulturadaptierte Bluttrypanosomen 48 h bei 37°C mit

1 mM pCPTcAMP inkubiert und anschließend in Gegenwart von Citrat und cis-Aconitat über einen Zeitraum von 96 h bei 27°C kultiviert. Alle 24 h wurden Proben aus der Kultur genommen und die Expression stadienspezifischer Proteine im Western Blot untersucht (Abb. 3.16).

Bereits nach einer 24stündigen Kultivierung bei 27°C hatten die pCPTcAMP-behandelten Trypanosomen ihr Oberflächenglykoprotein geändert. Das variable Oberflächenglykoprotein (VSG) der Bluttrypanosomen war nahezu verschwunden, während das Oberflächenglykoprotein Prozyklin (EP) der Insektenform maximal exprimiert wurde. Die Differenzierung gedrungener Bluttrypanosomen ist, wie schon gezeigt (s. 3.1) durch die erneute Bildung der R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase gekennzeichnet. Im Western Blot konnte die Expression von R2-Protein bei pCPTcAMP-behandelten Trypanosomen nach der 24stündigen Kultivierung bei 27°C nachgewiesen werden.

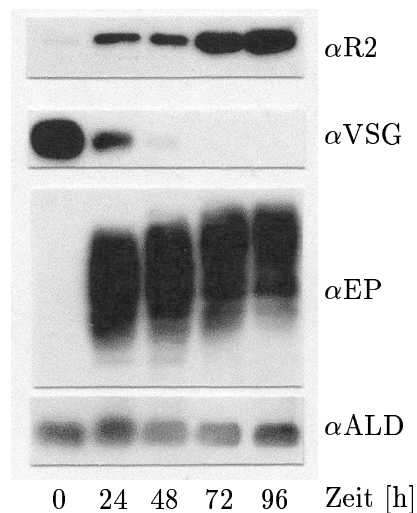


Abbildung 3.16: Expression stadienspezifischer Proteine während der *in vitro*-Differenzierung pCPTcAMP-behandelter kulturadaptierter *T. brucei*-Blutformen. TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden 48 h unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett mit 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Danach wurden die Parasiten geerntet und 5×10^6 Zellen/ml in SDM-79 Medium komplett mit 3 mM Citrat/cis-Aconitat bei 27°C weiterkultiviert (s. 2.8.2). Zu den angegebenen Zeiten wurden die Trypanosomen geerntet, lysiert und gleiche Proteinmengen (vgl. 3.1.1) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Proteine mit Antikörpern gegen R2 (α R2; 1:5000), VSG TC221 (α VSG; 1:1000) und Prozyklin (α EP; 1:2000) analysiert. Antikörper gegen Aldolase dienten als Nachweis, dass gleiche Proteinmengen aufgetrennt wurden. Die gezeigten Daten sind repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Gedrungene Bluttrypanosomen befinden sich in einem Zellarrest. Ihre Differenzierung zur prozyklischen Insektenform ist durch den Wiederbeginn der Zell-

proliferation gekennzeichnet (Ziegelbauer et al., 1990; Vassella et al., 1997). Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle konnten sich pCPTcAMP-behandelte Trypanosomen während der Kultivierung bei 27°C in Gegenwart von Citrat und cis-Aconitat vermehren (Abb. 3.17). Nach einer Ruhezeit von 24 h teilten sich die Zellen mit einer Generationszeit von 36 h. Im Vergleich dazu verzwei- oder verdreifachten sich etablierte prozyklische Trypanosomen innerhalb von 24 h (s. 3.1.2; Ziegelbauer et al., 1990; Vassella et al., 1997). Nach einer einwöchigen Kultivierung der pCPTcAMP-behandelten Parasiten bei 27°C begannen jedoch die Zellen abzusterben, ohne dass sich eine prozyklische Trypanosomenkultur etablierte (Daten nicht gezeigt).

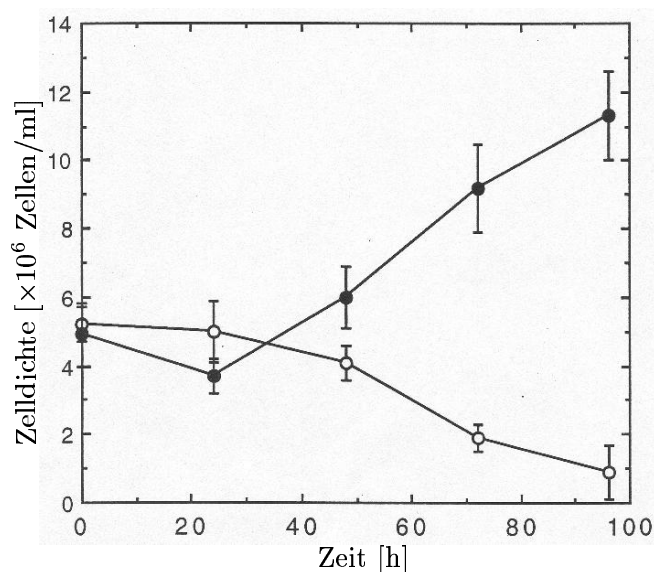


Abbildung 3.17: Zellproliferation während der *in vitro*-Differenzierung pCPTcAMP-behandelter kulturadaptierter *T. b. brucei*-Blutformen in prozyklische Insektenformen. TC221 Bluttrypanosomen (10^5 Zellen/ml) wurden 48 h unter den üblichen Kulturbedingungen (s. 2.8.1) in Baltz Medium komplett ohne (weiße Kreise) und mit (schwarze Kreise) 1 mM pCPTcAMP inkubiert. Danach wurden die Parasiten geerntet und 5×10^6 Zellen/ml in SDM-79 Medium komplett mit 3 mM Citrat/cis-Aconitat bei 27°C weiterkultiviert (s. 2.8.2). Zu den angegebenen Zeiten wurden die lebenden Zellen mit einem Neubauer-Hämozytometer gezählt (s. 2.8.5). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten.

Die Untersuchungen bestätigen die in 3.3.2 erhaltenen Ergebnisse. Kulturadaptierte Bluttrypanosomen differenzieren sich durch die Inkubation mit dem membranpermeablen cAMP-Derivat pCPTcAMP zur gedrungenen Blutform. Die Trypanosomen sind durch eine Veränderung der Kulturbedingungen in der Lage sich zur prozyklischen Insektenform weiterzuentwickeln.

Kapitel 4

Diskussion

Die Arbeit hatte drei Untersuchungs-Schwerpunkte:

1. Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von *T. b. brucei*.

Dieses eisenabhängige Enzym katalysiert die Bildung von Desoxyribonukleotiden und ist daher unentbehrlich für die DNA-Synthese des Parasiten.

2. Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf essentielle eisenabhängige Enzyme in Bluttrypanosomen.

Deferoxamin besitzt eine trypanozide Wirkung, deren Ursache bisher nicht genau bekannt ist (Scory, 1999)

3. Wirkung des membranpermeablen cAMP-Derivats 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP) auf monomorphe, kulturadaptierte Bluttrypanosomen.

Bislang wurde nicht untersucht, ob pCPTcAMP, ähnlich wie bei pleomorphen *T. b. brucei*-Stämmen (Vassella et al., 1997), auch bei kulturadaptierten, monomorphen Bluttrypanosomen eine Differenzierung induziert.

4.1 Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Lebens- und Zellzyklus von *T. b. brucei*

Die Ribonukleotid-Reduktase spielt bei der DNA-Synthese eine zentrale Rolle, da dieses Enzym die Herstellung von Desoxyribonukleotiden aus Ribonukleotiden katalysiert. Wie die meisten Eukaryonten besitzen Trypanosomen eine Klasse I-Ribonukleotid-Reduktase, die aus zwei homodimeren Untereinheiten (R1 und R2) aufgebaut ist (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997). Für die Aktivität des

Enzyms ist eine Interaktion der R1- und R2-Untereinheit notwendig. Eine Hemmung der trypanosomalen Ribonukleotid-Reduktase hätte eine Unterbrechung der Zellteilung zur Folge. Somit stellt dieses Enzym ein attraktives Ziel für eine Chemotherapie dar.

Antiproliferierende Wirkung von Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitoren konnte bereits bei Tumoren (Robins et al., 1995), Viren (Liuzzi et al., 1994) und *Plasmodium falciparum* (Chakrabarti et al., 1993) nachgewiesen werden. Prinzipiell können mehrere Angriffspunkte unterschieden werden: Antisense-Oligonukleotide, die die Expression der Ribonukleotid-Reduktase unterbinden, Peptide oder Peptidmimetika, die die Bildung des aktiven Ribonukleotid-Reduktase-Komplexes verhindern, Substratanaloga, die die katalytische Aktivität des Enzyms inhibieren und Verbindungen, die das essentielle Tyrosylradikal reduzieren. Chakrabarti et al. (1993) konnten zeigen, dass Antisense-Oligonukleotide schon in submikromolekularen Konzentrationen gegen den Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum* wirksam sind. Vielversprechende Ergebnisse wurden auch mit Peptidmimetika, die das carboxyterminale Ende der R2-Untereinheit von *Herpes simplex* simulieren, erzielt (Liuzzi et al., 1994). Die Inkubation von Säugerzellen mit dem Antitumormittel Hydroxyharnstoff (HU) führt zu einer Zerstörung des Tyrosylradikals der R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase, die eine Destabilisierung des Eisenzentrums der Untereinheit nach sich zieht (McClarty et al., 1990).

Im Rahmen der Arbeit wurde die Expression der Ribonukleotid-Reduktase in den verschiedenen Lebensstadien von *T. b. brucei* untersucht. Mittels Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die R1-Untereinheit sowohl in der schlanken als auch in der gedrungenen Blutform sowie in der prozyklischen Insektenform, wenn auch in geringfügig unterschiedlichen Mengen, vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist die R2-Untereinheit in der gedrungenen, sich im Zellarrest befindlichen, Blutform nicht nachweisbar (s. 3.1.1). Mittels RT-PCR und Southern Blot-Hybridisierung konnte die R1- und R2-mRNA in den drei Entwicklungsstadien in etwa gleicher Menge nachgewiesen werden (s. 3.1.1). Dieses Ergebnis bestätigt frühere Northern Blot-Analysen, die zeigten, dass die R2-mRNA von *T. b. brucei* in den drei Lebensstadien in annähernd gleicher Menge vorhanden ist (Dormeyer et al., 1997). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Ribonukleotid-Reduktase in *T. b. brucei* durch eine posttranskriptionale Regulation der R2-Untereinheit kontrolliert wird.

Eine Regulation der Ribonukleotid-Reduktase ist ebenfalls bei der Enddifferenzierung von Säugerzellen bekannt. Im Vergleich zu den Trypanosomen scheinen hier beide Untereinheiten der Ribonukleotid-Reduktase reguliert zu werden (Mann et al., 1988; Chen et al., 1998).

Die Expression der Ribonukleotid-Reduktase im Zellzyklus von *T. b. brucei* wurden ausgehend von der gedrungenen Blutform untersucht. Eine Synchronisation

von Trypanosomen ist bisher nicht möglich. Daher wurde ausgenutzt, dass die *in vitro*-Differenzierung der gedrungenen Blutform zur prozyklischen Insektenform mit dem synchronen Durchlaufen eines Zellzyklus verbunden ist (Czichos et al., 1986; Ziegelbauer et al., 1990; Matthew & Gull, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung nach 10 bis 12 h die R2-Untereinheit wieder gebildet wird (s. 3.1.2). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Beobachtungen, die eine DNA-Synthese von Trypanosomen 6 bis 12 h nach Differenzierungsbeginn mittels Thymidineinbau nachgewiesen hatten (Pays et al., 1993).

Bei Säugerzellen, Hefezellen und Malariaparasiten findet eine transkriptionale Regulation der Ribonukleotid-Reduktase-Synthese innerhalb des Zellzyklus statt (Björklund et al., 1990; Fernandez-Sarabia & Fantès, 1990; Elledge et al., 1992; Chakrabarti et al., 1993; Rubin et al., 1993). Säugerzellen weisen eine S-Phase-spezifische Regulation der Ribonukleotid-Reduktase auf (Björklund et al., 1990). Aufgrund der langen Halbwertszeit von R1-Protein (> 20 h; Mann et al., 1988) bleibt die R1-Proteinmenge während des gesamten Zellzyklus konstant. Die R2-Proteinmenge hingegen ist während der S-Phase des Zellzyklus am höchsten (Eriksson et al., 1984). Die Ribonukleotid-Reduktase-Aktivität von Hefezellen ist zu Beginn der S-Phase des Zellzyklus am höchsten (Lowdon & Vitols, 1973). Allerdings wird im Vergleich zu Säugerzellen die Enzymaktivität durch die transkriptionale Regulation von R1-Protein kontrolliert (Elledge et al., 1992). *Plasmodium falciparum* besitzt ebenfalls eine S-Phase-abhängige Regulation der Ribonukleotid-Reduktase (Chakrabarti et al., 1993), die jedoch noch eingehender untersucht werden muss.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Zellzyklus-abhängige Regulation der R1- und R2-Untereinheit bei der Differenzierung gedrungener Bluttrypanosomen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann jedoch nicht verallgemeinert werden, da es bisher nicht möglich ist, kulturadaptierte Blutform- oder prozyklische Insektenform-Trypanosomen zu synchronisieren.

Trypanosomen unterscheiden sich in der Genanordnung im Genom, der Transkription und der RNA-Prozessierung stark von anderen eukaryontischen Zellen. Die trypanosomalen proteinkodierenden Gene sind häufig in zwei oder mehr Kopien hintereinander angeordnet. Ähnlich wie in Bakterien erfolgt die Transkription polyzistronisch (Clayton, 1992; Pays, 1993). Dies könnte eine Erklärung für die posttranskriptionale Regulation der meisten trypanosomalen Proteine sein (Vanhamme & Pays, 1995; Graham, 1995; Clayton & Hotz, 1996). Ausserdem scheinen regulatorische Sequenzen in der 3'-nichtkodierenden Region der mRNA für die Regulation der trypanosomalen Proteine verantwortlich zu sein (Hug et al., 1993; Berberof et al., 1995; Hotz et al., 1995). Ob die Regulation der Ribonukleotid-Reduktase ebenfalls auf solche regulatorischen Sequenzen zurückzuführen ist, muss noch untersucht werden.

4.2 Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf kulturadaptierte Bluttrypanosomen

Bluttrypanosomen haben keine Cytochrome und dementsprechend einen geringen Eisenbedarf, den sie durch die Aufnahme von Wirtstransferrin decken (Schell et al., 1991; Steverding, 1998). Die Parasiten benötigen das Eisen für die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase (Dormeyer et al., 1997; Hofer et al., 1997), der Alternativen Oxidase (Fairlamb & Bowman, 1977b; Clarkson et al., 1989) und der Superoxid-Dismutase (Le Trant et al., 1983). Diese Enzyme spielen eine bedeutende Rolle bei der DNA-Synthese, der ATP-Gewinnung und dem oxidativen Stress. Eisenchelatoren könnten somit interessant für die Entwicklung neuer Medikamente gegen die afrikanische Schlafkrankheit sein. Über die Vitalfunktion der Aconitase (Overath et al., 1986; Saas et al., 2000), einem weiteren eisenabhängigen Enzym von *T. brucei*, wird zurzeit noch diskutiert.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Wirkung des Eisenchelators Deferoxamin auf die Ribonukleotid-Reduktase, die Alternative Oxidase und die Superoxid-Dismutase von *T. b. brucei* untersucht. Trypanosomen weisen eine etwa zehnmal höhere Sensitivität gegenüber Deferoxamin als Säugerzellen auf (Scory, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Deferoxamin bei Bluttrypanosomen eine Abnahme der DNA-Synthese (s. 3.2.2) und eine Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs hervorruft (s. 3.2.1). Die Superoxid-Dismutase-Aktivität der Trypanosomen wurde durch den Eisenchelator nicht beeinflusst (s. 3.2.3). Der reduzierte Sauerstoffverbrauch Deferoxamin-behandelter Trypanosomen ist wahrscheinlich auf die verminderte Aktivität der mitochondrialen Glycerin-3-Phosphat-Oxidase zurückzuführen. Sie besteht aus einem Flavoprotein, der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und einer Alternativen Oxidase, der trypanosomalen Alternativen Oxidase. Die Glycerin-3-Phosphat Oxidase ist für die Reoxidation des während der Glykolyse gebildeten NADH verantwortlich (Fairlamb & Bowman, 1977b; Clarkson et al., 1989). Die Behandlung von Bluttrypanosomen mit SHAM, einem Inhibitor der Alternativen Oxidase, und die Reduzierung der mRNA des Enzyms mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik führt zu einer Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs und zur Wachstumshemmung der Parasiten (Helfert et al., 2001). Dies hebt die Bedeutung der Alternativen Oxidase für die Trypanosomen hervor.

Es konnte gezeigt werden, dass in Trypanosomenlysaten Deferoxamin den Sauerstoffverbrauch nicht hemmt (s. 3.2.1). Der Chelator scheint somit nicht in der Lage zu sein, direkt das Eisen der Alternativen Oxidase zu komplexieren. Vielmehr legen die Untersuchungen den Schluss nahe, dass die Wirkung von Deferoxamin auf einer Reduzierung des intrazellulären Eisenbestands beruht und somit nicht genügend Eisen für neu-synthetisiertes Apoenzym zur Verfügung steht. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass der Einfluss des Deferoxamins auf Bluttrypanosomen durch eine zweistündige Inkubation mit Fe^{3+} -Ionen teilweise

aufzuheben ist (s. 3.2.1).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung von Deferoxamin auf die DNA-Synthese von Bluttrypanosomen auch auf einer verminderten Aktivität der parasitären Ribonukleotid-Reduktase beruht. Dies hätte eine verminderte Synthese von Desoxyribonukleotiden zur Folge. Der wahrscheinlichste Wirkmechanismus des Eisenchelators wäre, wie schon im Fall der Alternativen Oxidase, dass durch die Depletierung des intrazellulären Eisens nicht mehr genügend Eisen für neu-synthetisiertes R2-Apoprotein zur Verfügung steht. Eine solche indirekte Wirkung von Deferoxamin wird auch bei der Ribonukleotid-Reduktase in Säugerzellen vermutet (Nyholm et al., 1993; Cooper et al., 1996).

Eine zweistündige Inkubation mit Fe^{3+} -Ionen erhöhte die DNA-Synthese Deferoxamin behandelter Trypanosomen nicht (s. 3.2.2). Eine Erklärung dafür könnten neuere Untersuchungen mit humanen Leukämiezellen (HL-60-Zellen) liefern. So wurde gezeigt, dass Deferoxamin bei diesen Zellen einen Zellzyklus-Arrest in der S-Phase induziert und somit eine verringerte DNA-Synthese nicht ausschließlich auf eine Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase zurückzuführen sein muss (Gazitt et al., 2001).

Die unterschiedliche Wirkung von Deferoxamin auf die untersuchten eisenabhängigen Enzyme der Trypanosomen könnte auf deren Halbwertszeiten zurückzuführen. Bei Säugerzellen beträgt die Halbwertszeit des R2-Protein 3-4 h (Eriksson et al., 1984), während sie bei Mn- und Cu/Zn-Superoxid-Dismutasen von 12 h bis weit über 100 h reicht (Hass & Massaro, 1987; Berkovich et al., 1996). Für die trypanosomale R2-Untereinheit kann ebenfalls eine kurze Halbwertszeit angenommen werden, da während der *in vivo*-Differenzierung der schlanken zur gedrungenen Blutform das R2-Protein innerhalb von 48 h fast vollständig verschwindet (s. 3.1.1). Eine vergleichbare Beobachtung wird bei der pCPTcAMP-vermittelten Differenzierung kulturadaptierter Bluttrypanosomen gemacht (vgl. Abb. 3.12).

Im Gegensatz zur trypanoziden Wirkung auf Bluttrypanosomen in der Zellkultur, zeigte Deferoxamin nur einen geringen Effekt auf den Verlauf der Parasitämie von Trypanosomen-infizierten Mäusen (Scory & Steverding, persönliche Mitteilung). Der Grund dafür ist wahrscheinlich die sehr kurze Halbwertszeit von Deferoxamin *in vivo*. Im Blut des Menschen hat Deferoxamin eine Halbwertszeit von 5-10 min (Kontoghiorghes, 1995).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Eisenstoffwechsel von Trypanosomen einen interessanten Angriffspunkt für neue Chemotherapeutika bietet. Zukünftige Forschung sollte sich auf die Entwicklung von gut verträglichen Eisenchelatoren mit längeren biologischen Halbwertszeiten konzentrieren.

4.3 *In vitro*-Differenzierung kulturadaptierter, schlanker Bluttrypanosomen zur gedrunge- nen Form

Durch die Differenzierung schlanker zu gedrunge-
nen Bluttrypanosomen wird die Populationsgröße des Parasiten im Säugetierwirt reguliert (Black et al., 1985). Dieser Transformationsprozess ist abhängig von der Parasitendichte (Reuner et al., 1997) und steht unter dem Einfluss eines von den Trypanosomen selbst erzeugten, cAMP-vermittelten Signalstoffs, dem sog. *stumpy-induction-factor* (SIF) (Vassella et al., 1997). Monomorphe *T. brucei*-Stämme haben die Fähigkeit sich zu differenzieren verloren und wachsen deshalb in kurzer Zeit zu hohen Zelldichten heran. Wahrscheinlich ist dies in einem Defekt des SIF-Signalwegs begründet (Vassella et al., 1997). Unterstützt wird diese Vermutung durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

Die Inkubation monomorpher, kulturadaptierter Bluttrypanosomen mit dem membranpermeablen und gegenüber Phosphodiesterasen stabilen cAMP-Derivat 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP) ermöglichte die Differenzierung zur gedrunge-
nen Form (s. 3.3.2). Diese war in der Lage sich zur prozyklischen Insektenform zu differenzieren (s. 3.3.3). Im Vergleich zu pleomorphen Trypanosomenstämmen (Vassella et al., 1997) dauerte die Differenzierung pCPTcAMP-behandelter, monomorpher schlanker zu gedrunge-
nen Trypanosomen 48-72 h statt 12 h. Ausserdem wurde eine höhere pCPTcAMP-Konzentration benötigt (1 mM gegenüber 0,25 mM).

Neben pCPTcAMP können auch andere Verbindungen eine Differenzierung monomorpher Bluttrypanosomen induzieren. So lieferte eine *in vivo*- und *in vitro*-Behandlung schlanker Bluttrypanosomen mit DFMO (DL- α -Difluormethylornithin) (Giffin et al., 1986), einem seit 1990 zugelassenen Medikament zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit, oder mit dem Methylierungssagenz 1,2-bis(Methylsulfonyl)-1-methylhydrazin (Penketh et al., 1991) gedrunge-
ne Trypanosomen, die sich zur prozyklischen Insektenform differenzieren konnten. Beide Substanzen bewirkten einen Zellzyklus-Arrest der Parasiten. DFMO ist ein spezifischer, irreversibler Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase und blockiert die trypanosomale Polyamin-Synthese (Giffin et al., 1986), während 1,2-bis(Methylsulfonyl)-1-methylhydrazin die Entstehung mehrkerniger Zellen (Penketh et al., 1991) begünstigt.

Die Wirkung von pCPTcAMP hingegen scheint auf einem physiologischen Prozess zu beruhen (Vassella et al., 1997). Während der Differenzierung pCPTcAMP-behandelter schlanker zu gedrunge-
nen Bluttrypanosomen wurde die DNA-Synthese schon 24 h vor dem Verschwinden der R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase und der Expression der Liponamid-Dehydrogenase deutlich reduziert

(s. 3.3.2). Dieses Ergebnis bestätigt die von Vassella et al. (1997) vorgeschlagene physiologische Wirkung von pCPTcAMP auf die Trypanosomen. Obwohl sich die pCPTcAMP-behandelten Bluttrypanosomen zur prozyklischen Insektenform differenzieren konnten, war es nicht möglich die Kulturen zu etablieren (s. 3.3.3). Eine vergleichbare Beobachtung wurde mit der kulturadaptierten *T. b. brucei*-MITat 1.4 (117) Blutform, die sich zur prozyklischen Insektenform differenzieren ließ, gemacht (Mutomba & Wang, 1995). Allerdings benötigten die MITat 1.4 Bluttrypanosomen für die Differenzierung zur prozyklischen Form 96 h, während die mit pCPTcAMP-behandelten Bluttrypanosomen dafür nur 48-72 h benötigten, was der üblichen Differenzierungszeit entspricht (Ziegelbauer et al., 1990; vgl. 3.1.2).

Die pCPTcAMP-Inkubation kulturadaptierter, monomorpher Bluttrypanosomen bietet eine gute Möglichkeit, die Differenzierung schlanker zu gedrungenen Trypanosomen zu untersuchen. Gegenüber pleomorphen Trypanosomen-Stämmen haben monomorphe Parasiten den Vorteil, dass sie leicht genetisch manipulierbar sind und aufgrund ihrer Vermehrung in Flüssigkultur in sehr großer Anzahl gewonnen werden können.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen, die zu einem besseren Verständnis der Desoxyribonukleotid-Synthese, des Eisenstoffwechsels und der Differenzierung von Trypanosomen beitragen sollten. Aus diesem Grund umfasste die Arbeit drei Untersuchungsschwerpunkte.

Die Ribonukleotid-Reduktase katalysiert die Umsetzung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden und spielt somit eine wichtige Rolle bei der DNA-Synthese. Mit immunologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die R1-Untereinheit des Enzyms in der schlanken und gedrunenen Blutform, sowie in der prozyklischen Insektenform vorhanden ist. Im Gegensatz dazu kommt die R2-Untereinheit nur in der proliferierenden schlanken Blutform und der prozyklischen Insektenform vor, nicht jedoch bei den im Zellarrest befindlichen gedrunenen Bluttrypanosomen. Mit molekularbiologischen Methoden konnte die mRNA der R1- und R2-Proteine in allen drei Entwicklungsstadien des Parasiten in etwa gleicher Menge nachgewiesen werden. Somit lässt sich folgern, dass die Ribonukleotid-Reduktase in *T. brucei* durch eine posttranskriptionale Regulation der R2-Untereinheit kontrolliert wird. Eine Regulation der Ribonukleotid-Reduktase im Zellzyklus von *T. brucei* konnte nicht nachgewiesen werden.

Eisen stellt für Bluttrypanosomen einen essentiellen Wachstumsfaktor dar. Mit dem Eisenchelator Deferoxamin wurde der Einfluss einer Störung des Eisenhaushaltes auf Bluttrypanosomen untersucht. Deferoxamin-behandelte Trypanosomen zeigten gegenüber unbehandelten Parasiten eine deutlich geringere DNA-Syntheserate und Atmung. Die Wirkung des Chelators scheint jedoch nicht auf eine Komplexierung Enzym-gebundenen Eisens zurückzuführen zu sein. Die Behandlung der Holoenzyme (Ribonukleotid-Reduktase, Alternative Oxidase, Superoxid-Dismutase) mit Deferoxamin zeigte keinen Einfluss auf deren Aktivität. Die Wirkung des Chelators beruht vermutlich auf einer Depletierung intrazellulären Eisens, das somit nicht mehr für den Einbau in neu-synthetisiertes Apoenzym zur Verfügung steht.

Monomorphe Trypanosomenstämme haben im Gegensatz zu pleomorphen Stämmen die Fähigkeit verloren, sich zu differenzieren. Der Grund dafür ist vermutlich ein Defekt des cAMP-Signaltransduktionsweges. Im Rahmen der Arbeit konnte durch die Inkubation kulturadaptierter monomorpher Bluttrypanosomen mit dem membranpermeablen cAMP-Derivat 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP (pCPTcAMP) die Differenzierung der Parasiten zur gedrungenen Blutform erreicht werden. Die auf diese Weise erzeugte gedrungene Blutform besaß die Fähigkeit, sich zur prozyklischen Insektenform weiterzuentwickeln. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Unfähigkeit monomorpher Trypanosomen, sich zu differenzieren, in einem Defekt in der Perzeption oder Transduktion des Differenzierungssignals liegt, nicht aber in der anschließenden Signalweiterleitung.

Literaturverzeichnis

- [1] Abdi, Y. A., Gustafsson, L. L., Ericsson, Ö., Hellgren, U. (1995): Handbook of drugs for tropical parasitic infections; second edition. Taylor & Francis, London
- [2] Andersson, M. E., Nordlund, P. (1999): A revised model of the active site of alternative oxidase. FEBS Lett. 449, 17-22
- [3] Baltz, T., Baltz, D., Giroud, Ch., Crockett, J. (1985): Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. EMBO J. 4, 1273-1277
- [4] Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G. (1987): Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. CRC Crit. Rev. Biochem. 22, 111-180
- [5] Beauchamp, C., Friedovich, I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44, 276-287
- [6] Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S., Pays, E. (1995): The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage-specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 14, 2925-2934
- [7] Berkovich, A., Massaro, D., Clerch, L. B. (1996): Pertussis toxin alters the concentration and turnover of manganese superoxide dismutase in rat lung. Am. J. Physiol. 271, 875-879
- [8] Bitonti, A. J., Dumont, J. A., McCann, P.P (1986): Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal-bis(quanylhydrazone). Biochem. J. 237, 518-521
- [9] Björklund, S., Skog, S., Tribukait, B., Thelander, L. (1990): S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. Biochemistry 29, 5452-5458

- [10] Black, S. J., Sendashonga, C. N., O'Brian, C., Borowy, N. K., Naessens, M., Webster, P., Murray, M. (1985): Regulation of parasitemia in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117, 93-118
- [11] Brickman, M. J., Balber, A. E. (1994): *Trypanosoma brucei brucei* and *T. b. gambiense*: stumpy bloodstream forms express more CB1 epitope in endosomes and lysosomes than slender forms. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41, 533-536
- [12] Brun, R., Schönenberger, M. (1979): Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta Tropica* 36, 289-292
- [13] Chakrabarti, D., Schuster, S. M., Chakrabarti, R. (1993): Cloning and characterization of subunit genes of ribonucleotide reductase, a cell-cycle-regulated enzyme, from *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 12020-12024
- [14] Chaudhri, M., Steverding, D., Kittelberger, D., Tjia, S., Overath, P. (1994): Expression of a glycosylphosphatidylinositol-anchored *Trypanosoma brucei* transferrin-binding protein complex in insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6443-6447
- [15] Chaudhuri, M., Ajayi, W., Temple, S., Hill, G. C. (1995): Identification and partial purification of a stage specific 33 kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream trypomastigotes. *J. Euk. Microbiol.* 42, 467-472
- [16] Chaudhuri, M., Hill, G. C. (1996): Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 125-129
- [17] Chaudhuri, M., Ajayi, W., Hill, G. C. (1998): Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 53-68
- [18] Chen, Y., Sokoloski, J. A., Chu, E., Sartorelli, A. C. (1998): Regulation of the expression of enzymes involved in the replication of DNA in chemically-induced granulocytic differentiation of the HL-60 leukemia cells. *Leuk. Res.* 22, 687-695
- [19] Clayton, C. (1992): Developmental regulation of gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 43, 37-66
- [20] Clayton, C., Hotz, H.-R. (1996): Post-transcriptional control of PARP gene expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 1-6

- [21] Clayton, C., Michels, P. (1996): Metabolic compartmentation in african trypanosomes. *Parasitology Today* 12, 465-471
- [22] Clarkson, A. B., Bienen, E. J., ollakis, G., Grady, R. W. (1989): Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J. Biol. Chem.* 264, 17770-17776
- [23] Cooper, C. E., Lynagh, G. R., Hoyes, K. P., Hider, R. C., Cammack, R., Porter, J. B. (1996): The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonukleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 20291-20299
- [24] Cross, G. A. M. (1975): Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71, 393-417
- [25] Czichos, J., Nonnengässer, C., Overath, P. (1986): *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. *Exp. Parasitol.* 62, 283-291
- [26] Dönges, J. (1988): Parasitologie - Mit besonderer Berücksichtigung human-pathogener Formen; 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart
- [27] Dormeyer, M. (2000): *Trypanosoma brucei* Ribonukleotid-Reduktase: Trypanothion-abhängige Synthese von DNA-Bausteinen und Untersuchungen zur Hemmung des Enzyms. Dissertation, Universität Würzburg
- [28] Dormeyer, M., Schöneck, R., Dittmar, G. A. G., Krauth-Siegel, R. L. (1997): Cloning, sequencing and expression of ribonucleotide reductase R2 from *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 414, 449-453
- [29] Dormeyer, M., Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Krauth-Siegel, R. L. (2001): Trypanothione-dependent synthesis of desoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 276, 10602-10606
- [30] Eisenbrand, G., Metzler, M. (1994): Toxikologie für Chemiker. Thieme Verlag, Stuttgart
- [31] Elledge, S. J., Zhou, Z., Allen, J. B. (1992): Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* 17, 119-123
- [32] Engström, Y., Eriksson, S., Thelander, L., Åkerman, M. (1979): Ribonucleotide reductase from calf thymus. Purification and properties. *Biochemistry* 18, 2941-2948

- [33] Eriksson, S., Gräslund, A., Skog, S., Thelander, L., Tribukait, B. (1984): Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by *de novo* protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 259, 11695-11700
- [34] Fairlamb, A. H., Bowman, I. B. R. (1977a): *Trypanosoma brucei* suramin and other trypanocidal compound's effects on glycerol-3-phosphate oxidase. *Exp. Parasitol.* 43, 353-361
- [35] Fairlamb, A. H., Bowman, I. B. R. (1977b): The isolation and characterization of particulate *sn*-glycerol-3-phosphate oxidase from *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Biochem.* 8, 659-668
- [36] Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Cerami, A. (1989): Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2607-2611
- [37] Fast, B., Kremp, K., Boshart, M., Steverding, D. (1999): Iron-dependent regulation of transferrin receptor expression in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 342, 691-696
- [38] Ferguson, M. A. J., Homans, S. W., Dwek, R. A., Rademacher, T. W. (1988): Glykosyl-Phosphatidylinositol-moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* 239, 753-759
- [39] Fernandez-Sarabia, M. J., Fantes, P. A. (1990): Ribonucleotide reductase and its regulation during the cell cycle. *Trends Genet.* 6, 275-276
- [40] Fontecave, M., Eliasson, R., Reichard, P. (1989): Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphat reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2147-2151
- [41] Fontecave, M., Gräslund, A., Reichard, P. (1987): The function of superoxide dismutase during the enzymatic formation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 262, 12332-12336
- [42] Gaudu, P., Nivière, V., Pétillet, Y., Kauppi, B., Fontecave, M. (1996): The irreversible inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by superoxide radicals. *FEBS Lett.* 387, 137-140
- [43] Gazitt, Y., Reddy, S. V., Alcantara, O., Yang, J., Boldt, D. H. (2001): A new molecular role for iron in regulation of cell cycling and differentiation of HL-60 human leukemia cells: iron is required for transcription of p21(WAF1/CIP1) in cells induced by phorbol myristate acetate. *J. Cell. Physiol.* 187, 124-135

- [44] Giffin, B. F., McCann, P. P., Bitoni, A. J., Bacchi, C. J. (1986): Polyamine depletion following exposure to DL- α -difluormethylornithine both in vivo and in vitro initiates morphological alterations and mitochondrial activation in a monomorphic strain of *Trypanosoma brucei brucei*. J. Protozool. 33, 238-243
- [45] Gordeuk, V. R., Thuma, P. E., Brittenham, G. M., Biemba, G., Zulu, S., Simwanza, G., Kalense, P., M'Hango, A., Parry, D., Poltera, A. A., Aikawa, M. (1993): Iron chelation as a chemotherapeutic strategy for *falciparum* malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48, 193-197
- [46] Graham, S. V. (1995): Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. Parasitology Today 11, 217-223
- [47] Gurnett A. M., Ward, J., Raper, J., Turner, M. J. (1986): Purification and characterization of membrane-form variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 20, 1-13
- [48] Hass, M. A., Massaro, D. (1987): Developmental regulation of rat lung Cu,Zn-superoxide dismutase. Biochem. J. 246, 697-703
- [49] Helfert, S., Estévez, A. M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C. (2001): The roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. Biochem. J., in press
- [50] Hirumi, H., Hirumi, K., Doyle, J. J., Cross, G. A. M. (1980): In vitro cloning of animal infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Parasitology 80. 371-382
- [51] Hofer, A., Schmidt, P. P., Gräslund, A., Thelander, L. (1997): Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6959-6964
- [52] Holmgren, A. (1989): Thioredoxin and glutaredoxin systems. J. Biol. Chem. 264, 13963-13966
- [53] Hotz, H.-R., Lorenz, P., Fischer, R., Krieger, S., Clayton, C. (1995): Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 75, 1-14
- [54] Hug, M., Carruthers, V. B., Hartmann, C., Sherman, D. S., Cross, G. A. M., Clayton, C. (1993): A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 61, 87-96

- [55] Ismail, S. O., Paramchuk, W., Skeiky, Y. A. W., Reed, S. G., Bhatia, A., Gedamu, L. (1997): Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 86, 187-197
- [56] Jordan, A., Gibert, I., Barbè, J. (1994): Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. J. Bacteriol. 176, 3420-3427
- [57] Kontoghiorghes, G. J. (1995): Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. Toxicol. Lett. 80, 1-18
- [58] Kuzoe, F. A. S. (1993): Current situation of african trypanosomiasis. Acta Tropica 54, 153-162
- [59] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- [60] Lanham, S. M., Godfrey, D. G. (1970): Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Exp. Parasitol. 28, 521-534
- [61] Le Trant, N., Meshnick, S. R., Kitchener, K., Eaton, J. W., Cerami, A. (1983): Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterization, and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. J. Biol. Chem. 258, 125-130
- [62] Ligtenberg, M. J. L., Bitter, W., Kieft, R., Steverding, D., Janssen, H., Calafat, J., Borst, P. (1994): Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 13, 2565-2573
- [63] Liuzzi, M., Déziel, R., Moss, N., Beaulieu, P., Bonneau, A.-M., Bousquet, C., Chafouleas, J. G., Gerneau, M., Jaramillo, J., Krogsrud, R. L., Lagacé, L., McCollum, R. S., Nawoot, S., Guindon, Y. (1994): A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity *in vivo*. Nature 372, 695-698
- [64] Lowdon, M., Vitols, E. (1973): Ribonucleotide reductase activity during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 158, 177-184
- [65] Lüdemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H., Krauth-Siegel, R. L. (1998): *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. FEBS Lett. 431, 381-385

- [66] Maier, A., Steverding, D. (1996): Low affinity of *Trypanosoma brucei* transferrin receptor to apotransferrin at pH 5 explains the fate of the ligand during endocytosis. FEBS Lett. 396, 87-89
- [67] Mann, G. J., Musgrove, E. A., Fox, R. M., Thelander, L. (1988): Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. Cancer Res. 48, 5151-5156
- [68] Mao, S. S., Holler, T. P., Yu, G. X., Bollinger, J. M., Booker, S., Johnston, M. I., Stubbe, J. (1992a): A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: amazing and still confusing. Biochemistry 31, 9733-9743
- [69] Mao, S. S., Yu, G. X., Chalfoun, D., Stubbe, J. (1992b): Characterization of C439SR1, a mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase: evidence that C439 is a residue essential for nucleotide reduction and C439SR1 is a protein possessing novel thioredoxin-like activity. Biochemistry 31, 9752-9759
- [70] Mao, S. S., Holler, T. P., Bollinger, J. M., Yu, G. X., Booker, S., Johnston, M. I., Stubbe, J. (1992c): Interaction of C225SR1 mutant subunit of ribonucleotide reductase with R2 and nucleoside diphosphates: tales of a suicidal enzyme. Biochemistry 31, 9744-9751
- [71] Matthews, K. R., Gull, K. (1994): Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. Parasitology Today 10, 473-476
- [72] McClarty, G. A., Chan, A. K., Choy, B. K., Wright, J. A. (1990): Increased ferritin gene expression is associated with increased ribonucleotide reductase gene expression and the establishment of hydroxyurea resistance in mammalian cells. J. Biol. Chem. 265, 7539-7547
- [73] Mutomba, M. C., Wang, C. C. (1995): Differentiation of a cultured-adapted mutant bloodstream form of *Trypanosoma brucei* into procyclic form results in growth arrest of the cells. Mol. Biochem. Parasitol. 72, 215-225
- [74] Mutomba, M. C., Wang, C. C. (1996): Effects of aphidicolin and hydroxyurea on the cell cycle and differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. Mol. Biochem. Parasitol. 80, 89-102
- [75] Mutomba, M. C., Wang, C. C. (1998): The role of proteolysis during the differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. Mol. Biochem. Parasitol. 93, 11-22

- [76] Nyholm, S., Mann, G. J., Johansson, A. G., Bergeron, R. J., Gräslund, A., Thelander, L. (1993): Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J. Biol. Chem.* 268, 26200-26205
- [77] Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M., Reichard, P. (1996): The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotid reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 9410-9416
- [78] Opperdoes, F. R., Aarsen, P. N., Van der Meer, C., Borst, P. (1976): *Trypanosoma brucei*: an evaluation of salicylhydroxamic acid as a trypanocidal drug. *Exp. Parasitol.* 40, 198-205
- [79] Opperdoes, F. R. (1987): Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 127-151
- [80] Otto, M. (2000): Analytische Chemie, 2. Auflage. WILEY-VCH, Weinheim
- [81] Overath, P., Czichos, J., Haas, C. (1986): The effect of citrate/*cis*-aconitate on oxidative metabolism during transformation of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 160, 175-182
- [82] Pays, E. (1993): Genome organization and control of gene expression in trypanosomatids. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 50, 127-160
- [83] Pays, E., Hanocq-Quertier, J., Hanocq, F., Van Assel, S., Nolan, D., Rollin, S. (1993): Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 107-114
- [84] Penketh, D. G., Divo, A. A., Shyam, K., Patton, C. L., Sartorelli, A. C. (1991): The effect of the methylating agent 1,2-bis(methylsulfonyl)-1-methylhydrazine on morphology, DNA content and mitochondrial function of *Trypanosoma brucei* subspecies. *J. Protozool.* 38, 172-177
- [85] Raventos-Suarez, C., Pollack, S., Nagel, R. L. (1982): *Plasmodium falciparum*: inhibition of *in vitro* growth by desferrioxamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 919-922
- [86] Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Schmidt, H., Steverding, D., Krauth-Siegel, R. L. (2000): Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.* 275, 7547-7552
- [87] Reichard, P. (1997): The evolution of ribonucleotide reductase. *TIBS* 22, 81-85

- [88] Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B., Boshart, M. (1997): Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 269-280
- [89] Robins, M. J., Samano, M. C., Samano, V. (1995): Ribonucleotide reductase targets for chemotherapy: mechanistic aspects and biologically active agents. *Nucleosides Nucleotides* 14, 485-493
- [90] Roditi, I., Clayton, C. (1999): An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 99-100
- [91] Rodriguez, J., Deinhard, F. (1960): Preparation of a semipermanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology* 12, 316-317
- [92] Rouault, T., Klausner, R. (1997): Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Current Topics in Cellular Regulation* 35, 1-19
- [93] Rubin, H., Salem, J. S., Li, L.-S., Yang, F.-D., Mama, S., Wang, Z.-M., Fisher, A., Hamann, C. S., Cooperman, B. S. (1993): Cloning, sequence determination, and regulation of the ribonucleotide reductase subunits from *Plasmodium falciparum*: a target for antimalarial therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9280-9284
- [94] Saas, J., Ziegelbauer, K., von Haeseler, A., Fast, B., Boshart, M. (2000): A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 275, 2745-2755
- [95] Schell, D., Borowy, N. K., Overath, P. (1991): transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* 77, 558-560
- [96] Scory, S. (1999): Entwicklung einer neuen Strategie zur spezifischen Störung des Proteinstoffwechsels in *Trypanosoma brucei*. Dissertation, Universität Heidelberg
- [97] Sjöberg, B. M. (1995): Structure of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Eckstein, F., Lilley, D. M.J., Eds.), Vol. 9, 192-221
- [98] Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A. G., Overath, P. (1994): ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 78-87

- [99] Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Fuchs, H., Tauber, R., Overath, P. (1995): Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. J. Cell Biol. 131, 1173-1182
- [100] Steverding, D., Kremp, K. (1998): An improved method for the purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. Parasitol. Res. 84, 524-525
- [101] Steverding, D. (1998): Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* require only small amounts of iron for growth. Parasitol. Res. 84, 59-62
- [102] Steverding D. (2000): The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. Parasitol. Int. 48, 191-198
- [103] Stubbe, J., Ator, M., Krenitsky, T. (1983): Mechanism of ribonucleotide diphosphate reductase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 258, 1625-1630
- [104] Stubbe, J., Riggs-Gelasco, P. (1998): Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. TIBS 23, 438-443
- [105] Stubbe, J., Van der Donk, W. (1995): Ribonucleotide reductases: radical enzymes with suicidal tendencies. Chemistry & Biology 2, 793-801
- [106] Turner, C. M. R., Barry, J. D., Maudlin, I., Vickerman, K. (1988): An estimate of the size of the metacyclic variable antigene repertoire of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Parasitology 99, 67-75
- [107] Tyler, K. M., Matthews, K. R., Gull, K. (1997): the bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. Proc. R. Soc. Lond. B 264, 1481-1490
- [108] Umbach, A. L., Siedow, J. N. (1993): Covalent and non-covalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. Plant Physiology 103, 845-854
- [109] Vanhamme, L., Pays, E. (1995): Control of gene expression in trypanosomes. Microbiol. Rev. 59, 223-240
- [110] Van Meirvenne, N., Janssens, P. G., Magnus, E. (1975): Antigenic variation in syringe passaged populations of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei*. I. Rationalization of the experimental approach. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 55, 1-23

- [111] Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., Boshart, M. (1997): Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J. Cell. Sci.* 110, 2661-2671
- [112] Vickerman, K. (1965): Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature* 206, 762-766
- [113] Vickerman, K. (1985): Developmental cycle and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* 41, 105-114
- [114] Willing, A., Follmann, H., Auling, G. (1988): Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. *Eur. J. Biochem.* 170, 603-611
- [115] Ziegelbauer, K., Quinten, M., Schwarz, H., Pearson, T. W., Overath, P. (1990): Synchronous differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms in vitro. *Eur. J. Biochem.* 192, 373-378
- [116] Ziegelbauer, K. (1994): Afrikanische Trypanosomen. In: *Immunologische und molekulare Parasitologie* (Röllinghoff, M. & Rommel, M., Hrsg.), G. Fischer Verlag, Jena, 13-26

Veröffentlichungen

Die wesentlichen Ergebnisse der Dissertation sind in folgenden Publikationen enthalten:

1. Breidbach, T., Krauth-Siegel, R. L., Steverding, D. (2000): Ribonucleotide reductase is regulated via the R2 subunit during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. FEBS Lett. 473, 212-216
2. Breidbach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R. L., Steverding, D. (2002): Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. Int. J. Parasitol. 32, 473-479
3. Breidbach, T., Ngazoa, E. S., Steverding, D. (2001): *Trypanosoma brucei*: in vitro differentiation of culture-adapted long slender forms into short stumpy and procyclic forms. submitted

Anhang A

Chemische Strukturen

A.1 Medikamente gegen die afrikanische Schlafkrankheit

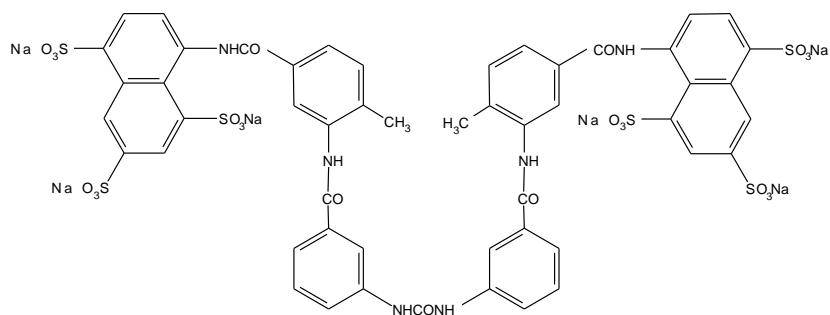


Abbildung A.1: **Suramin** (Handelsname: Suramin[®]; Bayer)

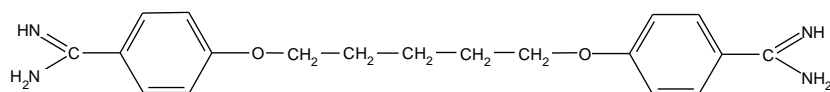


Abbildung A.2: **Pentamidin** (Handelsname: Pentam-300[®]; Aventis)

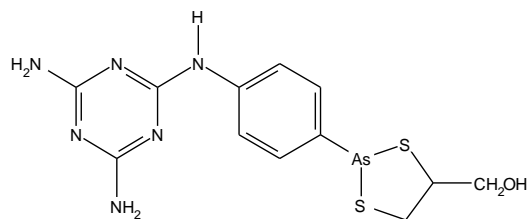


Abbildung A.3: **Melarsoprol** (Handelsname: Arsobal[®]; Aventis)

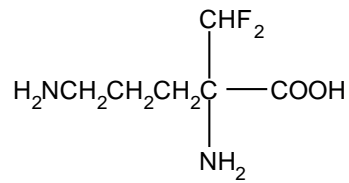


Abbildung A.4: **Efnornithin** (Handelsname: Ornidyl[®]; Aventis)

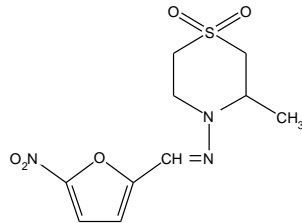


Abbildung A.5: **Nifurtimox** (Handelsname: Lampit[®]; Bayer)

A.2 Deferoxamin und Eisen-Deferoxamin

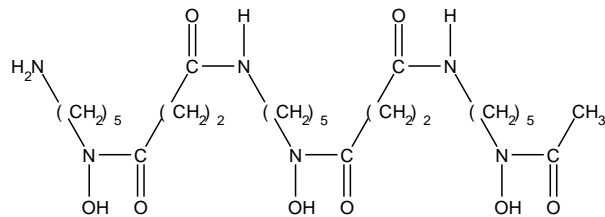


Abbildung A.6: **Deferoxamin**

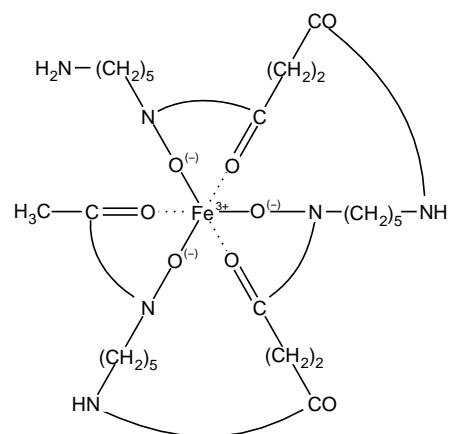


Abbildung A.7: **Eisen-Deferoxamin**

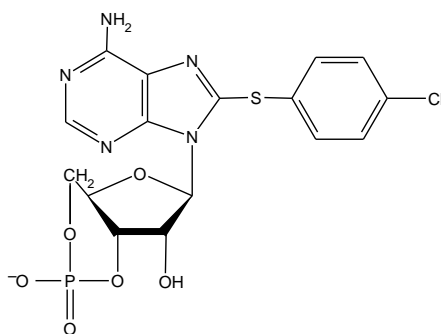
A.3 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP

Abbildung A.8: 8-(4-Chlorphenylthio)-cAMP

Danksagungen

Heide Schmidt danke ich für die Anleitung bei der Durchführung des Ribonucleotid-Reduktase-Assays und die vielen interessanten Diskussionen.

Für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten bedanke ich mich bei Nina Reckenfelderbäumer.

Vera Rosenkranz und Peter Hexel danke ich für die große Hilfe bei den Untersuchungen mit dem FACScan.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Anke Baar, Antje Fischer, Dr. Mostafa Kabiri, Katrin Kremp, Elise Solange Ngazoa, Daniela Schnörr, Dr. Stefan Scory und den übrigen Mitarbeitern der Abteilungen Parasitologie und Tropenhygiene sowie dem AK Krauth-Siegel für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Jörg, der mich während der gesamten Promotion unterstützt hat und stets zur Stelle war, wenn Computerprobleme aufgetreten sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tanja Breidbach, geb. Reichert
geboren am: 02.07.1972 in Koblenz
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschule Siershahn
1983 - 1992 Schönstätter Marienschule, Gymnasium in Vallendar
Abschluß: Abitur am 27.06.1992

Hochschulstudium:

Oktober 1992 - Juli 1998 Studium des Lehramts an Gymnasien für die Fächer Mathematik und Chemie an der Universität Kaiserslautern
Abschluß: 1. Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien am 14.07.1998

Studienschwerpunkte: Biochemie und Toxikologie

Staatsexamensarbeit in Chemie

Thema: „Untersuchungen zur cytotoxischen und mutagenen Wirkung umweltrelevanter N-Nitrosamine in CYP-transfizierten V79-Zellen“

Seit September 1998

Externe Promotion im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern.

Die Durchführung der Experimente erfolgte am Hygiene-Institut, Abt. Parasitologie der Universitätsklinik Heidelberg und am Biochemie-Zentrum Heidelberg unter der Betreuung von PD Dr. Dietmar Steverding und Prof. Dr. R. Luise Krauth-Siegel.

Berufliche Weiterbildung:

März 1999 Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit an der Universität Heidelberg

Berufsausbildung:

Seit September 2001 Studienreferendarin am Helmholtz-Gymnasium in Heidelberg