

**Effekte von Troglitazon und anderen Thiazolidindionen auf die
Blutform von *Trypanosoma brucei* –
Induktion der Differenzierung von *slender*-Formen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von
Viola Denninger

Tag der mündlichen Prüfung:

14. September 2007

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Feil

Diese Arbeit möchte ich meinem Vater widmen

*“When the wind fills the sky the clouds will move aside
And there will be the road to all our dreams
For any day that stings two better days it brings
Nothing is as bad as it seems”*

(aus: The master of the wind, Manowar)

Danksagungen

Bei Prof. Dr. Michael Duszenko möchte ich mich für seine Betreuung bedanken, während der er auch in schwierigen Situation ein offenes Ohr hatte, gleichzeitig aber auch die Freiheit ließ, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Prof. Dr. Robert Feil danke ich für seine Mühe, insbesondere bezüglich des intensiven und präzisen Korrekturlesens und der konstruktiven Kritik.

Meinem ältesten Mitstreiter Patrick Merkel möchte ich für seine Geduld danken, aber auch für seinen unerschöpflichen Humor, der viel Spaß in den Laboralltag brachte. Caroline Schönfeld danke ich für ihre Unterstützung bei vielen Experimenten, ihre Gesellschaft, wenn die Abende im Labor mal wieder länger wurden und für ein abwechslungsreiches WG-Leben. Katherine Figarella und Néstor Uzcátegui möchte ich für die wertvollen Tipps danken, die mir die vier bedeutendsten Dinge für die wissenschaftliche Arbeit nahe brachten: Etablieren, Reproduzieren, Paper lesen... und „chisme“ beim Kaffee trinken. ¡Siempre quedarán en mi corazón! Ein besonderer Dank an Didac Carmona-Gutiérrez – „Pousti, du bist der Beste!“. Witta Kaiser danke ich für ihren toleranten Musikgeschmack, ihre menschliche Art, ihr glückliches experimentelles Händchen und ihren Optimismus, Alexandra Thor für den frischen Wind, der immer mit ihr reinschneite. Dem „Kleenen“ Gordon Eske danke ich für seine Hilfsbereitschaft, seine Herzlichkeit und seine Stimmgewalt, mit der er nicht nur Hinterhöfe erschütterte. Björn Bassarak danke ich für seine beruhigende und abgeklärte Art, und dem letzten Gentleman Khalid Muhammad vor allem für die nette Begleitung auf dem Nachhauseweg, wenn der letzte Bus mal wieder abgefahren war. Ein „Merci!“ an Rudolf Koopmann für seine Begeisterungsfähigkeit bei der Zellkultivierung, seine Kreativität im Laboralltag und besonders für all die liebenswerten Seiten hinter dem kühlen Fischkopp; dem Bastler Björn Buchholz-„Pütz“ danke ich vor allem für Kaffee und Kinderriegel und das leckerste Tiramisu der Welt – unverzichtbare Nahrungsmittel für einen langen Labortag. Nina Weller möchte ich für ihre unterhaltsamen und lebensnahen Anekdoten danken. Ich danke auch „Ja-ne-wis-ich-nich“ Martin Schmidt für die Elektronenmikroskopie, Konstantinos Nouskas für das originelle Zelt und Leonard Ehigie. Meinem Praktikantem Torsten Barth danke ich für seine aufopferungsvollen Stunden am Mikroskop, Felix Klug für seine unerschütterliche Diskussionsfreundigkeit und Paula Quecke für die äußerst angenehme Zusammenarbeit.

„The Unforgiven“ Nadejda Valtcheva vom AK Feil danke ich für ihre ansteckende Lebensfreude, die bulgarischen Weisheiten und „unterhaltsamen“ Witze, „The Unforgiven II“ Ivan Nikolov für die Hilfe in so manchen auswegslosen Situationen.

Aus dem AK Dodt möchte ich vor allem Patrick Schulte-Euler-Swayze für die nette laborübergreifende Zusammenarbeit und für die Erfahrung, dass es nicht nur „Pipettenspitzen“-Boxen gibt, danken.

Der gesamten Besatzung des Isotopenlabors möchte ich für die aufmerksame und spontane Hilfe in sämtlichen gerätetechnischen und organisatorischen Fragen danken, sowie Helmut Jungwirth für die geduldige Unterweisung in das radioaktive Arbeiten.

Dr. Jörg Hoheisel danke ich für die Möglichkeit, Microarrays in seinem Labor des DKFZ (*functional genomics*) durchführen zu dürfen. Ein großer Dank gilt auch den Heidelbergern Stefanie Brems und Frowin „die Socke“ Herman, die mich bei der Durchführung dieser Experimente unterstützt und gleich so herzlich aufgenommen haben.

Bei Dr. Eberhard Christ bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre in der Apotheke und allen anderen für die nette Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich mich bei Brigitte Pfeifle für ihre Geduld, die langen und diskussionsreichen Abende, die netten Spaziergänge und ihre Ermutigung bedanken. Eine bessere Freundin gibt es nicht!

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Karsten, ohne deren Unterstützung und Ansporn vieles nicht möglich gewesen wäre und die mir durch ihre Liebe immer ein Halt waren.

Abkürzungen

AnTat	Antwerpen Trypanozoon antigenic type
APS	Ammoniumpersulfat
AP	Alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfat
BDMA	Benzyl dimethylamin
BF	Blutform der Trypanosomen
BFM	Blutform-Medium
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic Adenosin-3'-5'-monophosphat
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
CPT-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DDSA	Dodecylsuccinicanhydrid
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHLA-DH	Dihydroliponamid Dehydrogenase
DID	Differential Integrated Density
DIF	Differenzierungsfaktor
DFMO	Difluormethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothretinol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESAG	Expression site associated gene
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IMDM	Iscove's Dulbecco's medium
Kb	Kilobasen
kDNA	Kinetoplasten-DNA
LS	long slender Form der Trypanosomen

MEM	Minimum Essential Medium
MITat	Molteno Institute Trypanozoon antigenic type
MNA	Methylnadicanhydrid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Prozyklische Fliegenform der Trypanosomen
PG	Prostaglandin
PI	Proteaseinhibitoren
PJ	Propidiumjodid
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHAM	Salicylhydroxamsäure
SIF	Stumpy induction factor
SS	short stumpy Form der Trypanosomen
TAO	Trypanosomale Alternative Oxidase
TBS	Tris Buffered Saline
TDB	Trypanosome Dilution Buffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrodaminester
VSG	variant surface glycoprotein
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schlafkrankheit	2
1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsbild	2
1.1.2 Bisherige Behandlungsmethoden	4
1.2 Biologie der Kinetoplastiden	6
1.2.1 Systematische Einordnung der Trypanosomen	6
1.2.2 Zellmorphologie	7
1.2.3 Zellzyklus	8
1.2.4 Besondere Organellen: Glykosomen	9
1.3 Differenzierung in <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.3.1 Entwicklungszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	10
1.3.2 Differenzierung von <i>slender</i> zu <i>stumpy</i> :	
Bekannte Veränderungen und Offenes	12
1.4 Das Genom von <i>T. brucei</i> : Mechanismen und Regulation der Genexpression	16
1.4.1 Transkription der proteinkodierenden Gene und der <i>Spliced Leader</i> -RNA	16
1.4.2 Transkription der <i>transfer</i> - und U <i>small nuclear</i> RNA	19
1.4.3 Transkription der <i>ribosomalen</i> RNA, der <i>VSG-expression site</i> und des GPEET/EP	20
1.5 Die <i>VSG-expression site</i>	22
1.6 PPAR γ	26
1.6.1 Die Familie der <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors</i>	26
1.6.2 PPAR γ : Struktur und Funktion	27
1.6.3 Einsetzen von PPAR γ -Agonisten als Arzneistoffe	30
1.6.4 Thiazolidindione und Differenzierung	33
1.7 Zielsetzung der Arbeit	33
2. Material und Methoden	35
2.1 Verwendete Organismen	35
2.1.1 Verwendete Trypanosomen	35

Inhaltsangabe

2.1.2 Versuchstiere	35
2.2 Materialien	35
2.2.1 Chemikalien	35
2.2.2 Radiochemikalien	39
2.2.3 Enzyme	39
2.2.4 Antikörper	39
2.2.5 Primer	40
2.2.5.1 Reverse Transkription	40
2.2.5.2 Northern Blot-Sonden	40
2.2.6 Kits	41
2.2.7 Verbrauchsmaterialien	41
2.2.8 Geräte	42
2.2.9 Software und Datenbanken	43
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	44
2.3.1 Medien	44
2.3.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	47
2.3.3 Zytotoxizitäts-Test	48
2.3.4 FACS-Analyse	49
2.3.5 Immunfluoreszenz	49
2.3.6 Giemsa-Färbung	50
2.3.7 Elektronenmikroskopie	50
2.3.8 Glucose- und Pyruvatbestimmung	51
2.3.8.1 Glucose-Bestimmung	51
2.3.8.2 Pyruvat-Bestimmung	52
2.3.9 Aktivitätsmessung der SDH	52
2.3.10 Messung der Hemmbarkeit des Sauerstoffverbrauchs mittels O ₂ -Elektrode	53
2.3.11 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate	53
2.3.12 SDS-PAGE	54
2.3.13 Western-Blot	55
2.3.14 Northern-Blot	56
2.3.15 Microarray	57
2.4 Methoden	59
2.4.1 Sterile Isolierung von <i>T. brucei</i> aus dem Blut und Herstellung von	

Inhaltsangabe

Stabilaten	59
2.4.2 Axenische Kultivierung von Blutformen von <i>Trypanosoma brucei</i> , Stamm 221, aus Stabilaten	59
2.4.3 Axenische Kultivierung von Prozyklischen von <i>Trypanosoma brucei</i> , Stamm 221, aus Stabilaten	60
2.4.4 Axenische Kultivierung von BF 221 direkt nach steriler Isolierung aus dem Blut	60
2.4.5 Axenische Kultivierung von Blutformen des pleomorphen Stammes von <i>Trypanosoma brucei</i> , AnTat1.1	61
2.4.6 Transformation der Blutform in die Prozyklische Form von <i>T. brucei</i>	61
2.4.7 Zytotoxizitäts-Assay (Bestimmung der IC ₅₀)	62
2.4.8 FACS-Analyse	62
2.4.8.1 Bestimmung des relativen mitochondrialen Membranpotentials	62
2.4.8.2 Bestimmung nekrotischer Zellen	63
2.4.8.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkerne	63
2.4.9 Immunofluoreszenz	63
2.4.10 Giemsa-Färbung	64
2.4.11 Elektronenmikroskopie	64
2.4.11.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	64
2.4.11.2 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	65
2.4.12 Proteinbestimmung nach Bradford	65
2.4.13 Metabolitentests	66
2.4.13.1 Glucose-Bestimmung	66
2.4.13.2 Pyruvat-Bestimmung	66
2.4.14 Aktivitäts-Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase	67
2.4.15 Bestimmung der Hemmbarkeit des Sauerstoffverbrauchs mittels KCN und SHAM	67
2.4.16 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵ S]-Methionin	68
2.4.17 SDS-PAGE	68
2.4.18 Western-Blot	69
2.4.19 Northern-Blot	69
2.4.19.1 Probenvorbereitung	69
2.4.19.2 RNA-Gelelektrophorese	70
2.4.19.3 Blotting (Sandwich-Diffusions-Blot)	70

Inhaltsangabe

2.4.19.4 Sondenherstellung und Markierung mit α [³² P]-dATP	70
2.4.19.5 Entwicklung	71
2.4.19.6 Stripping	71
2.4.19.7 Auswertung	71
2.4.20 Microarray-Analyse	71
2.4.20.1 Labeling	72
2.4.20.2 Aufreinigung	72
2.4.20.3 Prähybridisierung der Slides	72
2.4.20.4 Hybridisierung	72
2.4.20.5 Auswertung	73
3. Ergebnisse	74
3.1 In vitro Effekt auf das Wachstumsverhalten der Blutform von <i>Trypanosoma brucei</i>	74
3.1.1 Wachstumshemmung von BF221 durch Thiazolidindione	74
3.1.2 Bestimmung der IC ₅₀ von Thiazolidindionen	77
3.1.3 Untersuchungen zum Zellzyklusarrest und zum induzierten Zelltod	78
3.2 Untersuchungen zur Morphologie	80
3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	80
3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen des pleomorphen Stammes AnTat1.1	83
3.3 Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels	85
3.3.1 Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials	85
3.3.2 Sauerstoffverbrauch und Aktivität der Succinatdehydrogenase	87
3.3.3 Änderungen der Expression mitochondrialer Marker	90
3.4 Betrachtung der Glykolyse	92
3.5 Untersuchung zur Proteinbiosyntheserate	94
3.6 Transformation der Blutform in prozyklische Parasiten	95
3.6.1 Transformation nach unterschiedlichen Inkubationszeiten	95
3.6.2 Konzentrationsabhängige Transformationseffizienz	99
3.6.3 Transformation mit einem natürlichen PPAR γ -Agonisten	103
3.6.4 Transformation mit dem PPAR γ -Antagonisten T0070907	104
3.7 <i>In silico</i> -Recherchen nach einem PPAR γ -Homolog	105

Inhaltsangabe

3.8 Untersuchungen auf Transkriptions-Level durch Microarrays	107
4. Diskussion	115
4.1 Wachstumshemmung ohne Induktion von Zelltod durch Thiazolidindione	115
4.2 Proliferation der Glykosomen und Steigerung der Glykolyserate	116
4.3 Aktivierung des Mitochondriums und Erhöhung der Transformationseffizienz durch Troglitazon	118
4.4 Die Induktion der Differenzierung erfolgt über einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus	120
4.5 Regulation auf Transkriptionsebene – Expression von ESAG 8	122
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	124
5. Zusammenfassung	126
Summary	129
6. Literaturverzeichnis	132

1. EINLEITUNG

Die ersten Fälle der Schlafkrankheit wurden schon im 14. Jahrhundert in Mali beschrieben. Im 18. und 19. Jahrhundert tauchten Bezeichnungen wie „sleepy distemper“ oder „fly disease“ auf, der Vektor oder die eigentliche Ursache waren bis dahin jedoch noch unbekannt. Erst im Jahre 1902 entdeckten zwei englische Ärzte namens Ford und Dutton den ersten Erreger, den Parasiten *Trypanosoma brucei gambiense* (Dutton, 1902; Abb.1-1). Sir David Bruce gelang es ungefähr zur selben Zeit, die Übertragung der *Nagana*-Erreger durch die Tsetse-Fliege aufzuzeigen (Bruce, 1895 und 1903). Schließlich isolierten Stephens und Fantham aus einem Patienten, der an der Schlafkrankheit erkrankt war, den Erreger der ostafrikanischen Variante, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Stephens and Fantham, 1910). Erst ab diesem Zeitpunkt, begann die Differenzierung in verschiedene Trypanosomen-Subspezies. Der deutsche Wissenschaftler Taute hatte bereits 1917 durch Selbstversuche herausgefunden, dass der Erreger der Nagana bei Tieren nicht infektiös für den Menschen war. Was zu diesem Zeitpunkt noch sehr skeptisch aufgenommen wurde, konnten Rickman und Robson 30 Jahre später durch einen Lysetest beweisen (Rickman und Robson, 1970). Im Gegensatz zu dem humanpathogenen Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense*, wurde *Trypanosoma brucei brucei* durch humanes Serum lysiert. Die dafür verantwortliche Fraktion wurde 1978 von Rifkin als HDL identifiziert. Seitdem schritten die Untersuchungen an den Erregern der Schlafkrankheit weiter voran und im Jahre 2005 gelang es endlich, das Genom von *Trypanosoma brucei* vollständig zu sequenzieren (Berriman *et al.*, 2005).

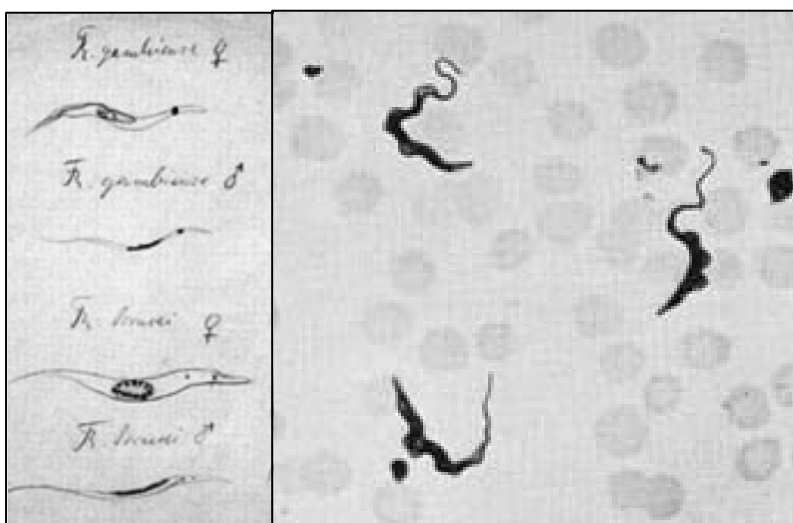


Abb.1-1. Skizzen und mikroskopische Aufnahme von *T. brucei gambiense* (Robert Koch, 100fache Vergrößerung, 1908).

1.1 Schlafkrankheit

1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsbild

Parasiten der *Trypanosoma brucei*-Gruppe werden durch die Tsetse-Fliege (*Glossina ssp.*) übertragen, welche weite Teile Afrikas besiedelt. Auch wenn die drei Arten dieser Gruppe morphologisch nicht zu unterscheiden sind, so variieren sie in ihrer Verbreitung, Wirtsspezifität und bevorzugtem Vektor. Die einzige, für den Menschen ungefährliche Art, ist wahrscheinlich zugleich die älteste und trägt den Namen *T. brucei brucei*. Normalerweise befällt dieser Parasit Antilopen oder andere in Afrika einheimische Wiederkäuer und verursacht bei diesen Tieren eine Krankheit, die als *Nagana* bezeichnet wird. Leider macht *T. brucei brucei* auch nicht vor Zuchttieren wie Schafen, Ziegen, Kühen und Schweinen halt, die zur Nahrungsmittelgewinnung nach Afrika eingeführt worden sind. So wirkt sich indirekt auch diese *Trypanosoma*-Art auf das Leben der Menschen dieses Kontinents aus.

Die eigentlichen Erreger der Schlafkrankheit werden in die westafrikanische Art *T. brucei gambiense* und in die ostafrikanische Art *T. brucei rhodesiense* unterteilt. Seit 1896 gab es dort drei große Epidemien, die letzte nahm 1970 ihren Anfang und hält noch heute an. Nach Schätzungen der WHO im Jahre 1998 starben jährlich bis zu 40.000 Menschen an dieser Krankheit, wobei die Dunkelziffer vor allem auf Grund schlechter medizinischer Versorgung oder fehlender Diagnose auf 300.000 bis 500.000 Fälle geschätzt wurde. Inzwischen konnte die offizielle Sterberate jedoch aufgrund umfangreicher medizinischer Maßnahmen auf 20.000 und die geschätzte Erkrankungsrate auf 50.000 – 70.000 Fälle pro Jahr reduziert werden (<http://www.who.int>, 2006). Dabei werden die mit Risiko behafteten Länder in vier verschiedene Gruppen aufgeteilt (Abb.1-2): I. Länder mit hoher Prävalenz, II. Länder mit mittlerer Prävalenz, III. Länder von geringem endemischen Level und IV. Länder von unklarem Status. In Angola, dem Kongo und dem Sudan steht die Schlafkrankheit als Todesursache sogar an erster Stelle, noch vor HIV. *T. brucei gambiense* wird vor allem von Glossinen der Palpalisgruppe übertragen, welche bevorzugt wasserreiche Gegenden und Uferwälder West- und Zentralafrikas besiedeln. Diese Form der Schlafkrankheit wird als chronisch bezeichnet, da die letzte Krankheitsphase erst nach Jahren auftreten kann. Die ostafrikanische Art *T. brucei rhodesiense* hingegen ist Ursache für die so genannte akute Form. Ihr dienen vor allem Glossinen der Morsitansgruppe, deren Reservoir eher Trockenbuschwälder bilden, als Vektoren. Der Krankheitsverlauf ist analog zu der westafrikanischen Form, geht jedoch schon nach einigen Wochen in das Endstadium über,

Einleitung

häufig mit Herzversagen als Todesursache, noch bevor die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke überqueren könnten.

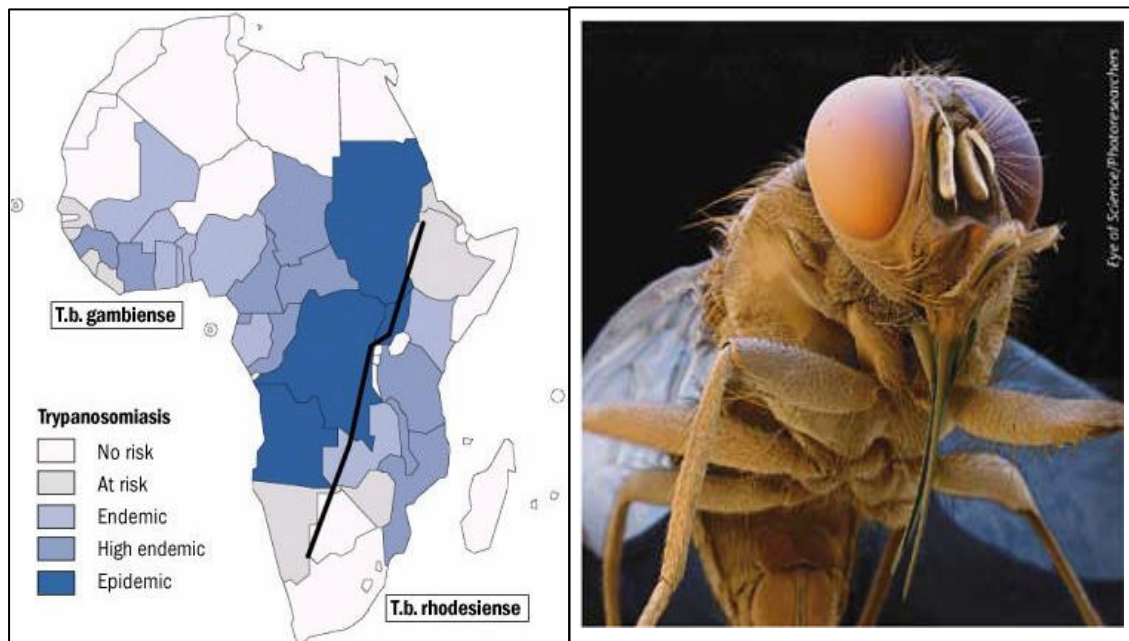


Abb.1-2. Links: Verbreitung von *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* in Afrika (<http://www.who.org>). Rechts: Der Überträger von *T. b. gambiense*: *Glossina palpalis* (aus: Eye of science).

Die Schlafkrankheit verläuft in drei Stadien. Wird sie früh erkannt, ist die Prognose vor allem bei der westafrikanischen Art gut. Allerdings sind die ersten Symptome sehr unspezifisch, so dass - auch in Anbetracht der medizinischen Versorgung in den betroffenen Gebieten – die richtige Diagnose oft zu spät erfolgt.

Nachdem die Tsetse-Fliege bei ihrer Blutmahlzeit die Parasiten durch die Einstichstelle auf den Wirt übertragen hat, entwickelt sich dort eine kleine weiche, gerötete Schwellung, die auch als „*Trypanosomenschanke*“ bezeichnet wird und nach einer Weile wieder verschwindet. Gleichzeitig verteilen sich die Trypanosomen auf die Blut- und Lymphbahnen. Dies kann ca. 2 Wochen dauern (**Phase I**). Von nun an vermehren sich die Erreger stark und dringen in fast alle Organe vor, was unter anderem eine starke Vergrößerung von Milz und Leber zur Folge hat. Neben starkem Gewichtsverlust leiden die Patienten an Schwellung der Lymphknoten („*Winterbottom's sign*“) und phasenweise auftretendem Fieber, oft begleitet von einem juckenden Hautausschlag (**Phase II**). Von nun an dauert es mindestens 6 Monate, bis *T. brucei gambiense* die Blut-Hirn-Schranke überquert und somit **Phase III** des Krankheitsverlaufs einleitet. Durch den Befall des ZNS entstehen Kopfschmerzen, Ausfallerscheinungen, Sprach-, Gang- und Koordinationsstörungen. Zudem leiden die Patienten tagsüber an Apathie und nachts an Schlaflosigkeit, Symptome, die der Krankheit

den Namen gaben. Zurückzuführen ist dies auf eine Störung des Schlaf-Wachrhythmus, der sowohl auf der Prostaglandin-Produktion des Patienten, als auch der Parasiten selbst beruht. Schließlich fallen die Patienten ins Koma. Aufgrund von Mangelernährung oder Sekundärinfektionen nimmt die Krankheit in der Regel einen tödlichen Verlauf, wenn sie unbehandelt bleibt.

1.1.2 Bisherige Behandlungsmethoden

Bis heute gibt es nur wenige Medikamente, die zur Bekämpfung der Schlafkrankheit einsetzbar sind, und die auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe sind zum großen Teil selbst äußerst toxisch. Schon das erste Medikament (Atoxyl[®]), das von Paul Ehrlich 1905 entwickelt worden war, enthielt Arsen und rief unter anderem aufgrund der notwendigen hohen Dosen schwere Nebenwirkungen wie Blindheit hervor. Später wurde Suramin (Germanin[®]) alleine in Phase I und in Kombination mit Tryparsamide auch in Phase II von *T. b. gambiense*-Infektionen eingesetzt. Heute ist Suramin immer noch Mittel der Wahl im frühen Stadium von *T. b. rhodesiense*-Infektionen. Bei der westafrikanischen Trypanosomiasis hingegen wird seit 1941 Pentamidin zur Behandlung bevorzugt. Haben die Parasiten jedoch die Blut-Hirn-Schranke überschritten, so sind diese Stoffe nicht mehr wirksam. Melarsoprol war lange das einzige Medikament, das auch in Phase II und III der Krankheit einsetzbar war. Schon die Applikation dieses Arsenderivats ist äußerst schmerzhaft für die Patienten. Zudem sterben aufgrund der hohen Toxizität 3-10% der Patienten alleine an den Nebenwirkungen von Melarsoprol wie Enzephalopathie. Gelingt es ihnen, dies zu überstehen, leiden nicht wenige an bleibenden Gehirnschäden. Da Melarsoprol sich aber als äußerst effektiv erwiesen hat, und sich die Wirkung zudem mit Nifurtimox steigern lässt, wird es weiterhin verwendet.

Durch Zufall wurde 1985 bei der Suche nach Krebstherapeutika die trypanozide Wirkung von Eflornithin entdeckt. Diese Substanz wirkt als Inhibitor der Ornithindecaboxylase, die eine wichtige Rolle im Polyaminstoffwechsel der Trypanosomen spielt. 1990 hatte es das Zulassungsverfahren der FDA durchlaufen und wurde tatsächlich als Medikament für Phase II und III auf den Markt gebracht. Dabei war es wesentlich besser verträglich als Melarsoprol. Als weiterer Aspekt sei die steigende Resistenz einiger Trypanosomen-Stämme gegenüber Melarsoprol erwähnt. Dies wurde auf einen Defekt des P2-Transporters zurückgeführt (Brun *et al.*, 2001), der unter anderem für die Aufnahme des Arsenderivats verantwortlich ist, aber nicht der einzige Faktor zu sein scheint (Geiser *et al.*, 2005). Die aufwendige Synthese und der nicht gerade gewinnbringende Markt führten jedoch dazu, dass Hoechst Marion Roussel

Einleitung

(heute Aventis) die Produktion von Eflornithin im Jahre 1995 stoppte. Seitdem hatte sich die WHO zusammen mit den „Médecins Sans Frontières“ um alternative Produktionsstätten gekümmert, nachdem sie das Herstellungspatent von Aventis übertragen bekommen hatten. Nach vielen Protesten gelang es der WHO 2001 schließlich, Aventis von einer Neuaufnahme der Produktion für wenigstens 5 Jahre zu überzeugen. Noch vor diesem Abkommen hatte das Unternehmen Bristol Myers Squibb das Lifestyle-Medikament Vaniqa® auf den amerikanischen Markt gebracht und am 20. März 2001 auch in Europa die Zulassung erlangt. Dieses Arzneimittel enthält 11,5% Eflornithin und wird bei Hirsutismus eingesetzt – eine wesentlich lukrativere Einnahmequelle.

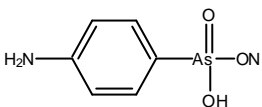
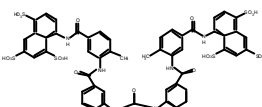
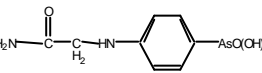
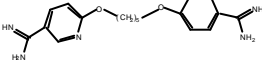
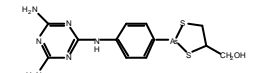
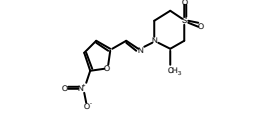
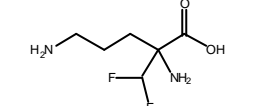
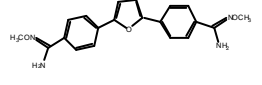
Na-hydrogen-arsanilat (Atoxyl[®])		1905: entwickelt von Paul Ehrlich und Kiyoshi Shiga	obsolet
Suramin (Germanin[®], Bayer)		1921	Phase I <i>T.b.rhodesiense</i>
Tryparsamid		1922	obsolet (damals mit Suramin für Phase II)
Pentamidin (Pentacarinat[®], Aventis/GSK)		1941	Phase I <i>T.b.gambiense</i>
Melarsoprol (Arsorbal[®], Aventis)		1949 In Kombination mit Nifurtimox (Bayer) wirksamer	Phase II+III <i>T.b.gambiense</i>
Nifurtimox (Lampit[®], Bayer)		1975	Normalerweise Behandlung der Chagas-Krankheit (<i>T. cruzi</i>)
Difluormethylornithin (Eflornithin[®], Aventis)		1990: Zulassung 1995: gestoppt 2001: Produktion wurde für 5 a wieder aufgenommen 2006: ?	Phase II+III <i>T.b.gambiense</i>
DB289 (Prodrug von DB75)		2005: Beginn von Klinischen Phase III Studien (Gates Stiftung + North Carolina University)	Phase I

Abb.1-3. Tabelle der Arzneimittel, die gegen die Schlafkrankheit eingesetzt wurden und aktuell werden (Stand 2006). Die Phasen I-III beziehen dabei auf den Infektionsverlauf.

Einleitung

Im Moment befindet sich ein weiterer viel versprechender Arzneistoff in der Klinischen Phase III-Studie. DB289 ist das Amidoxin-Prodrug von DB75 (Lanteri *et al.*, 2006) und wurde unter Finanzierung der Gates Stiftung in der North Carolina University entwickelt (<http://www.bukopharma.de/Service/Archiv/Schlafkrankheit.pdf>/ 2004).

1.2 Biologie der Kinetoplastiden

1.2.1 Systematische Einordnung der Trypanosomen

Trypanosomen gliedern sich in die große **Gruppe der Flagellaten** (Geißeltiere) ein, welche eine große Anzahl parasitischer Organismen einschließt. Im Gegensatz zu den Diplomonadida und Trichomonadida finden Parasiten der **Ordnung Kinetoplastida** ihren Lebensraum vorwiegend in Blut- und Lymphbahnen ihres Wirtes und werden deshalb zu den Haemoflagellaten gezählt. Die Kinetoplastiden erhielten ihren Namen aufgrund des Kinetoplasten, ein DNA-haltiger Abschnitt des Mitochondriums, in der Nähe der Flagellumtasche und teilen sich in die zwei **Unterordnungen** Bodonina (Parasiten mit zwei

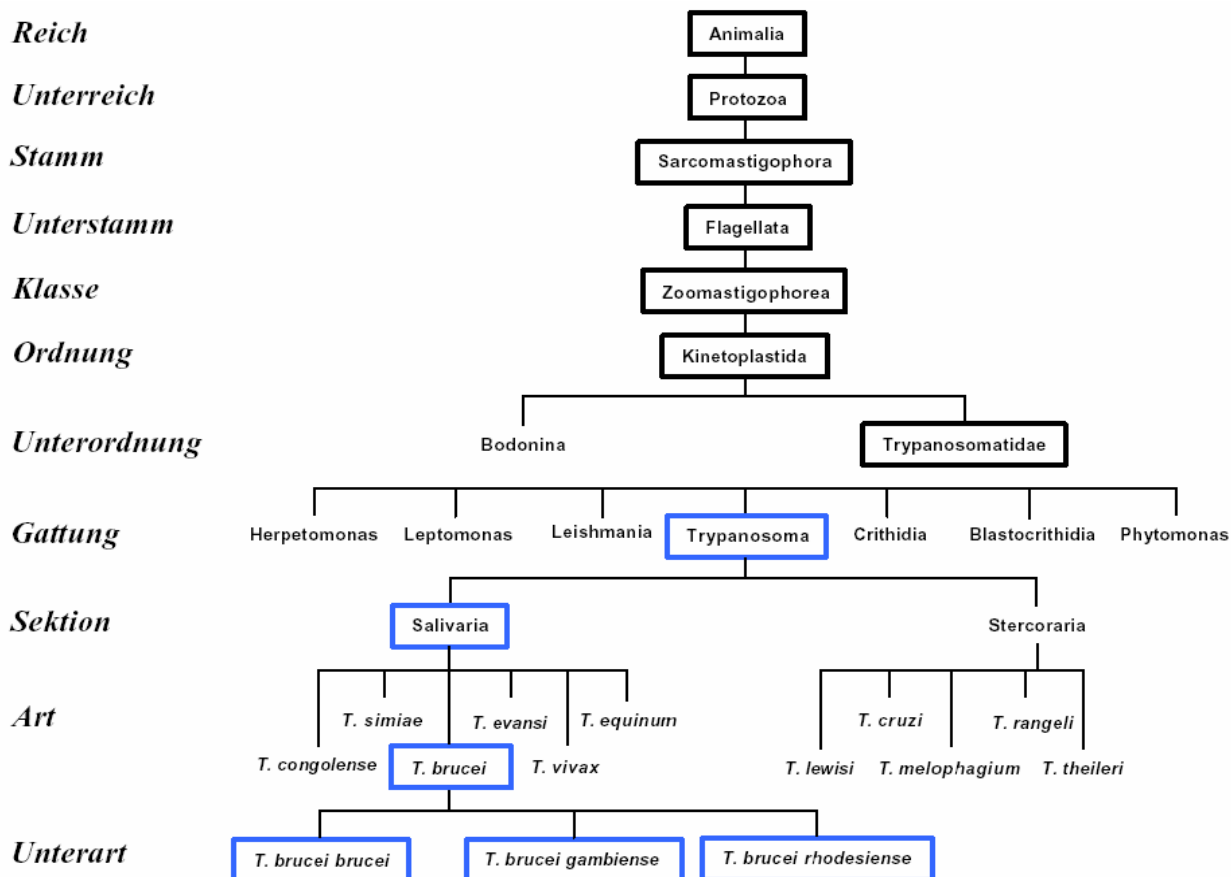


Abb.1-4. Systematische Einordnung von *Trypanosoma brucei*.

[nach Melhorn, H. und Piekarski G, Grundriß der Parasitenkunde, Gustav Fischer Verlag]

Einleitung

Geißeln) und **Trypanosomatidae** (Monoflagellaten) auf. Diese beherbergt nun sieben Gattungen (Abb.1-4), die allesamt spezifische morphologische Veränderungen im Laufe ihres Lebenszyklus vollziehen. Dabei gehören **Trypanosomen** zu den **heteroxenen Arten**, da sich ihr Zyklus über zwei Wirtstypen (Vertebrat und Invertebrat) erstreckt. Die **Gattung Trypanosoma** wird weiterhin in die **Sektionen** Stercoraria, die durch den Fäces des Insektenvektors übertragen werden, und in **Salivaria**, deren Übertragungsweg über den Speichel des Invertebraten vollzogen wird, unterteilt. Den letzteren gehören **alle Unterarten von Trypanosoma brucei** an.

1.2.2 Zellmorphologie

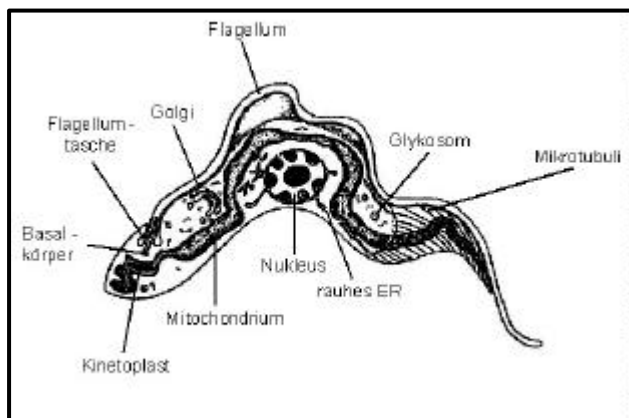


Abb.1-5. Morphologie der Kinetoplastiden, links am Beispiel von *Trypanosoma brucei* nach Vickerman, 1965.

Trypanosomen sind einzellige Parasiten, deren äußere Gestalt durch parallel verlaufende Mikrotubuli stabilisiert wird. Gebildet wird dieses Zytoskelett aus sechs Tubulin-Arten, von denen δ - und ϵ -Tubulin im Basalkörperchen und Flagellum vorkommen (Berriman *et al.*, 2005). Bei den Blutformen ist die Zellmembran zusätzlich von einem Mantel aus *Variant Surface Glycoproteins* (VSG) umgeben, das gegen Prozyklin ausgetauscht wird, sobald sie sich zu Fliegenformen entwickeln. Verankert sind beide Oberflächenmoleküle durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker. Im Laufe des Entwicklungszyklus treten bei *Trypanosoma brucei* sowohl trypomastigote als auch epimastigote Formen auf. Diese Einteilung erfolgt nach der Lage des Flagellumursprungs (Abb.1-5). Durch den Basalapparat ist das Flagellum im Cytoplasma verankert, durchläuft dann die Flagellumtasche und ein Stück an der äußeren Zellmembran entlang. Bei der Fortbewegung entsteht so der Eindruck einer undulierenden Membran. Aufgebaut ist das Flagellum aus einem Netzwerk von Filamenten, die entlang des Axonems (aus dem typischen $9 \times 2 + 2$ Mikrotubulisystem) (Mehlhorn und Piekarski, 1998) läuft. Die Flagellumtasche ist der einzige Ort der Endo- und

Exocytose und daher von *coated discs* oder *vesicles* umgeben, die bei Blutformen z.B. VSG nach außen transportieren und wieder aufnehmen. Auf diesem Wege internalisieren und degradieren die Parasiten aber auch Antikörper des Wirts (Morgan *et al.*, 2002 Part I and II). Stets in der Nähe des Basalapparates befindet sich der **Kinetoplast**, ein Bereich ineinander verflochtener mitochondrialer DNA-Ringe, den Maxi- und Minicircles. Das Mitochondrium selbst erstreckt sich durch die ganze Zelle und besitzt bei den Blutformen eher weniger, bei den prozyklischen Formen sehr viele Cristae.

Neben den für Eukaryonten typischen Strukturen wie Golgi-Apparat, rauem ER und Lysosomen, besitzen Trypanosomen zudem spezielle peroxisomale Organellen, die **Glykosomen**. In diesen läuft der größte Teil der Glykolyse ab, der Hauptstoffwechselweg der Blutformen. Wichtige Calcium-Speicher stellen die Acidocalcisomen dar, die bei Erhöhung des pH-Wertes Ca^{2+} ins Cytosol freisetzen (Vercest *et al.*, 1997).

1.2.3 Zellzyklus

Trypanosoma *ssp.* unterlaufen im Gegensatz zu höheren Eukaryonten eine so genannte geschlossene Mitose, d.h. es kommt während der Zellteilung zu keiner Auflösung der Kernmembran (Duszenko, 1998). Da die Zelle nur ein Mitochondrium besitzt, ist gleichzeitig auch eine Teilung des Kinetoplasten erforderlich. So sind die Teilung des Kerns und des Kinetoplasten zwar gekoppelt, erfolgen aber phasenverschoben und unabhängig voneinander (Woodward and Gull, 1990). Aller Unterschiede zum Trotz kann man auch ihren Zellzyklus in die Phasen G_1 / S/ G_2 / M einteilen.

Eingeleitet wird die Zellteilung durch die Reifung des Pro-Basalkörperchens, aus dem sich anschließend ein Tochterflagellum entwickelt. Der in der Nähe liegende Kinetoplast tritt nun in die S-Phase ein, gefolgt von der nuklearen S-Phase. Durch die Mikrotubuli trennen sich mit den Basalkörperchen auch die Kinetoplasten in der frühen G_2 -Phase (Robinson and Gull, 1991). Bei den Blutformen wird hierbei der Kinetoplast an das hintere Ende bewegt, bei prozyklischen Formen wandert er ungefähr auf halbem Weg zum Kern. Abschließend erfolgt die Mitose.

Reguliert werden diese Schritte durch Interaktion von *cdc2-related kinases* (CRKs) mit Cyclinen. In *Trypanosoma brucei* wurden bisher sechs CRKs, 1-4 und 6-7, identifiziert und kloniert (Mottram and Smith, 1995; Hammarton *et al.*, 2003 B), die das typische Cyclin-Bindemotive ‚PSTAIRE‘ - wenn auch abgewandelt - enthalten. Auch phosphorylierbare und somit regulierbare Threonin- und Tyrosin-Reste (Van Hellemond *et al.*, 2000) mit Ähnlichkeit

zu CDC1 in Hefe sind vorhanden. Die am besten untersuchte Kinase TbCRK3 spielt zusammen mit dem Cyclin TbCYC2 eine Rolle beim Übergang G₁/S (Van Hellemond *et al.*, 2000; Hammarton *et al.*, 2004). Die Mitose und Zytokinese beeinflusst sie hingegen durch Wechselwirkung mit TbCYC6 in G₂/M (Hammerton *et al.*, 2003 B). Von den acht bisher entdeckten Cyclinen CYC2-9 in *Trypanosoma brucei* sind CYC3, 6 und 8 an der Mitose beteiligt, während die anderen Homologien zu Cyclin C, PREG1 (*Neurospora crassa*) oder PHO80 (*Saccharomyces cerevisiae*) besitzen (Hammarton *et al.*, 2003 A).

1.2.4 Besondere Organellen: Glykosomen

Glykosomen sind mit den Peroxisomen höherer Eukaryonten und pflanzlichen Glyoxysomen verwandte Organellen. Gleichermaßen besitzen sie eine Membran und kein eigenes Genom.

Aufbau und Signalpeptide scheinen ähnlich zu den Peroxisomen zu sein, auch wenn noch nichts Genaueres über die Proliferation von Glykosomen bekannt ist (Parsons *et al.*, 2001).

Viele glykosomale Proteine besitzen die typische *peroxisomal targeting sequence 1* (PTS-1) am C-Terminus, die auch hier zur Lokalisierung notwendig ist (Sommer *et al.*, 1992). Eine der N-terminalen PTS-2 ähnliche Sequenz wurde in der trypanosomalen Aldolase entdeckt (Blattner *et al.*, 1995). Von den Proteinen, die zum Aufbau der Glykosomen notwendig sind, wurden bisher Analoga zu PEX2, PEX5, PEX6, PEX10, PEX11, und PEX12 gefunden (De Walque *et al.*, 1999; Flaspohler *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1998; Krazy *et al.*, 2006).

Ist die Glykolyse in höheren Eukaryonten im Cytosol lokalisiert, so läuft sie bei den Kinetoplastiden in den Glykosomen ab. Allerdings gelangt weder ATP noch NAD durch die Glykosomenmembran. Die Energie aus der Glykolyse beziehen die Parasiten so ausschließlich durch die letzten Schritte (Umwandlung des 3-Phosphoglycerats zu Pyruvat), die im Cytosol ablaufen (Duszenko, 1998). Die Kompartimentierung der Glykolyse stellt so eine Variante der Regulation dar, da die typischerweise regulierbaren Enzyme dieses Stoffwechselweges diese Eigenschaft in Trypanosomen nicht besitzen (Opperdoes, 1987).

Eine weitere zusätzliche Eigenschaft der Glykosomen ist der Umbau von Purinen, die vom Wirt aufgenommen wurden. So finden sich hier Enzyme wie die Hypoxanthin:Guanin-Phosphoribosyltransferase oder die Adenin-Phosphoribosyltransferase (Jardim *et al.*, 1999). Trypanosomatiden besitzen keine Möglichkeit für eine *de novo* Synthese von Purinen und sind so auch auf diesen Stoffwechselweg angewiesen (Parsons *et al.*, 2001).

Wie die Peroxisomen sind auch die Glykosomen Ort der Ether-Lipid-Biosynthese. Etherlipide spielen bei Leishmanien eine wichtige Rolle, da sie einen Bestandteil der GPI-Anker von Oberflächenmolekülen darstellen.

1.3 Differenzierung in *Trypanosoma brucei*

1.3.1 Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei*

Bei einer Blutmahlzeit von *Glossina ssp.* gelangen metazyklische Formen von *Trypanosoma brucei* über deren Speicheldrüse in die Blutbahn des Vertebraten, welche sich durch den Wechsel der Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Nahrungsangebot zu Blutformen transformieren (Abb.1-6). Diese werden als slender-Formen bezeichnet, teilen sich schnell und sind somit verantwortlich für den Anstieg der Parasitämie. Da das Angebot an Glucose in der Blutbahn des Wirtes so reichhaltig ist, genügt es ihnen, die benötigte Energie allein aus der Glykolyse zu generieren, was die starke Rückbildung des Mitochondriums dieser Formen erklärt. Um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, besitzen die Blutformen um ihre Membran einen Mantel aus ca. 10^7 Molekülen des *Variant Surface Glycoproteins* (VSG). Während der Infektion unterliegen diese einem ständigen Wandel, aber der Großteil der Parasiten weist zu einem Zeitpunkt die gleiche VSG-Variante auf. Wenn es dem Wirt gelungen ist, Antikörper gegen diese Variante zu bilden, wird die Parasitämie stark reduziert. Einige Zellen exprimieren jedoch eine andere Variante, gegen die der Körper nicht immun ist, und können ihrerseits wieder für einen Anstieg der Population sorgen. Auf diese Weise entsteht für den Vertebraten ein phasischer Infektionsverlauf. Innerhalb der Blutbahn können slender-Formen aber auch in die teilungsdefizienten stumpy-Formen differenzieren. Dies besitzt den Vorteil, dass die Trypanosomen die Parasitämie selbst in Grenzen halten können, und den Wirt nicht zu früh durch zu starke Vermehrung zerstören. So erhöhen sie die Chance, wieder von einer Tsetse-Fliege aufgenommen und weiter verbreitet zu werden. Zudem produzieren stumpy-Formen Prostaglandin D₂, welches im Blut schnell in weitere Metabolite wie PGJ₂, Δ¹²-PGJ₂ und 15-deoxy-PGJ₂ umgewandelt wird, die alle einen „Programmierten Zelltod“ dieser Stadien induzieren (Figarella *et al.*, 2005 und 2006). Somit konnte auch ein altruistisches Verhalten in einzellige Organismen wie Trypanosomen gezeigt werden (Duszenko, 2006). Abgesehen davon besitzen stumpy-Formen einen weiteren Vorteil für die Population: Nimmt eine Tsetse-Fliege Parasiten bei einem Stich auf, so können sich nur die stumpy-Formen in prozyklische Formen transformieren. Im Gegensatz dazu sterben die

Einleitung

slender-Formen aufgrund des geringen Glucoseangebots und zu niedriger Temperaturen im Verdauungstrakt der Fliege. Stumpy-Formen hingegen aktivieren schon Teile der Atmungskette und sind somit für das Umfeld in der Fliege präadaptiert. Prozyklische Formen besitzen einen voll funktionsfähigen Citratzyklus und nutzen für ihren Stoffwechsel vorwiegend Prolin. Den VSG-Mantel der Blutformen tauschen sie gegen das weniger dichte Prozyklin aus. Die ersten, trypomastigoten Formen, teilen sich rasch und befinden sich im hinteren Teil des Verdauungstrakts. Nach ungefähr 10 Tagen wandern sie in die vorderen Teile, über den Ösophagus und Pharynx bis hin zu den Speicheldrüsen. In dieser Zeit wandeln sie sich zuerst in die epimastigote Form um und differenzieren nach mehreren Tagen in den Speicheldrüsen schließlich zu infektiösen metazyklischen Fliegenformen. Um sich später den Bedingungen im Blut des Vertebraten anpassen zu können, besitzen diese ein bereits zurückgebildetes Mitochondrium und eine erste „metazyklische“ Variante des VSG-Mantels. So kann der Zyklus von neuem beginnen...

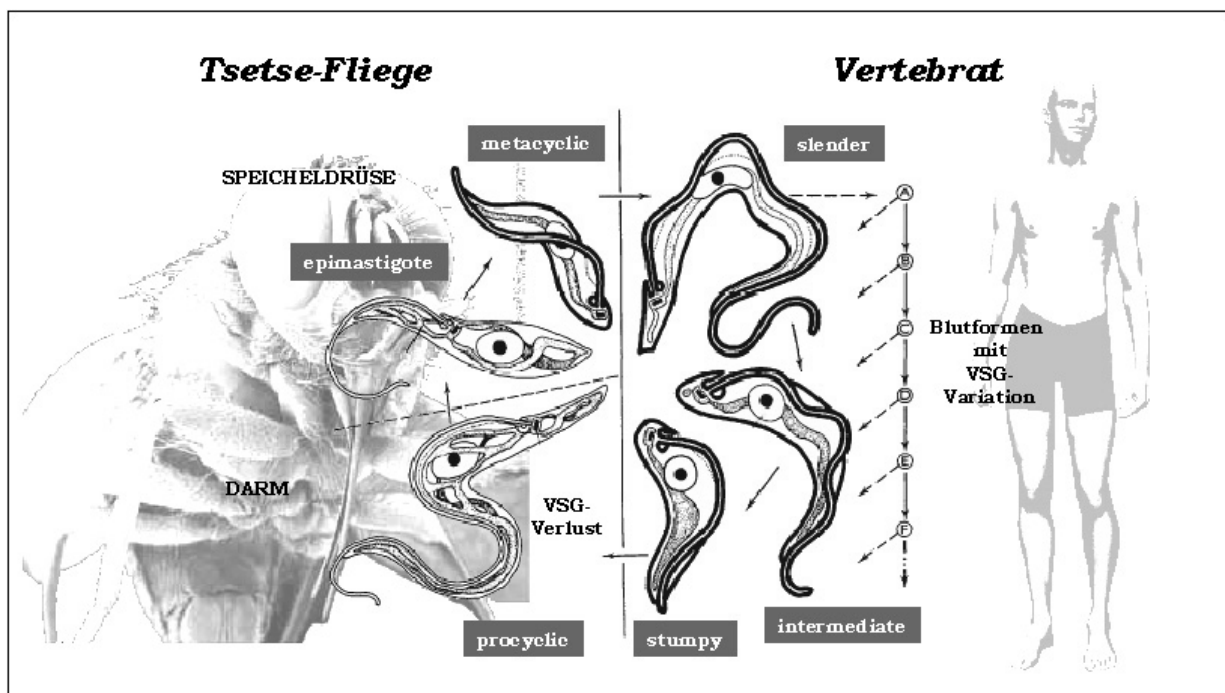
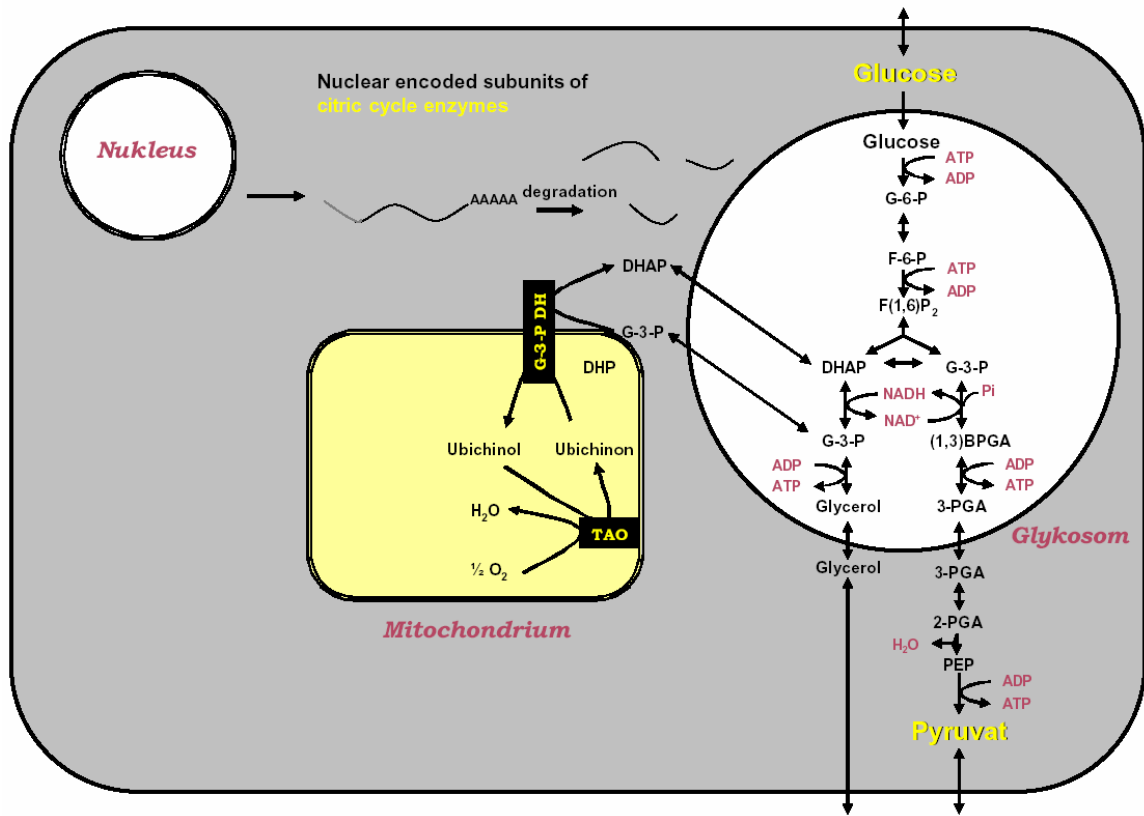


Abb.1-6. Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*, erstellt nach Vickerman, 1969. Nimmt eine Tsetse-Fliege ihre Blutmahlzeit, treten die infektiösen metazyklischen Parasiten in die Blutbahn des Vertebraten und entwickeln sich zu slender-Formen. Dort differenzieren sie über eine morphologisch und metabolisch intermediäre Form zu teilungsdefizienten stumpy-Parasiten. Werden diese präadaptierten Entwicklungsstadien von einer Tsetse-Fliege aufgenommen, können diese unter Verlust ihres VSG-Mantels zu prozyklischen Fliegenformen transformieren, die ein voll entwickeltes Mitochondrium besitzen und als Hauptenergiequelle nun Prolin nutzen.

1.3.2 Differenzierung von *slender* zu *stumpy*: Bekannte Veränderungen und Offenes

Schon 1965 entdeckte Keith Vickerman den Polymorphismus afrikanischer Trypanosomen, und beobachtete Gestaltsänderungen nicht nur beim Wechsel von Wirt zu Vektor, sondern auch im Blutstrom des Vertebraten selbst (Vickerman, 1965). Dabei treten zwei Formen auf, deren Übergang als *intermediate* bezeichnet wird. Slender-Formen sind von schlanker Gestalt, äußerst beweglich und besitzen eine hohe Teilungsrate. Die Energie, die sie benötigen, gewinnen sie vollständig aus der Glykolyse, was aufgrund des hohen Glucose-Angebots im Blut nahe liegt. Das hierbei gebildete Pyruvat wird einfach wieder von den Zellen abgegeben und kann in der Leber zur Glukoneogenese verwendet werden (Abb.1-7). Innerhalb des Glykosoms herrscht ein Gleichgewicht an Reduktionsäquivalenten, für das jedoch ein shuttle-Mechanismus über die TAO (Trypanosomale Alternative Oxidase) notwendig ist. So kann die mitochondriale G-3-Phosphat-Dehydrogenase das ausgeschleuste Glycerol-3-Phosphat in Dihydroxyaceton-Phosphat umwandeln, und dieses wieder in die Glykolyse einmünden. Unter anaeroben Bedingungen funktioniert dieser shuttle-Mechanismus jedoch nicht, und es entsteht vermehrt Glycerol, das ebenfalls ausgeschieden wird. Bei den teilungsdefizienten stumpy-Formen besitzt dieser Mechanismus immer noch Gültigkeit, das Mitochondrium ist aber bereits stärker differenziert und beinhaltet Teile der Atmungskette. Dies wirkt sich in einem erhöhten mitochondrialen Membranpotential (ψ_m) aus und hat gleichzeitig zur Folge, dass die Zelle während der Energiegewinnung nun auch Succinat produziert (Bienen *et al.*, 1991). Gleichzeitig erhöht sich die Cyano-Sensitivität der Zelle, während der Sauerstoffverbrauch bei den slender-Formen allein durch Salicylhydroxamsäure (Hemmung der TAO) inhibiert werden kann (Bienen *et al.*, 1981). Auch manche Transkripte der Atmungskette werden nun nicht mehr sofort degradiert, sondern besitzen höhere Stabilität und werden in Proteine translatiert (Priest and Hajduk, 1994). Dies gilt sowohl für die mitochondrial kodierten Untereinheiten der Cytochrom Oxidase, als auch für kernkodierte Proteine wie Cytochrom C. Nicht zuletzt verbessert sich die Fähigkeit der Zellen, proteolytischem oder durch niedrige pH-Werte verursachtem Stress standzuhalten (Nolan *et al.*, 2000), was ein nicht unbedeutender Vorteil bei der Aufnahme der Parasiten durch die Tsetse-Fliege ist.

Energiemetabolismus in slender Formen:



Energiemetabolismus in stumpy Formen:

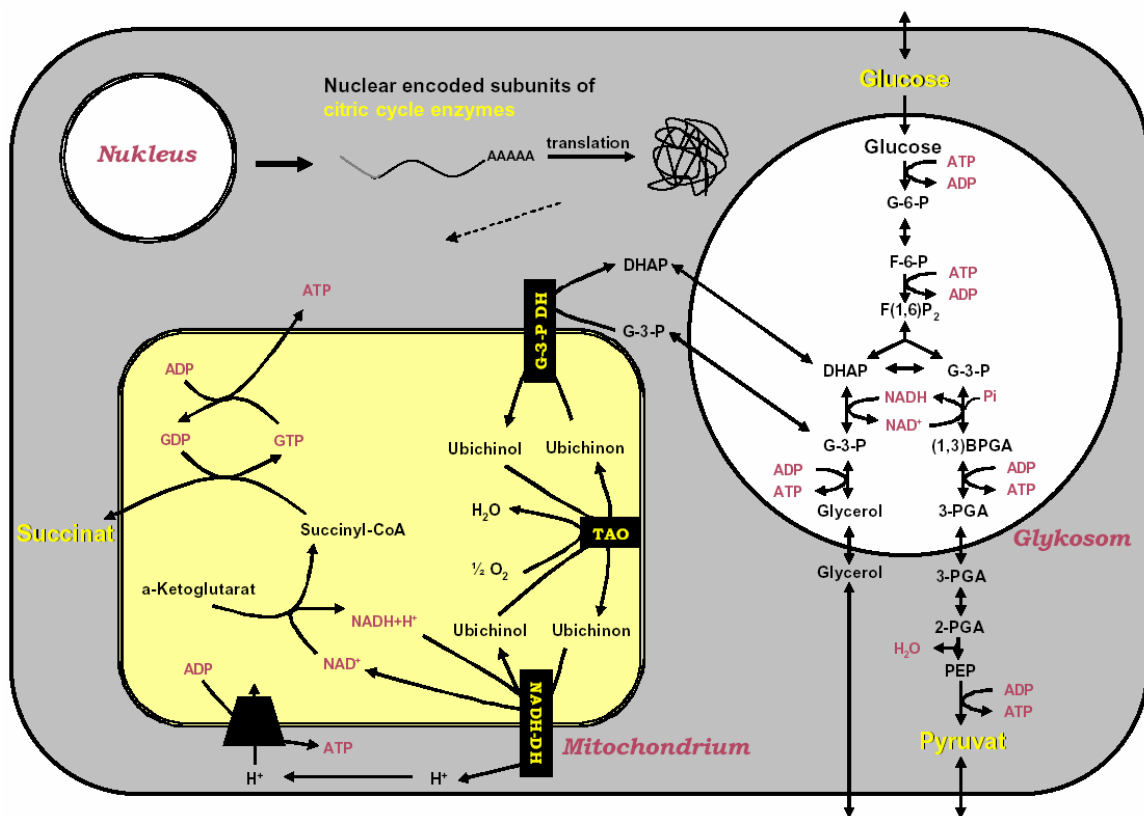


Abb.1-7. Energiestoffwechsel von slender- und stumpy-Formen im Vergleich.

Einleitung

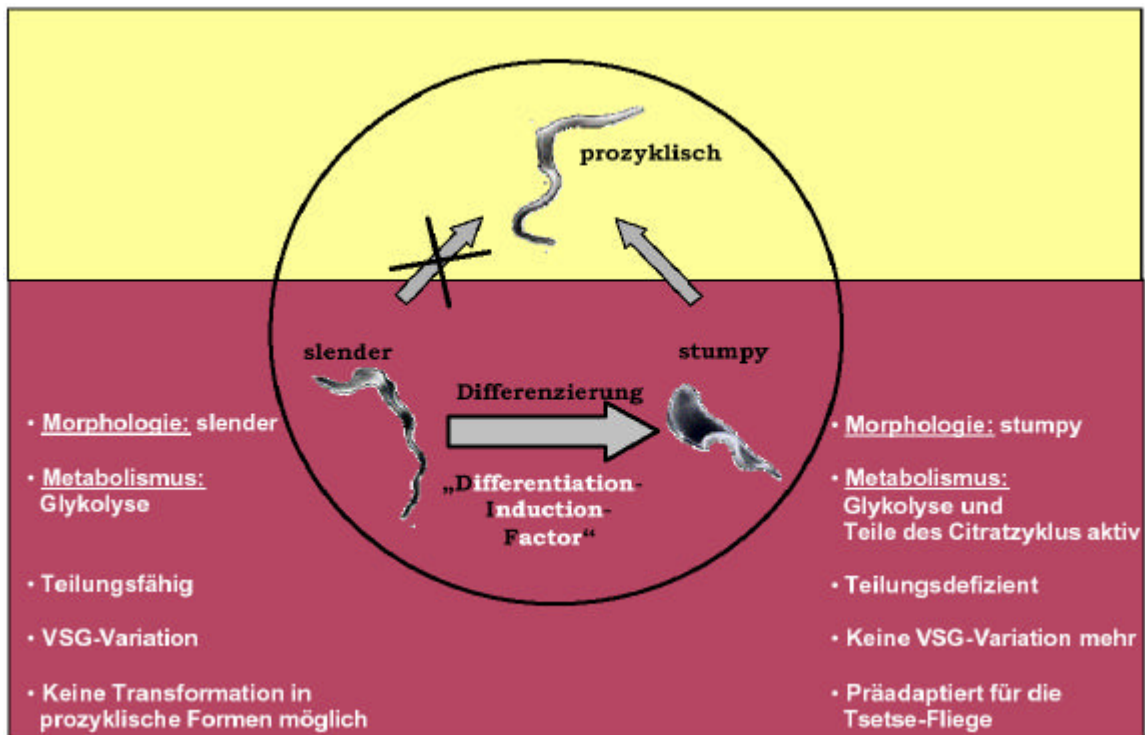


Abb.1-8. Zusammenfassung der wichtigsten Merkmale von slender- und stumpy-Formen.

Sind die Differenzierungsmerkmale von slender- und stumpy-Formen schon lange bekannt (Abb.1-8), so gelang die Aufklärung des Mechanismus, der diesen Veränderungen zu Grunde liegt, bisher nur in Ansätzen. Ein einflussreicher Aspekt stellt offensichtlich die Zelldichte dar (Hamm *et al.*, 1990; Hesse *et al.*, 1995; Reuner *et al.*, 1997; Seed and Black, 1997). Werden Blutform-Kulturen in der logarithmischen Phase ihres Wachstums immer wieder auf eine geringere Zelldichte verdünnt, so können die Parasiten stets von neuem hochwachsen. Haben Sie jedoch einmal eine gewisse Zelldichte erreicht, so treten sie in die stationäre Phase ein, gleichbedeutend mit einem Zellzyklusarrest. Offensichtlich liegt diesem Arrest nicht ein einfacher Mangel an Nährstoffen zu Grunde, da die Zellen auch nach Verdünnen der Kultur nicht mehr in den Zellzyklus zurückkehren. Aus dieser Tatsache heraus entwickelte sich die Idee des *quorum sensing* durch die Produktion eines **Differenzierungs- oder Stumpy Induktions-Faktors (DIF/SIF)** trypanosomalen Ursprungs (Hamm *et al.*, 1990; Vassella *et al.*, 1997). In vielen Bakterien wurde dieses Phänomen schon als Folge der Akkumulation bestimmter Signalstoffe wie z.B. von Homoserinlactonen untersucht, die mit einem Targetprotein interagieren und nach Bindung an die DNA so bestimmte Gene aktivieren (Fuqua und Greenberg, 2002). Es wird angenommen, dass dieser Differenzierungsfaktor, hat er sich einmal im Medium oder Blut angereichert, über einen Rezeptor am Parasiten selbst, eine Differenzierung über eine noch unbekanntes Signalkaskade induziert (Abb.1-9). Allerdings ist es bis heute nicht gelungen, diesen Faktor zu isolieren und zu identifizieren. In

Einleitung

den nachgeschalteten Signaltransduktionsweg scheint der *second messenger* cAMP involviert zu sein (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002), was durch den Einsatz membranpermeabler Analoga wie CPT-cAMP nachgewiesen werden konnte. Dafür könnte eine Adenylatzyklase (ESAG4) verantwortlich sein (Pandavoine *et al.*, 1992; Pays *et al.*, 2001), die eine große extrazelluläre Liganden-Bindedomäne aufweist und nur in Blutformen exprimiert wird. Bewiesen sind diese Hypothesen allerdings noch nicht. Eine weitere wichtige Rolle in der frühen Phase der slender/stumpy Differenzierung spielt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Stojdl and Clarke, 1996), die zu diesem Zeitpunkt absinkt, um sich dann konstant auf einem niedrigeren Level einzupendeln. Auch die zellulären Speicher beinhalten weniger Ca^{2+} , was sich nach Behandlung mit 10 μM Thapsigargin zur Entleerung zeigte. Ein negativer Regulator der Differenzierung, der für die Progression des Zellzyklus mitverantwortlich scheint, ist die MAP-Kinase 5 (Domenicali-Pfister *et al.*, 2006). Allerdings führte ein *knock out* dieses Proteins nicht zu einem vollständigen Zellzyklus-Arrest, so dass noch andere Proteine beteiligt zu sein scheinen. Weitere molekulare Mechanismen sind nicht bekannt.

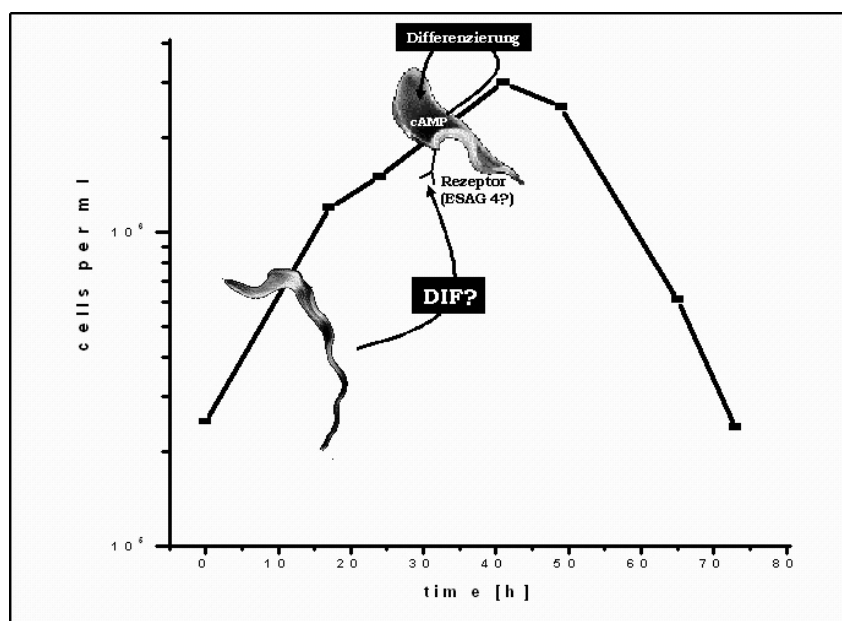


Abb.1-9. Schema der slender-/ stumpy-Differenzierung nach bisherigen Erkenntnissen.

Neben den erwähnten physiologischen Einflüssen, ist es *in vitro* auch gelungen, eine Art Differenzierung mit anderen, zelltoxischen Substanzen einzuleiten. 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-methylhydrazin ist eine methylierende Substanz und konnte *in vivo* und *in vitro* stumpy-Formen nach 1,5 bis 2 d hervorrufen (Penketh *et al.*, 1991). Durch die hervorgerufenen DNA-Schäden entstand ein unphysiologischer Zellzyklusarrest in der G_2 -Phase und brachte stumpy-Vorläuferformen mit 4-6fachem DNA-Gehalt hervor. Erst später entwickelten sich diese zu

nicht infektiösen stumpy-Formen, die sich gut zu prozyklischen Formen transformieren ließen. DL- α -Difluormethylornithin (DFMO) induzierte stumpy-Formen hingegen waren in der G₁/S-Phase arretiert, ließen sich nicht in Fliegenformen umwandeln (Giffin *et al.*, 1986), und stellen daher auch keine physiologisch relevante Form da. Dabei hemmt DFMO irreversibel die Ornithin Decarboxylase, ein Schlüsselenzym in der Polyamin-Synthese, und führt so zu stark reduzierten Mengen von Putrescin und Spermidin. Letzteres ist ein wichtiger Baustein für die Synthese des Trypanothions, bestehend aus zwei Molekülen Glutathion, die kovalent über Spermidin miteinander verbunden sind. Ebenso wie Glutathion in anderen Eukaryonten, dient Trypanothion als Schutz der Zelle vor Oxidantien. Polyamine sind zudem zur Stabilisierung der DNA von großer Bedeutung, und so entsteht die stumpy-Induktion bei DFMO wahrscheinlich auch über Schäden innerhalb der Zelle, u.a. der DNA. Auch Zellzyklusarrest in der G₂/M- und M/G₁-Phase durch Aphidicolin und Hydroxyurea riefen stumpy-ähnliche Formen hervor (Mutomba and Wang, 1998).

1.4 Das Genom von *T. brucei*: Mechanismen und Regulation der Genexpression

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten, die einen spezifischen Chromosomensatz besitzen, existieren im Nucleus von *T. brucei* 11 Megabasen-Chromosomen und eine unspezifische Anzahl von „*intermediate-sized*“ Chromosomen von 30-700 kb. Im Jahre 2005 ist es gelungen, das auf den 11 Megabasen-Chromosomen lokalisierte Genom zu entschlüsseln (Berriman *et al.*, 2005), welches insgesamt 26 Megabasen umfasst. Dabei tragen beide DNA-Stränge einander nicht überlappende *gene cluster* (Hall *et al.*, 2003; El-Sayed *et al.*, 2003). Kodiert sind insgesamt 9068 Gene, die vornehmlich in polycistronischen Transkriptionseinheiten, ähnlich den Prokaryonten, angeordnet sind.

1.4.1 Transkription der proteinkodierenden Gene und der *Spliced Leader* – RNA:

Die meisten **proteinkodierende Gene** werden analog zu höheren Eukaryonten, von **Polymerase II** transkribiert, die aber auch für die *Spliced-Leader* (SL) RNA und *small nucleolar* RNA zuständig ist (Clayton, 2002). Zunächst werden alle Gene einer Transkriptionseinheit zu einer prä-RNA abgelesen (Abb.1-10). Zwischen den einzelnen Genen liegen U-reiche Poly-Pyrimidineinheiten, die als Erkennungssignal für das sog. Transplicing dienen und den AG-Akzeptor-Stellen für den *Spliced-Leader* vorangehen. Gleichzeitig werden die SL-RNAs in *clustern* abgelesen und an deren 5'-Ende ein Cap

Einleitung

angeheftet. Werden die proteinkodierenden RNA-Einheiten an den erwähnten Bereichen auseinander geschnitten, so wird an jedes 5'-Ende eine SL-RNA angefügt. Die Polyadenylierung erfolgt am 3'-Ende in einem festen Abstand von 100-400 bp *upstream* des *splicing* Signals. Promotoren sind für proteinkodierende Gene noch nicht charakterisiert, jedoch sind sie wohl zusammen mit Terminationssignalen am Ort bidirektionaler Transkriptionsinitiation und am Ende von Polymerase II-TE lokalisiert, wo auch Gene für tRNA zu finden sind.

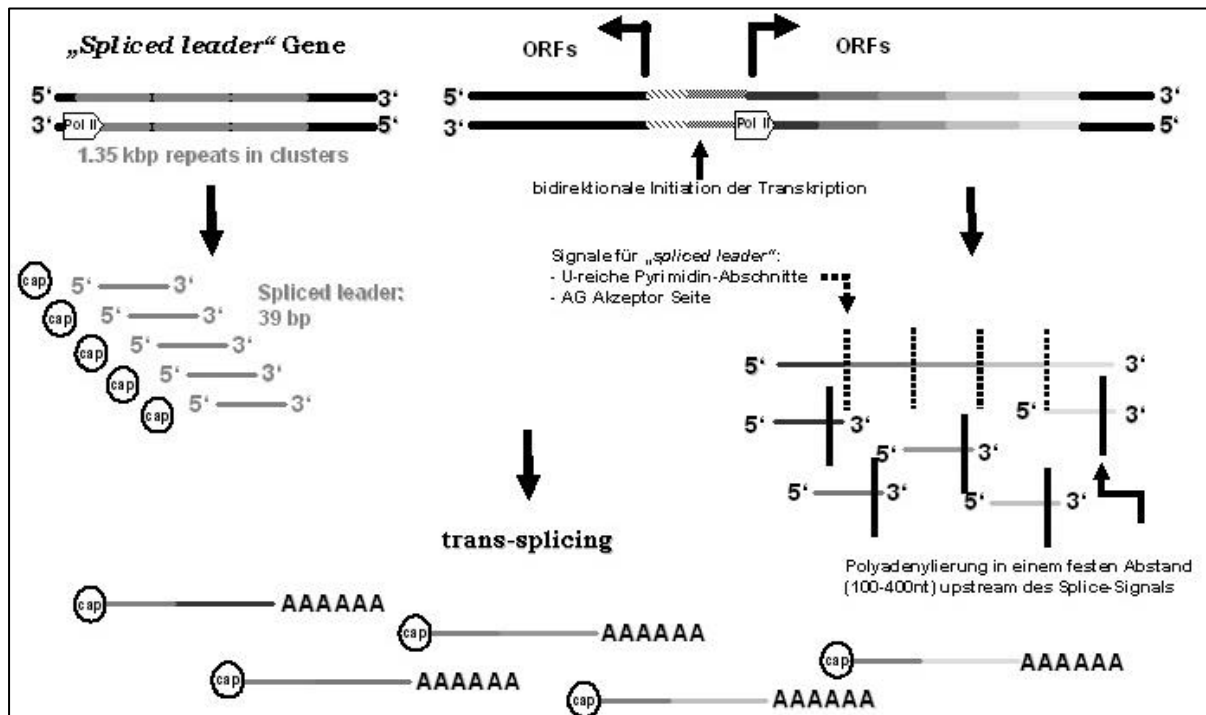


Abb.1-10. Transkription von proteinkodierenden Genen in polycistronischen Transkriptionseinheiten und *trans-splicing* (Anfügen der SL-RNA).

Regulation von Polymerase II- transkribierten Genen: Läuft die Regulation der Genexpression bei höheren Eukaryonten vorwiegend auf dem Level der Transkriptionsinitiation ab, so wurden bei Trypanosomen hierfür bisher keine Transkriptionsfaktoren gefunden. Die Parasiten bedienen sich daher anderer, vor allem posttranskriptionaler Mechanismen, um ihr Expressionsmuster dem Entwicklungsstadium anzupassen. Die 3' *untranslated regions* (UTR) besitzen sowohl Einfluss auf die Schnelligkeit der RNA-Degradierung als auch auf die Translations-Effizienz des betroffenen Gens (Blattner and Clayton, 1995; Charest *et al.*, 1996; Coughlin *et al.*, 2000; Brittingham *et al.*, 2001). Bei regulierten Genen finden sich darauf AU-reiche Elemente, die sich auch in 3'UTRs von Säuger-mRNA befinden (Mitchell and Tollervey, 2000). Desweiteren besitzt *Trypanosoma brucei* ein ausgeklügeltes RNAi-System, das in die Regulation involviert zu

sein scheint (Djikeng *et al.*, 2001; Clayton, 2002). Diese Art der Regulation genügt jedoch häufig nicht, Unterschiede von RNA zu Proteinmenge zu erklären, so dass zusätzlich ein posttranslationaler Degradationsmechanismus vermutet wird (Priest und Hajduk, 1994).

Um, im Gegensatz dazu, eine besonders hohe Transkriptionseffizienz zu erreichen, sind einige Gene wie z.B. β -Tubulin in *tandem-repeats* angeordnet (in diesem Falle 30) und werden auf diese Weise häufiger abgelesen und translatiert.

Regulation der SL-RNA:

Die Transkription von SL-RNA hingegen ist weit besser bekannt. Luo *et al.* (1999) konnten in *Leptomonas seymouri* den SL-Promotor identifizieren, der ca. 100 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunktes liegt. Er beinhaltet drei Strukturen, ein Initiator (Inr)-Element und zwei, weiter *upstream* gelegene Elemente, PBP-1E und PBP-2E (Luo *et al.*, 1999). Ähnliche Strukturen wurden auch in den verwandten Kinetoplastiden *T. brucei*, *T. cruzi* und *L. amazoniensis* gefunden (Campbell *et al.*, 2000). Reguliert wird die Transkription des *spliced leaders* u.a. über einen Transkriptionsfaktor von 122 kDa, der an die PBP-1E-Struktur bindet. PBP-1 ist ein Komplex aus drei Protein-Untereinheiten von der Größe 57, 46 und 36 kDa (Das und Bellofatto, 2003). p46 besitzt di-Leucin-Motive, die bedeutsam für Proteininteraktionen sind, und scheint ein für *Leptomonas* sehr spezifisches Peptid zu sein. Zu p57 hingegen existieren ähnliche Sequenzen im Genom von *T. brucei* und *L. major* (Landfear, 2003). Dieses Peptid ist zudem verwandt mit der SNAP50-Untereinheit des humanen SNAPc, ein Faktor der für die Transkription der snRNA verantwortlich ist. Auch in *T. cruzi* wurde ein PBP-1 Protein gefunden, das jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit p46 oder p57 besitzt (Wen *et al.*, 2000).

Für *T. brucei* charakterisierten Schimanski *et al.* (2004) den **SL-Promotor**, der analog aus einem zweiteiligen USE (*upstream sequence element*) und einem Initiator-Element aufgebaut ist. Dieser tritt mit einem Transkriptionskomplex aus sechs Peptiden in Wechselwirkung: trypanosomales SNAPc aus den Untereinheiten **TbSNAP50**, **TbSNAP3** und **TbSNAP2-P**, **TRF4** (*TBP-related factor 4*) und das aus zwei Untereinheiten bestehende **TbTFIIA** (Schimanski *et al.*, 2005) (Abb.1-11).

TRF4 ist ein fast alle Transkriptionen übergreifender Faktor in *T. brucei* und wurde 2004 von Ruan *et al.* charakterisiert. Dabei handelt es sich um einen mit dem TATA-bindenden Protein (TBP) verwandten Faktor. TRFs kommen auch in multizellulären Organismen wie *Xenopus*, *Caenorhabditis elegans* und Mäusen vor (Dantonel *et al.*, 2000; Veenstra *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), wo sie an Prozessen wie Zellzyklus und Stressantwort der Zellen beteiligt sind

(Shimada *et al.*, 2003). Im Falle von TRF4 birgt der C-Terminus ca. 30% Identität mit anderen TBPs oder TFRs in *Drosophila*, der N-Terminus erbrachte jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen. TRF4 ist sowohl in die Transkription von Prozyklin durch Polymerase I, von SL-RNA durch Polymerase II und U-snRNA durch Polymerase III involviert (Ruan *et al.*, 2004) und bindet auch nahe den 3'-Enden mancher proteinkodierender Gene. Dennoch besitzt es nicht die typischen Phenylalanin-Reste für Interaktionen mit der TATA-Box, was eine andere Bindungsstruktur der Promotoren suggeriert (Guillebault *et al.*, 2002). Mit **TFIIB** wurde mittels Datenbanksuche in *T. brucei*, *L. major* und *T. cruzi* ein zusätzlicher Faktor entdeckt, der zur Transkription der SL-RNA sowohl mit Polymerase II als auch mit TRF4 interagiert (Palenchar *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2006). Er besitzt eine Masse von ca. 38 kDa, ein Zn-Bindemotiv am N-Terminus und Cyclin-Bindemotive am C-Terminus, die zur Interaktion mit der DNA und TRF4 dienen. Er ist essentiell für die Synthese der SL-RNA und so für das Überleben der Zellen jedes Entwicklungsstadiums unentbehrlich.

Die Termination der SL-Transkription wird mitunter durch Poly-T-Elemente eingeleitet, analog zur Polymerase III-Transkription in höheren Eukaryonten (Sturm *et al.*, 1999).

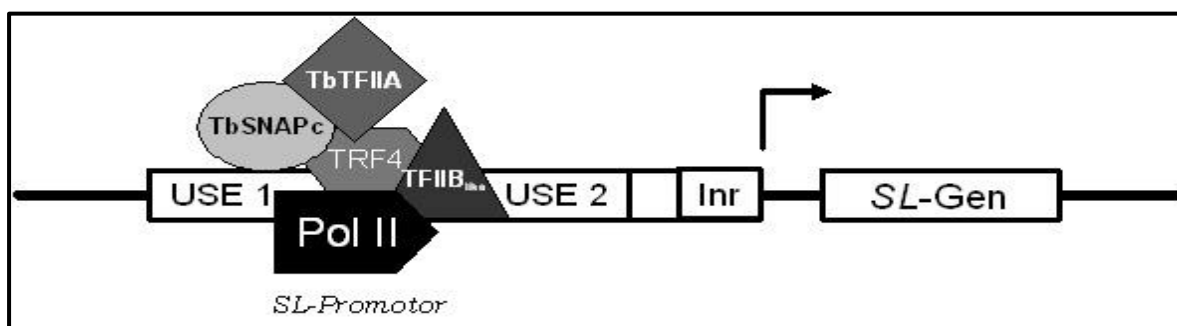


Abb.1-11. Der Initiationskomplex zur Transkription der SL-RNA (Stand 2006). TbSNAPc besteht aus drei Untereinheiten (TbSNAP50, TbSNAP3 und TbSNAP2-P), während TbTFIIA aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist. Die beiden US-Elemente sind wahrscheinlich direkt in die Bildung des Initiationskomplexes involviert und so für die ausreichende Transkription der SL-RNA von Bedeutung.

1.4.2 Transkription der *transfer-* und *U small nuclear RNA*:

Polymerase III transkribiert die tRNAs und die meisten U-snRNAs. Für die Transkription der U-RNAs (gezeigt an U2, U3 und U6 RNA) werden sowohl bestimmte Elemente innerhalb eines Gens als auch zwei Bereiche, die am 5'-Ende angrenzen, benötigt (Fantoni *et al.*, 1994). Diese externen A- und B-Boxen befinden sich innerhalb von tRNA- oder tRNA-ähnlichen Genen (Nakaar *et al.*, 1994; 1995; 1997) in einem konservierten Abstand von 95-99 bp. Während die relative Lage der A-Box zum U-Transkriptionsstart von großer Bedeutung

für die Transkription ist, spielt die B-Box wohl nur eine Rolle beim *remodelling* des Chromatins. Um die Polymerase III zur t-RNA Transkription zu rekrutieren, bindet sie an den Faktor **TFIIIB** (Nakaar *et al.*, 1997). Es befinden sich 65 tRNA- und 5 snRNA-Gene im Genom von *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005).

1.4.3 Transkription der *ribosomalen* RNA, der *VSG-expression site* und *GPEET/EP*:

Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten transkribiert die **Polymerase I** von *T. brucei* sowohl rRNA als auch die Oberflächenproteine VSG der Blutformen und GPEET/EP der prozyklischen Parasiten. Dieses Enzym besitzt eine extrem hohe Effektivität, so dass auch ohne Tandem-Repeats der Gene große Mengen an Transkripten entstehen.

Regulation der rRNA:

Der rRNA-Promotor besteht aus vier Boxen, von denen die vierte am weitesten *upstream* des Transkriptionsstartpunktes liegt. Er besteht aus zwei Elementen rUSE1 und rUSE2, die eine große Ähnlichkeit zum USE des SL-RNA-Promotors besitzen. Für die Regulation scheinen diese Elemente nur indirekte Funktion zu besitzen, evtl. durch Umordnung des Chromatins (Schimanski *et al.*, 2004).

Regulation der *VSG-expression site*:

Im Genom von *T. brucei* sind ca. 1000 nicht-exprimierte VSG-Gene vorhanden, die meist in den Telomer-Regionen liegen. Nur 7% dieser VSG-Gene sind voll funktionsfähig, 9% dagegen atypisch, 66% Pseudogene und 18% Gen-Fragmente (Berriman *et al.*, 2005). Die Oberfläche eines Trypanosoms ist zu einem Zeitpunkt mit ein und demselben VSG-Typ bedeckt, d.h. es wird nur eine VSG-Variante exprimiert. Die Transkription an anderen so genannten *VSG-expression sites* wird hingegen kurz nach der Initiation abgebrochen (Vanhamme *et al.*, 2000). Diese kurzen Transkripte werden ungenügend prozessiert und verbleiben deshalb im Nucleus. Bisher wurde keine Regulation der Transkriptionsinitiation gefunden und der Grund für den Abbruch an inaktiven *expression sites* ist unbekannt. Da gezeigt wurde, dass theoretisch zwei *expression sites* (ES) gleichzeitig aktiv sein können, liegt diesem Phänomen offensichtlich keine Kommunikation zwischen den unterschiedlichen ES zugrunde (Cornelissen *et al.*, 1985).

Bei der Antigen-Variation, die die Blutformen nutzen, um dem Immunsystem des Wirtes zu entfliehen, kommt es zu einer Umschaltung von einer *VSG-expression-site* zur nächsten.

Einleitung

Dieser Prozess ist selten und geschieht spontan (Lamont *et al.*, 1986). Zwei Mechanismen können dieses *switching* verursachen. Andere VSG-Gene aus dem Genom können durch Rearrangements in eine aktive ES transferiert werden, so dass nun diese VSG-Variante exprimiert wird. Dabei müssen nicht ganze Gene umlokalisiert werden, es können auch Mosaik aus Pseudogenen entstehen, die zusammen Hybride aus unterschiedlichen C- und T-Termina bilden (Berriman *et al.*, 2005). Eine andere Möglichkeit ist die Stilllegung der gerade exprimierten ES zu Gunsten der Aktivierung einer anderen. Dies scheint sowohl durch einen epigenetischen Mechanismus (Borst und Ulbert, 2001) als auch durch die Struktur des Chromatins reguliert zu sein (Horn, 2001). In prozyklischen Formen existieren nur inaktive VSG- *expression sites* (Pays *et al.*, 2001; Clayton, 2002).

Regulation des EP/GPEET:

Für die Oberflächenmoleküle der prozyklischen Fliegenformen existieren 8-10 Gene, die in Paaren oder Triplets vor einigen co-transkribierten Genen liegen. Bei der Transformation von Blutformen zu prozyklischen Fliegenformen wird zuerst EP als Oberflächenmolekül exprimiert, GPEET hingegen wird während dieses Prozesses nur langsam hochreguliert. In Blutformen unterliegen beide Transkripte einer starken Regulation, da hier keine Antigenvarianz vorliegt, und eine Exprimierung für die Blutformen letal wäre. Diese erfolgt wahrscheinlich über die Chromatinstruktur (Hotz *et al.*, 1998), posttranskriptionale Degradierung vermittelt über die 3'UTRs (Hotz *et al.*, 1997) und über die Translationseffizienz. Zusammen ergibt dies bei Blutformen eine 1000fache Regulation (Clayton, 2002).

	Target-Gene	Transkriptionsfaktoren	Regulation
Polymerase I	<ul style="list-style-type: none"> • rRNA • VSG • EP/GPEET 	<p style="text-align: center;">?</p> <p style="text-align: center;">?</p> <p style="text-align: center;">?</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chromatinstruktur ✓ Epigenetisch ✓ Chromatinsstruktur, ? ✓ Chromatinstruktur ✓ Degradierung der Transkripte ✓ Translationseffizienz
Polymerase II	<ul style="list-style-type: none"> • proteinkod. Gene • SL-RNA 	<p style="text-align: center;">?</p> <p style="text-align: center;">Ja</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 3'UTR ✓ RNAi ✓ posttranslational ✓ Transkriptionsfaktoren
Polymerase III	<ul style="list-style-type: none"> • tRNA • U-snrRNA 	<p style="text-align: center;">Ja</p> <p style="text-align: center;">Ja</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Transkriptionsfaktoren ✓ Transkriptionsfaktoren

Abb.1-12. Übersicht zur Transkription und Regulation der unterschiedlichen RNA-Typen.

1.5 Die VSG-expression site

Die Gene des *variant surface glycoproteins* liegen in subtelomeren Bereichen, zusammen mit anderen co-exprimierten Genen in VSG-expression sites und besitzen eine Größe von 50-60 kb (Abb.1-13). Am 5'-Ende jeder VSG-ES findet sich eine Region von 50 bp *repeats* (Gottesdiener *et al.*, 1991), an die der Promotor angrenzt. Im folgenden Bereich befinden sich die sogenannten ESAGs, die *expression site associated genes*, die durch eine *barren region* aus 70 bp *repeats* von dem eigentlichen VSG-Gen abgegrenzt sind, das am weitesten *downstream* liegt (Lui *et al.*, 1983). Alle ESAGs außer einem wurden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert (1-11). Die Ausnahme bildet SRA (*serum resistance associated*), das schon charakterisiert worden war, bevor es als ESAG identifiziert wurde. Fast alle ESAGs sind über die unterschiedlichen *expression sites* hinweg konserviert und variieren von Stamm zu Stamm nur in ihrer Kopienzahl. Eine Ausnahme hierbei bilden ESAG9, 10 und SRA, die nur in einigen *expression sites* zu finden sind. Nicht alle ESAGs sind nur Bestandteile solcher *expression sites*, sondern in einigen Kopien oder als verwandte Gene auch innerhalb des Genoms angesiedelt.

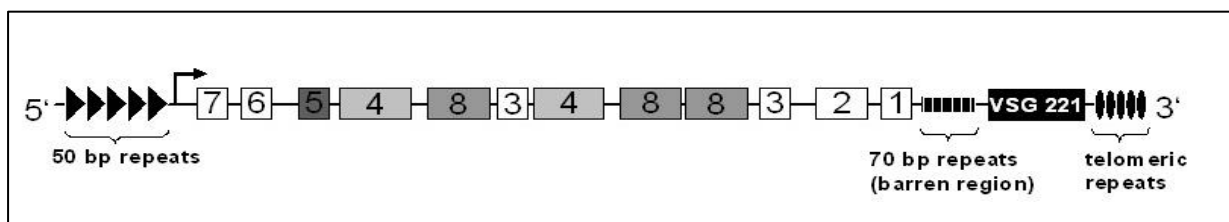


Abb.1-13. Aufbau der VSG expression site des monomorphen Stammes MiTat1.2 mit der Antigenvariante 221. Zwischen den einzelnen ESAGs liegen weitere Genbereiche, die allerdings noch nicht annotiert sind. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit dem Pfeil markiert. [nach Sheader *et al.*, 2004].

ESAG1 ist ein Membranprotein und in der Flagellumtasche lokalisiert. Es besitzt ein N-terminales Signalpeptid, eine einzige Transmembrandomäne und einen kurzen C-Terminus, der in das Cytoplasma hineinragt. Aufgrund des endosomalen Sortierungsmotives wird angenommen, dass es sich hierbei um einen Oberflächenrezeptor handelt.

Auch für **ESAG2** gibt es Evidenzen, dass es in der Flagellumtasche lokalisiert und in die Endozytose involviert ist. Das Protein ist stark glykosyliert und besitzt einen GPI-Anker.

Im Gegensatz zu den ersten beiden ESAGs besitzt **ESAG3** zwar ein Signalpeptid zum Transport in die Plasmamembran, jedoch ohne gleichzeitig eine Transmembrandomäne oder einen hydrophoben C-Terminus zu enthalten. Ein Hinweis darauf, dass es sich um ein

sezerniertes Oberflächenmolekül handelt, das vielleicht mit einem noch unbekanntem Protein mit GPI-Anker ein Heterodimer bildet (ähnlich zu ESAG6/7).

ESAG4 ist das mit am besten untersuchte Mitglied dieser Familie und kodiert für eine Adenylatzyklase an der Oberfläche des Flagellums (Paindavoine *et al.*, 1992). Diese besitzt eine einzige Transmembrandomäne und einen äußerst großen extrazellulären N-Terminus, der wahrscheinlich als Rezeptor fungiert. Im Gegensatz zu den Adenylatzyklasen höherer Eukaryonten ist ESAG4 jedoch nicht G-Protein abhängig (Pays *et al.*, 1996). Um aktiv werden zu können, muss die katalytische Einheit eines ESAG4-Proteins mit einer anderen dimerisieren. Diese sind direkt unter der Membran gelegen (Abb.1-14) und bilden cAMP aus ATP. Strukturelle Untersuchungen an trypanosomalen Adenylatzyklasen legen nahe, dass diese Dimerisierung durch allosterische Inhibitoren verhindert wird, bis es durch Bindung eines Liganden zu einer Konformationsänderung kommt (Bieger *et al.*, 2001). Da cAMP als *second messenger*, vor allem auch im Hinblick auf Differenzierung von slender zu stumpy, fungiert (Vassella *et al.*, 1997), wird ESAG4 eine Rolle bei diesen Prozessen zugesprochen. Zudem scheint diese Adenylatzyklase auch durch proteolytischen oder säurebedingten Stress aktiviert zu werden (Nolan *et al.*, 2000) und könnte daher auch als Sensor für Änderungen der Umgebung wie Glucosespiegel oder pH dienen (Ross *et al.*, 1991). Zusätzlich gibt es innerhalb des Genoms ca. 100 ähnliche Gene, die aus diesem Grund GRESAGs (Genes Related to ESAG4) genannt und in weitere vier Gruppen (GRESAG4.1, 4.2, 4.3, 4.4) unterteilt werden. Sie besitzen im Bereich des C-Terminus große Homologie zu ESAG4, differieren jedoch stark im N-terminalen Rezeptorbereich, was ihnen eine gewisse Substratspezifität verleiht (Alexandre *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu ESAG4 werden diese jedoch sowohl von Blutformen als auch von prozyklischen Formen exprimiert.

Für **ESAG5** sind weder Lokalisation noch Funktion bekannt. Es scheint jedoch zwei Transmembrandomänen zu besitzen und ein integrales Membranprotein zu sein.

Die Gene für **ESAG6 und 7** sind am Beginn der *expression site* lokalisiert. Als Heterodimer bilden sie einen Transferrin-Rezeptor, der sich in der Flagellumtasche befindet (Steverding *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 1994). Beide Proteine besitzen Homologie zu VSG, jedoch einen reduzierten C-Terminus. ESAG7 fehlt zudem noch der GPI-Anker und wird nur durch Wechselwirkung mit ESAG6 in der Membran gehalten (Abb.1-14). Da ein Teil des Heterodimers auch im Lumen der Flagellumtasche aufzufinden und mit poly-N-Acetylactosamin glykosyliert ist (Nolan *et al.*, 1999), entstand die Hypothese einer Lectin-vermittelten Endozytose. In einigen Aminosäuren der für die Transferrin-Bindung verantwortlichen *loops* variieren ESAG6 und 7 verschiedener *expression sites*. So entstehen

Einleitung

Änderungen in der Affinität der Rezeptoren zu Transferrinen verschiedener Spezies und damit Wirtsspezifität einzelner *T. brucei*-Stämme (Bitter *et al.*, 1998).

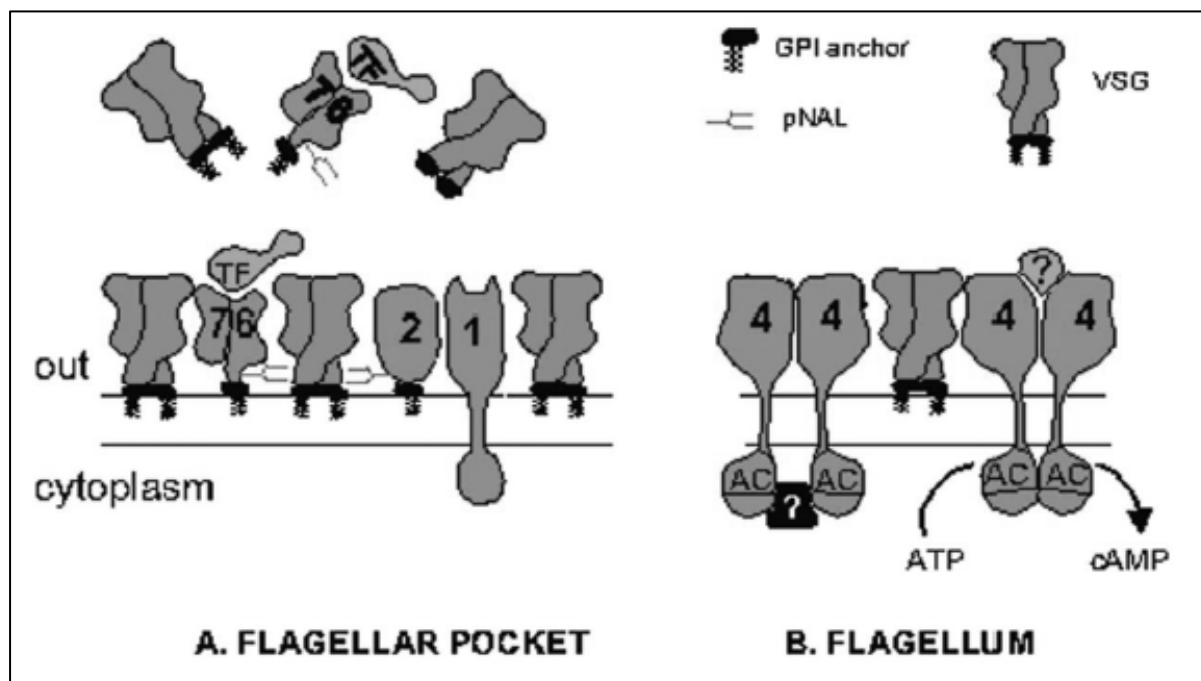


Abb.1-14. Schema verschiedener *expression site associated genes*, Lokalisierung und Aufbau. Aus: Pays *et al.*, Mol. Biochem Parasitol. 2001. ESAG6/7 befinden sich im Lumen der Flagellumtasche, binden Transferrin und werden über Wechselwirkung zwischen pNAL und Lectinen an der Membranoberfläche gebunden und endozytiert. ESAG4 hingegen befindet sich, durch allosterische Hemmung inaktiviert, über die ganze Flagellumoberfläche verteilt. Durch Bindung eines Liganden nähern sich die katalytischen Domänen und werden so aktiviert.

Das wohl interessanteste Protein der *expression site* ist gleichzeitig auch das einzige ESAG, das nicht in der Membran lokalisiert ist. **ESAG8** wird ausschließlich in den *expression sites* kodiert und kommt vor allem im Nucleolus (82%), in geringer Menge jedoch auch im Cytosol (18%) vor (Lips *et al.*, 1996; Hoek *et al.*, 2000). Am N-Terminus besitzt es ein Ring-Finger-Motiv, d.h. eine spezialisierte Variante des Zinkfingers zur Bindung zweier Zn^{2+} -Ionen, das in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist (Abb.1-15). Das Protein enthält zudem eine LRR-Domäne mit 18 *leucine rich repeats*, die jeweils 23 Aminosäuren enthalten (Revelard *et al.*, 1990). Über die Aufgabe von ESAG8 gibt es bis heute viele Spekulationen und kontroverse Ansichten darüber, ob es ein essentielles Protein darstellt (Xong *et al.*, 1998; Hoek *et al.*, 2000). Seiner Struktur zufolge, wird ihm eine Rolle als Regulatorprotein sowohl bei energetischen Prozessen als auch während der Differenzierung zugeschrieben. Diese Annahme beruht auf der Nähe des ESAG8-Genlokus zu dem von ESAG4. Sequenzhomologien von ESAG8 zu Regulator-domänen der Adeylatzyklen von Hefen

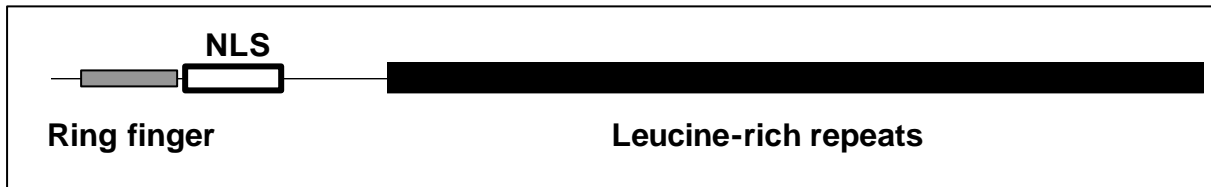


Abb.1-15. ESAG8. Aus: Pays *et al.*, Mol.Biochem.Parasitol. 2001. Sowohl das Ring-Finger-Motiv am N-Terminus als auch die LRR-Domänen weisen auf Protein-Protein-Interaktionen hin. Zusätzlich besitzt ESAG8 ein *nuclear localisation signal* (NLS) und findet sich so zum großen Teil im Nucleolus wieder.

weisen auf einen möglichen regulatorischen Komplex aus ESAG4 und 8 hin (Ross *et al.*, 1991). Andere Publikationen deuten auf eine Interaktion mit PIE8 (Pérez-Morga und Pays, 1999) oder Proteinen der PUF-Familie (Hoek *et al.*, 2002) hin. PIE8 (*Protein Interacting with ESAG8*) wurde in Mitochondrien von stumpy-Formen nachgewiesen, jedoch nicht in slender-Formen mit rudimentärer mitochondrialer Funktion und nicht in prozyklischen Formen, die eine voll aktivierte Atmungskette besitzen. So wird vermutet, dass PIE8 an der Aktivierung des Mitochondriums beteiligt ist, und durch Interaktion mit ESAG8 davon abgehalten wird, dorthin zu gelangen. Hoek *et al.* (2002) konnten hingegen eine Interaktion mit einem Protein der *Pumilio*-Familie, TbPUF1 nachweisen. PUF-Proteine sind an der Regulation der RNA beteiligt, indem sie beispielsweise an die 3'UTR binden (Murata und Wharton, 1995) und durch Unterstützung der Deadenylierung für eine schnellere Degradierung der mRNA verantwortlich sind. Dies äußert sich in reduzierten Protein-Mengen. TbPUF1 erwies sich bisher jedoch eher als mRNA-stabilisierend. Da jedoch noch einige andere ESAG8-enthaltende Komplexe nachgewiesen werden konnten, gibt es Vermutungen einer regulatorischen Beteiligung an Ubiquitinierungs-Prozessen. Unterstützt wird diese These durch die hohe Homologie zu eukaryontischen E3-Enzymen, die als Ubiquitin-Bindeprotein fungieren. Durch Interaktion mit dem Target-Protein, E1 (Ubiquitin-Aktivierungsprotein) und E2 (Ubiquitin-Verknüpfungprotein) sind diese an der Degradierung im Proteasom beteiligt. Auch für E3-Proteine sind LRR-Domänen und Ring-Finger-Motive (Freemont, 2000) charakteristisch. Dabei weist ESAG8 die höchste Ähnlichkeit mit einem Ubiquitin-Bindeprotein auf, das in Säugerzellen für die Degradierung Cykline und Cyclin-abhängigen Kinasen verantwortlich ist, und so beispielsweise Hepatozyten in die G₀-Phase überführt (Ilyin *et al.*, 1999; Pagano *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1998). Bei all diesen Befunden handelt es sich bisher allerdings nur um Indizien, der tatsächliche Mechanismus des ESAG8 ist dagegen noch ungelöst.

Wie auch ESAG2 und ESAG6 besitzt **ESAG9** einen GPI-Anker und ist auf der Zelloberfläche

lokalisiert. Zudem enthält die Struktur eine GTP-Bindestelle (Pays *et al.*, 2001) und somit wahrscheinlich eine GTPase-Aktivität. Spekulationen zufolge könnte es sich hierbei um ein Ras-Analogon handeln, das in Differenzierungs- und Zellteilungsprozesse involviert ist, und durch ESAG4 reguliert werden könnte (Ross *et al.*, 1991).

Zum Biopterin-Transporter von *Leishmania* (Myler *et al.*, 1994; Lemley *et al.*, 1999) besitzt **ESAG10** eine signifikante Sequenzhomologie (Pays *et al.*, 2001) und ist wahrscheinlich ein integrales Membranprotein, für das allerdings noch keine weiteren Funktionen beschrieben wurden.

Über **ESAG11** ist abgesehen vom Besitz eines GPI-Ankers, also einer Lokalisierung in der Membran, noch nichts bekannt.

Das letzte der bisher entdeckten ESAGs wird **SRA** (*serum resistance associated*) genannt, da es bereits in einem anderen Zusammenhang charakterisiert worden war, bevor es der Familie der ESAGs zugeordnet wurde. SRA ist nicht in jeder *expression site* zu finden, wohl aber in der des humanpathogenen Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Evolutionär entstand es wohl durch Mutation und Verkürzung des VSG-Gens, mit dem es ähnliche mRNA-Level teilt (Xong *et al.*, 1998). Als Protein liegt es jedoch in weit geringeren Mengen vor. Es ist bekannt, dass SRA die Parasiten gegen das menschliche HDL „immunisiert“. Trypanosomen besitzen Rezeptoren für LDL und HDL, mit deren Hilfe sie Sterole durch Endozytose aufnehmen können (Green *et al.*, 2003). Zwei Komponenten der HDL-Fraktion sind jedoch für *T. brucei brucei* letal, TLF-1 und TLF-2 (*trypanosome lytic factor*) (reviewed by Morgan *et al.*, 2002). Auch wenn der genaue Resistenzmechanismus bisher verborgen blieb (Pays *et al.*, 2001), scheint in humanpathogenen *T. brucei* - Arten SRA spezifisch das Verschmelzen der TLF-1 enthaltenden Vesikeln mit den Lysosomen zu blockieren und so die Lyse der Zellen zu verhindern (Oli *et al.*, 2006).

Durch die Verlagerung der beschriebenen Gene in die *VSG-expression site* wird die hohe Effektivität der Polymerase I auch für diese ausgenutzt. Die einzelnen Transkripte werden jedoch posttranskriptional, oft stark abweichend zu VSG selber, reguliert (Vanhamme *et al.*, 2000).

1.6 PPARg

1.6.1 Die Familie der *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*

Lipophile Hormone wie Steroide, Schilddrüsenhormone und auch Retinoide binden an

Einleitung

intrazelluläre Rezeptoren, die dann als Transkriptionsfaktoren fungieren. Auch die Familie der *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* (PPARs) gehört zu den Kernrezeptoren und ist in mehrere Stoffwechselprozesse involviert. Diese Familie besteht aus drei Rezeptor-Subtypen (PPAR α , PPAR β und PPAR γ), die bis auf ihre Liganden-Bindedomäne sehr ähnlich aufgebaut sind. PPAR α wird vor allem in Leber, Niere, Herz und Muskelgewebe exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle in der Katabolisierung von Fettsäuren und in Entzündungsprozessen (Hihi *et al.*, 2002). Natürliche Liganden sind unter anderem Prostaglandine und Leukotriene. Gleichzeitig ist PPAR α aber auch Target für Arzneistoffe wie Clofibrat und Bezafibrat, die eingesetzt werden, um den Triglycerid-Spiegel im Blut zu senken und den HDL-Anteil zu erhöhen.

PPAR β (δ) wird in allen Geweben exprimiert. Eine besondere Rolle kommt ihm bei inflammatorischen Prozessen in Epithelien zu. So wird PPAR β sofort nach der Zerstörung von Epithelzellen aktiviert, fördert deren Proliferation und Resistenz gegenüber TNF α , so dass eine Einleitung der Apoptose verhindert wird (Michalik *et al.*, 2001; Icre *et al.*, 2006).

1.6.2 PPAR γ : Struktur und Funktion

Vom letzten Mitglied dieser Familie, PPAR γ , existieren drei Isoformen, die aus der Nutzung verschiedener Promotoren und alternativem *Splicing* resultieren (Elbrecht *et al.*, 1996; Fajas *et al.*, 1998). PPAR γ 1 und PPAR γ 3 führen zum gleichen Proteinprodukt und werden vor allem in der Niere, Herz, Leber und Monozyten exprimiert. PPAR γ 2 hingegen kommt vorwiegend im Fettgewebe vor und besitzt einen längeren N-Terminus (Elbrecht *et al.*, 1996).



Abb.1-16. Aufbau von PPAR γ . Das Protein besitzt eine Masse von ca. 55 kDa.

Der Aufbau dieser Kernrezeptoren ist dreigeteilt (Abb.1-16). Am N-Terminus befindet sich die Aktivatorfunktion 1 (AF-1), die eine vom Liganden unabhängige Transkriptionsfunktion besitzt. Wird sie von der MAPK phosphoryliert, so reduziert sich die Fähigkeit des Rezeptors, Liganden zu binden (Willson *et al.*, 2001). Die innerhalb der PPARs höchst konservierte DNA-Bindedomäne besteht aus ca. 70 AS und beinhaltet zwei Zn-Finger. Durch sie erfolgt die Wechselwirkung des Transkriptionsfaktors mit dem PPRE (*Peroxisome Proliferator*

Einleitung

Responding Element), upstream der Targetgen-Promotoren. Die Liganden-abhängige Aktivatorfunktion 2 (AF-2) ist am C-Terminus lokalisiert und bedingt nach Konformationsänderung des Proteins unter anderem die Rekrutierung unterschiedlicher Cofaktoren. Die AF-2 beinhaltet zudem die Ligandenbindedomäne mit einer Größe von 250 AS und Dimerisierungsmotive, die zur Bildung eines Heterodimers mit dem Retinoid-X-Rezeptor RXR notwendig sind.

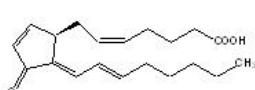
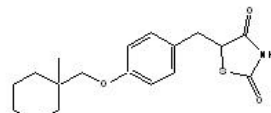
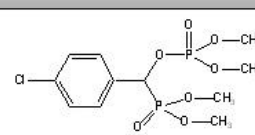

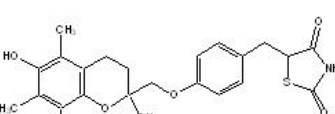
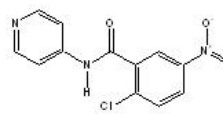
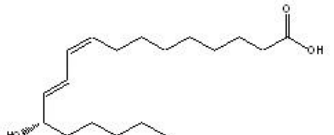
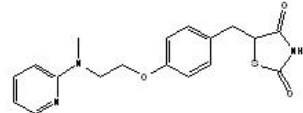
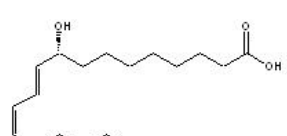
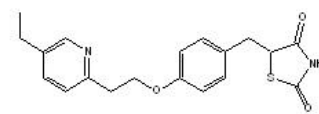
Natürliche Liganden	Synthetische Agonisten	Synthetische Antagonisten
 <p>15-deoxy-PGJ₂</p>	 <p>Ciglitazon</p>	 <p>SR-202 (Rieusset <i>et al.</i>, 2002)</p>
 <p>Linolensäure</p>	 <p>Troglitazon EC₅₀ (human receptor) = 660 nM</p>	 <p>T0070907 (Lee <i>et al.</i>, 2002)</p>
 <p>13-Hydroxyoctadecadiensäure</p>	 <p>Rosiglitazon EC₅₀ (human receptor) = 43 nM</p>	
 <p>9-Hydroxyoctadecadiensäure</p>	 <p>Pioglitazon EC₅₀ (human receptor) = 580 nM</p>	

Abb.1-17. PPAR γ -Liganden in der Übersicht.

Zu den natürlichen Liganden von PPAR γ zählen vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Linolensäure, Linolensäure), oxidierte Fettsäuren (9- und 13-Hydroxyoctadecadiensäure), und Eicosanoide wie 15-deoxy-PGJ₂ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995) (Abb.1-17). Allerdings besitzen sie mit halbeffektorischen Konzentrationen im μ M-Bereich (Keller *et al.*, 1993) relativ geringe Affinität im Vergleich zu Liganden anderer Kernrezeptoren, was unter anderem in der ungewöhnlich großen Bindungstasche des Transkriptionsfaktors begründet ist. Synthetische Agonisten wie die Glitazone und Tyrosin-Derivate (Farglitazar), als auch Antagonisten (SR-202 und T0070907) besitzen hingegen sind sehr viel niedrigere EC₅₀-Werte im nM-Bereich (Shearer and Hoekstra, 2002). Dabei bilden sie mit ihren meist sauren

Einleitung

hydrophilen Köpfen Wasserstoffbrücken mit basischen AS innerhalb der Bindungsdomäne (Yu *et al.*, 2004). Die Anzahl dieser Wechselwirkungen variieren je nach Ligand. Mit dem längeren hydrophoben Rest der Liganden ragen sie in die hydrophobe Tasche und binden dort stark an lipophile AS-Reste (Abb.1-18).

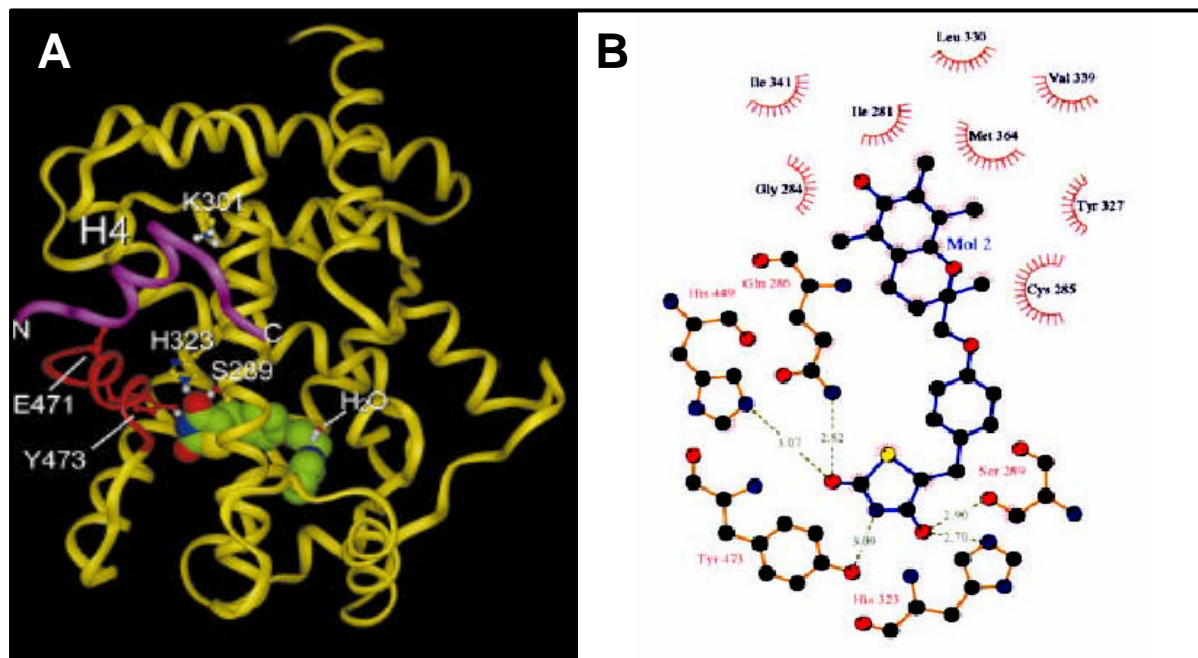


Abb.1-18. (A) Lage des Liganden (hier Rosiglitazon) in der Bindungstasche von PPAR γ . In Rot dargestellt ist die AF-2 Domäne, die für die folgende Rekrutierung von Cofaktoren wie SRC1 (violett) verantwortlich ist (aus: Willson *et al.*, 2001). (B) Wechselwirkungen zwischen Ligand und AS der Bindungsdomäne, hier am Beispiel von Troglitazon. Der hydrophile Thiazolidindion-Kopf bildet 5 Wasserstoffbrücken mit den AS Gln 286, His 449, Tyr 473, His 323 und Ser 289 aus. Zusätzlich tritt der lange hydrophobe Rest in extrem starke hydrophobe Wechselwirkungen mit den AS Cys 285, Leu 330, Ile 341, Met 348 und Met 364 der lipophilen Bindungstasche (aus: Yu *et al.*, 2004).

Um aktiv zu werden, muss PPAR γ jedoch über hydrophobe Wechselwirkungen mit RXR in Kontakt treten. Über eine Salzbrücke zwischen E441 von PPAR γ und R393 des RXR erfolgt die Formation eines Heterodimers. Zusammen wandern sie zur DNA, wo sie an das PPR-Element (AGGTCAnAGGTCA) binden, um die Expression von Genen wie der Acyl-CoA-Oxidase (Tugwood *et al.*, 1992) oder aP2 (Willson *et al.*, 2000) zu induzieren oder zu supprimieren. Generell kann die Aktivierung auch über RXR-Liganden wie 9-cis-Retinsäure erfolgen, da die Bildung des Heterodimers immer eine Konformationsänderung des PPAR γ zur Folge hat und so zu einer aktiven Form führt.

Je nachdem, welcher Ligand gerade gebunden ist, variiert die Proteinkonformation von PPAR γ aufgrund ihrer hohen Dynamik sehr stark. Dies hat die Rekrutierung unterschiedlicher

Cofaktoren zur Folge, die wiederum die Effekte des Transkriptions-Dimeren modulieren. Coaktivatoren sind beispielsweise SRC1, CBP, PBP, PGC1 und PGC2. Die ersten drei Proteine besitzen LxxLL-Motive, die allgemein eine kooperative Bindung zu Heterodimeren ermöglichen und durch intrinsische Histonacetyltransferase-Aktivität zu einer Modifikation der Chromatin-Struktur führen. So wird die Bindung großer Transkriptionskomplexe an die DNA erleichtert (Ogryzko *et al.*, 1996). SRC1 bindet an die AF-2 Domäne und zwar bevorzugt dann, wenn PPAR γ aktiviert ist. Involvierung unterschiedlicher Seitenketten bei Aktivierung durch Troglitazon oder Rosiglitazon resultieren so in der Regulation überlappender aber nicht identischer *gene cluster* (McInerney *et al.*, 1998). Die beiden anderen LxxLL-Proteine CBP und PBP hingegen binden in der Nähe der Ligandenbindedomäne bzw. zwischen Heterodimer und grundsätzlicher Transkriptionsmaschinerie (Freedman, 1999). Die Aktivierung durch PGC1 und 2 erfolgt über einen davon abweichenden Mechanismus. PGC1 bindet nicht an die Transkriptionsfaktoren selber, sondern kooperativ mit SRC1 oder CBP (Puigserver *et al.*, 1999). Am spezifischsten verhält sich PGC2, der keinerlei Affinität zu PPAR α oder β besitzt und über Bindung am N-Terminus von PPAR γ unter anderem für die Induktion der Differenzierung von Adipozyten von Bedeutung ist (Castillo *et al.*, 1999).

1.6.3 Einsetzen von PPAR γ - Agonisten als Arzneistoffe

Glitazone als Substanzen zur Behandlung von TypII Diabetes mellitus, wurden durch Screening-Verfahren gefunden, noch bevor ihr Target-Protein oder Wirkungsmechanismus bekannt war (Suter *et al.*, 1992; Nolan *et al.*, 1994). Ciglitazon war das erste Glitazon-Derivat und wurde 1978 von der Firma Takeda entwickelt. Allerdings diente diese Substanz nur als Prototyp für andere Glitazone und gelangte nie in Form eines Arzneimittels auf den Markt. Im Jahre 1997 ließ die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) Troglitazon unter dem Namen Rezulin[®] für den US-Markt zu. Dies gelang jedoch nicht für den europäischen Markt, da Fälle schwerer Leberschäden bekannt wurden, die in einigen Fällen sogar bis zum Tode der Patienten führten. Als Konsequenz wurde das Arzneimittel am 21. März 2000 wieder vom amerikanischen Markt genommen. Rosiglitazon (Avandia[®], GlaxoSmithKline) und Pioglitazon (Actos[®], Takeda Global Research) hingegen gelang es im selben Jahr (1999), die Zulassung von der FDA zu erlangen, die der EMEA ein Jahr später. Diese Glitazon-Derivate werden im Gegensatz zu Troglitazon über CYP2C8 metabolisiert und wirken somit nicht induktiv auf CYP3A4. Die Lebertoxizität, die durch die entstehenden Metabolite

Einleitung

ausgelöst wird, ist daher nicht so stark ausgeprägt. Trotzdem ist die Gabe bei Patienten mit Leberschäden absolut kontraindiziert, und generell während der Therapie eine ständige Überwachung der Leberenzyme notwendig.

Der Wirkmechanismus dieser hochaffinen Agonisten wurde erst 1995 aufgedeckt (Lehmann *et al.*, 1995). Über Aktivierung von PPAR γ reduzieren sie den Spiegel an Glucose, Triglyceriden und freien Fettsäuren im Blut, ohne eine Stimulation der Insulin-Sekretion einzuleiten. Daher wird die Familie der Glitazone auch als „Insulin-Sensitizer“ bezeichnet.

Diese Effekte resultieren aus einem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen in verschiedenen Zelltypen wie die der Leber, des Fettgewebes und der Muskeln. In Adipozyten erfolgt dies unter anderem über die Verringerung der TNF α -Ausschüttung, die für die Ausbildung einer

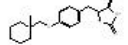
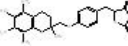
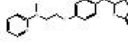
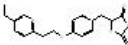
Arzneistoff	Fertigarzneimittel	Zulassung
 Ciglitazon	<ul style="list-style-type: none"> • Prototyp der anderen Arzneistoffe • wurde 1978 von Takeda entwickelt 	
 Troglitazon	Rezulin [®] 200 mg, 300 mg oder 400 mg Hersteller: Parke-Davis/Warner Lambert, jetzt Pfizer	FDA: 30.01.1997 21.03.2000 wurde Rezulin vom US-Markt genommen EMEA: keine Zulassung wegen Lebertoxizität
 Rosiglitazon	Avandia [®] 4 mg oder 8 mg Hersteller: SmithKline Beecham, jetzt GlaxoSmithKline	FDA: 26.05.1999 EMEA: 11.07.2000
	Avandamet [®] 1 mg + 500 mg Metformin oder 2 mg + 500 mg Metformin Hersteller: SmithKline Beecham, jetzt GlaxoSmithKline	EMEA: 20.10.2003
 Pioglitazon	Actos [®] 15 mg, 30 mg oder 45 mg Hersteller: Takeda Global Research	FDA: 15.07.1999 EMEA: 13.10.2000
	Competact [®] 15 mg + 850 mg Metformin Hersteller: Takeda Global Research	EMEA: 01.10.2006



Abb.1-19. Übersicht der Glitazon-Derivate und ihrer Arzneiformen.

Einleitung

Insulinresistenz mitverantwortlich ist (Uysal *et al.*, 1998). Allgemein kann man von einem Flux an Glucose und Fettsäuren von den Muskeln hin zum Fettgewebe sprechen (Abb.1-20). Dort ist die Expression einer Reihe von Genen, die an Speicherung, Transport und Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind, gesteigert, in Muskeln und Leber hingegen gehemmt. Eine zellabhängige Regulation erfolgt auch in Bezug auf den Glucose-Stoffwechsel. Enzyme der Gluconeogenese wie Pyruvat-Carboxylase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase werden in der Leber stark supprimiert (Way *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 1995). Im Muskel wird dafür der Glucose-Verbrauch gesteigert, indem zum Beispiel die Expression der PDH-Kinase 4 reduziert wird, die somit PDH nicht mehr phosphorylieren und damit inaktivieren kann (Way *et al.*, 2001). Beide Wege resultieren in einer Senkung des Blut-Glucosespiegels.

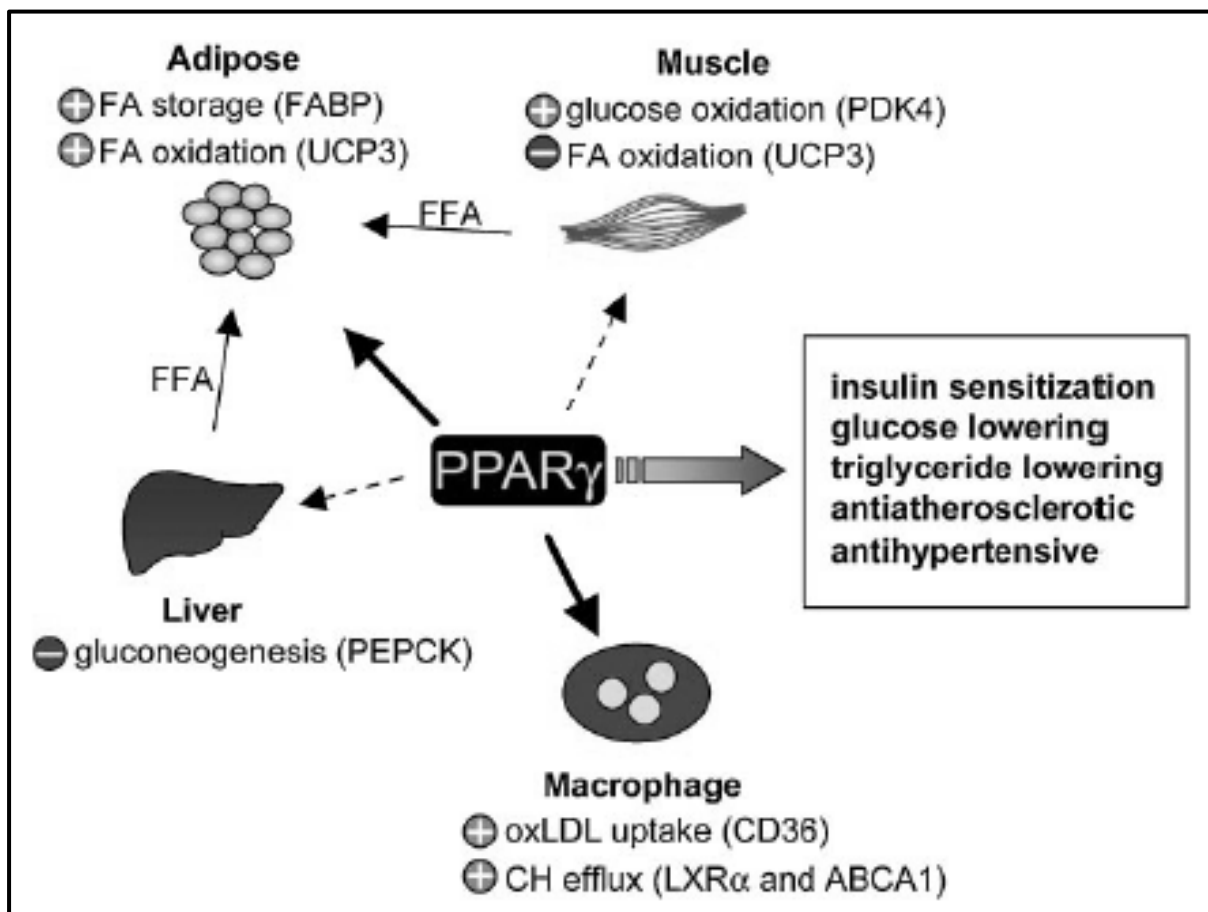


Abb.1-20. Die Effekte von PPAR γ erstrecken sich auf die unterschiedlichsten Gewebetypen und wirken sich so positiv auf das Metabolische Syndrom aus. Über eine Hemmung der Gluconeogenese in der Leber und gesteigerten Glucose-Verbrauch in den Muskeln wird der Glucose-Spiegel im Blut gesenkt. Zudem wird Cholesterin vermehrt von Makrophagen aufgenommen und wieder abgegeben, so dass keine Anreicherung und keine daraus entstehenden Entzündungsprozesse in den Gefäßen entstehen (aus: Willson *et al.*, 2001).

1.6.4 Thiazolidindione und Differenzierung

In den letzten 10 Jahren wurde in zahlreichen Arbeiten versucht, den Mechanismus der Thiazolidindione aufzuklären. Dabei zeigte sich ihr Vermögen, Effekte einerseits über PPAR γ -Aktivierung, andererseits aber auch über unabhängige Mechanismen und andere Targetproteine auszulösen. Aufgrund dieser Vielfalt wird ihr potentieller Einsatz auch bei anderen Krankheiten wie Hypertonie (Kurtz und Gardner, 1998), Artherosklerose (Nagy *et al.*, 1998; Chawla *et al.*, 2001), Asthma (Becker *et al.*, 2006; Roth und Black, 2006) oder Karzinomen (Kato *et al.*, 2004; Varley *et al.*, 2004) untersucht.

Je nach Zellart und Höhe der Konzentration verursachen diese Substanzen eine Hemmung der Zellproliferation, Differenzierung, Verlängerung der Lebenszeit einer Zelle (Wang *et al.*, 2002) aber auch Apoptose (Shiau *et al.*, 2005; Pandhare *et al.*, 2006), meist über ein Zusammenspiel von PPAR γ -abhängigen und -unabhängigen Mechanismen. So scheint eine Hemmung der Proliferation unter anderem durch Suppression der Caseinkinase-2 zu erfolgen (Lee *et al.*, 2006). Ein PPAR γ -unabhängiger antiproliferativer Effekt von Troglitazon wurde hingegen in Tumorzellen der Schilddrüse gefunden, der mit einer Einleitung der Differenzierung einhergeht (Fröhlich *et al.*, 2005). Durch erleichterten Abbau von Cyclin-D im Proteasom (Huang *et al.*, 2005) oder der Inhibierung Zellzyklus-abhängiger Kinasen wie cdk-2 und Cyclin A-Proteinkinase (Bae *et al.*, 2003) wird so ein Zellzyklusarrest verursacht. Zellen können jedoch auch über Aktivierung von PPAR γ zur Differenzierung veranlasst werden (Tontonoz *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 2004), beispielsweise unter Nutzung der Proteinkinase-C β (Zhou *et al.*, 2006).

Hinsichtlich des mitochondrialen Membranpotentials können Glitazone entweder zu einer Erhöhung und so zu einer Funktionssteigerung des Mitochondriums beitragen (Wang *et al.*, 2002) oder aber durch deren Zerstörung zur Apoptose führen (Liu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Pandhare *et al.*, 2006). Welche Bedeutung dabei die Wechselwirkung mit einem mitochondrialen Protein namens mitoNEET besitzt, bleibt noch aufzuklären (Colca *et al.*, 2004).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die chronische Phase der afrikanischen Schlafkrankheit ist dadurch ausgezeichnet, dass die Parasiten die Blut-Hirnschranke überqueren, um sich in der Cerebrospinalflüssigkeit des Wirts weiter zu vermehren. Dort fanden Wissenschaftler eine Erhöhung der Prostaglandin D₂-

Konzentration (Pentreath *et al.*, 1990), die unter anderem eine Erklärung für die Symptomatik wie Fieber, Müdigkeit und Immunsuppression bei den Patienten lieferte. Zuerst wurde angenommen, dies sei alleine das Resultat einer gesteigerten Produktion des Wirtes infolge einer Reaktion auf die Infektion. Kubata *et al.* (2000) konnten jedoch zeigen, dass auch *Trypanosoma brucei* in der Lage ist, verschiedene Prostaglandin-Derivate zu synthetisieren. Zudem gelang es ihnen mit der PGF_{2α}-Synthase das erste Enzym des Prostaglandin-Stoffwechsels in Trypanosomen zu isolieren. Neben PGF_{2α} produzieren die Parasiten während der Infektion auch PGD₂, das sie in das Blut des Wirtes abgeben. Dort unterliegt PGD₂ einem schnellen Metabolismus und wird unter anderem in PGJ-Derivate umgeformt (Shibata *et al.*, 2002). Diese besitzen nicht nur Wirkung auf den Wirtsorganismus, sondern zeigen auch spezifische Effekte auf die Parasiten selbst. Untersuchungen von Figarella *et al.* (2005 und 2006) offenbarten eine Rolle dieser Metabolite in der Regulation der Zelldichte durch Induktion eines programmierten Zelltods (Duszenko *et al.*, 2006). Eines dieser Metabolite ist 15-desoxy-PGJ₂, welches in höheren eukaryontischen Zellen unterschiedliche Targetproteine besitzt (Narumiya *et al.*, 1999). Einer dieser Rezeptoren ist der Transkriptionsfaktor PPARγ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Da seine natürlichen Liganden keine große Affinität besitzen, wurden für diese Arbeit die synthetischen Agonisten verwendet und deren Effekte mit denen der Prostaglandine verglichen. Es zeigte sich jedoch keine Übereinstimmung der Effekte, d.h. es konnten keine apoptotischen Vorgänge durch Thiazolidindione induziert werden. Vielmehr verursachten die synthetischen Agonisten eine Steigerung des Metabolismus und der mitochondrialen Aktivität.

Die Arbeit fokussierte sich daraufhin auf die genauere Untersuchung der Thiazolidindion-induzierten Effekte auf die Blutform von *Trypanosoma brucei*. Dabei vermochte vor allem Troglitazon eine Differenzierung in diesen Zellen zu induzieren, ohne in den verwendeten Konzentrationen Anzeichen von Toxizität zu zeigen, wie es bei anderen Substanzen wie DMFO (Giffin *et al.*, 1986) oder 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-methylhydrazin (Penketh *et al.*, 1991) der Fall war. Charakteristika einer physiologischen Differenzierung von slender- zu stumpy-Formen wurden nach Behandlung mit Troglitazon untersucht. Zudem lieferten Microarray-Analysen neue Anhaltspunkte für die mechanistische Aufklärung dieses Vorganges.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Organismen

2.1.1 Verwendete Trypanosomen

In dieser Arbeit fanden zwei Stämme des Parasiten *Trypanosoma brucei brucei* Verwendung: der monomorphe Stamm MITat1.2 (Molteno Institute Trypanozoon antigenic type, Cambridge), der aus dem Stamm EATRO 427 kloniert wurde (Cross, 1975) und die Antigenvariante 221 exprimieren, und der pleomorphe Stamm AnTat1.1 (Antwerpen Trypanozoon antigenic type, Le Ray *et al.*, 1977).

Prozyklische Formen waren durch Transformation (Overath *et al.*, 1986) aus dem Blutform-Stamm 221 hervorgegangen.

2.1.2 Versuchstiere

Für Stabilate und Experimente, für die viele Trypanosomen erforderlich waren, dienten Ratten der Rasse Wistar und weibliche NMRI-Mäuse (Charles River Laboratories/ USA). Beide erhielten R7M-H Alleinfutter (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

cis-Aconitat	Sigma, Deisenhofen
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
Adenosintriphosphat	Sigma, Deisenhofen
Agar 100	Plano, Wetzlar
Ammoniumpersulfat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
L-Arginin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparagin	Sigma, Deisenhofen
BCS	Sigma, Deisenhofen

Material & Methoden

Benzyldimethylamin	Plano, Wetzlar
Bisbenzimid	Sigma, Deisenhofen
Bradford Farbstoff-Konzentrat	BioRad, München
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
BSA, fettsäurefrei	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Canusal [®] (Heparin-Na), 10x2ml	CP Pharmaceuticals Ltd, Wrexham (UK)
Chymostatin	Sigma, Deisenhofen
Ciglitazon	Calbiochem, Schwalbach
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth, Karlsruhe
CPT-cAMP	Sigma, Deisenhofen
Cy3-monoreaktiver Ester	Amersham Biosciences, Freiburg
Cy5-monoreaktiver Ester	Amersham Biosciences, Freiburg
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen
DEAE-Sephacel	Sigma, Deisenhofen
15deoxy-Prostaglandin J ₂	IBL, Hamburg
2'-Desoxythymidin	Sigma, Deisenhofen
2,6-Dichlorphenolindophenol	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Dodecenylnsuccinicanhydrid	Plano, Wetzlar
Ethanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Giemsa-Stammlösung	Fluka, Buchs (CH)
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutaminsäure	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma, St. Louis (USA)
Glycerin, 87% und 100%	Sigma, Deisenhofen

Material & Methoden

Glycin	Sigma, Deisenhofen
Hemin	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
L-Histidin	Sigma, Deisenhofen
Hypoxanthin	Sigma, Deisenhofen
Iscove's Dulbecco's medium	Sigma, Deisenhofen
L-Isoleucin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumcyanid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Fink GmbH, Herrenberg
Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
MEM Vitaminlösung	Sigma, Deisenhofen
MEM Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
L-Methionin	Sigma, Deisenhofen
Methylcellulose	Fluka, Buchs (CH)
Methylnadicanhydrid	Plano, Wetzlar
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Myristinsäure	Sigma, Deisenhofen
NADH	Roche, Mannheim
NADP	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumbicarbonat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt

Material & Methoden

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nitroblautetrazolium	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs (CH)
Penicillin/Streptomycin, 100fach	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma, Deisenhofen
L-Prolin	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis (USA)
Propylenoxid	Plano, Marburg
Protein-Ladder	Biomol, Hamburg
Protein-Ladder, pre-stained	Biomol, Hamburg
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Rosiglitazon	IBL, Hamburg
Roti [®] -Load1 (4fach,; reduzierend)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
RHX Document Type Developer	Rollei GmbH, Berlin
RXA Rapid fixing bath	Rollei GmbH, Berlin
Saccharose	Sigma, St. Louis (USA)
Salicylhydroxamsäure (SHAM)	Sigma, St. Louis (USA)
Salzsäure (HCl)	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Slide Hyb-buffer #1	Ambion, Huntigdon (UK)
SR-202	Geschenk von Dr. Walter Wahli
Succinat	Sigma, Deisenhofen
T0070907	IBL, Hamburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetramethylrhodamineethylester	Invitrogen, Karlsruhe
L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
a-Tocopherol	Sigma, Deisenhofen
Trinatriumcitrat	Sigma, Deisenhofen

Material & Methoden

Tris	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Troglitazon	Biomol, Hamburg; IBL, Hamburg
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen
ULTRAhyb™	Ambion, Huntingdon (UK)
Uranylacetat	Plano, Marburg
L-Valin	Sigma, Deisenhofen
Valinomycin	Sigma, Deisenhofen

2.2.2 Radiochemikalien

5'-[³² P]dATP	Amersham Biosciences, Freiburg
[³⁵ S]L-Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig
Ultima Gold	Packard, Frankfurt

2.2.3 Enzyme

Hexokinase (1,4 U/ml)/ Glucose-6-Phosphat-DH (2,5 U/ml)-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
L-Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
SuperScript II RT	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.4 Antikörper

Anti-Aldolase (Kaninchen)	Geschenk von Dr. Christine E. Clayton
Anti-DHLADH (Kaninchen)	Geschenk von Dr. Luise Krauth-Siegel
Anti-Kaninchen, Alexa 594	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen, AP-Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Anti-VSG (Variante 221; Kaninchen)	

2.2.5 Primer

2.2.5.1 Reverse Transkription:

Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl)

Invitrogen, Karlsruhe

2.2.5.2 Northern Blot-Sonden:

Calpain-like-cystein-peptidase (Syst. Id: Tb927.7.4060/ Länge 348 bp)

Sense: 5'-ATGTCCGATATCACGTACGAGAACG-3'

Antisense: 5'-TCATGACTGAGGAATAGGATTGGCT-3'

Amplifizierter Bereich: 348 bp

Cation Transporter (Syst. Id: Tb11.01.0725/ Länge 1185 bp)

Sense: 5'-ATGGCTAACGTTAATAACGAGACCA-3'

Antisense: 5'-TTAGACCCATTTTCCTAACACGGCC-3'

Amplifizierter Bereich: 1185 bp

Cytochrom C (Syst. Id: M23360 (NCBI)/ Länge 565 bp/ 3'UTR: 213-565)

Sense: 5'-AATTGTTGGCCGTAAATCCGGAAC-3'

Antisense: 5'-GTAATTCATTTATGTTCTTCTTTCTT-3'

Amplifizierter Bereich: 564 bp

ESAG 4 (Syst. Id: H25N7.29/ Länge 3807 bp)

Sense: 5'-ATGAATATGCTTCACTTGAGCGACC-3'

Antisense: 5'-TTAGGTGGTAGCGCTGTCATTTTCC-3'

Amplifizierter Bereich: 3807 bp

ESAG 8 (Syst. Id: H25N7.27/ Länge 1893 bp)

Sense: 5'-ATGACTGGCCGTAGCACATATGGG-3'

Antisense: 5'-TCAAAATATATGCACACCTCGTCTC-3'

Amplifizierter Bereich: 1893 bp

PIE 8 (Syst. Id: Tb927.6.2850/ Länge 1683 bp)

Sense: 5'-ATGTCCCACTTTCAGCCTTCGCCG-3'

Antisense: 5'-TTAGTCGCTGCAAAAGTCCGCCTT-3'

Amplifizierter Bereich: 1683 bp

9S rRNA (Syst. Id: X02547 (NCBI)/ Länge 610 bp (1189-1799))

Sense: 5'-TAAATTATGGTCAATTGTTAGTATTCA-3'

Antisense: 5'-ATAAATATATTAATTACTGCACGTTATT-3'

Amplifizierter Bereich: 600 bp

b-Tubulin (Syst. Id: K02836 (NCBI)/ Länge 1329 bp)

Sense: 5'-ATGCGCGAAATCGTCTGCGTTCAG-3'

Antisense: 5'-CTCCTCCTCGTCGAACTCGCCCT-3'

Amplifizierter Bereich: 1320 bp

Die Primer für die Northern Blot Analyse waren von OPERON, Huntsville.

2.2.6 Kits

HexaLabel™ DNA Labeling Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
HotStarTaq® Master Mix Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Omniscript® Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

2.2.7 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- und 96-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem®-Cups	Plano, Marburg
BioMax MR Film (13x18 cm)	Kodak, Stuttgart
Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Menzel-Glaser, Braunschweig
Eppendorf-/ PCR-Cups	Greiner, Frickenhausen

Material & Methoden

Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Glasfaser Mikrofilter	Whatman, Maidstone (USA)
Hybond™ - N+ (Nylon Transfer Membran)	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybond™ - ECL™ (Nitrocellulosemembran)	Amersham Biosciences, Freiburg
Imago®-EM23 Schwarzweiß-Negativfilme	Ahlemeyer GmbH, Duisburg
Immunofluoreszenz-Objektträger	bioMerieux, Nürtingen
Kupfernetzchen (200Square mesh)	Plano, Marburg
Küvetten - Vollküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Küvette mikro	Brand GmbH, Wertheim
Objektträger	Menzel-Glaser, Braunschweig
Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
Rundfilter MN 615	Macherey-Nagel, Düren
Sterilfilter, SFCA-Membran	Nalge, Hereford (UK)
Scintillationsgefäße	PerkinElmer, MA (USA)

2.2.8 Geräte

Beckmann Mikrofuge E™	Beckmann, München
Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode
Semi-dry Blotting Apparatur	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Brutschrank (27°C)	Köttermann, Uetze
Brutschrank (Hera Cell, 37°C, CO ₂ -Begasung)	Heraeus, Osterode
Elektrophoresekammer	BioRad, München
	Serva, Heidelberg
	HSI, San Francisco (USA)
Elisa Reader MRX-II Revelation	Dynex, Chantilli (USA)
FACSCalibur®	Becton Dickinson & Co, San Jose (USA)
Fluoreszenzmikroskop Olympus BH2 RFCA	Olympus, Hamburg
Hämozytometer (Tiefe 0,02 mm) nach Neubauer	Brand, Wertheim
Hybridisierungsofen BFD 53 WTP	Binder, Tuttlingen
Kamera Olympus U-PMTVC	Olympus, Hamburg

Material & Methoden

8-Kanal-Mikropipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb1600 TR	Packard, Frankfurt a. M.
LKB 11800 Pyramitone®	LKB, Stockholm (Schweden)
Mikropipetten	Abimed, Langenfeld
Mikrozentrifuge MC-13	Heraeus, Osterode
PCR-Gerät Techne	Progene, USA
pH Meter (pH 539)	WTW, Weilheim
Raster-EM Cambridge Stereo Scan 250 Mk2	Cambridge, (UK)
Röntgenentwickler SRX-101A	Konica, Unterföhring
ScanArray 5000 (konfokaler Laserscanner)	Perkin Elmer, Boston (USA)
Sterilpumpe	Microgon, Laguna Hills (UK)
Schnellkochtopf	CS Solingen, Solingen
Sigma Laborzentrifuge 302-K	Sigma, Deisenhofen
Spectrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge (UK)
Sterilbank, LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus, Hanau
Ultramikrotom OM U3 C.	Reichert, Wien (AU)
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
UV Stratalinker™1800	Stratagene, Heidelberg
Zeiss EM 109 Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Zeiss ID 02, Invertmikroskop	Zeiss, Oberkochen

2.2.9 Software und Datenbanken

Agowa	www.agowa.de (Berlin)
GeneDB	www.genedb.org (Sanger Institute, UK)
GenePix Pro™ 4.0	www.axon.com (Axon I., USA)
Matlab® 6.0	www.mathworks.com (Axon I., USA)
M-CHIPS	www.mchips.org (DKFZ, Heidelberg)
PubMed (nucleotide)	www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR	www.tigr.org (J. Craig Venter Institute)

2.3 Medien, Puffer, Lösungen

2.3.1 Medien

Grundmedium

Das MEM-Medium wurde nach Standardprotokoll (Eagle, 1959) hergestellt und beinhaltete Modifikationen nach Duszenko *et al.* (1985 und 1992).

	[mg/l]
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	265
KCl	400
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200
NaCl	6800
HEPES	140

Nach Einwiegen der Salze und des HEPES, wurde der pH-Wert auf 7,4 titriert.

	[mg/l]
L-Arginin HCl	126
L-Histidin HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	60
L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	100
L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin HCl	50
Adenosin	12

Die Aminosäuren und Adenosin wurden darin gelöst und die nachfolgend genannten kommerziellen Lösungen incl. Phenolrot zugegeben.

Material & Methoden

	[mg/l]
MEM- nichtessentielle Aminosäure	10
MEM-Vitaminlösung	10
Phenolrot	10

Alles wurde mittels Pumpe und Filter (SFCA-Membran) sterilfiltriert und bei 4°C bis zu 6 Monaten gelagert.

BF-Medium

Dem Grundmedium wurden folgende Substanzen zugegeben:

	[ml/l]
NaHCO ₃ (75,0 mg/ml in Aqua dest.)	30
L-Glutamin (29,2 mg/ml in Aqua dest.)	10
L-Cystein (3,03 mg/ml in Aqua dest.)	10
2'-Desoxythymidin (0,39 mg/ml in Aqua dest.)	10
Hypoxanthin (1,36 mg/ml in 0,1 M NaOH)	10
BCS (0,56 mg/ml in Aqua dest.)	1
BSA/Myristinsäure *	20
Penicillin/Streptomycin	5
Glucose x H ₂ O	5940
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)	150

* Für diese Lösung wurde 1 g entfettetes BSA in 20 ml Aqua dest. gelöst. Unter Rühren wurde nach und nach die Myristinsäurelösung (24 mg in 100 µl Ethanol) zupipettiert. Zur Aufbewahrung wurden 20 ml Aliquots bei -20°C eingefroren (Cross and Manning, 1973; Ferguson and Cross, 1984).

Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 7,4 nachtitriert. Nach dem Sterilfiltrieren war das BF-Medium 4 Wochen bei 4°C haltbar.

PC-Medium

Zur Kultivierung der prozyklischen Fliegenformen wurden dem Grundmedium folgende Substanzen zugegeben:

Material & Methoden

	[ml/l]
L-Prolin (60,0 mg/ml in Aqua dest.)	10
L-Glutamin (29,2 mg/ml in Aqua dest.)	10
Pyruvat (22,0 mg/ml in Aqua dest.)	10
Hemin (8,3 mg/ml in 0,1 M NaOH)	3
Penicillin/Streptomycin	5
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)	100

Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach dem Sterilfiltrieren war das PC-Medium 4 Wochen bei 4°C haltbar.

Transformations-Medium

Das Transformations-Medium dient dazu, Blutformen von *T. brucei in vitro* in prozyklische Fliegenformen zu überführen (Hamm *et al.*, 1990; Overath *et al.*, 1986). Dem Grundmedium wurde dafür hinzugefügt:

	[mg/l]
Glucose x H ₂ O	5940
Cis-Aconitat	552
Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O	4020

	[ml/l]
L-Prolin (60,0 mg/ml in Aqua dest.)	10
L-Glutamin (29,2 mg/ml in Aqua dest.)	10
Pyruvat (22,0 mg/ml in Aqua dest.)	10
Hemin (8,3 mg/ml in 0,1 M NaOH)	3
Penicillin/Streptomycin	5
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)	100

HMI-9 Medium mit Methylcellulose

Für die Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen des Stammes AnTat1.1 ohne Fibroblasten als „Feeder Cell Layer“ nach Hirumi *et al.* (1989), Modifizierung nach Engstler, M. (München).

Material & Methoden

Für 2xHMI-9 wurden 35,4 g Iscove's modified Dulbecco's medium und 4,5 g NaHCO₃ in 1 l Aqua dest. gelöst, folgende Substanzen zugegeben und der pH-Wert auf 7,3 eingestellt:

	[ml/l]
L-Thymidin (0,39 mg/ml in Aqua dest.)	27,4
L-Cystein (18,2 mg/ml in Aqua dest.)	27,4
BCS (0,56 mg/ml in Aqua dest.)	27,4
Hypoxanthin (13,6 mg/ml in 0,1 M NaOH)	27,4
Mercaptoethanol (1,56 mg/ml in Aqua dest.)	27,4
Penicillin/Streptomycin	27,4
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)	410,0

Zu 640 ml des 2xHMI-9 wurden 366 ml Methylcellulose-Lösung* hinzugefügt und alles steril bei 4°C gerührt bis keine Klumpen mehr vorhanden waren. Das Medium war so 2 Wochen haltbar.

* Dafür wurden 11 g Methylcellulose über 2 h bei 4°C unter Rühren in 366 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert.

2.3.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

Separation buffer, pH 8,0

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	20,41 g/l	(57 mM)
KH ₂ PO ₄	0,41 g/l	(3 mM)
NaCl	2,57 g/l	(44 mM)
Glucose x H ₂ O	10,91 g/l	(55 mM)

Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,76 g/l	(7,7 mM)
KCl	0,65 g/l	(8,7 mM)
KH ₂ PO ₄	0,32 g/l	(2,3 mM)
NaCl	7,01 g/l	(120 mM)

Material & Methoden

Tris buffered saline (TBS), pH 7,4

Tris-HCl	3,0 g/l	(25 mM)
KCl	0,2 g/l	(2,7 mM)
NaCl	8,0 g/l	(137 mM)

Trypanosome dilution buffer (TDB; Cross, 1975), pH 7,7

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	6,45 g/l	(18 mM)
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,28 g/l	(2 mM)
KCl	0,37 g/l	(5 mM)
NaCl	4,67 g/l	(80 mM)
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g/l	(1 mM)
Glucose x H ₂ O	3,96 g/l	(20 mM)

Citrat-Glucose-Antikoagulans (CGA), pH 7,7

Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O	29,91 g/l	(102 mM)
Glucose x H ₂ O 7,21	7,93 g/l	(40 mM)

Einfriermedium für Trypanosomen-Stabilate

TDB	77,00 ml	
Glycerin, 87%ig	23,00 ml	(20 %)

Proteaseinhibitor-Mix, 1000fach

Leupeptin	4,27 mg/ml	(1 mM)
Pepstatin A	6,86 mg/ml	(1 mM)
Chymostatin (Mix aus A, B und C)	6,03 mg/ml	(1 mM)

Alle drei Proteaseinhibitoren wurden in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.3.3 Zytotoxizitäts-Test

Lysepuffer, pH 5,5

Na-Acetat	82,03 g/l	(1 M)
TritonX-100	10,0 ml/l	(1%)

Material & Methoden

Nitrophenylphosphat-Lösung (frisch hergestellt)

Nitrophenylphosphat 20 mg/ml in Lysepuffer

2.3.4 FACS-Analyse

TMRE-Stammlösung

TMRE (Mr = 515) 25 µM in DMSO

Valinomycin-Stammlösung

Valinomycin (Mr = 1111) 10 µM in Aqua dest.

PJ/PBS (Nekrose)

Propidiumjodid (Mr = 668,4) 0,5 mg/ml in PBS

PJ/PBS (DNA-Gehalt)

Propidiumjodid (Mr = 668,4) 20 µg/ml in PBS

Digitonin-Stammlösung

Digitonin (Mr = 1229,31) 6,4 mM in Aqua dest.

Lysepuffer (10 mM Pi-Puffer), pH 7,4

KH₂PO₄ 0,31 g/l (2,3 mM)

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 2,76 g/l (7,7 mM)

RNase (10 mg/ml in Aqua dest.) 10 ml/l

2.3.5 Immunfluoreszenz

Alle Lösungen wurden stets frisch hergestellt.

Fixierlösung

Paraformaldehyd 0,8 g (4%)

PBS 19,2 ml

Das Lösen erfolgte unter ständiger Kontrolle in der Mikrowelle. Nach Abkühlen der Lösung wurde 0,1% Glutaraldehyd zugegeben.

Material & Methoden

1% BSA

BS-Albumin 10 mg/ml in PBS

Natriumphosphat-Glycin, pH 7,2

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 35,81 g/l

Glycin 7,51 g/l (100 mM)

0,2% Triton

TritonX-100 2 mg/ml in PBS

Bisbenzimid

Bisbenzimid 1 mg/ml in Aqua dest.

2.3.6 Giemsa-Färbung

Weise-Puffer

Na₂HPO₄ x 12 H₂O 23,89 g/l (67 mM)

KH₂PO₄ 0,90 g/l (6,6 mM)

Färbelösung (frisch herstellen)

Giemsa-Stammlösung 0,1 ml/ml Weise-Puffer

2.3.7 Elektronenmikroskopie

Cacodylatpuffer 2fach, (pH 7,4)

Na-Cacodylat x 3 H₂O 42,8 g/l (200 mM)

Saccharose 80,0 g/l (234 mM)

Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer

Glutaraldehyd 2% in 1x Cacodylatpuffer

Osmiumtetroxid-Lösung, 3%

Osmiumtetroxid 0,25 g

Aqua bidest. 8,18 ml

Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer

3%ige OsO₄-Lösung 1:1 in 2x Cacodylatpuffer

Uranylacetat, 5%

Uranylacetat 50mg/ml in Aqua bidest.

Diese Lösung wurde mindestens 1 d vor Gebrauch angesetzt, 1 min zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert.

Einbettungsharz: Zusammensetzung für eine Einbettung

Agar 100 Resin	2,00 g
DDSA	1,00 g
MNA	1,08 g
BDMA	0,04 g

Bleicitrat-Lösung

Bleicitrat 1 mg/ml in Aqua dest.

Mit 20-50 µl einer 10 M NaOH-Lösung alkalisieren und nach dem Lösen des Bleicitrats sterilfiltrieren.

2.3.8 Glucose- und Pyruvat-Bestimmung

BF-Medium mit 4 mM Glucose

Um im messbaren Bereich zu bleiben, wurde BF-Medium mit 4 mM Glucose (793 mg/l Glucose x H₂O) hergestellt und analog zu 2.3.1 sterilfiltriert.

2.3.8.1 Glucose-Bestimmung:

Tris-HCl-Puffer, pH 7,8

Tris-HCl	12,1 g/l	(100 mM)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,81 g/l	(4 mM)
NADP	0,79 g/l	(1 mM)
ATP	1,03 g/l	(1,7 mM)

Material & Methoden

Reaktionsmix für 40ml (ausreichend für 96-Well-Plate)

Hexokinase/Glucose-6-P-DH-Mix	229 µl
Tris-HCl-Puffer	ad 40 ml

2.3.8.2 Pyruvat-Bestimmung:

KP-Puffer, pH 7,0

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	22,82 g/l	(100 mM)
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	13,80 g/l	(100 mM)

Beide Salze wurden getrennt voneinander in Aqua dest. gelöst und die entstandenen 100 mM Lösungen gegeneinander titriert, so dass sich ein pH-Wert von 7,0 einstellte.

Reaktionsmix für 40 ml (ausreichend für 96-Well-Plate)

NADH (Dinatriumsalz)	5,68 mg	(20 mM)
LDH	2,0 µl	
KP-Puffer	ad 40 ml	

2.3.9 Aktivitätsmessung der SDH

KP-Puffer (100 mM)

$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	22,82 g/l	(100 mM)
KH_2PO_4	13,60 g/l	(100 mM)

Beide Salze wurden getrennt voneinander in Aqua dest. gelöst und die entstandenen 100 mM Lösungen gegeneinander titriert, so dass sich ein pH-Wert von 7,0 einstellte.

Lysepuffer

KP-Puffer (100 mM) mit:	
Proteaseinhibitor-Mix (1000fach)	0,1 %
TritonX-100	1 %

Natriumazid (20 mM)

Natriumazid	1,30 mg/ml in Aqua dest.
-------------	--------------------------

Material & Methoden

Succinat (100 mM)

Dinatrium-Succinat x 6 H₂O 27,01 mg/ml in Aqua dest.

DCPIP (30 mM)

2,6-Dichlorphenolindophenol 8,70 mg/ml in Aqua dest.

Für die Messung wurde diese Lösung nochmals 1:100 verdünnt, so dass eine 300 µM Lösung entstand.

2.3.10 Messung der Hemmbarkeit des Sauerstoffverbrauchs mittels O₂-Elektrode

Elektrodenpuffer, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,51 g/l	(3,7 mM)
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	5,84 g/l	(16,3 mM)
KCl	0,37 g/l	(5,0 mM)
NaCl	4,68 g/l	(80,1 mM)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,41 g/l	(2,0 mM)
Glucose x H ₂ O	0,99 g/l	(5,0 mM)
BSA	1,5%	

Der Puffer wurde vor den Messungen frisch angesetzt.

KCl-Lösung, 3 M

KCl 223,70 mg/ml in Aqua dest.

SHAM-Lösung, 50 mM

Salicylhydroxamsäure 7,66 mg/ml in Ethanol

KCN-Lösung, 5 mM

KCN 0,33 mg/ml in Aqua dest.

2.3.11 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate

BSA-Lösung

BS-Albumin 10 mg/ml in Aqua bidest.

Material & Methoden

[³⁵S]-Methionin-Stammlösung

[³⁵S]-Methionin (Hartmann) 1:10 verdünnt in Aqua dest.

5%ige TCA/Methionin

L-Methionin 298,4 mg/l (2 mM)

Trichloressigsäure 5 % in Aqua dest.

Sonstige Substanzen:

1%ige Essigsäure

Aceton

Ultima Gold

2.3.12 SDS-PAGE

Sammelgel (für 2 Gele, 10% SDS):

1 M Tris-HCl(pH 6,8) 0,75 ml

Aqua dest. 4,20 ml

Acrylamid 1,00 ml

10% SDS 60 µl

10% APS (frisch herstellen!) 30 µl

TEMED 6 µl

Trenngel (für 2 Gele, 10% SDS):

1 M Tris-HCl (pH 8,8) 4,30 ml

Aqua dest. 3,30 ml

Acrylamid 3,80 ml

10% SDS 114 µl

10% APS (frisch herstellen!) 39 µl

TEMED 12 µl

Running-Buffer, pH 8,3

Tris 3,04 g/l (25 mM)

Glycin 14,42 g/l (192 mM)

SDS 1,00 g/l (0,1%)

Coomassie-Färbung:

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau G250*	1 g/l
Ethanol	400 ml/l
Aqua dest.	500 ml/l
Eisessig	100 ml/l

* Coomassie Blau wurde zuerst in Ethanol gelöst und dann erst mit den anderen Lösungsmitteln gemischt.

Entfärbelösung

Ethanol	400 ml/l
Aqua dest.	500 ml/l
Eisessig	100 ml/l

2.3.13 Western Blot

Transferpuffer, pH 9,2

Tris	5,82 g/l	(48 mM)
Glycin	2,93 g/l	(39 mM)
10% SDS	3,75 ml/l	
Methanol	200,00 ml/l	

2 x PBS, pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	7,26 g/l	(20,3 mM)
KCl	0,40 g/l	(5,4 mM)
KH ₂ PO ₄	0,48 g/l	(3,5 mM)
NaCl	16,00 g/l	(274,0 mM)

Blocking-Lösung

Milchpulver	10% in 2fach PBS
-------------	------------------

Waschpuffer, pH 7,4

Tris-HCl	1,21 g/l	(10 mM)
----------	----------	----------

Material & Methoden

NaCl	8,77 g/l	(150 mM)
Tween 20	1,00 ml/l	(0,1 %)

AP-Puffer, pH 8,9

Tris-HCl	2,42 g/l	(20 mM)
NaCl	8,77 g/l	(150 mM)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g/l	(10 mM)

Nachweislösung

BCIP, Toluidin-Salz (28,16 mg/ml in DMF)	500 µl	(0,38 mM)
NBT (32,7 mg/ml in 70% DMF)	1000 µl	(0,40 mM)
AP-Puffer	ad 100 ml	

DHLADH-Antikörper in TBS: 1: 250

Anti-Rabbit-AK, AP-gekoppelt, in TBS: 1: 20 000

2.3.14 Northern Blot

10x FA Gel-Puffer, pH 7,0

MOPS	41,86 g/l	(200 mM)
Na-Acetat	4,10 g/l	(50 mM)
EDTA	3,72 g/l	(10 mM)

Der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.

1x FA Laufpuffer

10x FA Gel buffer	100,00 ml/l
37% ig Formaldehyd	20,00 ml/l

5x Ladepuffer

Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)	16 µl
EDTA (500 mM, pH 8,0)	80 µl
37%ig Formaldehyd	720 µl
100%ig Glycerol	2000 µl
Formamid	3084 µl

Material & Methoden

10x FA Gel buffer	4000 µl
Ampuwa	ad 10 ml

Der Ladepuffer wurde bei 4°C gelagert und war 3 Monate haltbar.

20x SSC, pH 7,0

NaCl	175,3 g/l	(3,0 M)
Na-Citrat x 3 H ₂ O	88,2 g/l	(0,3 M)

500 mM NaPi, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	(500 mM)
--	----------

Der pH-Wert wurde mit H₃PO₄ eingestellt.

Hybridmix NaPi

SDS	70,0 g/l	(7%)
EDTA (pH 7,5; 93,05 mg/ml = 0,5 M)	4,0 ml/l	
NaPi (500mM)	ad 1000 ml	

Pi-Wash

SDS	10,0 g/l	(1%)
NaPi (500mM)	80,0 ml/l	
Ampuwa	ad 1000 ml	

Stripping buffer

SDS	10,0 g	(1%)
Ampuwa	ad 1000 ml	

2.3.15 Microarray

RT-Mix

5x first stranded buffer	17 µl
0,1 M DDT	7 µl
10 mM dAGT-Mix	6 µl
1 mM dCTP	4 µl

Material & Methoden

Rnase OUT	2 µl
SuperScript II RT	4 µl

Spüllösung

SDS	1 g/l in dH ₂ O (1%)
-----	---------------------------------

20xSSC, pH 7,0

NaCl	175,3 g/l	(3,0 M)
Na-Citrat x 3 H ₂ O	88,2 g/l	(0,3 M)

Prähybridisierungs-Lösung

BSA	10 g/l
20xSSC	250 ml/l
dH ₂ O	745 ml/l
10% SDS	5 ml/l

10 mM EDTA

EDTA	1,86 mg/ml in dH ₂ O
------	---------------------------------

Waschpuffer A

SDS	2 g/l	(0,2%)
20xSSC	100 ml/l	
dH ₂ O	ad 1000 ml	

Waschpuffer B

20xSSC	100 ml/l
dH ₂ O	ad 1000 ml

Waschpuffer C

20xSSC	10 ml/l
dH ₂ O	ad 1000 ml

2.4 Methoden

2.4.1 Sterile Isolierung von *T. brucei* aus dem Blut und Herstellung von Stabilaten

Zur Anzucht von Blutformen des Stammes BF221 in Blut wurde eine Ratte mittels Ether betäubt und mit 5×10^7 Zellen aus einem Rattenstabilat intraperitoneal infiziert. Nach normalerweise 3 d erreichte die Parasitämie eine Konzentration von ca. 1×10^9 Zellen/ml Blut. Um die Ratte zu präparieren, wurde sie mittels CO₂ eingeschläfert, der Thorax mit einer Schere geöffnet und mit ca. 2 ml CGA (2.3.2) gespült. Nun wurde die *Vena cava inferior* durchtrennt und das Blut mit einer Pasteurpipette in ein steriles Falcon-Tube überführt. Um noch restliches Blut zu bekommen, wurde das Gefäßsystem durch Punktion des linken Ventrikels zusätzlich noch mit 5 ml CGA gespült. Das so erhaltene Blut wurde nachfolgend bei 3000 Upm bei 4°C für 10-15 min (Sigma 302-K) zentrifugiert, so dass Blutplasma und zelluläre Bestandteile sichtbar voneinander getrennt und der die Parasiten enthaltende *buffy coat* zwischen den Phasen erkennbar wurde. Dieser wurde zur Herstellung von Kulturstabilaten vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in 4 ml CGA resuspendiert. Nach Zugabe von 6 ml BF-Medium (2.3.1) und 2 ml Canusal[®] (entsprechen 200 U Heparin-Na) wurde die Zellsuspension ausgezählt, auf eine Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit Einfriermedium gemischt. Unter ständiger Kühlung im Eisbad wurden nun 1 ml-Aliquots in Cryo-Röhrchen pipettiert. Diese wurden zum schonenden Einfrieren für 1 h bei -20°C und über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff zur Lagerung der Stabilate bis zum Gebrauch. Zur Herstellung von Rattenstabilaten, die der Infektion neuer Tiere dienten, wurde das Blut nicht abzentrifugiert, sondern gleich mit CGA auf eine Zelldichte von ca. 5×10^8 Zellen/ml eingestellt, 1:1 mit Einfriermedium (2.3.2) verdünnt und dann analog zu den Kulturstabilaten eingefroren.

2.4.2 Axenische Kultivierung von Blutformen von *Trypanosomen brucei*, Stamm 221, aus Stabilaten

Die axenische Kultivierung erfolgte aus Stabilaten. Diese wurden sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoff-Behälter unter fließendem warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Tube mit 9 ml kaltem Blutform-Kulturmedium (2.3.1) überführt, und bei 4°C und 3000 Upm 5 min (Sigma 302-K) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml

verworfen, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:100 mittels Hämozytometer ausgezählt. Die Vorkultur wurde auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in einer Kulturflasche mit vorgewärmtem Blutform-Kulturmedium angesetzt und bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach ca. 22 h bei einer Zelldichte von 8×10^5 bis $1,2 \times 10^6$, wurde die Vorkultur verdünnt und die Hauptkultur für die jeweiligen Experimente mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml gestartet. **Die Kontrolle erfolgte immer unter Zugabe des Volumens an Lösungsmittel, in dem die jeweiligen Substanzen gelöst worden waren.** Nach ca. 36 h bei einer Zelldichte von ca. 3×10^6 Zellen/ml erreichte die Hauptkultur die stationäre Phase, um dann in die Absterbephase überzugehen.

2.4.3 Axenische Kultivierung von Prozyklischen Formen von *Trypanosomen brucei*, Stamm 221, aus Stabilaten

Das Auftauen und Waschen erfolgte analog zur Handhabung der Blutformen, nur unter Verwendung von Prozyklischen-Medium (2.3.1). Die Kultur wurde auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml angesetzt und bei 27°C kultiviert. Die Kultur wurde einmal in der Woche erneut auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und die Parasiten so als Dauerkultur oder Hauptkultur weiterkultiviert.

2.4.4 Axenische Kultivierung von BF 221 direkt nach steriler Isolierung aus dem Blut

Um große Mengen an Zellen zu erhalten, wurde eine Ratte mit 5×10^7 Zellen infiziert, das Blut nach drei Tagen analog zur Stabilat-Herstellung steril entnommen und mit 1 ml CGA verdünnt. Das Vollblut wurde 10 min bei 4°C und 3000 Upm (Sigma 302-K) zentrifugiert, das Plasma steril abgenommen und der *buffy coat* auf die DEAE-Sephacel-Säule gegeben. Zur Herstellung und Vorbereitung der Säule, wurde eine 5 ml – Spritze mit einem zugeschnittenen Filterpapier (MN 615) und einer 1 cm Schicht aus Glaswolle versehen, in Alufolie gepackt und in einem Schnellkochtopf von CS Solingen 30 min autoklaviert. Dies erfolgte auch mit dem Säulenmaterial und allen zur Isolierung benötigten Gefäßen. Scheren und Pinzetten wurden vor dem Gebrauch in Ethanol aufbewahrt und abgeflammt. Ungefähr 3 ml Sepharose wurde in die Säule gegeben und mehrmals mit steril filtriertem *separation buffer* (2.3.2) gespült. Nach dem Aufgeben des *buffy coats* wurden die Parasiten mit 20 ml *separation buffer* eluiert und wiederum 5 min bei 4°C und 3000 Upm (Sigma 302-K) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml Blutform-Medium

resuspendiert. Das Auszählen und Ansetzen der Kultur erfolgte analog zu 2.4.2.

2.4.5 Axenische Kultivierung von Bluförmigen des pleomorphen Stammes von *Trypanosoma brucei*, AnTat1.1

Mäuse wurden mit je 1×10^6 Zellen in 100 μ l sterilem CGA i.p. infiziert. Die Parasitämie wurde durch tägliche Entnahme von Blut aus der Schwanzvene überwacht. Das Blut wurde mit CGA i.d.R. 1:50 verdünnt und die Parasiten ausgezählt. Zusätzlich wurden Blutaussstriche angefertigt und einer Giemsa-Färbung unterzogen, um morphologisch den Anteil an slender – und stumpy – Formen zu bestimmen. Bei 80% slender Population wurde die Maus präpariert und die Trypanosomen über eine sterile Sephacel-Säule analog zu 2.4.4 isoliert. Die Kulturen wurden in einer 6-Well-Plate auf eine Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml in 2 ml HMI-9 Medium mit Methylcellulose (2.3.1) angesetzt. Die Inkubation erfolgte auch hier bei 37°C und 5% CO₂.

2.4.6 Transformation der Blutförmigen in die Prozyklische Form von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen vom Stamm BF221 wurden axenisch in Blutförmigen-Kulturmedium bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Kulturen mit Hilfe eines Hämozytometers ausgezählt, 1×10^7 Zellen entnommen, mit Transformations-Medium gewaschen und bei 4°C und 3000 Upm (Sigma 302-K) für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde steril abgenommen, und die Zellen in 10 ml Transformations-Medium aufgenommen, so dass sich eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml einstellte. Transformationsmedium enthält cis-Aconitat und Citrat (2.3.1), die eine Umwandlung von Blutförmigen zu Prozyklischen erleichtern (Brun *et al.*, 1981; Overath *et al.*, 1986; Hamm *et al.*, 1990). Nach 48 h bei 27°C wurden diese Kulturen wiederum ausgezählt, $2,5 \times 10^6$ Zellen entnommen, diese mit Prozyklischen-Medium gewaschen, zentrifugiert, der Überstand steril abgenommen, und die Zellen in jeweils 10 ml Prozyklischen-Medium aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei 27°C. Durch tägliches Auszählen wurde das Wachstum der Parasiten überwacht.

2.4.7 Zytotoxizitäts-Assay (Bestimmung der IC₅₀)

Dieser Assay wurde nach Bodley *et al.* 1995 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in einer 96-Well-Plate in Blutform- oder Prozyklischen- Kulturmedium ohne Phenolrot kultiviert, da dieser Farbstoff die spätere Absorptionsmessung bei 405 nm stören würde. Zu je 199 μ l Zellsuspension wurde 1 μ l der gelösten Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Dabei wurden die Konzentrationen - wenn möglich - so gewählt, dass bei der niedrigsten fast alle Zellen überlebten, die höchste jedoch alle abtötete. Als Kontrollen dienten die Absorptionen des Mediums ohne Zellen, der Zellsuspension ohne Zusatz und der Zellsuspension unter Zusatz des Lösungsmittels der jeweiligen Substanz. Nach 24 h Inkubation unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen erfolgte die Zugabe von 20 μ l p-Nitrophenylphosphat, gelöst in 1 M Natriumacetat und 1% Triton (pH 5,5) (2.3.3), pro well. Die Zellen wurden dadurch lysiert und die saure Phosphatase freigesetzt, die nun p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol umwandelte. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde die Absorption des p-Nitrophenols, die direkt proportional zur Zelldichte ist, mittels ELISA-Readers (MRX II von Dynex Technologies) bei 405 nm bestimmt.

2.4.8 FACS - Analyse

2.4.8.1 Bestimmung des relativen mitochondrialen Membranpotentials

Um Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials (ψ_m) zu bestimmen, wurden die Zellen kultiviert, ausgezählt, pro Probe 1 ml entnommen und die Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die zur Zerstörung des ψ_m kurz zuvor mit 100 nM Valinomycin behandelt wurden. Es erfolgte die Zugabe von je 0,5 μ l TMRE – Stammlösung (25 μ M in DMSO) (2.3.4). Dieser Farbstoff wird abhängig vom Protonengradienten in das Mitochondrium der lebenden Zelle aufgenommen. Nach vorsichtigem Invertieren wurden die Proben 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert und anschließend in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der Fluoreszenz lebender Zellen erfolgte mittels eines Durchflusszytometers (FACSCalibur®) im roten Kanal. Die erhaltenen Daten wurden mittels der CellQuest-Software ausgewertet.

2.4.8.2 Bestimmung nekrotischer Zellen

Kulturen wurden ausgezählt und je 500 µl entnommen. Jeder Probe wurde 0,5 µl Propidiumjodid-Stammlösung (0,5 mg/ml) (2.3.4) zugegeben, vorsichtig invertiert und ebenfalls im roten Kanal eines FACSCalibur gemessen. Diesmal dienten Zellen nach Zugabe von Digitonin (12,8 µM) als Positivkontrolle. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der CellQuest-Software.

2.4.8.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkerne

Nach dem Auszählen der Kulturen wurde je 1 ml entnommen und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer (2.3.4) und 1 µl Digitonin-Stammlösung (6,4 mM) aufgenommen und zur Lyse 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl PJ in PBS (siehe 2.3.4) wurde vorsichtig invertiert und die Proben in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte auch hier im roten Kanal und die Auswertung mit der CellQuest-Software.

2.4.9 Immunofluoreszenz

Pro Probe wurden 1×10^6 Zellen entnommen und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 200 µl PBS und 300 µl Fixierungslösung (2.3.5) aufgenommen, durch vorsichtiges Invertieren gemischt und über Nacht bei 4°C im Dunkeln fixiert.

Die fixierten Zellen wurden mit einer Mikrozentrifuge MC-13 20 sec bei 13 000 Upm abzentrifugiert und anschließend mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde zuerst in 500 µl Natriumphosphat-Glycin-Puffer aufgenommen und 15 min inkubiert. Zur Permeabilisierung erfolgte eine Inkubation für weitere 5 min nach Zugabe von 500 µl 0,2%igem Triton. Für den primären Antikörper wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS/BSA gewaschen und in 100 µl Erstantikörperlösung resuspendiert. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, das Pellet nun in 100 µl der entsprechenden Zweitantikörperlösung resuspendiert und wiederum 1 h bei 4°C inkubiert. Um Kern und Kinetoplast gegenzufärben, wurde 1 µl einer frischen Bisbenzimid-Stammlösung (1mg/ml) zugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS und mehrfach mit *Aqua dest.*

gewaschen, das Pellet in 10 µl aufgenommen und auf einen *immunoslide* (Objektträger) aufgegeben. Die Proben wurden getrocknet und unter dem Mikroskop (Olympus BH2 RFCA) betrachtet. Fotos wurden mit der Kamera Olympus U-PMTVC gemacht und die Bilder unter Verwendung von Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.4.10 Giemsa-Färbung

Für eine Übersichtsfärbung der Parasiten wurde entweder ein Tropfen der Kultursuspension oder Blut aus der Schwanzvene des infizierten Tieres auf einen mit Isopropanol gereinigten Objektträger ausgestrichen und trocknen gelassen. Die Zellen wurden zweimal mit Methanol fixiert und der Objektträger dann mit abgekochtem *Aqua dest.* abgespült. Die Färbung erfolgte mit einer 1:10 verdünnten Giemsa-Lösung in Weisepuffer (2.3.6). Nach 20 min wurde die Farblösung wiederum mit abgekochtem *Aqua dest.* abgespült und die Probe getrocknet.

2.4.11 Elektronenmikroskopie

2.4.11.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die TEM wurden mindestens 1×10^8 Zellen nach der entsprechenden Behandlung und Inkubationszeit abzentrifugiert (4°C und 3000 Upm 5min (Sigma 302-K)) und zweimal mit TDB (2.3.2) gewaschen. Nach der Fixierung mit 2% Glutaraldehyd für 1 h bei 4°C, wurden die Zellen viermal mit Cacodylatpuffer gewaschen und nochmals 1 h bei 4°C in 1,5% Osmiumtetroxid fixiert (2.3.7). Anschließend wurden die Zellen wiederum einmal mit Cacodylatpuffer und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen, um sie dann 1 h bei Raumtemperatur mit 0,5% Uranylacetat zu kontrastieren. Zur Entwässerung wurde einmal mit *Aqua bidest.* und nachfolgend jeweils 5 min mit 50%, 70%, 95%, dreimal mit 100% Ethanol und dreimal mit Propylenoxid gewaschen. Für die Einbettung der Zellen wurden diese in 50% Eponharz (in Propylenoxid) aufgenommen. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Probe mittels reinem Eponharz in Beem[®]-Cups überführt und nochmals 1 h stehen gelassen. Zur endgültigen Aushärtung wurde das Eponharz im Überstand gewechselt, und die Probe 12 h bei 45°C und 24 h bei 60°C polymerisiert.

Nach der Erhärtung des Harzes wurden die Beem[®]-Cups entfernt und die Spitze der Einbettung mit dem LKB 11800 Pyramitone[®] zu einem Trapez mit einer Basislänge von ca.

0,5 mm getrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom OM U3 (Reichert) erhalten und auf Kupfergrids (200 Square mesh) gefischt.

Um die Schnitte anzufärben, wurde ein Tropfen einer Uranylacetatlösung auf Parafilm gegeben, die Grids mit der Oberseite nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrastierung wurden die gefärbten Grids mit *Aqua bidest.* gewaschen, für 45 s in eine Bleicitrat-Lösung gedippt und dann mit einem scharfen Strahl sterilfiltriertem *Aqua bidest.* abgespült.

Die Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop mit TFP-Großbildkamera. Für die Aufnahmen wurden die Schwarzweiß-Negativfilme IMAGO[®]-EM23 (8,3 x 10,2 cm) der Firma Ahlemeyer verwendet, die 3-5 min mit einer 1:8 - Verdünnung des RHC[®] Document Type Developers entwickelt und 7-10 min mit einer 1:8 - Verdünnung des RXA[®] Rapid Fixing Baths fixiert wurden.

2.4.11.2 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Für die REM waren $2-3 \times 10^7$ Zellen ausreichend. Diese wurden analog zu den TEM-Proben fixiert und kontrastiert. Die Entwässerung erfolgte bis zum 70%igen Ethanol. Nachdem die Proben auf mit Polylysin beschichtete Träger gespottet wurden, folgte eine jeweils 8-stündige Inkubation in 96%igem und 100%igem Ethanol. Dann wurden sie in flüssigem CO₂ einer Kritischen-Punkt-Trocknung unterzogen, bevor sie mit einer Palladium-Gold-Mischung (Schichtdicke 20 nm) besputtert wurden. Dies wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Betz (Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten, Auf der Morgenstelle 28E) von Herrn Karl-Heinz Hellmer durchgeführt, der auch die Rasteraufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop Cambridge Stereo Scan 250 Mk2 durchführte.

2.4.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 10 mM Phosphatpuffer (Lysepuffer aus 2.3.4, ohne RNase) mit Proteaseinhibitoren lysiert. Jeweils 800 µl Probe oder Standard wurden mit 200 µl Farbstoff-Konzentrat (Bio-Rad) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für den BSA-Standard dienten die Konzentrationen 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml. Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung bei 595 nm (Spectrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia)).

2.4.13 Metabolitentests

Um den Glucoseverbrauch zu bestimmen, wurden die Blutformen mit den entsprechenden Substanzen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, anschließend ausgezählt, mit Blutformmedium (4 mM Glucose, 2.3.8) gewaschen und mit demselben auf eine Zelldichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml in 6-Well-Plates angesetzt. Zu den Zeitpunkten 0, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h und 5 h wurden je 500 µl entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3,5% Perchlorsäure deproteiniert und diente zur Metabolitenbestimmung. Das Zellpellet wurde für die Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt (2.4.15). Zu jedem Zeitpunkt wurde die Zellzahl durch Auszählen mit dem Hämozytometer kontrolliert. So konnten der Glucose-Verbrauch und die Pyruvat-Produktion sowohl mit der Zellzahl als auch mit der Proteinmenge korreliert werden.

2.4.13.1 Glucose-Bestimmung

Für die Glucose-Bestimmung wurden für jeden Messzeitpunkt 10 µl der jeweiligen Proben in eine 96-Well-Plate pipettiert. Sowohl die Proben als auch die Standardreihe wurden als Triplikat aufgetragen. Für den Standard wurden 0 M, 250 µM, 500 µM, 1mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM und 5 mM Glucose in deproteiniertem Medium, das nach Zugabe von 3,5% Perchlorsäure mindestens 1 h im Kühlschrank gefällt und anschließend abzentrifugiert worden war, gelöst. Um die Reaktion zu starten, wurden in jedes Well 350 µl Reaktionsmix (2.3.8.1) hinzugegeben und die Platte 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte als Endpunktsbestimmung bei 340 nm mit dem ELISA-Reader (MRX II von Dynex Technologies). Dabei war die Extinktionszunahme durch Bildung von NADPH proportional zur Glucose-Konzentration.

2.4.13.2 Pyruvat-Bestimmung

Zur Pyruvat-Bestimmung in den Proben wurden auch hier jeweils 10 µl in eine 96-Well-Plate als Triplikat pipettiert. Für den Standard wurde Pyruvat in den Konzentrationen 0 M, 250 µM, 500 µM, 1 mM, 1,25 mM, 2,5mM, 3,75 mM und 5 mM in deproteiniertem Medium (2.4.13.1) gelöst. Nach Zugabe von je 350 µl Reaktionsmix (2.3.8.2) wurde die Platte 10 min im Dunkeln inkubiert und analog zur Glucosebestimmung bei 340 nm vermessen. Hierbei wurde die Abnahme von NADH bestimmt, die proportional zur Pyruvatkonzentration war.

2.4.14 Aktivitäts-Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase

Die Aktivität der SDH wurde indirekt über eine nachgeschaltete Farbreaktion bestimmt (modifiziert nach Robinson *et al.*, 1991; Lutz, 2003). Dabei wurde Succinat und FAD über die SDH zu Fumarat und FADH₂ umgesetzt. Letzteres geht normalerweise anschließend eine Reaktion mit Ubichinon ein. Für dieses Experiment wurde Ubichinon durch den blauen Farbstoff DCPIP ersetzt, der nach der Reduktion durch FADH₂ in die farblose Form umgewandelt wird.

Pro Probe und Messung wurden 3×10^7 Zellen benötigt. Diese wurden zweimal mit eiskaltem PBS (2.3.2) gewaschen und in je 100 μ l Lysepuffer (2.3.9) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 μ l KP-Puffer, 1 ml *Aqua dest.*, 500 μ l Natriumazid und 500 μ l DCPIP und vorsichtigem Mischen wurde die Reaktion in 3 ml-Küvetten mit 500 μ l Succinat gestartet und die Abnahme der Absorption bei 600 nm über 10 min mit einem Spectrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia) verfolgt. Als Kontrolle, um unspezifische Änderungen auszuschließen, diente die Messung einer Probe ohne Zusatz von Succinat. Jede Probe wurde als Triplikat gemessen. Aus der Steigung des linearen Anfangsbereichs ($\Delta A/\Delta t$) und mit Hilfe des spezifischen Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{600\text{nm}} [\text{DCPIP}] = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ konnte die Aktivität der SDH [$\mu\text{M}/\text{min}$] bestimmt werden. Um die spezifische Aktivität [$\text{U}/\text{mg Protein}$] bestimmen zu können, wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (2.4.12).

2.4.15 Bestimmung der Hemmbarkeit der Sauerstoffverbrauchs mittels KCN und SHAM

Die Parasiten wurden wie o.g. kultiviert und nach der entsprechenden Inkubationszeit ausgezählt. Nachdem sie 5 min bei 3000 Upm abzentrifugiert worden waren, wurde das Pellet zweimal mit Elektrodenpuffer (2.3.10) gewaschen und anschließend in demselben auf eine Zelldichte von 1×10^7 pro 20 μ l eingestellt. Die Messung (Dreifachbestimmung) erfolgte mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ. Kathode und Anode wurden mit 3 M KCN-Lösung benetzt und über die Kathode eine Teflonmembran gespannt. Nach Schließen der Kammer wurden 350 μ l Elektrodenpuffer vorgelegt. Sobald der Sauerstoffgehalt stabil war, wurden 20 μ l Zellsuspension hinzugegeben und die Abnahme des Sauerstoffgehalts pro Minute gemessen. Nach 10 min Messzeit wurde zuerst 4 μ l einer 5 mM KCN-Lösung, dann 4 μ l einer 50 mM SHAM-Lösung hinzugegeben und die jeweils resultierende Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (sichtbar in einer flacheren Steigung) dokumentiert.

2.4.16 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵S]-Methionin

Blutformen wurden für 4 h, 8 h und 12 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, ausgezählt und pelletiert. Die Zellen wurden einmal in TDB gewaschen und auf eine Zelldichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Nach einer 5 min Vorinkubation im Wasserbad (37°C) wurden zu jeweils 1,5 ml Zellsuspension 7,5 µl (entsprechend 7,5 µCi) [³⁵S]-Methionin (Hartmann Analytic GmbH) zugegeben (2.3.11). Die Inkubationszeit betrug 10 und 20 min; jede Messung erfolgte als Triplikat. Zur Probenentnahme wurden 20 µl BSA-Lösung in einem Eppendorf-Cup vorgelegt, 200 µl Zellsuspension zum jeweiligen Zeitpunkt entnommen und die Proteine mit 600 µl Aceton gefällt. Die so präparierten Proben wurden für mindestens 20 min bei -20°C aufbewahrt. Um den Überstand abzunehmen, wurden die Proben 15 min bei 4°C und 13 000 Upm (Biofuge A; Heraeus Sepatech) zentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 ml 5%iger TCA mit 2 mM Methionin (kalt) resuspendiert und auf die vorbereitete Filtereinheit gegeben. Das auf dem Filterpapier verbliebene Präzipitat wurde dreimal mit je 5 ml TCA/Methionin und einmal mit eiskalter wässriger Essigsäure gewaschen. Mittels Stecknadeln wurden die Filterpapiere zum Trocknen auf einer Styroporplatte befestigt und dann in Szintillatorgefäße mit 5 ml Ultima Gold gegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag mit dem Flüssigszintillationszähler (3H-14C; 4 min) gemessen.

2.4.17 SDS-PAGE

Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist in 2.3.12 aufgelistet. Die Kammern wurden vor Gebrauch sorgfältig mit Aqua dest. und Ethanol gesäubert. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Die Polymerisationszeit beider Gele betrug ca. 45 min. Der Proteingehalt der aufzutrennenden Proben wurde nach Bradford bestimmt. Je nach Versuch wurden 10 oder 20 µg Protein pro Tasche aufgetragen, nachdem die Proben zuvor zur Reduktion und Entfaltung 5 min bei 100°C mit der entsprechenden Menge Probenpuffer erhitzt worden waren.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (200 V) unter Wasserkühlung. Sobald das enthaltene Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet, das Gel herausgenommen und entweder geblottet (2.4.18) oder gefärbt.

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 1 h in Coomassie-Färbelösung und anschließend für die gleiche Zeit in Entfärbelösung inkubiert, so dass nur die Proteinbanden sichtbar blieben.

2.4.18 Western-Blot

Die zu untersuchenden Proben wurden wie in 2.4.17 beschrieben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Um das Gel zu blotten, wurden drei Lagen in Transferpuffer (2.3.13) getränkte Whatman-Papiere, die ebenfalls getränkte Nitrocellulosemembran (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences) und dann das Gel vorsichtig auf die Anodenplatte gelegt. Die Schichten wurden mit weiteren drei Lagen Whatmanpapiere bedeckt. Bei jedem Schritt wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Membran, Gel und Filterpapier verblieben. Die Blotting-Apparatur (Biotech Feischer) wurde mit der Kathodenplatte geschlossen und mit 1-2 kg beschwert. Nach 1 h bei 12 V wurde die Membran entnommen und in 10%igem Milchpulver in 2fach-PBS über Nacht geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran 5 Mal je 5 min mit Waschpuffer gewaschen, dann mit der ersten Antikörper-Lösung in eine Folie eingeschweißt und unter Schütteln 1 h inkubiert. Waschen und Inkubation mit dem entsprechenden zweiten Antikörper erfolgten analog. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgten in TBS, da die Alkalische Phosphatase des zweiten AKs mit Phosphatpuffer inaktiviert würde. Vor der Entwicklung wurde nochmals gewaschen, um dann nach Zugabe der Nachweislösung die Farbreaktion unter ständiger Beobachtung zu starten. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion mit PBS gestoppt, die Membran gescannt (ScanJet 5370C von hp) und dann auf Filterpapier getrocknet.

2.4.19 Northern-Blot

2.4.19.1 Probenvorbereitung

Je nach Größe des Ansatzes (bedingt durch Wachstumshemmung der eingesetzten Substanzen auf die Parasiten und so geringerer Zelldichten) wurden die Kulturen entweder mit Stabilaten (2.4.2) oder mit frisch isolierten Zellen (2.4.4) gestartet. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Kulturen 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets dienten anschließend zur Isolierung der RNA, die nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Kit von QIAGEN) durchgeführt wurde. Die RNA wurde

schließlich mit Aqua bidest. (Ampuwa, Fresenius) eluiert, in Cryo-Tubes überführt und im Stickstoffbehälter aufbewahrt.

2.4.19.2 RNA-Gelelektrophorese

Für das Gel wurden 0,6 g Agarose eingewogen und vorsichtig in 50 ml Laufpuffer (2.3.14) in der Mikrowelle gelöst. In die noch warme Lösung wurden unter dem Abzug 900 µl 37%iger Formaldehyd und 1 µl Ethidiumbromid zugegeben und unter vorsichtigem Schwenken gemischt. Das Gel wurde in einen Schlitten gegossen und nach dem Erstarren noch mal für mindestens 30 min bei 4°C aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA-Proben wurden mit einem Ultrospec 2100 Photometer (Amersham Biosciences) gemessen. Zur Verifizierung der gemessenen Konzentrationen wurden zusätzlich Probegele mit 1 µg RNA gefahren, für die Experimente wurden 10-20 µg RNA verwendet. Zusammen mit dem Ladepuffer wurden die Proben 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, bevor sie ca. 1-2 h einer Elektrophorese bei 80 V unterzogen wurden. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Laufstrecke der drei großen rRNA-Banden (2 250 b, 1 850 b und 1 350 b) gemessen.

2.4.19.3 Blotting (Sandwich-Diffusions-Blot)

Zum Blotten wurde die Gelkammer mit 20x SSC (2.3.14) gefüllt. Der RNA-Kapillartransfer erfolgte nach Standard-Vorschrift auf eine Hybond™-N+ Nylon-Membran (Amersham). Nach 16 – 24 h wurde der Blot entnommen, zweimal kurz in 20x SSC gewaschen und unter Lichtausschluss trocknen gelassen. Das Cross-Linking zur Fixierung der RNA auf der Nitrocellulose erfolgte mit einem UV Stratalinker™ 1800 (Programm: AutoCrossLink).

2.4.19.4 Sondenherstellung und Markierung mit α [³²P]-dATP

Die Herstellung der unmarkierten Sonden erfolgte über RT-PCR. Die reverse Transkription der Matrizen-RNA erfolgte mit dem Omniscript® Reverse Transcription Kit, die PCR mit dem HotStarTaq® PCR Kit (beides QIAGEN) jeweils nach Herstellerangaben. Die PCR-Produkte wurden zur Größenbestimmung einer Elektrophorese unterzogen, aus dem Gel mittels QIAquick® Gel Extraction Kit gereinigt und mittels *Aqua bidest.* (Ampuwa) eluiert. Die Sonden wurden bei -20°C gelagert. Direkt vor der Hybridisierung erfolgte die radioaktive

Markierung mit [³²P]-dATP (Amersham) mit dem HexaLabel™ DNA Labeling Kit (Fermentas).

2.4.19.5 Entwicklung

Für die Hybridisierung wurde zunächst 1% BSA in Hybridmix NaPi (2.3.14) gelöst und mit 100 µg/ml Lachssperma, das vorher bei 95°C denaturiert worden war, versetzt. Darin wurde die Membran ca. 10 min geblockt. Dann wurden 50 µl der markierten Sonde (2.4.19.4) hinzugefügt und der Blot darin über Nacht hybridisiert. Alle Schritte erfolgten bei 68°C im Wasserbad. Am nächsten Tag wurde der Blot für je 20 min mit 0,5% BSA in Pi-Wash und zweimal mit Pi-Wash gewaschen, zusammen mit Röntgenfilmen in eine Entwicklerkassette gelegt (in einer Frischhaltefolie eingepackt) und 1-48 h bei -70°C exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit einem Röntgenentwickler (SRX-101A, Konica).

2.4.19.6 Stripping

Das Strippen hybridisierter Membranen erfolgte 20 min bei 68°C im Wasserbad in 1% SDS (2.3.14). Danach konnten die Membranen für weitere Hybridisierungen verwendet werden.

2.4.19.7 Auswertung

Die entwickelten Filme wurden gescannt und durch Bestimmung der Dichte der Banden (DID) mittels GelScan V5.1 semiquantifiziert.

2.4.20 Microarray-Analyse

Die Anzucht und Kultivierung der Zellen wurden nach 2.4.4 und die RNA-Isolierung nach 2.4.19.1 durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte in einer Stickstoffatmosphäre.

Alle Schritte bis zur Auswertung wurden von mir im Deutschen Krebsforschungszentrum, Department of Functional Genome Analysis, im Arbeitskreis von Dr. Jörg Hoheisel durchgeführt.

2.4.20.1 Labeling

Für das Labeling wurden 10 µg jeder RNA-Probe mit 5 µl Oligo-dT-Primer für 10 min bei 70°C auf dem Heizblock inkubiert, dann weitere 5 min auf Eis und zum Schluss kurz zentrifugiert. Für die Reverse Transkription wurde ein RT-Mix hergestellt (2.3.15) und pro 20 µl Mix entweder 2 µl Cy3 (rot) oder Cy5 (blau) zugegeben. 21 µl dieses Mixes wurden zu den RNA-Proben gegeben und 1 h bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl SuperScript II wurden die Proben über Nacht weiter bei 42°C inkubiert.

2.4.20.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung der markierten cDNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN). Zur Kontrolle der Konzentrationen wurden die Eluate einzeln photometrisch bei 260 nm (cDNA), 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5) vermessen. Die zwei unterschiedlichen Konditionen, die entweder mit Cy3 oder Cy5 angefärbt worden waren, wurden nun vereint und 1-2 h in der SpeedVac bis zur Trockne eingedampft.

2.4.20.3 Prähybridisierung der Slides

Die *array slides* wurden im DKFZ Heidelberg hergestellt und beinhalteten 24.567 PCR-Produkte, die durch zufällige Klonierung des *T. brucei*-Stammes 927 gewonnen worden waren.

Die Arrays wurden mit dem Glasschreibstift markiert, bei Raumtemperatur 10 s in Spüllösung, 10 s in Micropur-Wasser und bei 95°C 3 min in Micropur-Wasser gewaschen. Prähyb-Hüllen wurden mit Prähyb-Lösung gefüllt, die Arrays hineingelegt und so 45 min bei 62°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Abspülen mit Micropur-Wasser wurden die Glas *slides* im Stickstoffstrom getrocknet.

2.4.20.4 Hybridisierung

Die eingedampfte und markierte cDNA wurde 5 min bei 95°C in 10 µl EDTA (10 mM) gelöst und die Hybridisierungslösung „Slide Hyb-buffer #1“ (Ambion, Huntigdon) für 15 min bei 68°C vorgewärmt. Jeder Probe wurden 70 µl „Slide Hyb-buffer #1“ zugefügt und das Gemisch tröpfchenweise auf die *arrays* gegeben und unter Vermeidung von Luftblasen mit

einem Deckglas abgedeckt. Die *slide* Träger wurden verschlossen und alles über Nacht bei 65°C im Wasserbad hybridisiert. Für jede Bedingung wurden sechs Hybridisierungen durchgeführt.

2.4.20.5 Auswertung

Nachdem die Slides aus den Hybridisierungskammern entnommen worden waren, wurden sie jeweils 10 min mit Waschpuffer A bei 37°C, mit Waschpuffer B bei Raumtemperatur und mit Waschpuffer C bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt (2.3.15). Anschließend wurde wieder mit Stickstoff getrocknet. Die Arrays wurden einzeln mit einem konfokalen Laserscanner (ScanArray 5000) eingescannt und daraus mittels GenePixPro™ 4.0 Intensitätslisten erstellt. Diese dienten der Auswertung mit dem Programm Mchips (Fellenberg *et al.*, 2001 und 2002), das ebenfalls im DKFZ Heidelberg entwickelt worden war. Dabei wurden die Daten durch Einstellung von drei Parametern gefiltert und so einer sog. Korrespondenz-Analyse unterzogen. Um die nicht oder schlecht exprimierten Gene herauszufiltern, wurde die **Intensität** der Spots, die für die Endauswertung zugelassen wurden, auf mind. 60.000 eingestellt. Die *ratio* bezeichnet das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten eines Spots der beiden Proben, d.h. eine möglichst unterschiedliche Regulation dieser Sequenz in den beiden Bedingungen. Der dritte Filter war die **min/max separation**, ein Parameter der dafür sorgen sollte, dass die Menge aller Genregulationen einer Kondition sich möglichst ähnlich, aber von der anderen Kondition unterscheiden sollten. Die übrigen Regulationen wurden nach Höhe und Reproduzierbarkeit sortiert und die zugehörigen Klone bei Agowa (Berlin) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels blastN mit der Sanger Datenbank (Sanger GeneDB, Glasgow) verglichen und die Ergebnisse durch Northern Blot Analyse (2.4.19) überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1 *In vitro* Effekt auf das Wachstumsverhalten der Blutform von *Trypanosoma brucei*

Entgegen der bis dahin allgemeinen Annahme wurde im Jahre 2000 gezeigt, dass auch die Trypanosomen selbst für den erhöhten Prostaglandin-Spiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit infizierter Menschen verantwortlich sind (Kubata *et al.*, 2000). Besonders Prostaglandin D₂ spielt so nicht nur für die Krankheitssymptomatik eine wichtige Rolle, sondern auch für die Eigenregulation der parasitären Zelldichte (Figarella *et al.*, 2005). Durch Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt PGD₂ zur Einleitung eines programmierten Zelltodes. Dies gilt auch für seine Metabolite PGJ₂, Δ12-PGJ₂ und 15-desoxy-PGJ₂ (Figarella *et al.*, 2006), die in höheren Eukaryonten an zahlreiche Rezeptoren binden, unter anderem an den *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* γ.

3.1.1 Wachstumshemmung von BF221 durch Thiazolidindione

Synthetische Agonisten von PPARγ besitzen eine wesentlich höhere Affinität zu dem Transkriptionsfaktor als seine natürlichen Liganden. Um herauszufinden, ob dieser als Target für die PG-vermittelten Effekte eine Rolle spielt, wurden deshalb Substanzen der Thiazolidindion-Familie in Zellkultur eingesetzt.

In vitro führen Prostaglandin D₂ und seine Metabolite wie 15-desoxy-PGJ₂ zu konzentrationsabhängiger Hemmung des Wachstums monomorpher Trypanosomen-Stämme (Figarella *et al.*, 2005 und 2006). Auch die Thiazolidindione Troglitazon und Ciglitazon inhibierten das Wachstum der Blutformen (BF221) in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 3-1 A und B). Rosiglitazon hingegen zeigte nur einen marginalen Effekt auf die Zelldichte (Abb. 3-1 D).

Da man den stärksten inhibitorischen Effekt bei Troglitazon beobachten konnte, wurde zusätzlich α-Tocopherol eingesetzt. Dieses Molekül teilt den hydrophoben Rest des Thiazolidindions. In den gleichen Konzentrationen wie die Thiazolidindione rief α-Tocopherol jedoch keinerlei Reduktion der Zelldichte hervor (Abb.1 C). Die Wachstumshemmung scheint folglich auf den Thiazolidindion-Rest zurückzuführen zu sein.

Ergebnisse

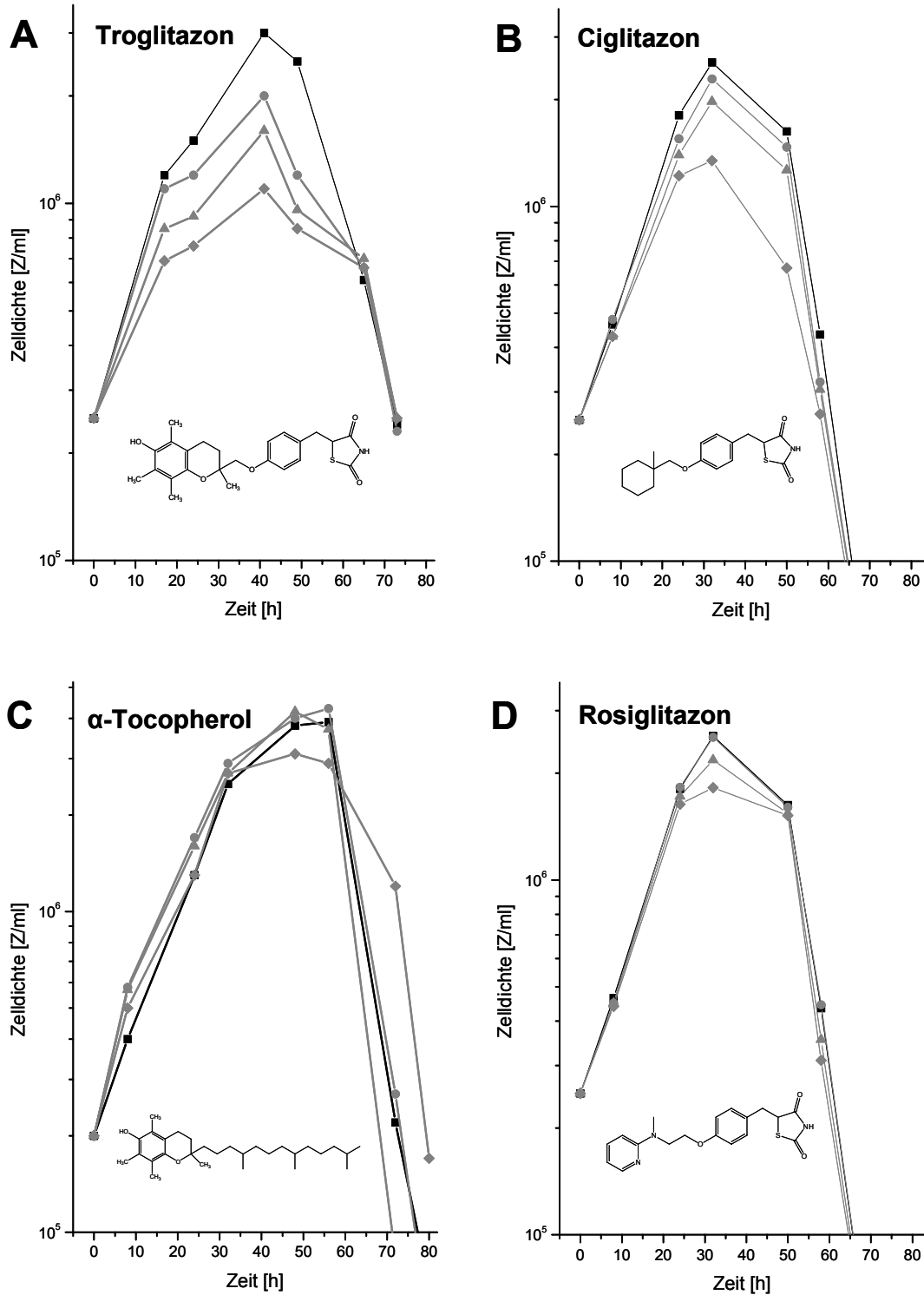


Abb.3-1. *In vitro* Wachstumsverhalten der Blutform von *T. brucei* bei Inkubation mit Thiazolidindionen. (A) Zugabe von Troglitazon, (■) Kontrolle (+0,05% DMSO), (●) 2 μ M, (▲) 5 μ M, (◆) 10 μ M; (B) Zugabe von Ciglitazon (■) Kontrolle (+0,05% DMSO), (●) 2 μ M, (▲) 5 μ M, (◆) 10 μ M; (C) Zugabe von α -Tocopherol, (■) Kontrolle (+0,05% EtOH), (●) 1 μ M, (▲) 5 μ M, (◆) 10 μ M; (D) Zugabe von Rosiglitazon (■) Kontrolle (+0,05% DMSO), (●) 2 μ M, (▲) 5 μ M, (◆) 10 μ M. Bei allen Kulturen wurde stets das gleiche Volumen unterschiedlich konzentrierter Stammlösungen oder des Lösungsmittels (Kontrollen) eingesetzt, um unspezifische Effekte auszuschließen.

Ergebnisse

Die Induktion des Zelltodes durch PGD₂-Metabolite tritt bevorzugt in stumpy-Formen auf. So führt Zugabe in der logarithmischen Phase des Zellwachstums, in der die Kultur zum großen Teil aus slender-Formen besteht, nur zu einer relativ schwachen Verringerung der Zelldichte im Vergleich zur Zugabe während der stationären Phase. Aus diesem Grund wurde das gleiche Experiment mit Troglitazon durchgeführt, das in einer Konzentration von 5 µM sofort, nach 24 h oder nach 40 h zur Kultur zugegeben wurde (Abb.3-2). Im Gegensatz zu den Prostaglandinen führte dies in der stationären Phase zwar zu einer spontanen Wachstumsinhibierung, aber nicht zu einem Absterben der Zellen.

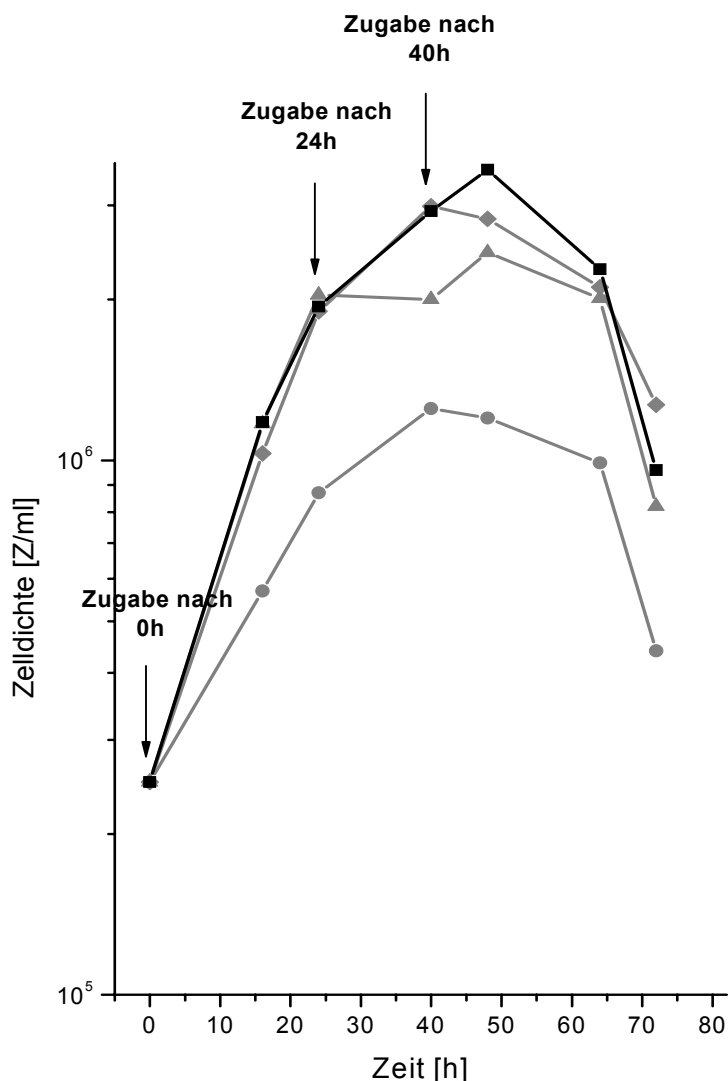


Abb.3-2. Wirkung von Troglitazon in unterschiedlichen Wachstumsphasen von *T. brucei*. Zugabe von 5 µM Troglitazon nach (●) 0 h, (▲) 24 h, (◆) 40 h in Kultur; (■) Kontrolle (+0,05% DMSO). Je später der Zeitpunkt der Zugabe gewählt wurde, desto schneller stagnierte das Wachstum der Zellen ohne sie jedoch schneller abzutöten.

3.1.2 Bestimmung der IC_{50} von Thiazolidindionen

Um einen direkten Vergleich der Substanzen über ein weiteres Konzentrationsspektrum zu bekommen, wurde die Zytotoxizität nach Bodley *et al.* (1995) bestimmt. Dazu wurden Trypanosomenkulturen 24 h mit Konzentrationen von 1 – 100, 200 oder 400 μM , je nach Löslichkeit der Thiazolidindione, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels einer Farbreaktion die Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt. Diese ist direkt proportional zum Anteil überlebender Zellen. Eine geringere Zelldichte erfolgt hierbei entweder als Resultat einer Proliferationshemmung oder Toxizität der Substanzen. Die resultierenden halbinhibitorischen Konzentrationen bestätigten die Wachstumsversuche. Alle Werte lagen im μM – Bereich. Troglitazon zeigte auch hier die niedrigste IC_{50} mit 42 μM , gefolgt von Ciglitazon mit 63 μM . Rosiglitazon erreichte in seinem Löslichkeitsbereich nur ca. 55% Wachstumsinhibierung bzw. Letalität und so eine IC_{50} von $\sim 175 \mu\text{M}$ (Abb.3-3). α -Tocopherol besaß bis 2 mM keinerlei Effekt auf die Zellproliferation. Daraus lässt sich eine strukturspezifische Proliferationshemmung ableiten, die anscheinend vom Thiazolidindion-Teil des Moleküls abhängt, durch den hydrophoben Rest jedoch in seiner Stärke moduliert wird.

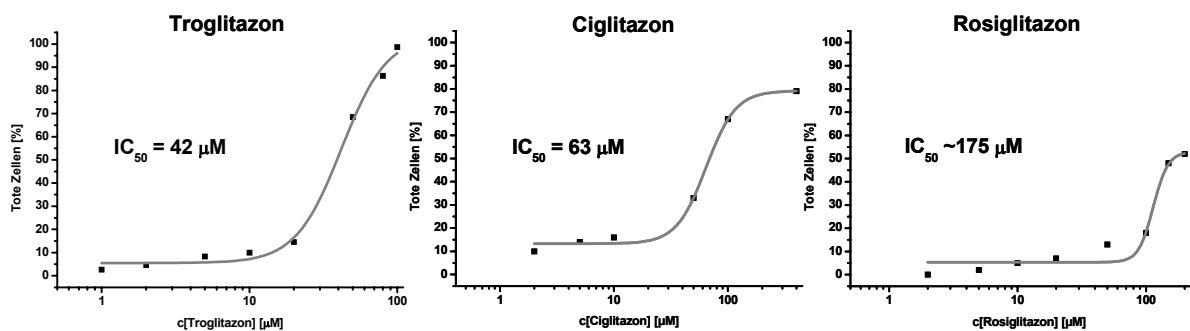


Abb.3-3. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentrationen der Thiazolidindione auf Blutformen. Die Bestimmung erfolgte nach 24 h Inkubation mit Troglitazon, Rosiglitazon und Ciglitazon. Im Falle von Rosiglitazon konnte aufgrund der Löslichkeit keine vollständige Inhibierung des Zellwachstums induziert und so eine halbinhibitorische Hemmkonzentration nur abgeschätzt werden.

3.1.3 Untersuchungen zum Zellzyklusarrest und zum induzierten Zelltod

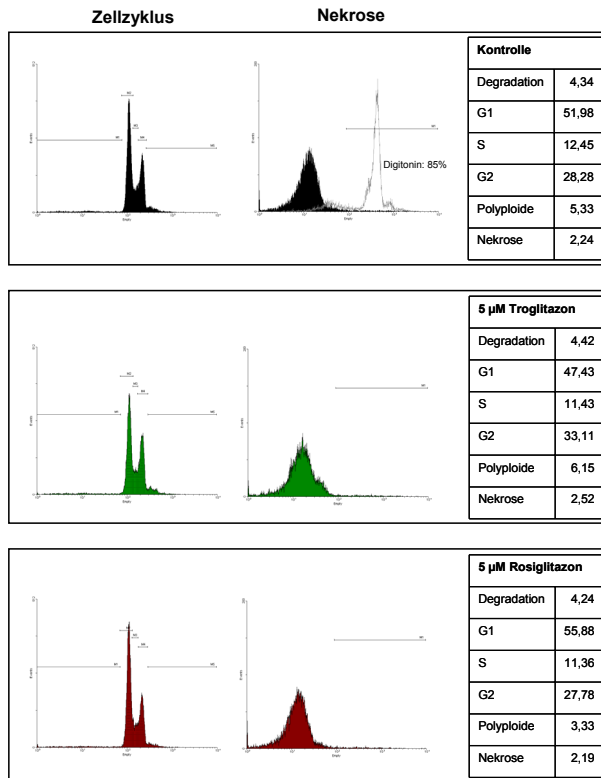
Die Reduktion der Zelldichte durch Thiazolidindione könnte sowohl durch eine Induktion des Zelltodes, aber auch durch eine schlichte Proliferationshemmung hervorgerufen werden. Um diesen Möglichkeiten nachzugehen, wurden nach Anfärben der Zellen bzw. ihrer DNA mit Propidiumjodid FACS-Analysen durchgeführt. Dabei kann der Farbstoff nur durch Zellmembranen gelangen, die durch beginnende Nekrose der Zellen permeabel geworden sind. Dies wird zum Beispiel durch Digitonin induziert, was sich in einer erhöhten Fluoreszenz der Zellpopulation bemerkbar macht (Abb.3-4 A). Weder Kontrollen noch die mit 5 μ M Troglitazon oder Rosiglitazon behandelten Zellen wiesen dieses Phänomen auf. Die bei diesen Konzentrationen schon deutlich eingetretene Wachstumshemmung ist folglich nicht auf nekrotische Prozesse zurückzuführen.

Durch Färbung der Kerne und anschließender FACS-Messung wurde der DNA-Gehalt der Zellen ermittelt. So konnten Zellpopulationen, die sich in unterschiedlichen Zyklusphasen befanden, sichtbar gemacht und zwischen den unterschiedlichen Konditionen verglichen werden. Auch hier war keinerlei Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen erkennbar (Abb.3-4 A). Unter allen Bedingungen konnten ~4% der Zellen mit DNA-Degradation und ein etwas höherer Anteil an polyploiden Zellen detektiert werden. In keiner der Zellzyklusphasen konnte ein Arrest durch Thiazolidindione wie etwa bei PGD₂ und seinen Metaboliten festgestellt werden.

Um die Ergebnisse aus der FACS-Analyse zu verifizieren, wurden zusätzlich Kerne mit Bisbenzimid gefärbt, fotografiert und jeweils ca. 200 Zellen ausgezählt. Die Auswertung dieser Kernfärbung bestätigte die Resultate der FACS-Analyse und offenbarte weder einen Zellzyklusarrest noch eine höhere Population an sterbenden Zellen (Abb.3-4 B). Somit war die Induktion von Zelltod mit Auflaufen der Zellen in einer Zellzyklusphase als Grund für die Wachstumsinhibierung auszuschließen.

Ergebnisse

A



B

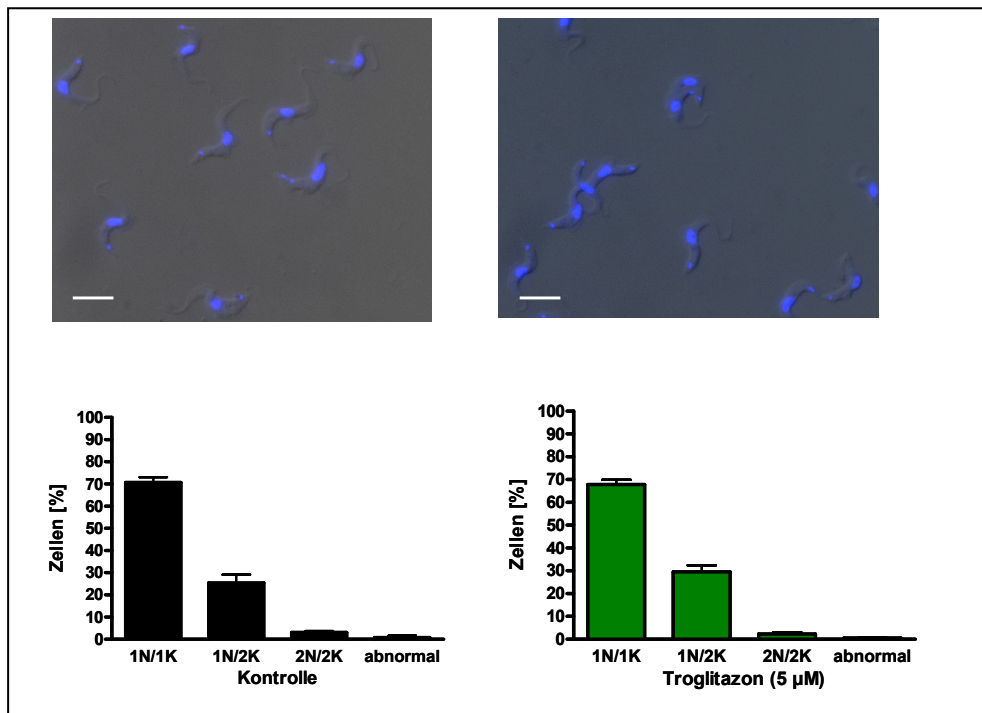


Abb.3-4. Untersuchungen zu Zellzyklus und Nekrose nach 16 h Inkubation mit 5 µM Troglitazon oder Rosiglitazon. (A) FACS-Analyse. Färbung der Kerne bzw. der Zellen nach Inkubation mit Propidiumjodid. Als Positivkontrolle für Nekrose wurden die Zellen vorher mit Digitonin behandelt. **(B) Kernfärbung der Zellen mit Bisbenzimid.** Die Zellen wurden fotografiert und Kern bzw. Kinetoplasten von ca. 200 Parasiten ausgezählt (N = Nukleus; K = Kinetoplast). Balken = 10 µm.

3.2 Untersuchungen zur Morphologie

3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um genauere Hinweise auf morphologische oder strukturelle Veränderungen zu bekommen, wurden elektronenmikroskopische Methoden genutzt. Dazu wurden Zellen des monomorphen Stammes 221 16 h mit Troglitazon behandelt und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die behandelten Zellen zeigten keine Zeichen eines zytotoxischen Effekts, wirkten im Vergleich zur Kontrolle jedoch etwas dicker (Abb.3-5).

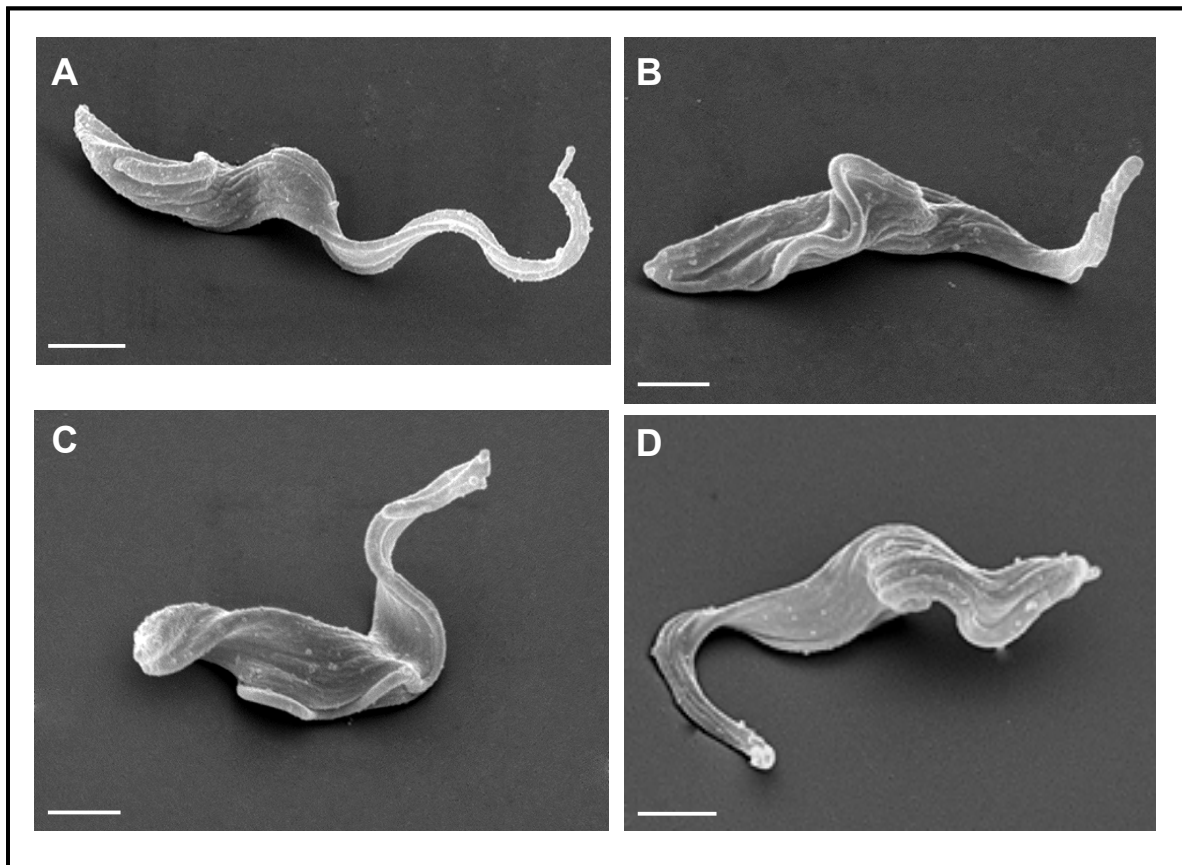


Abb.3-5. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation mit Troglitazon. Monomorphe Blutform-Zellen wurden 16 h inkubiert und dann für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. **(A)** Kontrollzelle mit slender-Morphologie; **(B-D)** Zellen nach Behandlung mit 5 μM Troglitazon sehen intakt aus, zeigen aber eine gedrungene Gestalt. Balken = 2 μm .

Ergebnisse

Betrachtet man die Feinstruktur der Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie, so kann man auch hier keine Zeichen toxischer Effekte erkennen (Abb.3-6). Auch die behandelten Zellen besitzen intakte Kerne und keine gesteigerte Anzahl an Lysosomen oder Autophagosomen. Auffällig sind jedoch die erhöhte Glykosomen-Dichte und eine Vergrößerung des Mitochondriums. Zudem scheint das Mitochondrium besser entwickelt zu sein, was sich in einer deutlicheren Ausprägung der Cristae im Mitochondrium bemerkbar macht. Dies würde für eine Differenzierung der slender-Blutformen in die stumpy-Form sprechen, die schon ein stärker ausgeprägtes Mitochondrium besitzen, um Teile der Atmungskette zu aktivieren. Aus diesem Grunde wurden als weitere Kontrolle Zellen mit CPT-cAMP behandelt. Hierbei handelt es sich um ein membrangängiges cAMP-Analogon. Für diesen Botenstoff wurde eine Rolle bei der Induktion der Differenzierung nachgewiesen (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002). Auch diese Zellen wiesen keine sichtbaren Zellschäden auf, aber ein deutlich ausgeprägteres Mitochondrium, das denen der Troglitazon-behandelten Zellen entspricht (Abb.3-6).

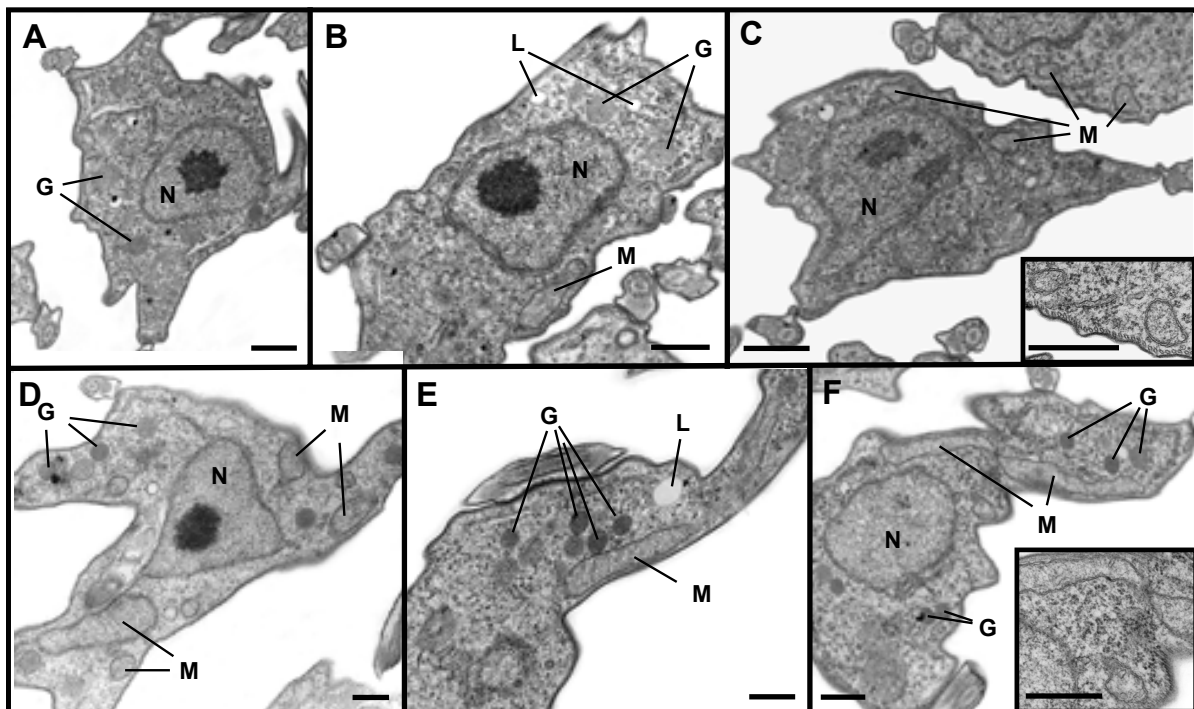


Abb.3-6a. TEM-Aufnahmen nach 16 h Inkubation mit Troglitazon. (A-C) zeigen Kontrollzellen mit intaktem Nucleus und einem rudimentär ausgebildeten Mitochondrium. **(D-F)** Zellen nach Behandlung mit 5 μM Troglitazon zeigen keine Anzeichen von Zytotoxizität. Der Kern ist intakt, keine Erhöhung der Lysosomenzahl ist sichtbar. Das Mitochondrium hingegen ist vergrößert und besitzt mehr Einstülpungen. Zudem ist die Anzahl der Glykosomen erhöht. (G = Glykosom; L = Lysosom; M = Mitochondrium; N = Nucleus). Balken = 0,5 μm .

Ergebnisse

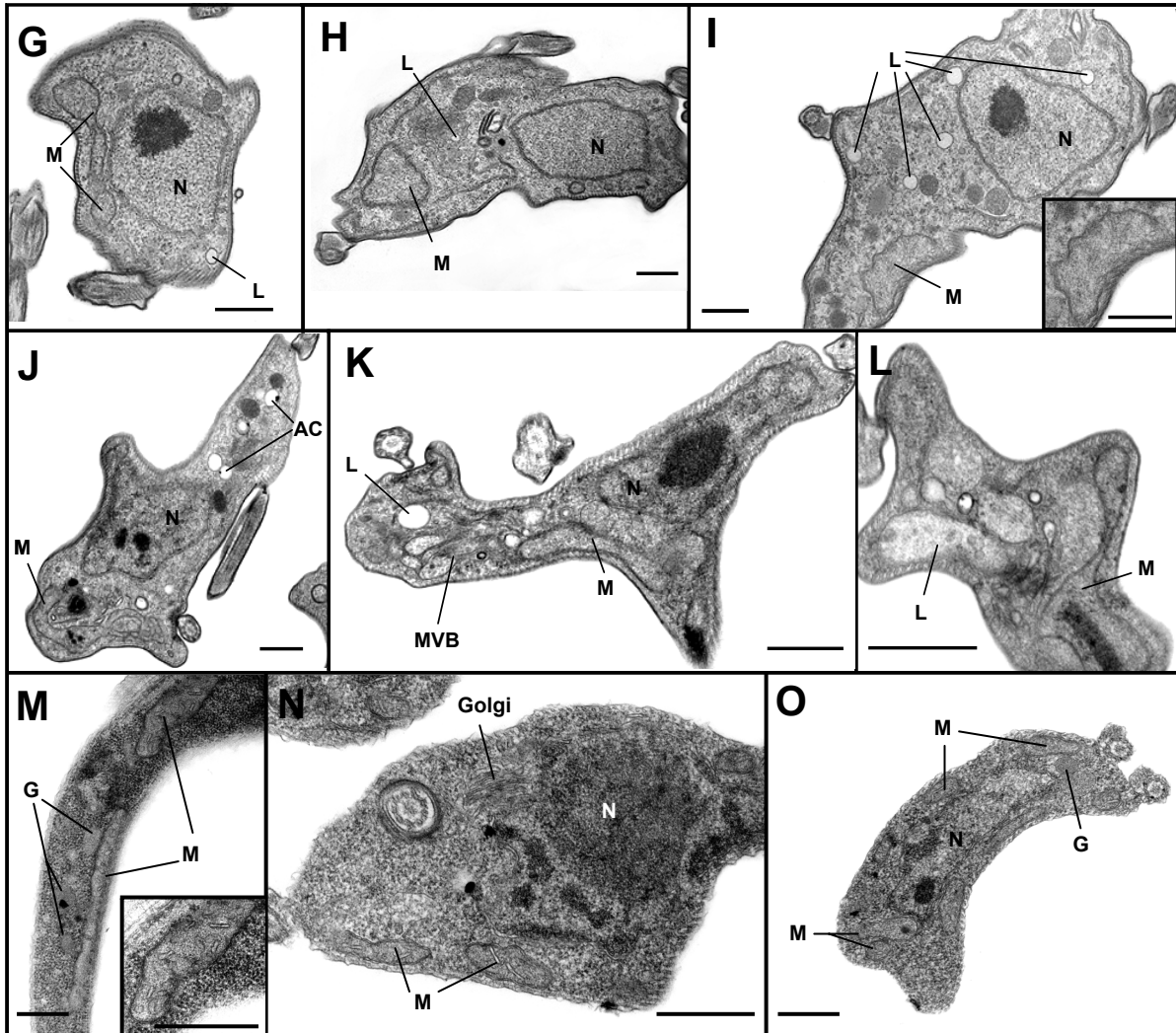


Abb.3-6b. TEM-Aufnahmen verschiedener Entwicklungsstadien. (G-I) Zellen, die mit 100 μM CPT-cAMP behandelt wurden, zeigen ebenfalls einen intakten Nukleus und keine Anzeichen von Zytotoxizität. Das Mitochondrium ist analog zu den Troglitazon-behandelten Zellen vergrößert und besitzt mehr Einstülpungen. (J-L) Blutform-Zellen aus der stationären Phase besitzen ebenfalls noch einen intakten Nukleus und ein weiter entwickeltes Mitochondrium. Allerdings zeigen die Zellen eine gesteigerte Anzahl an Lysosomen und *multi vesicular bodies*, was ein Indiz für den Eintritt in die Absterbephase sein könnte. (M-O) Prozyklische Formen. (AC = Acidocalcisom; G = Glykosom; L = Lysosom; M = Mitochondrium; MVB = *multi vesicular body*; N = Nukleus). Balken = 0,5 μm.

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen des pleomorphen Stammes AnTat1.1

Der monomorphe Stamm MITat1.2 wurde durch anfängliche Infektion eines Klones und hintereinandergeschaltete Blutpassagen auf schnelles Wachstum selektiert. Dies hatte zur Folge, dass die Zellen im Wirt kaum zu stumpy-Zellen differenzieren und ihn so durch die hohe Parasitämie nach ein paar Tagen zerstören. In Kultur kann man monomorphe Zellen durchaus zur Differenzierung anregen (Hamm *et al.*, 1990; Hesse *et al.*, 1995), morphologisch sind sie jedoch nicht so eindeutig in slender- oder stumpy-Formen einzuteilen. Für die lichtmikroskopischen Experimente wurde deshalb der pleomorphe Stamm AnTat1.1 herangezogen. Im Tier verursacht dieser einen periodischen Infektionsverlauf.

Für den Versuch wurde eine Maus mit 2×10^6 Zellen infiziert. Allerdings befanden sich viele tote Zellen im Stabilat, so dass die wahre Infektionszahl bei ca. 3×10^5 Zellen lag. Sowohl die Parasitämie als auch der Anteil an slender- und stumpy-Formen wurde täglich überprüft. Schließlich erfolgte die Präparation der Maus bei einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml und einem slender-Anteil von 80%. Nach der Isolation der Zellen aus dem Blut, wurden sie 16 h mit $5 \mu\text{M}$ Troglitazon inkubiert, anschließend fixiert und mit Giemsa angefärbt. Ungefähr 250 Zellen jeder Kondition wurden ausgezählt und ihre Morphologie bestimmt.

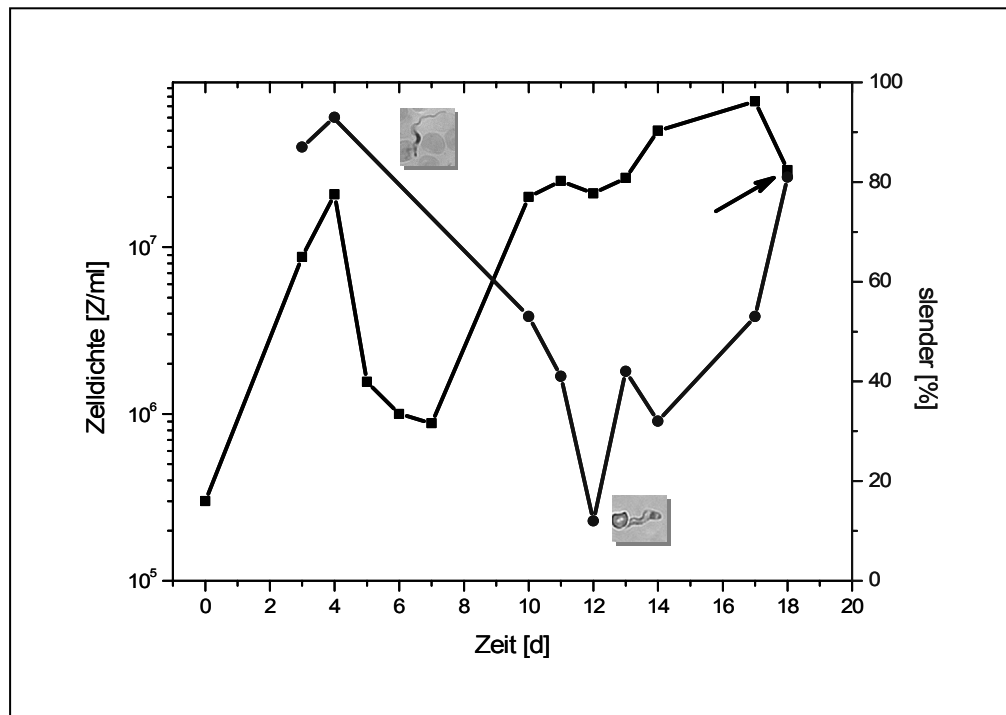


Abb.3-7. Infektionsverlauf von pleomorphen Zellen des Stammes AnTat 1.1 in der Ratte. Die Höhe der Infektion wurde durch Auszählen, die Morphologie der Parasiten durch Giemsa-Färbung bestimmt. Bei einer slender-Population von 80% wurden die Trypanosomen isoliert und für den weiteren Versuch eingesetzt. (■) Zelldichte, (●) slender-Population.

Ergebnisse

Während nach 16 h Inkubation die slender-Population in der Kontrolle noch 73% betrug, wies sie in der Kultur, die mit Troglitazon behandelt worden war, nur noch 33% auf. Dagegen zeigten 64% der Troglitazon-Zellen stumpy-Morphologie. In beiden Bedingungen waren etwa gleich viele tote oder entartete Zellen vorhanden, der jeweilige Anteil jedoch unter 5%. Dies spricht für eine Einleitung der Differenzierung von slender- zu stumpy-Formen durch Troglitazon, zumindest unter morphologischen Gesichtspunkten.

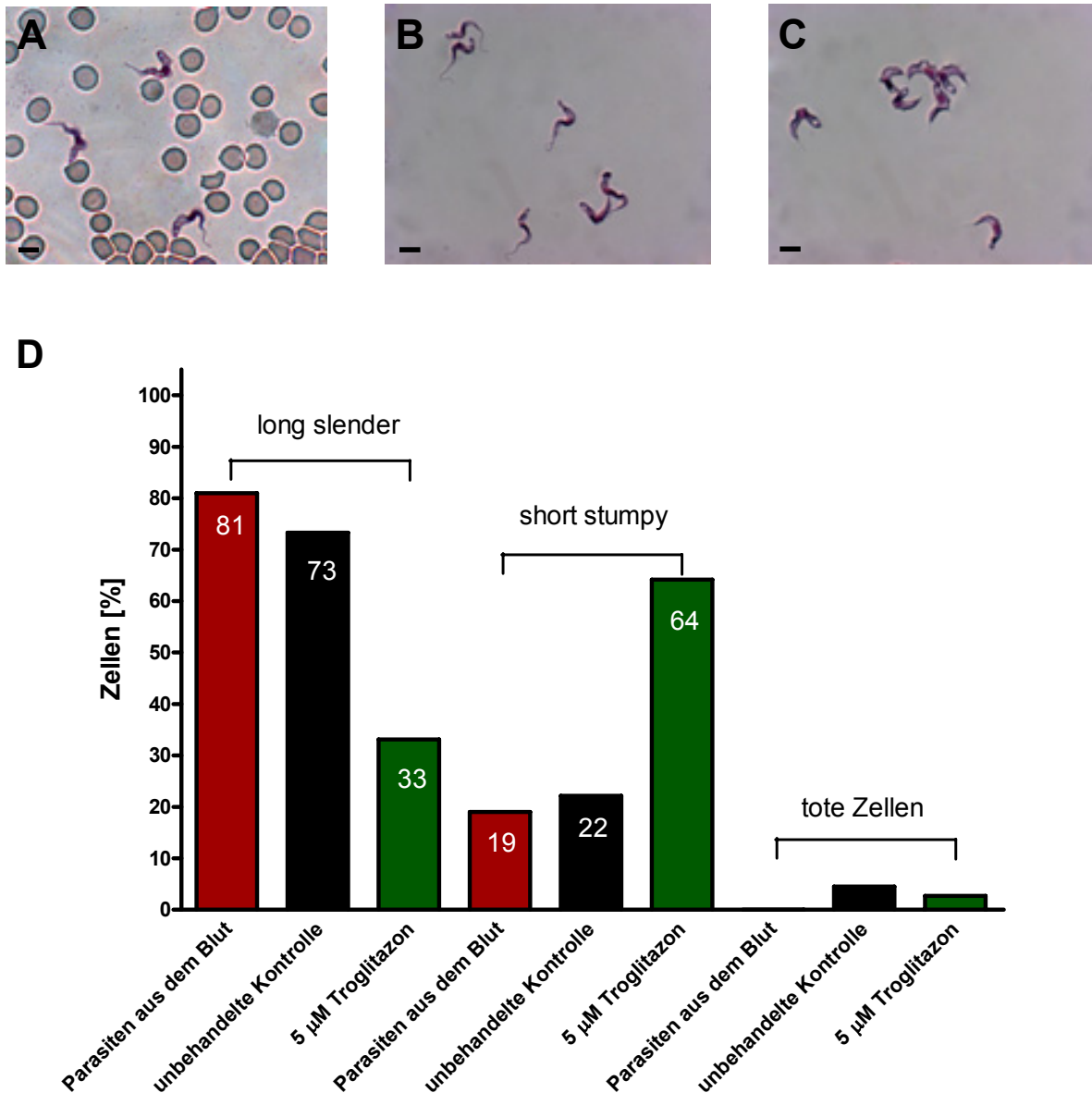


Abb.3-8. Auswirkung von Troglitazon auf die Morphologie pleomorpher Blutform-Zellen. (A) Blutformen vor der Isolierung aus dem Blut, (B) Kontroll-Zellen nach 16 h Inkubation, (C) Zellen nach 16 h Behandlung mit 5 µM Troglitazon. (D) Nach der Isolierung aus dem Blut (rot) wurden die Parasiten 16 h in Kultur mit 5 µM Troglitazon (grün) behandelt, anschließend Giemsa-gefärbt und die Morphologie bestimmt. Dabei zeigten 64% der behandelten Zellen stumpy-Gestalt, hingegen nur 22% der Kontrollpopulation. Auch hier waren keine zytotoxischen Effekte erkennbar. Balken = 10 µm.

3.3 Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels

3.3.1 Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Differenzierung von slender- zu stumpy-Formen wird nicht nur von morphologischen Veränderungen begleitet, sondern geht auch mit einer Aktivierung des Mitochondriums einher. So sind die Zellen für das Überleben in der Fliege präadaptiert, in der sie sich nicht mehr ausschließlich auf das Angebot an Glucose verlassen können. Nach Infektion der Fliege können die Parasiten ihre Atmungskette vervollständigen und so zu prozyklischen Zellen transformieren.

Die Aktivierung des Mitochondriums äußert sich unter anderem in einer Erhöhung seines Membranpotentials ψ_m , das dazu beiträgt, die im Cytosol gebildeten Enzyme in das Mitochondrium zu transportieren (Priest and Hajduk, 1996). Im Gegensatz dazu verringert sich ψ_m beispielsweise beim programmierten Zelltod (Figarella *et al.*, 2005).

Um Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials zu untersuchen, wurden Zellen 16 h inkubiert und anschließend mit TMRE angefärbt. Dieser kationische Fluoreszenzfarbstoff reichert sich potentialabhängig im Mitochondrium an. Anschließend wurde mittels FACS-Analyse die Fluoreszenzintensität der Zellen bestimmt (Abb.3-9). Als Kontrolle dienten sowohl unbehandelte Zellen als auch Zellen, denen 100 nM Valinomycin zugegeben worden war. Letzteres führt zu einem Verlust des Membranpotentials, also zu einer geringeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontroll-Population. Bei den Thiazolidindionen Troglitazon, Ciglitazon und Rosiglitazon besaß die Mehrheit der Zellen jedoch ein erhöhtes ψ_m , was in einer Verschiebung des Peaks zu erhöhten Fluoreszenzintensitäten sichtbar war (Abb.3-9). Diese Verschiebung war allerdings nicht oder nur geringfügig von der Konzentration der Substanzen abhängig.

Ergebnisse

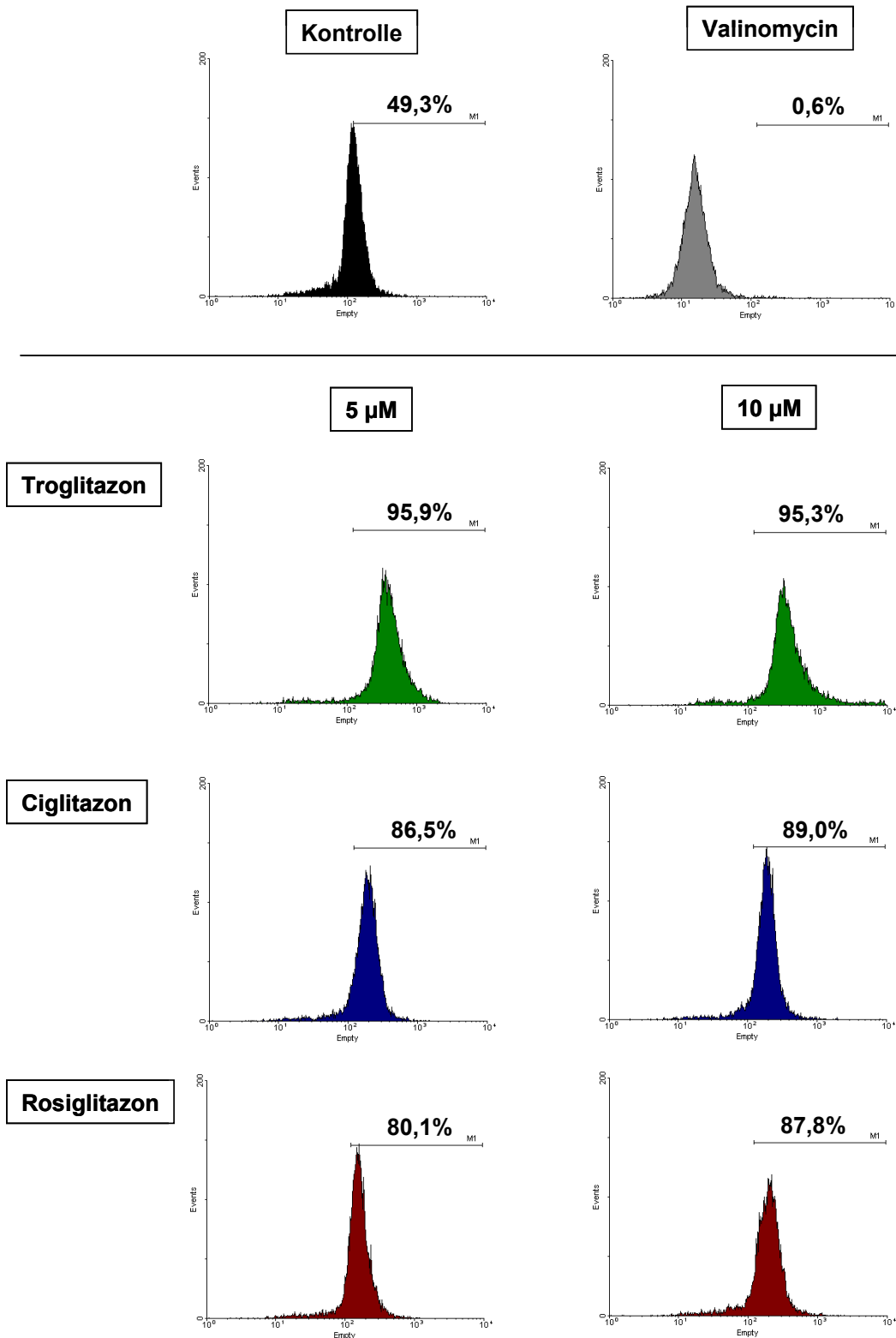


Abb.3-9. FACS-Analyse zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (ψ_m). Zellen wurden vor Zugabe von TMRE 16 h mit 5 oder 10 μM der jeweiligen Glitazone inkubiert. Da TMRE die Mitochondrien potentialabhängig anfärbt, konnten so Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials durch Verschiebung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Behandlung mit Valinomycin diente als Positivkontrolle zum vollständigen Verlust von ψ_m . Alle Glitazone hingegen führten zu einer Erhöhung von ψ_m .

3.3.2 Sauerstoffverbrauch und Aktivität der Succinatdehydrogenase

Um die Anzahl der Reduktionsäquivalente im Glykosom im Gleichgewicht zu halten, wird über einen shuttle-Mechanismus Glycerol-3-Phosphat zum Mitochondrium transportiert, mit Hilfe der trypanosomalen alternativen Oxidase (TAO) zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt und wieder ins Glykosom zurückgeführt. Zur Reduktion des dabei zu Ubichinol umgewandelten Ubichinons verbraucht die TAO Sauerstoff, der zu Wasser oxidiert wird. Hemmt man die TAO beispielsweise durch SHAM, so geht der Sauerstoffverbrauch zurück. Dabei ist das Ausmaß dieser Hemmung ein Maß für die glykolytische Aktivität der Zellen, also besonders ausgeprägt bei slender-Formen. Wird bei der Differenzierung zu stumpy-Formen die Atmungskette in Teilen aktiviert, so steigt im Gegensatz dazu die Hemmbarkeit durch Cyanate wie KCN und erreicht bei prozyklischen Fliegenformen mit voll entwickelter mitochondrialer Aktivität ein Maximum.

Beobachtet man die Sauerstoff-Konzentration bei gleicher Zellzahl im Meßsystem, so erkennt man einen höheren Verbrauch durch Troglitazon-behandelte Blutformen. Coinkubiert man Zellen jedoch mit dem PPAR γ -Antagonisten T0070907 und Troglitazon, so tritt dieser Effekt nicht auf. T0070907 bindet in höheren Eukaryonten irreversibel an PPAR γ und besitzt hohe Spezifität und Affinität zu diesem Protein (Lee *et al.*, 2002). Auch in *Trypanosoma brucei* kann man eine niedrigere halbinhibitorische Konzentration im μM Bereich beobachten, die jedoch die Hemmkonzentrationen in Bezug auf die Troglitazon-induzierten Effekte bei weitem übersteigt (Abb.3-10). Folglich kann zumindest der durch Troglitazon erhöhte Sauerstoffverbrauch durch T0070907 antagonisiert werden.

Um die Hemmbarkeit des Sauerstoffverbrauchs zu überprüfen, wurden Zellen 16 h mit Troglitazon inkubiert und nach konstantem Sauerstoffabfall 5 mM KCN zugegeben. Als Kontrollen dienten sowohl unbehandelte Blutformen als auch prozyklische Parasiten. KCN inhibierte den Sauerstoff-Verbrauch in behandelten Zellen um ca. 20%, was gleichbedeutend mit 2/3 der Hemmung in prozyklischen Zellen war. Obwohl der Unterschied zu unbehandelten Zellen aus der logarithmischen Phase signifikant war, zeigte sich auch hier eine Hemmung durch KCN. Dies steht im Widerspruch zur Annahme, monomorphe Zellen seien gleichbedeutend mit slender-Formen. Letztere sollten aufgrund ihres Metabolismus keine Hemmbarkeit durch Cyanate besitzen. Um einen weiteren Vergleich zu haben, wurde der Versuch zusätzlich mit direkt aus dem Blut des infizierten Tieres isolierten Zellen durchgeführt. Diese wiesen tatsächlich keine Cyano-Sensitivität auf. Monomorphe Trypanosomen sind also tatsächlich mit slender-Formen gleichzusetzen, allerdings nur in der

Ergebnisse

Blutbahn ihres Wirts. Offenbar induzieren schon Kultivierungsbedingungen an sich eine beginnende Differenzierung.

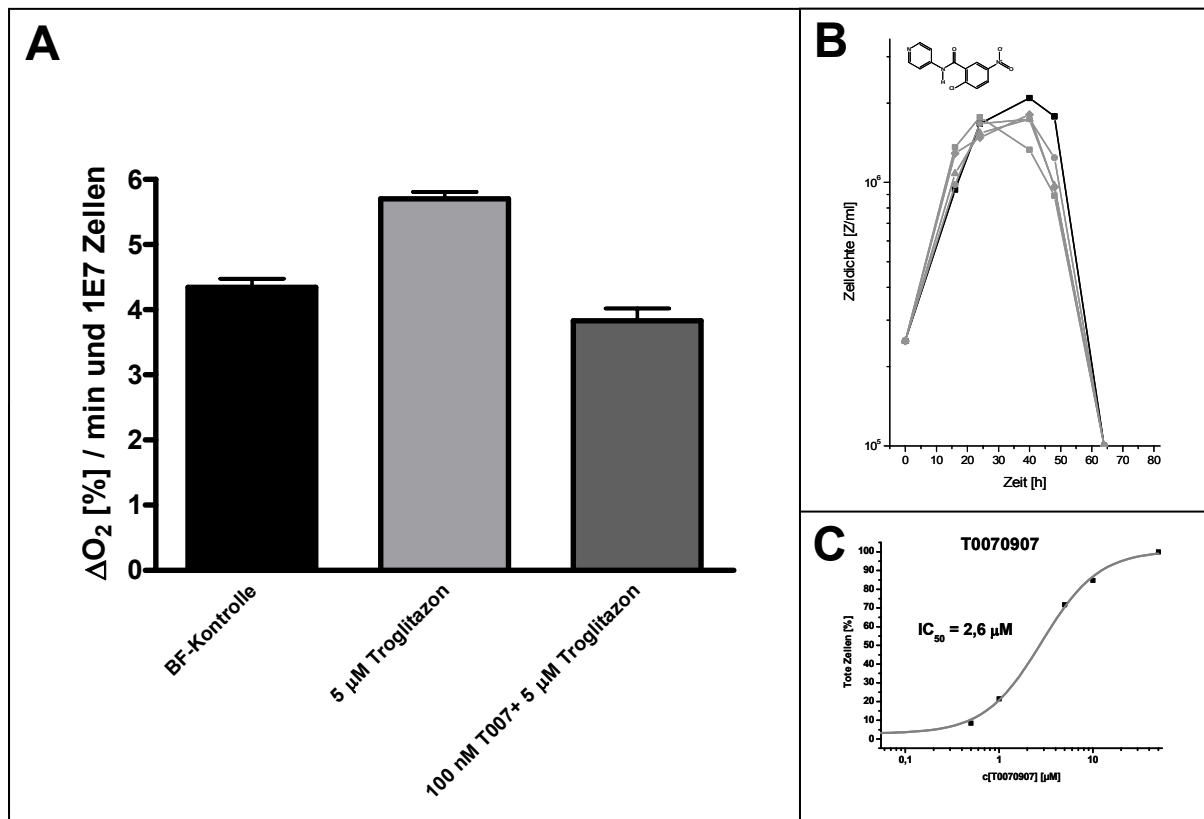


Abb.3-10. Messung des Sauerstoffverbrauchs. (A) Zellen, die 16 h mit 5 μ M Troglitazon inkubiert wurden, verbrauchten deutlich mehr Sauerstoff als Kontrollzellen. Wurden sie allerdings mit dem PPAR γ -Antagonisten T0070907 coinkubiert, so sank der Sauerstoffverbrauch wieder auf Kontrollniveau ab. **(B)** Wachstum von Blutformen nach Behandlung mit T0070907 (●) 1 nM, (▲) 10 nM, (◆) 100 nM, (■) 1 μ M, (■) Kontrolle. In den dokumentierten effektorischen Konzentrationen konnte keine Wachstumshemmung durch den Antagonisten festgestellt werden. **(C)** Bestimmung der IC_{50} in Blutform-Zellen nach 24 h Inkubation mit T0070907.

Eine mit der Differenzierung einhergehende mitochondriale Aktivierung offenbart sich auch in der Aktivierung entsprechender Enzyme wie der Succinatdehydrogenase (SDH). Durch nachgeschaltete Farbreaktion von der blauen zur farblosen DCPIP-Form, konnte der Umsatz von Succinat in Anwesenheit der jeweiligen Zelllysate photometrisch verfolgt werden. Auch hier zeigte sich eine signifikant höhere SDH-Aktivität in den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, mit einer maximalen Aktivität in prozyklischen Parasiten.

Ergebnisse

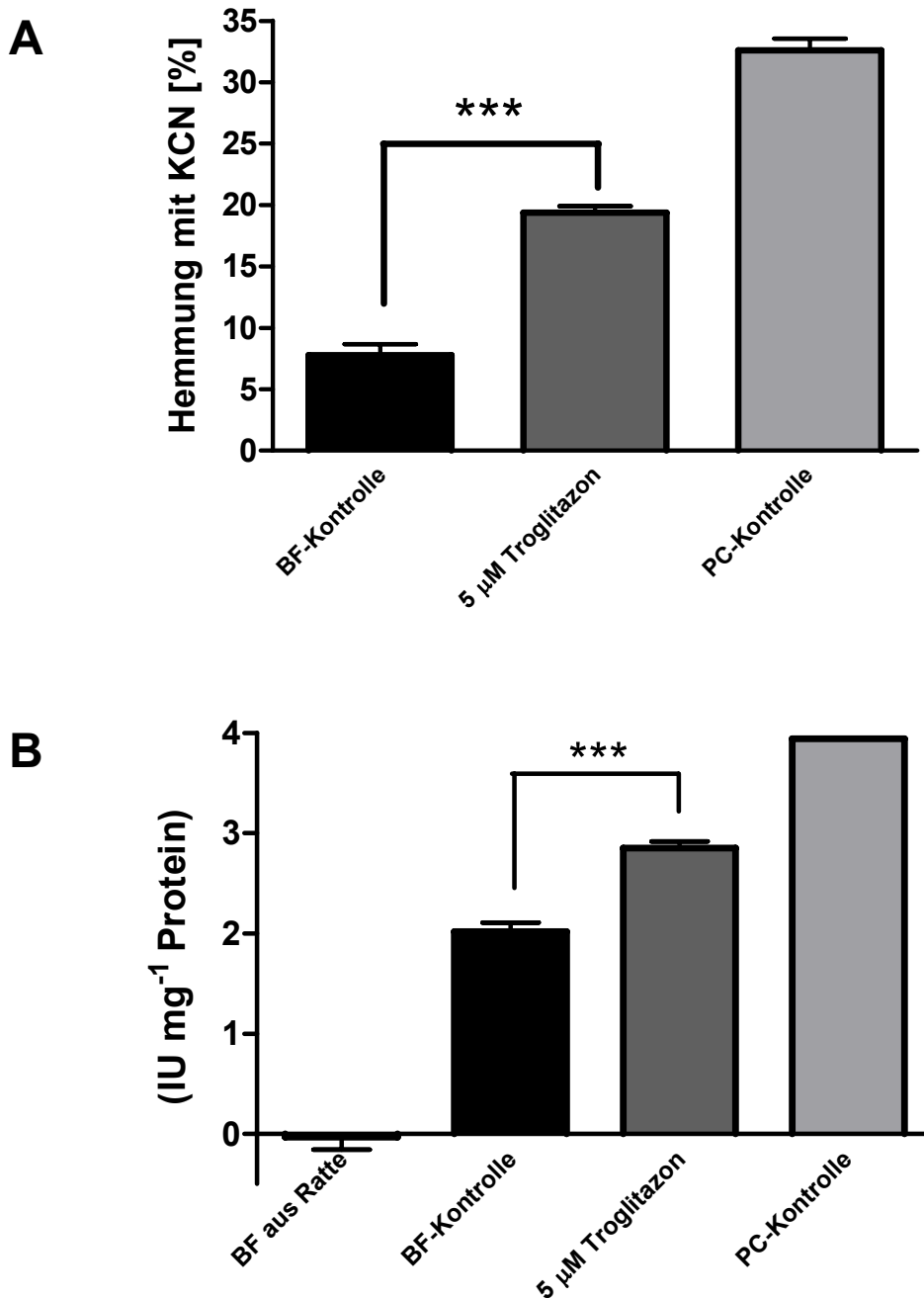


Abb.3-11. Aktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels nach Behandlung mit Troglitazon.

(A) Nach Inkubation von Blutform-Zellen mit Troglitazon steigt die Hemmbarkeit des Sauerstoffverbrauchs durch KCN. Dies ist ein Indiz für eine Aktivierung der Atmungskette und erster Cytochrome. **(B)** Bestimmung der SDH-Aktivität. In behandelten Blutform-Zellen zeigt sich wiederum eine signifikante Erhöhung der Aktivität. Monomorphe Zellen aus der Ratte entsprechen hingegen zu 100% slender-Formen und besitzen dementsprechend keine SDH-Aktivität. Bei beiden Versuchen wurden prozyklische Fliegenformen (PC) als Positivkontrolle genutzt, da sie eine voll entwickelte Atmungskette besitzen.

3.3.3 Änderungen der Expression mitochondrialer Marker

In Trypanosomen verläuft die Regulation der Genexpression in der Regel nicht durch Änderungen der Transkriptions-Initiation. Vielmehr wird die Anzahl der Transkripte und Proteine über ihre Stabilität bzw. durch Regulation ihrer Degradation kontrolliert (Clayton, 2002). Dieses Degradierungs-Muster ändert sich während der Differenzierung bezüglich der für die Regulation und die metabolischen Veränderungen bedeutenden Proteine.

Eines der gut charakterisierten Markerenzyme für die mitochondriale Aktivierung in Trypanosomen ist die Dihydroliponamid Dehydrogenase (Lohrer und Krauth-Siegel, 1990). Durch *Western blot* Analyse nach 16 h Inkubation mit Rosiglitazon und Troglitazon konnte eine Steigerung der DHLADH-Expression von 26% bei den Kontrollzellen zu 28% bzw. 43% beobachtet werden. Auch hier war der Effekt von Troglitazon um einiges deutlicher. Die DHLADH-Menge in prozyklischen Formen wurde auf 100% gesetzt.

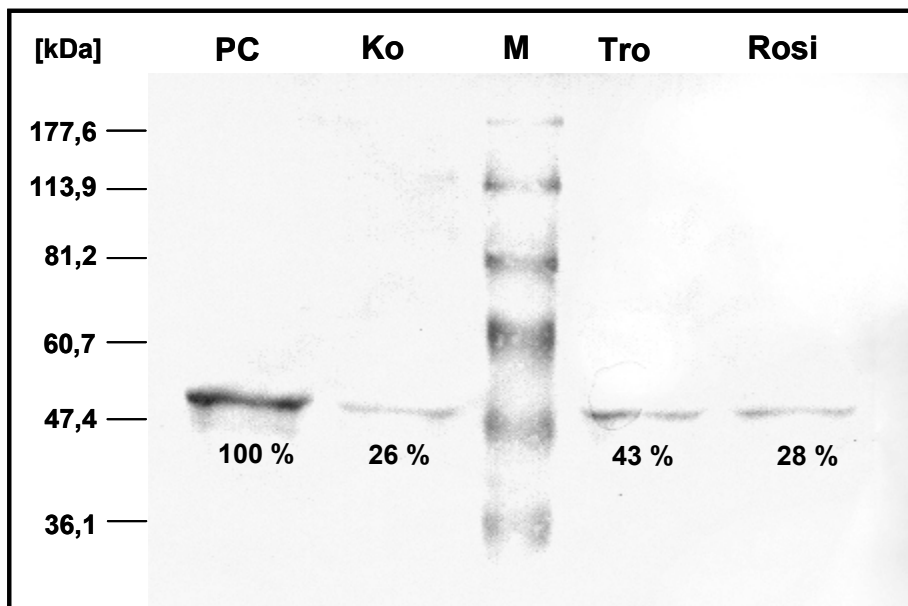


Abb.3-12. Erhöhung der DHLADH-Expression durch Troglitazon. Nach 16 h Inkubation wurde mittels Western-Blotting die Expression der Dihydroliponamid-Dehydrogenase bestimmt. Es wurden jeweils 20 µg Protein pro Bande aufgetragen; die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford, 1976. Als Referenzpunkt für die semiquantitative Bestimmung diente die Expression in prozyklischen Zellen. Die Analyse der Bandendichte erfolgte mittels GelScan V5.1. (PC = prozyklische Zellen, Ko = Blutform-Kontrollzellen, Tro = Troglitazon, Rosi = Rosiglitazon, M = Marker).

Ergebnisse

Priest und Hajduk (1994) zeigten eine Änderung des Transkriptionsmusters verschiedener mitochondrialer Enzyme wie der Cytochrom-Reduktase oder der Cytochrom-Oxidase. Für Cytochrom C wiesen sie eine transiente Steigerung der Transkriptionsmenge von 0,06 Einheiten in slender-Formen, 0,17 Einheiten in stumpy-Formen zu 1 Einheit in prozyklischen Formen nach. Eine spezifische Regulation über die Stabilität der Transkripte im Verlaufe des Lebenszyklus konnte auch bezüglich der 9S rRNA und 12S rRNA beobachtet werden (Michelotti und Hajduk, 1987; Michelotti *et al.*, 1992).

Nach Inkubation der Zellen und RNA-Isolierung wurden *Northern blot* Analysen durchgeführt. Dabei dienten sowohl unbehandelte Blutformen als auch prozyklische Formen als Kontrollen. Als Ladekontrolle dienten die drei großen RNAs (2260 bp, 1860 bp und 1360 bp). Die *blots* zeigten sowohl für Cytochrom C-Transkripte als auch für die 9S rRNA eine stärkere Expression in Troglitazon-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Blutform-Kontrollen. Die semiquantitative Bestimmung der Bandendichte bestätigte dies. Dafür wurden die Dichte-Werte der Blutform-Kontrollen gleich 1 gesetzt und die Dichte der anderen Konditionen relativ dazu berechnet. Cytochrom C und 9S rRNA stiegen in den behandelten Zellen auf 1,24 bzw. 7,04 Einheiten an und erreichten in prozyklischen Zellen ein Level von 2,03 bzw. ~17 Einheiten.

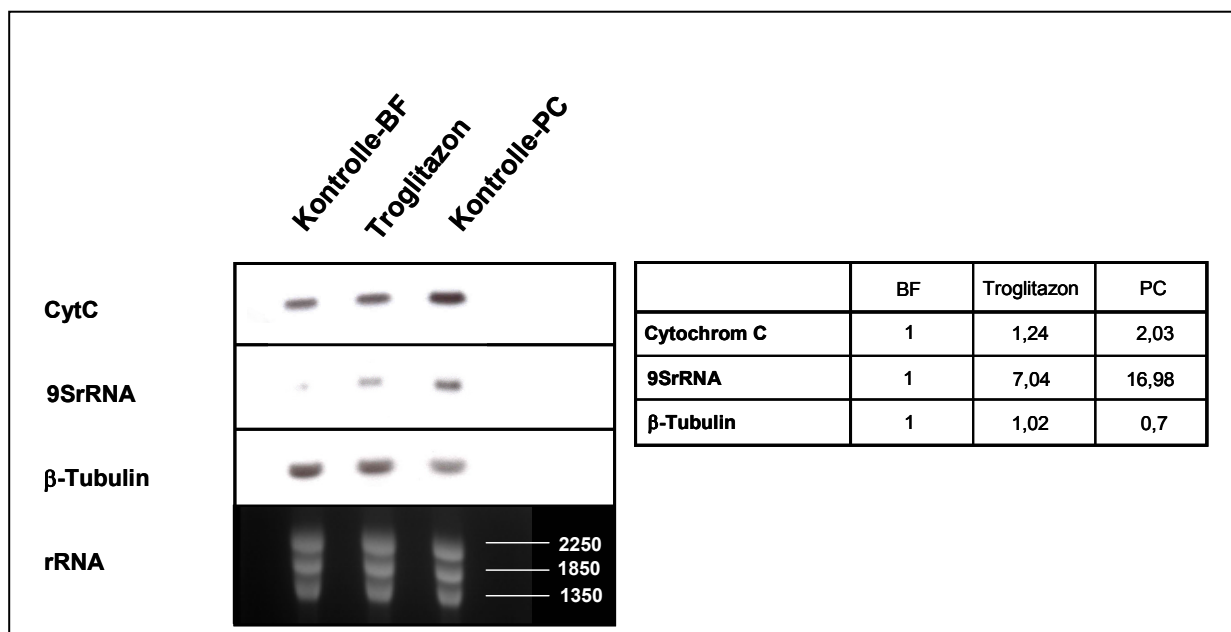


Abb.3-13. Northern blot Analyse mitochondrialer Marker. Troglitazon (5 μ M)-behandelte Blutform-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression von Cytochrom C und 9S rRNA. β -Tubulin und die drei großen rRNAs dienten als Ladekontrolle, RNA aus prozyklischen Zellen als Kontrolle mit maximalem Expressionslevel. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mittels GelScan V5.1.

3.4 Betrachtung der Glykolyse

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Parasiten nach der Behandlung mit Troglitazon war nicht nur eine Änderung des Mitochondriums ersichtlich, sondern auch eine Erhöhung der Glykosomen-Dichte. Da hier aber aufgrund der Technik nur wenige Zellen und Ebenen betrachtet werden können, wurde zur weiteren Untersuchung Immunfluoreszenz zur Anfärbung eines glykosomalen Markerenzym, der Aldolase durchgeführt (Clayton, 1987). Die Mehrheit der Zellen zeigte nach Behandlung mit Troglitazon eine intensivere Fluoreszenz als die entsprechenden Kontrollzellen. Dies könnte entweder in einer erhöhten Aldolase-Expression oder durch Steigerung der Glykosomen-Dichte durch Übereinanderlagerung der Intensitäten begründet sein.

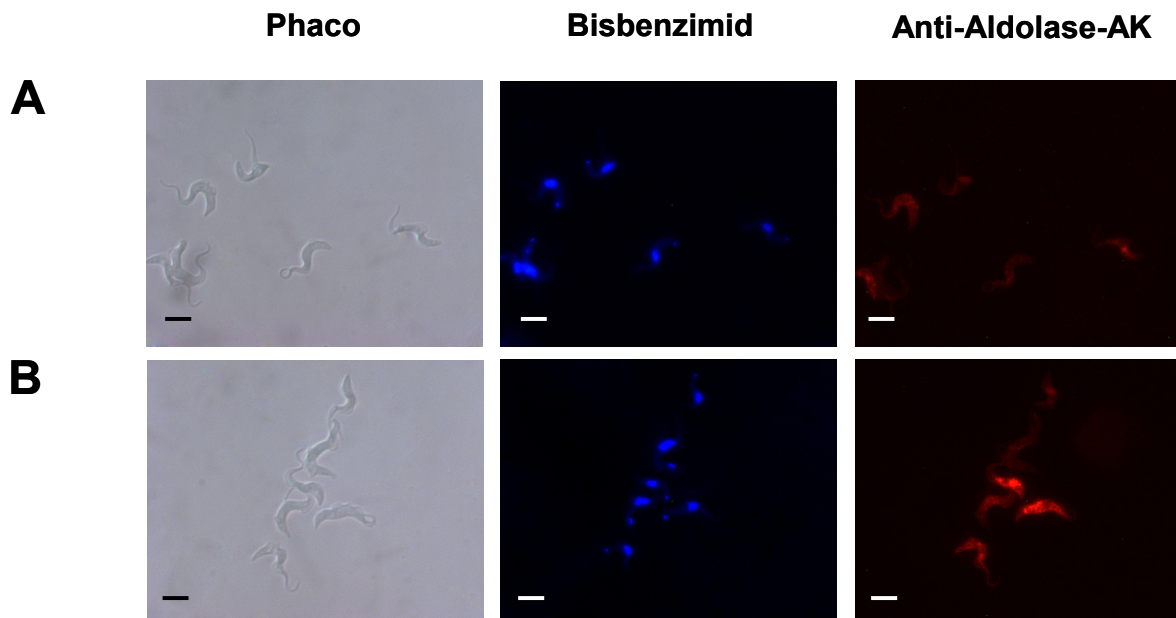


Abb.3-14. Immunfluoreszenz zur Untersuchung der Glykosomen-Dichte nach Behandlung mit Troglitazon. Dazu wurden Antikörper gegen das glykosomale Markerenzym Aldolase genutzt. Ein großer Teil der behandelten Zellen wies eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber den Kontrollzellen auf. (A) Kontrollzellen, (B) Zellen, behandelt mit 5 µM Troglitazon, jeweils nach 16 h Inkubation. Balken = 10 µm.

Ergebnisse

Da die Glykolyse in Trypanosomen ausschließlich in den Glykosomen abläuft, müsste während der Proliferation auch der Glucose-Verbrauch der Parasiten steigen. Um die Menge an verstoffwechselter Glucose zu bestimmen, wurden Zellen 5 h in Medium mit 4 mM Glucose inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Der Glucose-Verbrauch und die Pyruvat-Produktion wurden photometrisch über die Zunahme von NADPH bzw. die Abnahme von NADH bei 340 nm bestimmt. Zusätzlich wurde zu jedem Zeitpunkt sowohl die Zellzahl als auch die Proteinkonzentration bestimmt. Aus den stündlichen Differenzen der Glucose- und Pyruvatkonzentrationen der Medien wurde ein Mittelwert gebildet und dieser entweder auf die jeweilige Zellzahl oder die Proteinmenge bezogen. Dabei zeigte sich bezogen auf die Zellzahl eine Induktion des Glucose-Verbrauchs mit einer dazu proportionalen Pyruvat-Produktion durch Troglitazon. Der Unterschied verschwand jedoch nach Einbeziehung der jeweiligen Proteinkonzentration. Dies legt zwar eine Vermehrung der Glykosomen durch Troglitazon, aber auch eine generelle Erhöhung der Proteinkonzentration nahe.

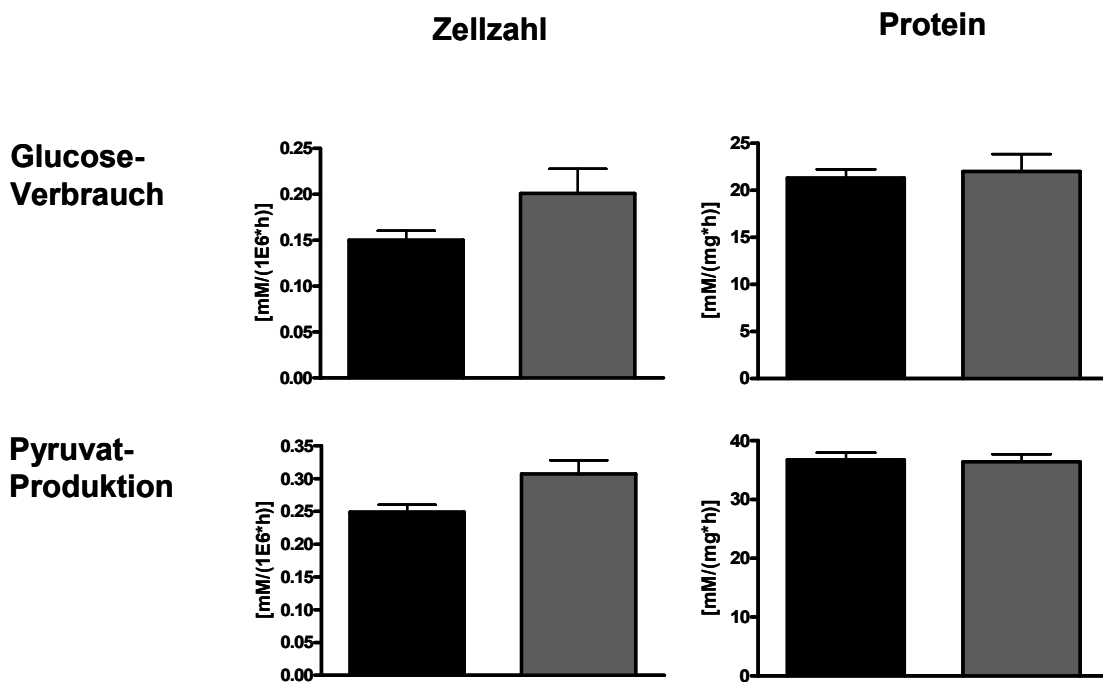


Abb.3-15. Bestimmung des Glucose-Metabolismus in behandelten Zellen. (schwarz) Kontrolle, (grau) 5 μ M Troglitazon. Blutform-Trypanosomen, die mit Troglitazon behandelt wurden, wiesen nach 16 h sowohl erhöhten Glucose-Verbrauch als auch Pyruvat-Produktion auf als Kontrollzellen. Dieser Unterschied relativierte sich jedoch, wenn der jeweilige Umsatz auf die Proteinmenge bezogen wurde.

3.5 Untersuchung zur Proteinbiosyntheserate

Bezieht man die Proteinmenge der Zellen nach Troglitazon-Behandlung direkt auf die Zelldichte, so ist tatsächlich eine erhöhte Proteinkonzentration pro Zelle ersichtlich (Abb.3-16). Um zu untersuchen, ob dies auf einer gesteigerten Proteinbiosyntheserate beruht, wurden Zellen 4, 8 oder 12 h mit Troglitazon inkubiert. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurden Proben entnommen, die Zelldichte kontrolliert und die Zellen 10 min mit [³⁵S]-Methionin inkubiert. Nach Waschen und Fällern der Proteine wurde die eingebaute Radioaktivität der jeweiligen Proben gemessen. Die Zelldichte zeigte, dass die Zellen nach 4 bzw. 8 h noch nicht in die logarithmische Phase eingetreten waren und die Zellzahl nur leicht angestiegen war. Dies spiegelte sich auch in der Proteinbiosyntheserate der Kontrolle wider. Mit der ersten Verdopplung der Parasiten waren die Zellen jedoch in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten und zeigten auch eine Erhöhung ihrer Proteinbiosyntheserate. Auffällig war jedoch, dass Troglitazon-behandelte Zellen trotz gleichem Wachstumsverhalten nach 4 h Inkubation eine wesentlich höhere Proteinsyntheserate besaßen. Offensichtlich ist also die höhere Proteinkonzentration der Zellen in einer gesteigerten Produktion in der beginnenden Wachstumsphase begründet.

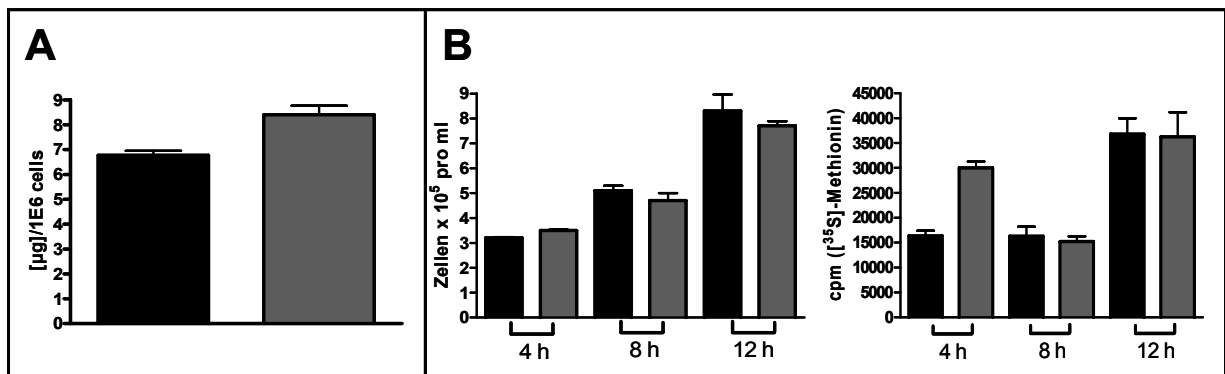


Abb.3-16. Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵S]-Methionin. (A) Nach 16 h Inkubation mit Troglitazon wiesen die behandelten Zellen einen höheren Proteingehalt als die Kontrollkultur auf. (B) Zellen wurden 4, 8 oder 12 h mit 5 µM Troglitazon inkubiert, ausgezählt und ihre Proteinbiosyntheserate zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt. Während die Zellzahl der behandelten Kulturen gegenüber der Kontrolle abnahm, zeigen sie jedoch nach 4 h eine fast doppelt so hohe Proteinbiosyntheserate, die sich später auf den Kontrollwert einpendelt. (schwarz) Kontrolle; (grau) Zellen mit 5 µM Troglitazon.

3.6 Transformation der Blutform in prozyklische Parasiten

Die Blutbahn des Vertebraten beherbergt zwei Lebensstadien der Trypanosomen, die schnell proliferierenden slender- und die arretierten stumpy-Formen. Bei einer Blutmahlzeit nimmt die Tsetse-Fliege automatisch Parasiten auf. Während die slender-Formen aufgrund der veränderten Umgebungsbedingungen in der Fliege zugrunde gehen, besitzen die stumpy-Formen die Fähigkeit, durch ihre Präadaption aus dem Zellzyklusarrest auszutreten und sich zu prozyklischen Fliegenformen zu transformieren. Diese Umwandlung kann mithilfe eines Transformations-Protokolls, das Overath *et al.* (1986) publizierten, auch *in vitro* durchgeführt werden. Die Transformation zu prozyklischen Parasiten wird hier sowohl durch Zugabe von cis-Aconitat und Citrat als auch durch Temperaturerniedrigung auf 27°C induziert. Nach zwei Tagen kann man die Zellen in prozyklisches Medium ohne Zusatz von Glucose umsetzen, so dass die prozyklische Parasitenpopulation anwachsen kann.

3.6.1 Transformation nach unterschiedlichen Inkubationszeiten

Um zu untersuchen, ob Troglitazon eine Differenzierung zu stumpy-Formen induziert, wurden Zellen 8, 16 oder 24 h mit 5 µM Troglitazon inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurde wiederum ausgezählt, die Zellen in prozyklisches Medium umgesetzt und diesmal auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt.

Nach 8 h Inkubation in Blutformmedium gab es offensichtlich sowohl in der Kontrollpopulation als auch in der mit Troglitazon behandelten Kultur einige stumpy-Formen. Beide Populationen wuchsen im Transformationsmedium und auch im prozyklischen Medium zu einer gewissen Zelldichte an. Nach 16 h Inkubation änderte sich dieses Bild. Die mit Troglitazon behandelten Zellen erreichten während der Transformation eine 4fach höhere Zellzahl und im prozyklischen Medium sogar eine maximale Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml. Die Kontrollzellen, die sich im Blutformmedium in der logarithmischen Wachstumsphase befunden hatten, beinhalteten offensichtlich einen größeren Anteil slender-Formen, die den Transformationsprozess nicht überlebten. Dies wird auch in den begleitenden mikroskopischen Aufnahmen ersichtlich, die in der Troglitazon-Kultur gesunde prozyklische Zellen zeigen, in der Kontrolle jedoch sterbende, unförmige Parasiten. Nach 24 h, zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase stieg der Anteil an stumpy-Zellen in der Kontrolle offensichtlich wieder an, was man an einer erhöhten Wachstumsbereitschaft im

Ergebnisse

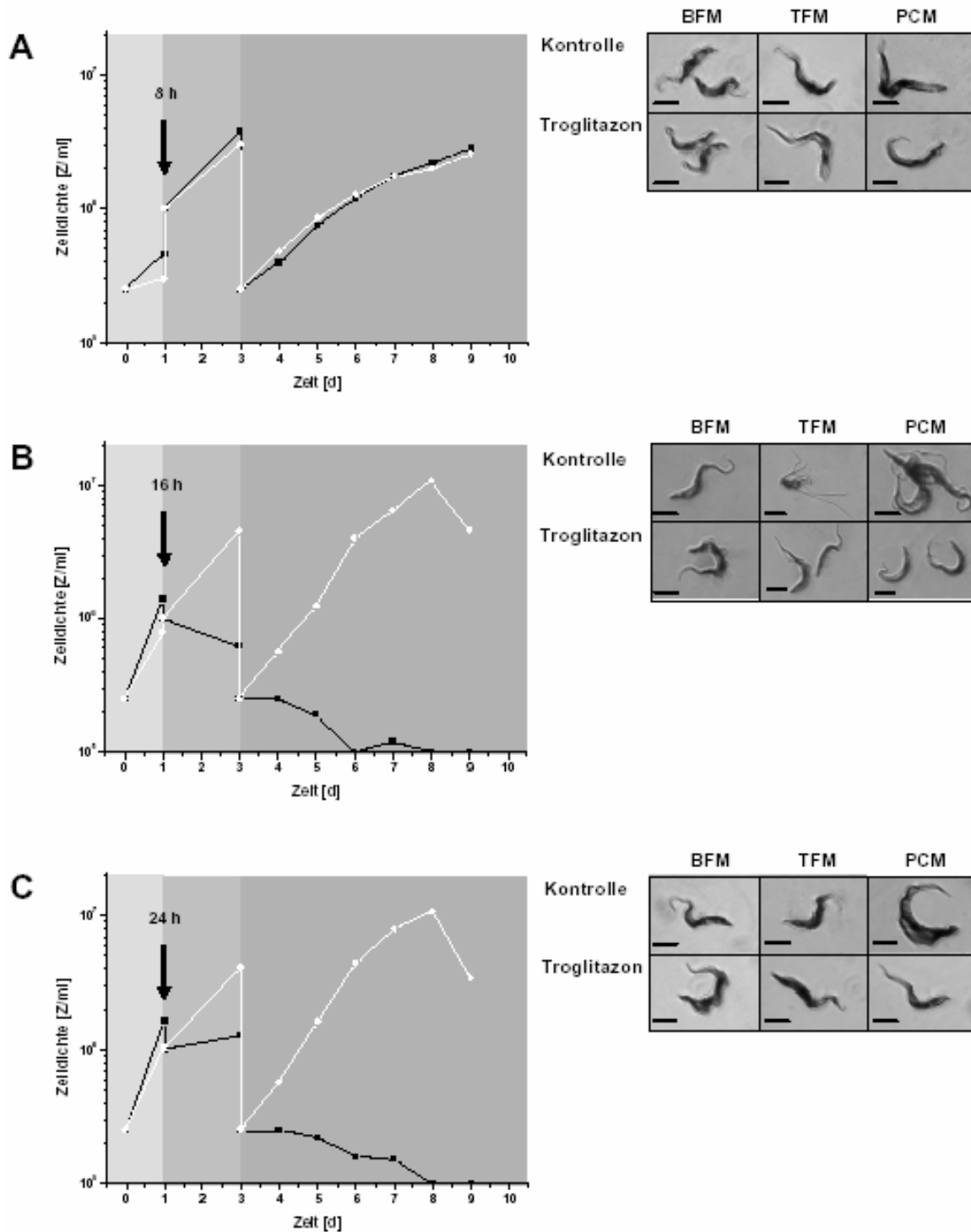


Abb.3-17. In vitro Transformation von Blutformen zu prozyklischen Parasiten. Blutformen wurden (A) 8 h, (B) 16 h oder (C) 24 h mit 5 μ M Troglitazon behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (○) Zellen, behandelt mit Troglitazon, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C. Die Zellmorphologie zu den jeweiligen Zeitpunkten und Konditionen wurde mittels Giemsa-Färbung bestimmt. Balken = 10 μ m.

Ergebnisse

Transformationsmedium zeigt. Allerdings starben die Zellen in prozyklischem Medium wieder ab. Die Troglitazon-behandelten Zellen verhielten sich dagegen genauso wie nach 16 h Inkubation in Blutformmedium, was dafür spricht, dass eine maximale Anzahl an stumpy-Formen erreicht worden war, die simultan zu prozyklischen Zellen transformierte.

Der geringe Unterschied zwischen den beiden Konditionen nach 8 h Inkubation könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen nach Ansetzen der Kultur noch nicht gleich in die logarithmische Wachstumsphase eingetreten waren und diese retardierten Zellformen besser in prozyklische Formen transformierbar waren.

Neben der offensichtlichen morphologischen Wandlung tauschen die Blutformen während ihrer Transformation zu prozyklischen Parasiten auch ihren Mantel aus VSG gegen Prozyklin. Dieses Phänomen kann man so zur Verifizierung des Transformations-Versuches, oder vielmehr zur Beobachtung des Prozesses nutzen. Hierfür wurden Zellen sowohl nach 16 h Inkubation in Blutformmedium als auch während der Inkubation in Transformationsmedium nach 8, 24 und 48 h entnommen und mittels Antikörper gegen ihre VSG-Variante 221 angefärbt. Sind anfangs noch jeweils ca. 80% der Zellen VSG221 positiv, so kann man im Laufe der Transformation einen kontinuierlichen Abfall dieser Population feststellen, bis nach 48 h ~ 90% der Parasiten ihren VSG-Mantel verloren haben. Dies spricht für eine erfolgreiche Differenzierung der Blutformen zu prozyklischen Parasiten, die die morphologischen Beobachtungen bestätigen.

Vergleicht man die VSG-positiven Populationen der Troglitazon - behandelten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten mit den Kontrollzellen, so kann man eine etwas schnellere Transformation dieser Zellen beobachten. Gegenüber dem Unterschied der Zelldichten ist dieser jedoch geringfügig. Dies könnte daran liegen, dass nicht angepasste Blutformen relativ schnell absterben, so dass die prozentuale Verteilung von VSG-positiven und -negativen Zellen vergleichbar ist. Diese Vermutung wird durch die Aufnahmen nach 8 h in Transformationsmedium bestätigt. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Umstellung sehen die Troglitazon-behandelten Blutformen gesund aus, während die Kontrolle viele abgerundete, sterbende Zellen aufweist. Den größten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen kann man auch bei der SDS-PAGE nach 8 bzw. 24 h Inkubation in Transformationsmedium beobachten. VSG zeigt sich hierbei in beiden Konditionen nach 16 h in Blutformmedium als dominante Bande im Bereich von 55 kDa, verschwindet aber während des Wandels zu prozyklischen Formen schneller in der mit Troglitazon behandelten Kultur (Abb.3-18 D).

Ergebnisse

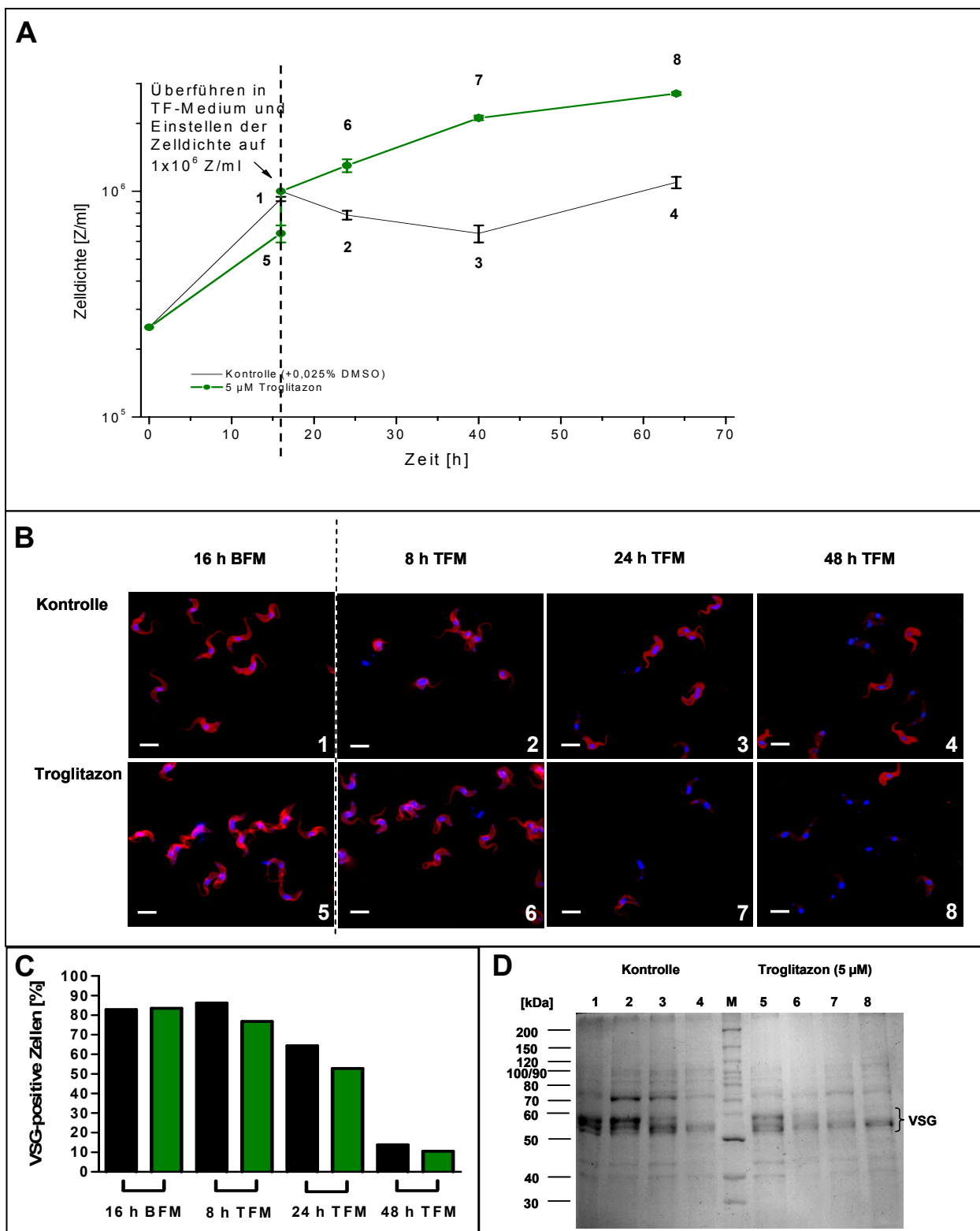


Abb.3-18. Zelldichten und VSG-Verlust während der Transformation von Blutformen zu prozyklischen Zellen. (A) Nach 16 h wurden die Zellen in Transformationsmedium auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 48 h inkubiert. Während die Kontrollzellen zunächst absterben, wachsen behandelte Zellen sofort weiter. (■) Kontrolle, (●) 5 µM Troglitazon. **(B)** Sichtbarmachung des VSG-Verlustes während der Transformation durch Immunofluoreszenz. Balken = 10 µm. **(C)** Quantifizierung der VSG-positiven Zellen (Schwarz = Kontrolle; Grün = 5 µM Troglitazon). **(D)** Verschwinden von VSG während der Transformation gezeigt durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung. 5 µg Protein pro lane; (1;5) 16 h BFM, (2;6) 8 h TFM, (3;7) 24 h TFM, (4;8) 48 h TFM.

3.6.2 Konzentrationsabhängige Transformationseffizienz

Da die Inhibierung des Zellwachstums bei allen drei eingesetzten Thiazolidindionen konzentrationsabhängig war, sollte überprüft werden, ob dies auch für die Transformationseffizienz zutrifft. Dafür wurden die Zellen 16 h mit 2, 5 und 10 μM Troglitazon, Ciglitazon oder Rosiglitazon behandelt, mittels Transformationsmedium zu prozyklischen Zellen umgewandelt und danach in prozyklisches Medium umgesetzt. Tatsächlich besaß Troglitazon den stärksten Effekt auf das Transformationsverhalten der Parasiten, während Rosiglitazon den geringsten Einfluß zeigte (Abb.3-19 a-c).

Am deutlichsten waren die Abstufungen der Transformationseffizienz während der Inkubation im Transformationsmedium zu beobachten. Während sich die Zelldichte der Kontrolle um ca. 50% auf 5×10^5 Zellen/ml reduzierte, erhöhte sich diese mit 10 μM Rosiglitazon auf $1,3 \times 10^6$, mit 10 μM Ciglitazon auf $1,4 \times 10^6$ und mit 10 μM Troglitazon auf 2×10^6 Zellen/ml. Dies bestätigt die Ergebnisse aus anderen Versuchen wie etwa die Wachstumsinhibierung (3.1.1) oder die Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials (3.3.1), die genau diese Abstufungen der Effekte zeigen.

Vergleicht man die Zelldichten nach Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen eines Thiazolidindion-Derivats, so kann man auch hier eine Steigerung der Prozyklischen-Zahl erkennen, die jedoch im Verhältnis zur Konzentrationserhöhung relativ gering erscheint. Das deutlichste Ergebnis zeigt hier Troglitazon. Die Zelldichte nach 48 h in Transformationsmedium stieg hier von $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml bei 2 μM auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml bei 5 μM und fast 2×10^6 Zellen/ml bei 10 μM .

Nach Umsetzen in prozyklisches Medium spiegelte sich ungefähr dieses Bild wider. Dabei erreichten die mit 10 μM Troglitazon behandelten Zellen eine maximale Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml. Auch die erfolgreich transformierten Kontrollzellen konnten im prozyklischen Medium anwachsen, erreichten aber nicht ähnlich hohe Zelldichten und starben schneller ab.

Demzufolge induzieren alle Thiazolidindione eine Differenzierung der Blutform-Parasiten zu transformierbaren Zellen, wobei Troglitazon die effektivste Substanz darstellt. Die Konzentrationsabhängigkeit ist hierbei nur geringfügig.

Ergebnisse

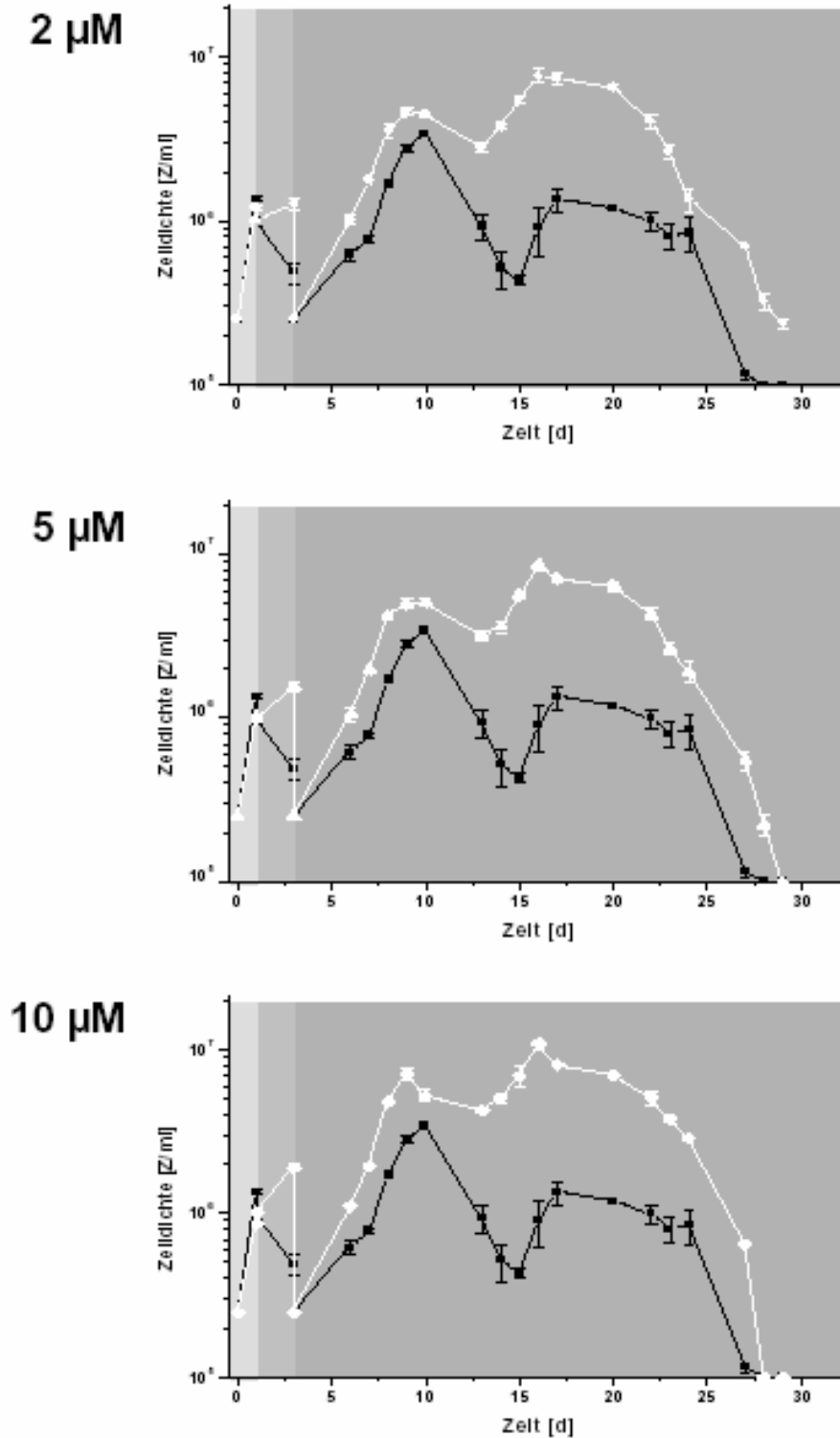


Abb.3-19 a. Troglitazon - Konzentrationsabhängigkeit der Transformationseffizienz. Blutformen wurden 16 h mit 2, 5 oder 10 µM Troglitazon behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (○) Zellen, behandelt mit Troglitazon, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C.

Ergebnisse

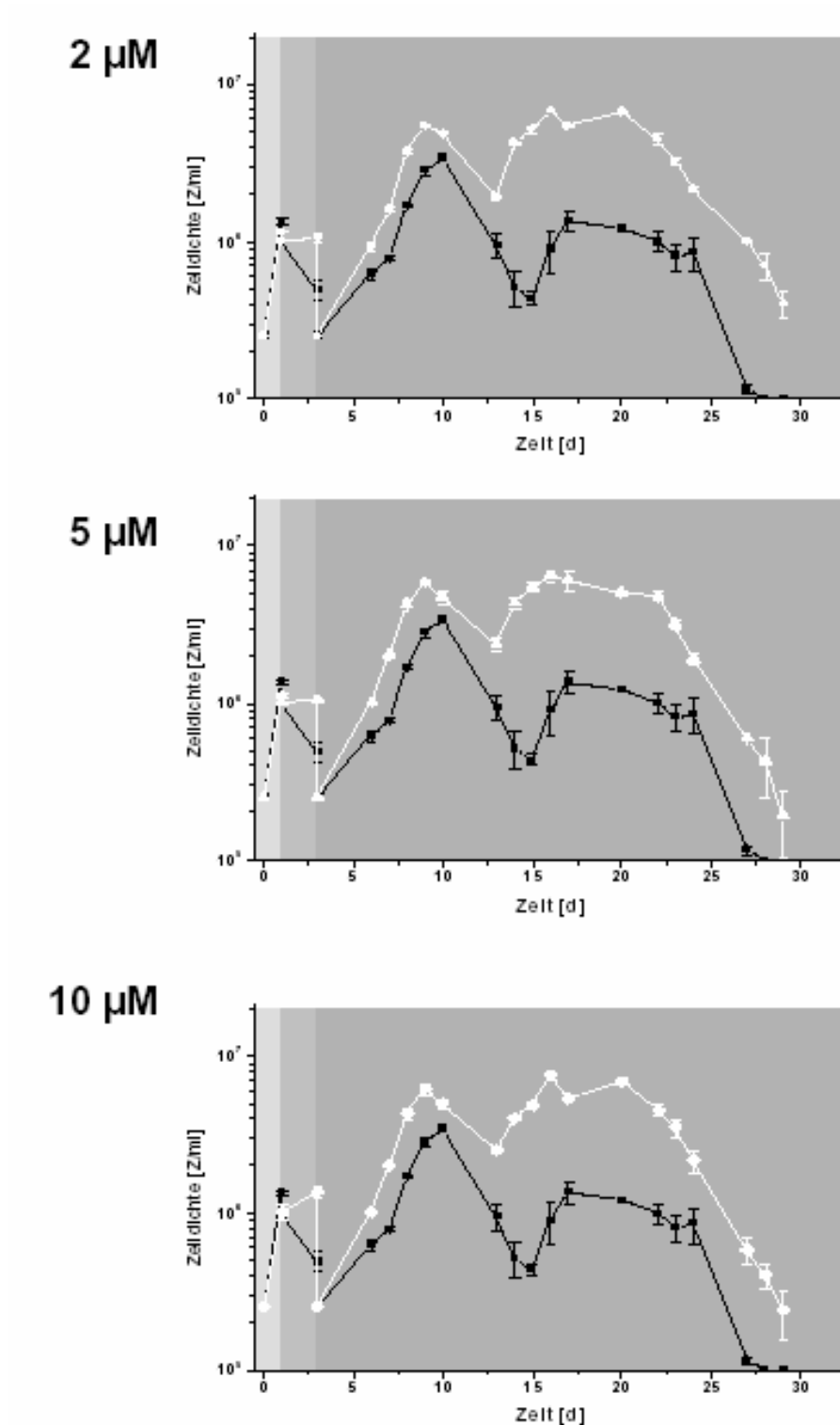


Abb.3-19 b. Ciglitazon - Konzentrationsabhängigkeit der Transformationseffizienz. Blutformen wurden 16 h mit 2, 5 oder 10 µM Ciglitazon behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (O) Zellen, behandelt mit Ciglitazon, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C.

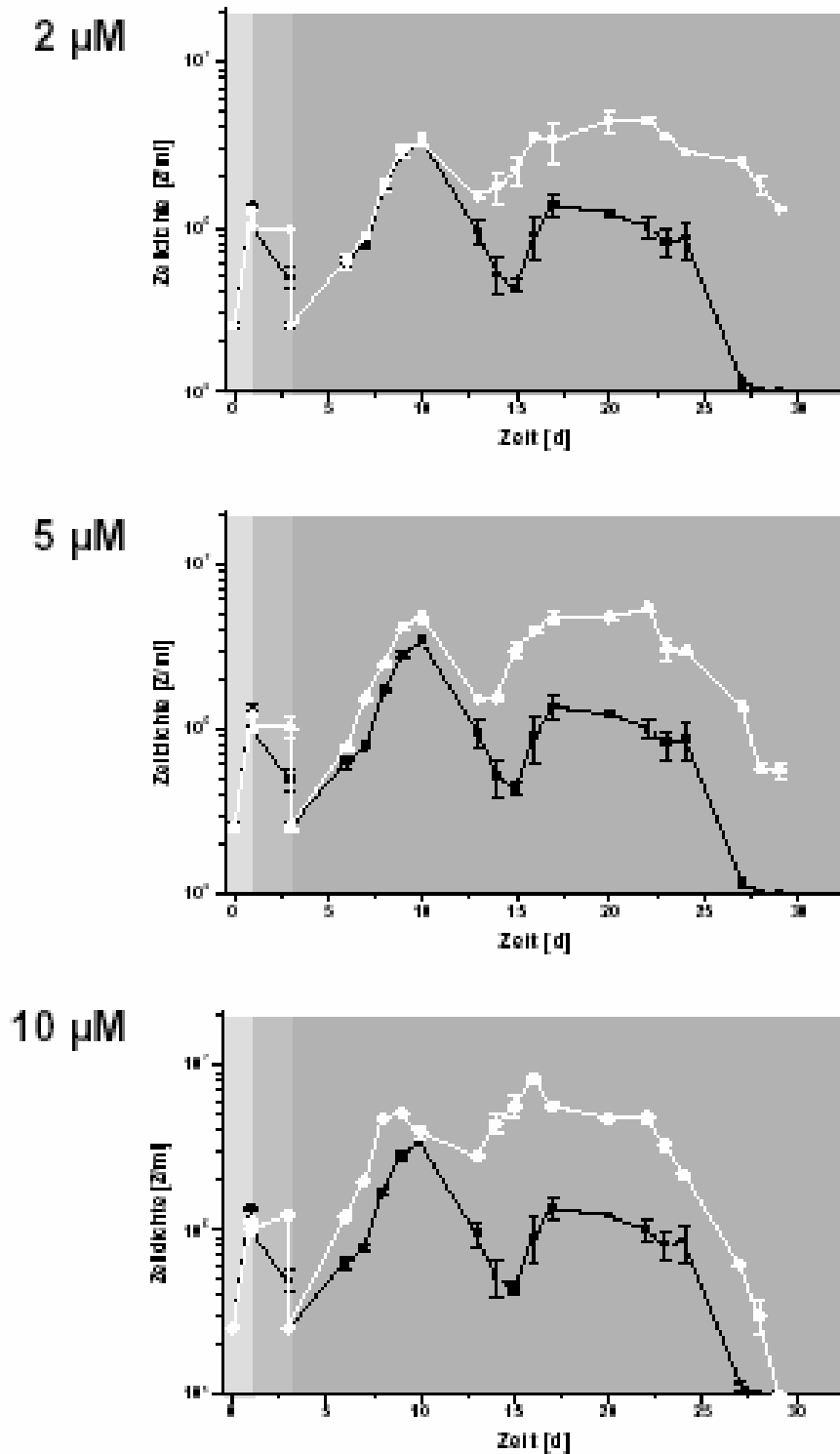


Abb.3-19 c. Rosiglitazon - Konzentrationsabhängigkeit der Transformationseffizienz. Blutformen wurden 16 h mit 2, 5 oder 10 µM Rosiglitazon behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (○) Zellen, behandelt mit Rosiglitazon, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C.

3.6.3 Transformation mit einem natürlichen PPAR γ - Agonisten

Alle Thiazolidindione scheinen, wenn auch mit unterschiedlicher Stärke, eine Differenzierung zu induzieren, was einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus nahe legt. Das erste Targetprotein, das für diese Substanzklasse entdeckt wurde, war der Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , an den alle drei der untersuchten Glitazone mit hoher Affinität binden (Young *et al.*, 1998; Shearer and Hoekstra, 2002). Neben anderen ungesättigten Fettsäuren ist 15-desoxy-PGJ₂, ein Metabolit des PGD₂, ein natürlicher Ligand für PPAR γ . Basierend auf Versuchen von Figarella *et al.* (2006) wurde für das Transformations-Experiment eine Konzentration von 5 μ M 15-desoxy-PGJ₂ gewählt, um eine ähnliche Wachstumsinhibierung zu induzieren wie bei Behandlung mit Troglitazon. Nach 16 h Inkubation der Blutformen mit diesem PG-Derivat war die Zelldichte genau wie die der Troglitazon-Kultur um ca. 30% geringer als die der Kontrolle.

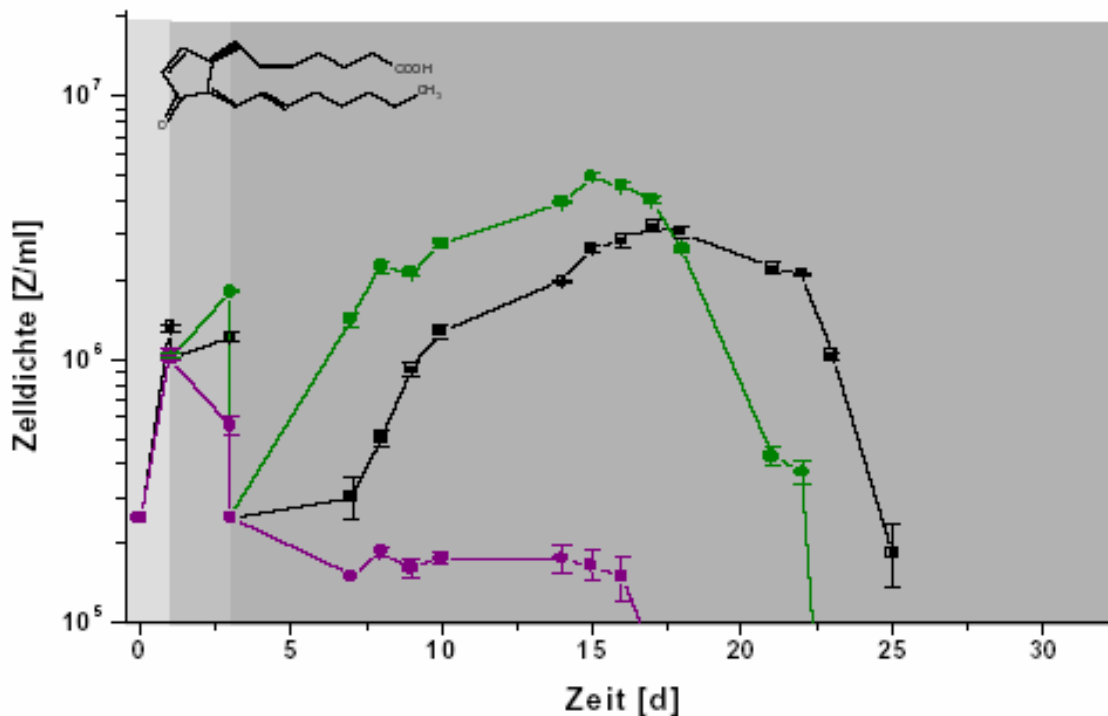


Abb.3-20. Transformation von Zellen, die mit 15desoxy-PGJ₂ behandelt wurden. Blutformen wurden 16 h mit 5 μ M Troglitazon oder 15desoxy-PGJ₂ behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf 2,5 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (●) Zellen, behandelt mit Troglitazon, (●) Zellen, behandelt mit 15desoxy-PGJ₂, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C.

Nach Umsetzen in Transformationsmedium hatte sich die Zelldichte der Troglitazon-Kultur allerdings verdoppelt, wohingegen die zuvor mit 15-desoxy-PGJ₂ behandelten Zellen unter diesen Bedingungen zum großen Teil abstarben. Auch die noch überlebenden Parasiten konnten sich nicht zu prozyklischen Zellen transformieren, was sich nach Transfer in prozyklisches Medium deutlich zeigte (Abb.3-20).

Offensichtlich verursacht 15-desoxy-PGJ₂ in *T. brucei* im Gegensatz zu den Glitazonen keine Differenzierung, wohl aber in Übereinstimmung mit den Daten von Figarella *et al.*, 2006 eine Wachstumsinhibierung, die analog zu anderen PG-Derivaten der D- und J-Serie auf Induktion eines programmierten Zelltodes begründet ist.

3.6.4 Transformation mit dem PPAR γ - Antagonisten T0070907

Das Transformations-Experiment mit dem natürlichen PPAR γ -Agonisten 15-desoxy-PGJ₂ deutet auf einen unabhängigen Mechanismus unter Interaktion mit anderen Proteinen hin. Um ein PPAR γ -Analogon ausschließen zu können, wurde zusätzlich der hochaffine PPAR γ -Antagonist T0070907 eingesetzt. Dieser bindet irreversibel an den Rezeptor und führt zu seiner Inhibition (Lee *et al.*, 2002).

Für den Transformationsversuch wurden die Zellen zunächst 1 h mit 100 nM T0070907 vorinkubiert und anschließend 5 μ M Troglitazon hinzugegeben. Als Kontrolle dienten sowohl Kulturen, die ausschließlich mit den entsprechenden Konzentrationen von T0070907 oder Troglitazon behandelt wurden, als auch unbehandelte Zellen. Auch wenn die Zellen, die ausschließlich mit T0070907 behandelt worden waren, im Transformationsmedium weiter abstarben als die unbehandelten Parasiten, so verhielten sich beide Kulturen im prozyklischen Medium gleich. Auch die Coinkubation der Blutformen mit dem Antagonisten hatte keinerlei Einfluß auf die Wirkung von Troglitazon. Beide Kulturen, denen das Thiazolidindion zugesetzt worden war, wuchsen im Transformationsmedium zu gleicher Zelldichte an und verhielten sich auch nach Transfer in prozyklisches Medium gleich (Abb.3-21). T0070907 besitzt somit keinen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung von Blutformen und kann auch die Wirkung von Troglitazon nicht aufheben. Analog zu dem Experiment mit 15-desoxy-PGJ₂ spricht dies für einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus.

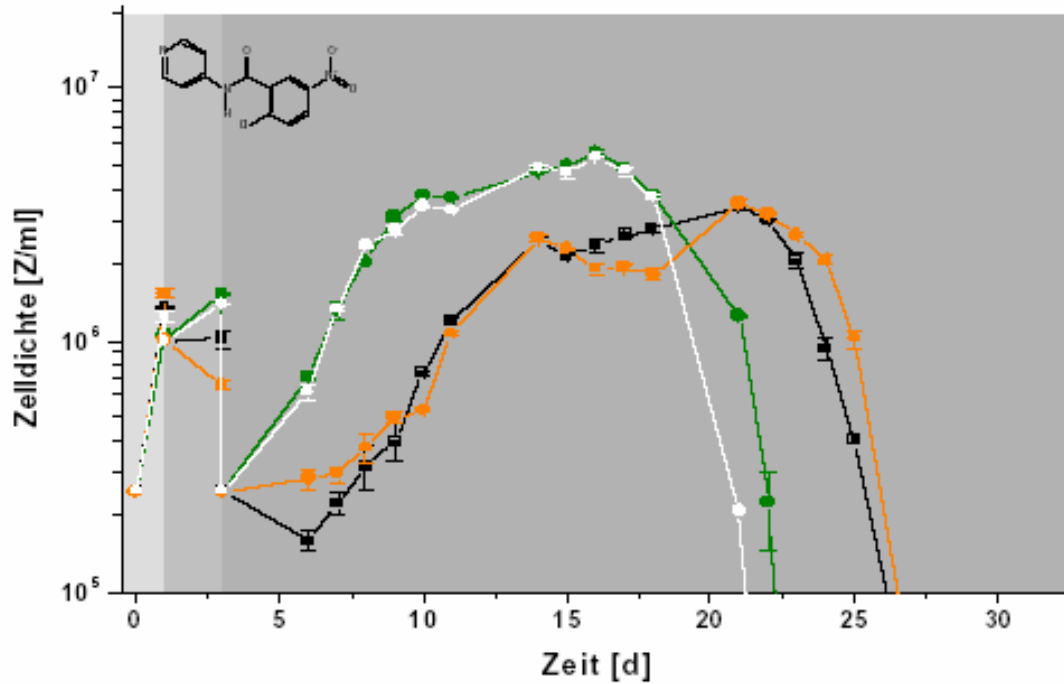


Abb.3-21. Transformation von Zellen, die mit T0070907 behandelt wurden. Blutformen wurden 16 h mit 5 μ M Troglitazon und/oder 100 nM T0070907 behandelt, anschließend auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Transformationsmedium überführt. Nach 48 h wurden die Zellen wiederum ausgezählt, auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in prozyklisches Medium (ohne Glucose) überführt. (●) Zellen, behandelt mit Troglitazon, (○) Zellen, behandelt mit T0070907, (○) Zellen, die mit Troglitazon und T0070907 coinkubiert wurden, (■) Kontrollzellen. Hellgrau = Blutformmedium und Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂, Mittelgrau = Transformationsmedium (PCM + Glucose, cis-Aconitat und Citrat) und Inkubation bei 27°C, Dunkelgrau = prozyklisches Medium und Inkubation bei 27°C.

3.7 *In silico*-Recherchen nach einem PPAR γ -Homolog

Desweiteren wurden Datenbanksuchen nach Kandidaten für ein potentiell PPAR γ -Homolog durchgeführt. Hierfür wurden cDNA – und Proteinsequenzen des humanen PPAR γ gegen das Genom von *T. brucei* geblastet. Wie aus Tabelle 3-1 ersichtlich, ist die Sequenz von PPAR γ verschiedener Spezies hoch konserviert. Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* stellt die bisher evolutionär niedrigsten Spezies dar, in der ein Protein der PPAR-Familie bekannt ist. Die Homologie zum humanen Protein beträgt hier 43%. Im Gegensatz dazu ergibt nur die Suche mittels der Proteinsequenz des gesamten PPAR γ oder dessen Liganden-Bindedomäne Treffer in der Datenbank von *T. brucei*, die jedoch keine hohe Homologie aufweisen und zudem Pseudogene darstellen.

Ergebnisse

A

Gene_ID	Organismus	Identität [%]
NM_138712	<i>Homo sapiens</i> Variante 1	
NM_015869	<i>Homo sapiens</i> Variante 2	100,00
NM_138711	<i>Homo sapiens</i> Variante 3	100,00
NM_005037	<i>Homo sapiens</i> Variante 4	100,00
NM_214379	<i>Sus scrofa</i>	91,88
NM_011146	<i>Mus musculus</i>	90,62
NM_013124	<i>Rattus norvegicus</i>	90,48
NM_077719	<i>Caenorhabditis elegans</i>	43,23
	<i>Trypanosoma brucei</i>	keine Treffer

B

Protein_ID	Organismus	Identität [%]
NP_005028	<i>Homo sapiens</i> Isoform1	
NP_056953	<i>Homo sapiens</i> Isoform2	100,00
AAR99619	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	98,78
NP_035276	<i>Mus musculus</i>	98,11
O88275	<i>Rattus norvegicus</i>	98,11
Tb927.4.3610	<i>Trypanosoma brucei</i>	25,97 (gap:35,59%)
Tb927.4.3560		22,85 (gap:31,01%)

Tabelle 3-1. Alignments bekannter PPAR γ Sequenzen verschiedener Spezies. (A) Two sequence alignments der cDNA-Sequenzen mit der Transkript-Variante 1 aus *Homo sapiens*. Weder BlastN, BlastX oder TblastX ergaben bei der Datenbanksuche (GeneDB, Sanger Institute; TIGR, C. Venter Institute) einen Treffer. **(B) Two sequence alignments** der Protein-Sequenzen mit der PPAR γ -Isoform 1 aus *Homo sapiens*. Bei der Suche mit BlastP ergaben sich zwei Treffer, die allerdings für Pseudogene kodieren und keine hinreichende Übereinstimmungen besaßen. Die Suche mit TblastN ergab keinen Treffer. Alignments wurden mittels DNAMAN durchgeführt.

3.8 Untersuchungen auf Transkriptions-Level durch Microarrays

Um einen größeren Einblick in die durch Troglitazon hervorgerufenen Veränderungen und somit erste Hinweise für einen verantwortlichen Mechanismus zu bekommen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Auf den hierfür genutzten Arrays waren 24 567 verschiedene PCR-Produkte als Spots aufgetragen, die alle mehr oder weniger große Teile des trypanosomalen Genoms beinhalten (Diehl *et al.*, 2002, Brems *et al.*, 2005). Für die Proben wurden Parasiten des monomorphen Stammes 221 aus dem Blut der Ratte isoliert und 14 h unter Kulturbedingungen mit oder ohne Troglitazon inkubiert. Um auch Veränderungen des Transkriptionsmusters in der späten stationären Wachstumsphase zu erfassen, wurden zudem Zellen für 36 h kultiviert. Nach Isolierung der RNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Arrays wurden jeweils mit cDNA der Parasiten direkt aus dem Blut als Referenzbedingung und einer der drei anderen Proben inkubiert. Nach dem Scannen der Arrays wurden die Fluoreszenzintensitäten aufgenommen und die Regulationen nach einem Filterprozess erfasst. Letzteres erfolgte mit dem Programm MChips (Fellenberg *et al.*, 2001 und 2002) nach drei Kriterien: Fluoreszenzintensität der Spots, das Verhältnis der Fluoreszenzwerte beider Konditionen (*ratio*) und die *min/max-separation* der einzelnen Hybridisierungen einer Kondition zur anderen. Auf diese Weise verbleiben nur noch Gene, die deutlich reguliert und exprimiert sind. Alle Gene, die jedoch geringfügig oder in allen Konditionen gleich (z.B. *house-keeping-enzymes*) exprimiert werden, fallen dem Filtervorgang zum Opfer. Aufgrund der erhaltenen Daten kann eine Correspondence-Analyse vollzogen werden. Dafür werden zwei Plots übereinandergelegt, bei denen zum einen die Gene in Abhängigkeit der Konditionen aufgetragen werden, zum anderen die Konditionen in Abhängigkeit der Gene. Daher ist sowohl die Ordinate als auch die Abszisse des resultierenden Plots dimensionslos.

Abb.3-22 zeigt das Ergebnis aus jeweils sechs unabhängigen Versuchen zu jeder Kondition. Dabei stellen die grauen Punkte die regulierten Gene dar, die Quadrate hingegen die einzelnen Hybridisierungen. Da die Regulationen der Parasiten direkt aus dem Blut als Referenz dienten, wurde hier nur ein Mittelwert aus den gesamten 18 Versuchen aufgetragen. Liegen Gene in der Nähe der farbigen Quadrate einer Kondition, so sind diese unter dieser Bedingung hochreguliert, während die runterregulierten Gene auf der gegenüberliegenden Seite liegen (jeweils durch Pfeile der entsprechenden Farbe dargestellt).

Da monomorphe Trypanosomen aus dem Blut zu 100% aus slender-Formen bestehen, kann man in diesem Plot schon eine Veränderung der Genexpression durch die Kulturbedingungen

beobachten, auch wenn die Blutformen sich nach 14 h Inkubation noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Dies bestätigt das Ergebnis aus 3.3.2, bei dem in Zellen direkt aus dem Blut keine SDH-Aktivität gemessen werden konnte, wohl aber in Zellen aus der logarithmischen Phase in Kultur. Die Hybridisierungsexperimente mit Zellen aus der stationären Phase hingegen *clustern* noch weiter von der Referenzkondition entfernt. Diese sind zum Großteil schon im Zellzyklus arretiert und stellen eine sterbende Population dar, daher besitzen sie auch das von der Referenz entfernteste Expressionsmuster. Die in der Troglitazon-Kondition hochregulierten Gene befinden sich zwischen denen der Kontrolle der logarithmischen Phase und denen der stationären Phase. Diese Lokalisation im Plot ist gleichbedeutend mit einer in Richtung stumpy-Form fortgeschrittenen Differenzierung durch Troglitazon, ohne jedoch in der endgültigen proliferationsdefizienten, sterbenden Form zu münden. Wahrscheinlich resultieren aus der Behandlung mit Troglitazon weiter differenzierte, intermediäre Trypanosomen, die sich in ihrer Entwicklung zwischen den schnell proliferierenden slender-Formen der logarithmischen Wachstumsphase und den stumpy-Formen befinden. So kann man mit Hilfe der Correspondence-Analyse die Differenzierung der Blutform-Parasiten zirkulär verfolgen.

Ergebnisse

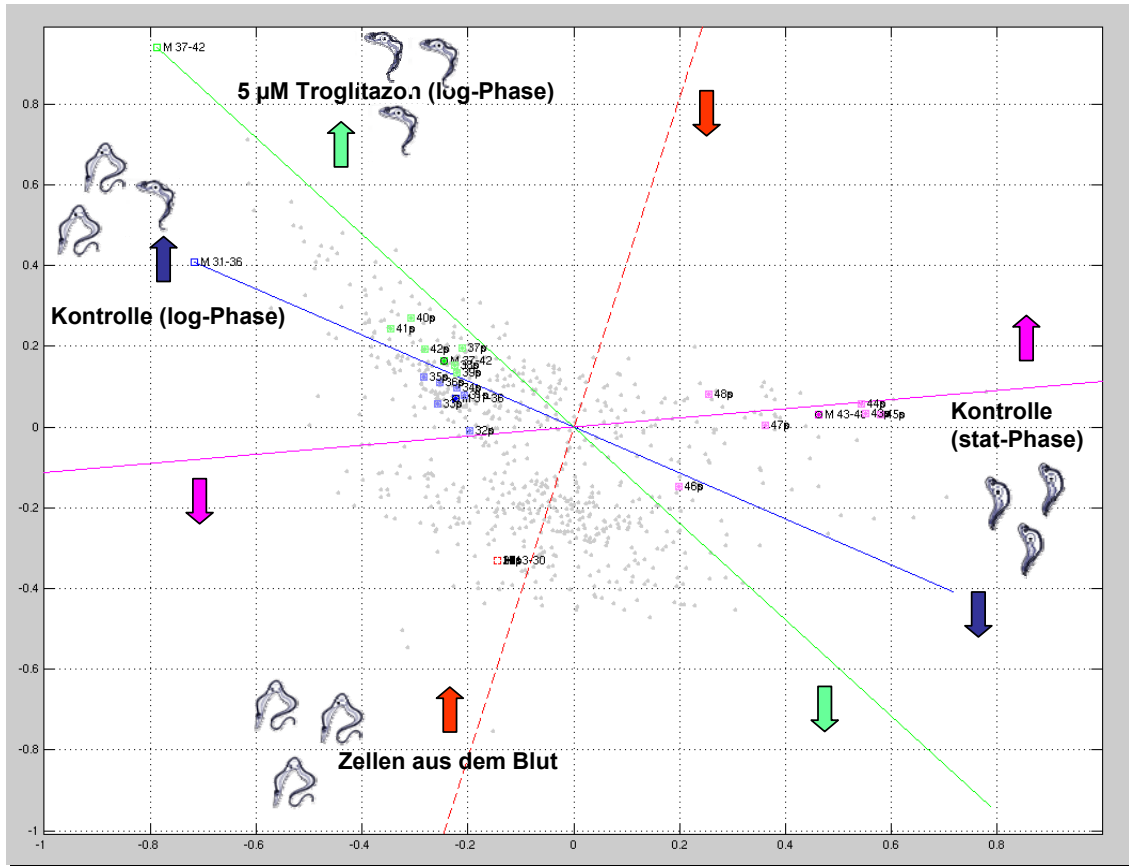


Abb.3-22. Correspondence-Analyse. Alle Proben wurden gegen cDNA der Parasiten aus dem Blut hybridisiert, diese Kondition diente somit als Referenz. Die erhaltenen Fluoreszenz-Daten wurden mit der Software MChips (DKFZ Heidelberg) gefiltert und eine Correspondence-Analyse erstellt. **Filterdaten:** Intensitätsschwelle = 60.000, ratio = 4, min/max-separation = 0,1. Die nach dem Filtern verbliebenen regulierten Gene sind hier als graue Punkte dargestellt. Alle sechs Hybridisierungen der Referenz-Kondition bilden einen Mittelwert (rotes Quadrat), bei den anderen Konditionen wurden alle sechs Einzelhybridisierungen einer Kondition als Quadrate abgebildet (blau = Kontrolle der log-Phase, grün = Troglitazon-behandelte Zellen, rosa = Kontrolle der stat-Phase). Je näher die Quadrate einer Phase liegen, desto reproduzierbarer waren die Experimente. Die Gene, die nahe um die Quadrate einer Farbe liegen, sind in dieser Kondition hochreguliert, die auf der Gegenseite jedoch runterreguliert (Pfeile).

Die jeweils am deutlichsten regulierten Spots wurden sequenziert und mit Hilfe der Trypanosomen-Datenbank des Sanger Instituts *GeneDB* bestimmten Genen zugewiesen. Da auf den Arrays *random*-PCR-Produkte gespottet waren, zeigten manche regulierten Sequenzen Teile des gleichen Gens. Aus diesen Regulationen wurde dann ein Mittelwert gebildet. Schließlich wurden die unterschiedlichen Gene nach der Funktion ihrer Proteinprodukte in Cluster eingeteilt.

Die größten Unterschiede bezüglich der Expression waren bei Genen der *VSG-expression-site* zu beobachten (Abb.3-23). In Zellen, die mit Troglitazon behandelt worden waren, war vor

allem der Level an ESAG 8 – Transkripten um das 11-fache der Kontrolle aus der logarithmischen Phase erhöht. ESAG 8 gehört zwar zur *VSG-expression site*, ist aber das einzige nicht membranständige Protein dieser Familie. Es spielt über noch ungeklärte Proteininteraktionen wahrscheinlich eine Rolle als Differenzierungsregulator (Pays *et al.*, 2001). Ein anderes Gen dieser Familie, ESAG 4, codiert für eine membranständige Adenylatzyklase der Flagellumtasche und ist sowohl in der Kontrolle der log-Phase als auch nach Troglitazon-Behandlung um das 3-4fache hochreguliert. Dies kann sowohl eine Antwort auf Stressreaktionen durch Kultivierungsbedingungen darstellen, als auch für eine Differenzierungsinduktion durch Produktion von cAMP sprechen.

Während die Expression von Transporter-Proteinen des zweiten Clusters durch Troglitazon stark runterreguliert ist, besteht eine erhöhte Anzahl an Transkripten bestimmter Enzyme. Darunter betrifft die deutlichste Regulation eine *Calpain-like* Peptidase. Generell unterscheiden sich trypanosomale Calpaine von denen höherer Eukaryonten, da ihnen die Domäne IV zur Ca^{2+} -Bindung fehlt (Ersfeld *et al.*, 2005). Die bei diesem Experiment regulierte Sequenz könnte man aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu verschiedenen *Calpain-like* Peptidasen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zuordnen. Alle zählen jedoch zu der neuen Klasse der „short calpain-like proteins lacking domain II“, die nur eine einzige, Trypanosomen-spezifische Domäne I^k besitzen. Daher ist es fraglich, ob sie wirklich als Peptidasen wirken, oder eine ganz andere Funktion besitzen.

Ein weiteres deutlich induziertes Gen codiert für ein *Ubiquitin-activating enzyme*, das zusammen mit anderen Enzymen an der Markierung von Proteinen zur deren weiteren Degradierung beteiligt ist, und so regulatorisch auf die Proteinausstattung der Zelle wirken kann.

Desweiteren scheint Troglitazon die Expression von zwei *heat shock* Proteinen zu induzieren. HSP 60 ist ein mitochondriales Chaperon, das sowohl Aggregation von Proteinen verhindert, als auch Proteine in ihre funktionale Form faltet, nachdem diese die Membranen des Mitochondriums passiert haben (Nadeau *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu ist HSP 83 ein cytosolisches Chaperon, über das in Trypanosomen allerdings noch wenig bekannt ist.

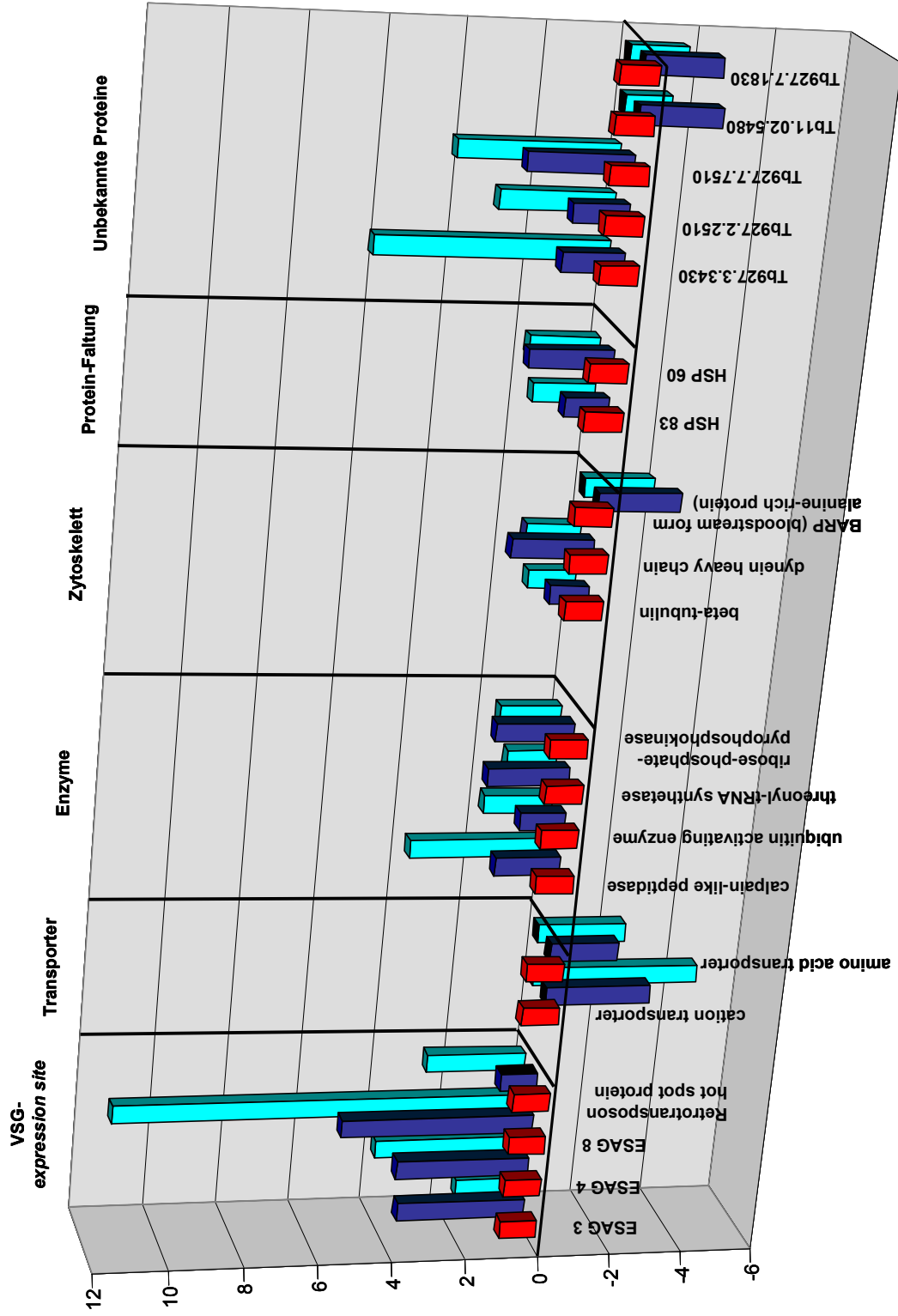


Abb.3-23. Microarray-Ergebnisse. Regulierte Gene. (■) Kontrolle (log-Phase, aus dem Blut der Ratte isoliert), (■) Kontrollzellen (log-Phase in Kultur), (■) Zellen, behandelt mit 5 µM Trogilitazon (log-Phase in Kultur). Da Parasiten aus dem Blut als Referenz dienten, wurde die Expression der jeweiligen Gene für diese Bedingung als „1“ und die Expression aus den Kulturbedingungen dazu ins Verhältnis gesetzt.

Interessanterweise besitzen die Homologen zu HSP 83 der Kinetoplastiden generell eine größere ATPase-Aktivität als die der höheren Eukaryonten (Nadeau *et al.*, 1992). In der Regel besitzen diese Proteine Chaperon-Aktivität, sind aber auch für die Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren zuständig, solange diese nicht aktiviert sind. Zudem können sie mit Zellzyklus-Kinasen interagieren (Buchner, 1999).

Die Microarrays zeigen auch eine Reihe von unbekanntem Proteinen, die nach Behandlung mit Troglitazon hochreguliert waren, deren Funktion allerdings noch zu klären ist.

Um die Ergebnisse aus den Microarray-Analysen zu überprüfen, wurden zusätzlich Northern-Blots durchgeführt. Dazu wurden stellvertretend zu vier der regulierten Sequenzen Sonden hergestellt und mit Proben aus der logarithmischen und stationären Phase hybridisiert. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Expression der Adenylylzyklase ESAG4 mit Eintritt in die stationäre Phase und durch Behandlung mit Troglitazon. Analog zu den Array-Ergebnissen war die Expression nach 14 h durch Troglitazon nur leicht erhöht, in der stationären Phase verdeutlichte sich dieser Unterschied jedoch stark. Bei der Hybridisierung mit der Sonde gegen ESAG8 wurden zwei Banden sichtbar. Dies lässt sich daraus erklären, dass auf der *VSG-expression site* drei Gene für dieses Protein lokalisiert sind, von denen zwei gleiche Transkript-Länge besitzen, eines jedoch ca. 100 bp mehr besitzt. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Anstieg durch Behandlung mit Troglitazon und Eintritt in die stationäre Phase, der die Microarray-Resultate widerspiegelt. Zwei Banden konnten auch im Falle der *calpain-like cystein peptidase* detektiert werden. Eines dieser Transkripte scheint in allen Phasen ungefähr gleich exprimiert zu werden, während das andere eine zellzyklusabhängige Regulation zeigt. Letzteres wurde wahrscheinlich bei der Microarray-Analyse erfasst, indem es mit einem Teil der Sequenz an das aufgetragene PCR-Produkt gebunden hat. Für den Kationen-Kanal, der wahrscheinlich Metallionen wie Zn^{2+} transportiert, konnte in allen Proben der logarithmischen Phase keine Expression gefunden werden. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den Microarray-Experimenten, die eine Runterregulation aufzeigten. Eine mögliche Erklärung wäre eine geringe Expression in der Kontrolle aus der logarithmischen Phase (Blut), die mit den weniger sensitiven Northern-Blots nicht erfasst werden können. So entzieht sich eine evtl. Runterregulation unter Kulturbedingungen auch der Detektion.

Insgesamt bestätigen die Northern-Blot-Experimente jedoch die Ergebnisse aus den Microarray-Analysen und können nun als Grundlage für weiterführende Experimente hinsichtlich der Differenzierung in Trypanosomen herangezogen werden.

Ergebnisse

ID	Proteinprodukt	Regulation	Länge	MW	IP	Lokalisierung
H25N7.23	ESAG3	↑	1104 bp	42,5 kDa	7,0	Membran
H25N7.20	ESAG4	↑	3807 bp	139,2 kDa	5,3	Membran
H25N7.22	ESAG8	↑	1893 bp	70,0 kDa	6,8	Zytosol/ Nukleus
H25N7.27			1893 bp	69,9 kDa	6,5	
H25N7.28			2028 bp	75,3 kDa	7,8	
Tb11.01.0725	Cation transporter	↓	1185 bp	42,2 kDa	6,5	Membran
Tb11.01.7590	Amino acid transp.	↓	1488 bp	54,1 kDa	8,3	Membran
Tb927.7.4060	Calpain-like cysteine peptidase	↑	348 bp	12,8 kDa	4,5	Zytosol
Tb927.7.4070			363 bp	13,5 kDa	4,7	
Tb11.02.5410	Ubiquitin-activating enzyme	↑	888 bp	32,3 kDa	5,8	Zytosol
Tb927.5.1090	Threonyl-tRNA synthetase	↑	2400 bp	90,9 kDa	6,8	Zytosol
Tb927.5.3170	Ribose-phosphate- pyrophosphokinase	↑	1074 bp	39,1 kDa	4,9	Zytosol
Tb927.1.2330	Beta-tubulin	↑	1329 bp	49,7 kDa	4,5	Zytoskelett
Tb927.8.3250	Dynein heavy	↑	14025 bp	537,3 kDa	6,2	Zytoskelett
Tb09.244.2510	BARP	↓	783 bp	27,4 kDa	5,3	Membran (GPI-Anker)
Tb10.26.1080	HSP 83	↑	2115 bp	80,7 kDa	4,9	Zytosol
Tb10.70.0430	HSP 60	↑	1689 bp	59,5 kDa	5,1	Mitochondrium
Tb927.3.3430	Hypothetical protein	↑	516 bp	20,0 kDa	10,6	Zytosol ?
Tb927.2.2510	Hypothetical protein	↑	813 bp	29,1 kDa	9,6	Zytosol ?
Tb927.7.7510	Hypothetical protein	↑	738 bp	26,7 kDa	4,9	Zytosol ?
Tb11.02.5480	Hypothetical protein	↓	390 bp	13,5 kDa	8,6	Membran
Tb927.7.1830	Hypothetical protein	↓	1101 bp	40,8 kDa	8,0	Zytosol ?

Tabelle 3-2. Liste der regulierten Transkripte. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Datenbank des *Sanger Institute's* zu den jeweiligen Genen zugeordnet und hier ihre experimentell gefundenen oder vorhergesagten Eigenschaften aufgelistet. (Pfeile symbolisieren die Regulation nach Behandlung mit Troglitazon gegenüber aus dem Blut isolierten Parasiten)

Ergebnisse

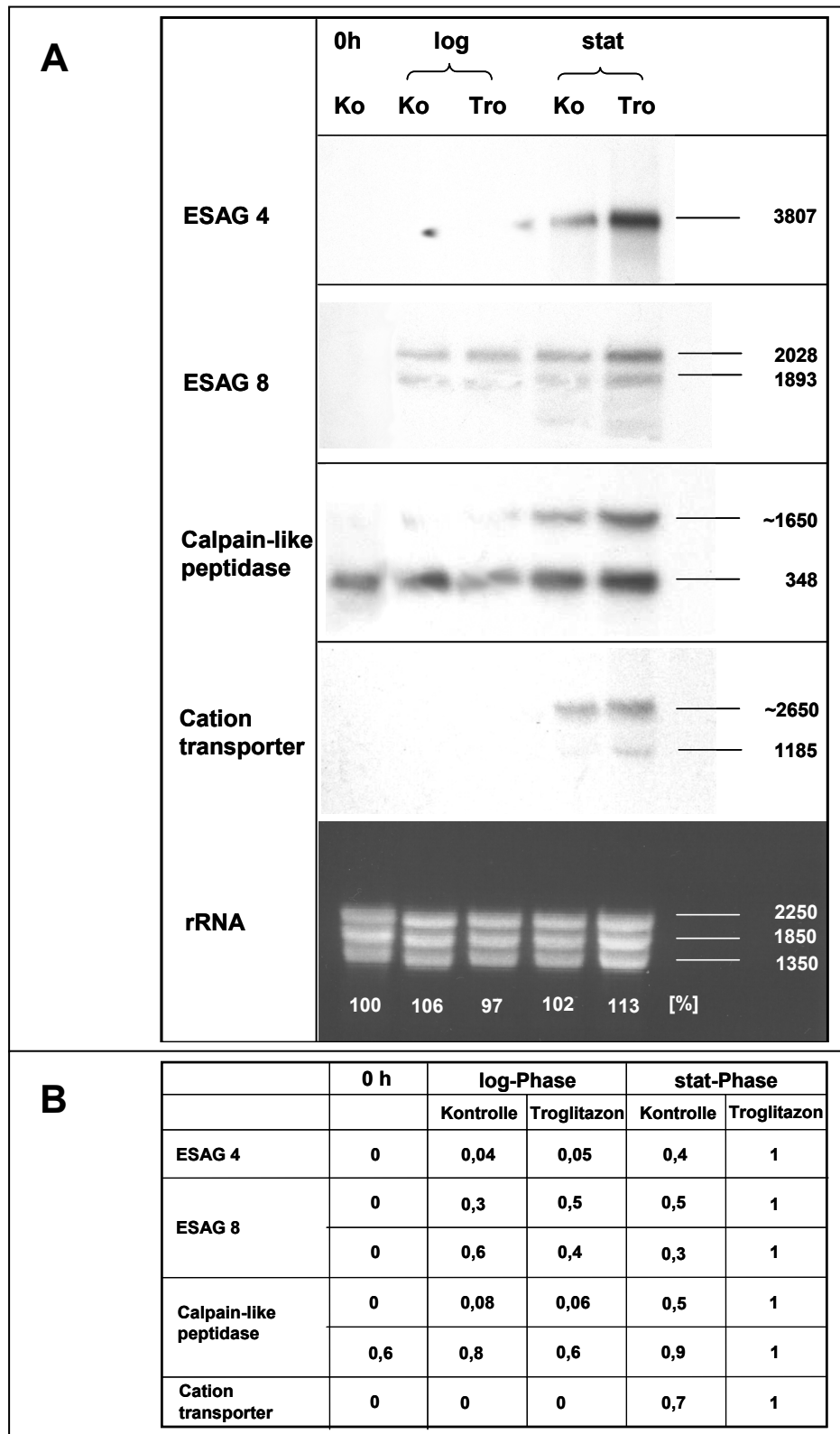


Abb.3-24. Überprüfung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blotting. Zu den wichtigsten regulierten Genen wurden Sonden hergestellt und deren Expression während der logarithmischen und stationären Phase mit und ohne Zugabe von Troglitazon verfolgt. Als Ladekontrolle dienen die drei großen rRNAs, die Semi-Quantifizierung erfolgte densitometrisch mit Hilfe von GelScan V5.1. Dabei wurde die stärkste Expression als 1 gesetzt. 0 h = Kontrolle (log-Phase aus dem Blut), log-Phase = Zellen nach 14 h in Kultur, stat-Phase = Zellen nach 36 h in Kultur.

4. DISKUSSION

4.1 Wachstumshemmung ohne Induktion von Zelltod durch Thiazolidindione

Durch Arbeiten von Figarella *et al.* (2005 und 2006) wurde bekannt, dass bestimmte Prostaglandin-Derivate, die von den Parasiten selbst synthetisiert und in die Umgebung abgegeben werden, Wachstumshemmung und programmierten Zelltod hervorrufen. Darunter fallen Prostaglandine der D- und J-Serie, die durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur DNA-Degradation führen, wobei ein Zellzyklusarrest in der G₁-Phase auftritt. Das von den Blutformen gebildete PGD₂ wird unter Beteiligung von Albuminen im Blut wahrscheinlich schnell in seine Metabolite wie PGJ₂, Δ¹²-PGJ₂ und 15-desoxy-PGJ₂ überführt. Bisher ist allerdings nicht bekannt, über welchen Mechanismus diese Derivate in die Zellen aufgenommen und über welchen Rezeptor die Effekte vermittelt werden. Wahrscheinlich gelangt PGD₂ selbst nicht in die Zellen und die Induktion des Zelltodes erfolgt über Bindung der jeweiligen Metabolite. Einer dieser Derivate ist 15-desoxy-PGJ₂, das in niedrigen Konzentrationen an Membranrezeptoren binden kann (Monneret *et al.*, 2002), sonst aber auch zahlreiche nukleäre Targetproteine wie z.B. PPARγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) besitzt (Cheron *et al.*, 2004). Zu den natürlichen Liganden von PPARγ zählen neben 15-desoxy-PGJ₂ aber auch andere ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure, Linolensäure oder auch oxidierte Fettsäuren wie 9- und 13-Hydroxyoctadecadiensäure (Shearer and Hoekstra, 2002). Allerdings ist deren Affinität zu dem Kernrezeptor relativ gering. Im Gegensatz dazu stehen die synthetischen Agonisten, allen voran die Familie der Thiazolidindione, deren EC₅₀ sich im nanomolaren Bereich befindet. Neben Effekten wie Differenzierung, Proliferation von Peroxisomen, Senkung des Glukosespiegels oder Verhinderung der Schaumzellenbildung (Willson *et al.*, 2001) wurde auch von PPARγ induzierter Apoptose (Padilla *et al.*, 2000; Eucker *et al.*, 2006; Ming *et al.*, 2006) berichtet. Um herauszufinden, ob der von PGD₂ und seinen Metaboliten induzierte Zelltod in *Trypanosoma brucei* über Aktivierung eines PPARγ-Homologs vermittelt wird, wurden zunächst Experimente mit den höher affinen Thiazolidindionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese tatsächlich einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum besitzen. Von den drei Substanzen, die für die Experimente verwendet wurden, besaß Troglitazon sowohl die stärkste wachstumshemmende Wirkung als auch mit 42 μM die niedrigste IC₅₀, gefolgt von Ciglitazon mit 63 μM und Rosiglitazon mit ~175 μM. Da α-Tocopherol, das strukturelle Ähnlichkeit mit Troglitazon, aber nicht mit den anderen

beiden Substanzen besitzt, in Konzentrationen bis zu 2 mM kaum einen Effekt auf das Wachstum der Zellen zeigte, liegt es nahe, dass diese Wirkung durch den Thiazolidindion-Teil vermittelt wird. Dabei könnte der lipophile Rest die Stärke des Effekts modulieren.

In Analogie zu den Prostaglandinen, wurden die Zellen nach Behandlung auf Nekrose- und Apoptosemarker untersucht. FACS-Analysen mit Propidiumjodid zeigten aber keine Anzeichen erhöhter Membranpermeabilität wie sie für Nekrose zu erwarten gewesen wäre. Untersuchungen des DNA-Gehaltes der Kerne zeigten zudem weder DNA-Degradation noch Polyploidie, was auch durch Kernfärbung unter dem Mikroskop bestätigt wurde. Auch die Färbung des Mitochondriums mit TMRE offenbarte keinen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und bestätigte somit die anderen Ergebnisse. Im Gegensatz dazu erzeugten alle Thiazolidindione eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials. Da diese Daten nicht für Nekrose oder einen programmierten Zelltod sprechen, wurde die Morphologie der Zellen zusätzlich mittels Transmissionselektronen-Mikroskopie untersucht. Auch hier waren weder Chromatinkondensation noch eine Erhöhung der Lysosomen- oder Autophagosomenzahl erkennbar, so dass auch Autophagie ausgeschlossen werden konnte. Somit gab es bei Behandlung mit den PPAR γ -Agonisten keine Evidenzen für toxische Effekte auf die Zellen, vielmehr schlossen diese Experimente die Beteiligung eines PPAR γ -abhängigen Mechanismus bei der Induktion eines programmierten Zelltodes durch PGD₂ und seine Derivate aus.

4.2 Proliferation der Glykosomen und Steigerung der Glykolyserate

Die Glykosomen der Kinetoplastiden gehören zusammen mit den Glyoxysomen der Pflanzen zu den Peroxisomen verwandten Organellen. Neben einigen gemeinsamen besitzen diese jedoch auch divergente Stoffwechselwege, die wahrscheinlich auf Eigenheiten der jeweiligen Spezies beruhen (Parsons, 2004). So ist beispielsweise die Glykolyse bei Trypanosomen nicht im Cytosol, sondern in den Glykosomen lokalisiert, so dass letztere besonders für die Blutform ein essentielles Organell darstellt. Die Biogenese von Peroxisomen in höheren Eukaryonten benötigt generell cytosolische Proteine und Membrantransportproteine, die Peroxine. Bei der *de novo* Synthese induzieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder sogenannte Peroxisomen-Proliferatoren (Fibrate, Thiazolidindione, etc.) durch Bindung an die *Peroxisome Proliferator Activated Receptors* die Transkription peroxisomaler Gene, denen ein *PP-Responding Element* vorgeschaltet ist. Alternativ können Peroxisomen auch einfach durch die Spaltung schon vorhandener Peroxisomen entstehen (Chandoga und Petrovic,

2001).

Tatsächlich zeigen TEM-Aufnahmen von Blutform-Zellen, die mit Troglitazon behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine erhöhte Anzahl an Glykosomen. Da aufgrund der Methodik jedoch nur wenige Zellen betrachtet werden können, wurden für eine gesicherte Beurteilung zusätzlich Immunofluoreszenz-Experimente durchgeführt und die Glykosomen mittels Antikörper gegen das dort lokalisierte Enzym Aldolase angefärbt. Auch hier ist eine deutliche Proliferation dieser Organellen durch Troglitazon ersichtlich. Dies könnte für eine den höheren Eukaryonten ähnliche Regulation über einen nukleären Rezeptor wie PPAR γ sprechen. Allerdings gibt es bisher keine Evidenzen für einen ähnlichen Mechanismus in Trypanosomatiden (Parsons, 2004), zumal die Regulation auf Transkriptionsebene dort generell keine große Rolle einnimmt (Clayton, 2002).

Um quantitativere Aussagen treffen zu können, wurde die Glykolyserate der Zellen bestimmt, da diese ein indirektes Maß für die Glykosomenzahl darstellt. Nach Behandlung mit Troglitazon erhöhten sich der Glucoseverbrauch und die Pyruvatproduktion der Zellen um ca. 25%. Dies legt folglich zwar eine Erhöhung der Glykosomenzahl pro Zelle nahe, allerdings nivellierte sich dieser Unterschied bei Bezug auf die jeweilige Proteinmenge, da die Parasiten nach Behandlungen eine höhere Proteinkonzentration aufwiesen. Bestimmungen der Proteinbiosyntheserate zeigten, dass dies nicht auf einer Hemmung des Proteinabbaus, sondern auf einer bereits 4 h nach Zugabe von Troglitazon erhöhten Proteinbiosyntheserate der Zellen beruht. Letzteres spricht für einen aktiven Umwandlungsprozess der Parasiten durch Expression neuer Proteine.

Da die Aufnahme von Glucose nicht reduziert ist, scheint die Proliferation der Glykosomen keine Folge von Nahrungsmangel zu sein. In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass die enzymatische Zusammensetzung der Glykosomen in den verschiedenen Entwicklungsstadien, d.h. im Vergleich von Blutformen zu prozyklischen Parasiten, einer Veränderung unterliegt (Hannaert and Michels, 1994; Colasante *et al.*, 2006). In Analogie zur „Pexophagie“ in Hefen, vertreten Rigden *et al.* (2005) die Hypothese einer „Glycophagie“ in Trypanosomen, die eine Anpassung an verschiedene Entwicklungsstadien und Umgebungsbedingungen darstellen könnten. Dabei werden Glykosomen neuer Enzymausstattung synthetisiert und die vorhandenen durch Autophagie abgebaut. Solch ein Prozess könnte auch der durch Troglitazon induzierten glykosomalen Proliferation zugrunde liegen und so eine Anpassung an sich potentiell verändernde Umgebungsbedingungen einleiten.

4.3 Aktivierung des Mitochondriums und Erhöhung der Transformationseffizienz durch Troglitazon

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Troglitazon-behandelten Zellen zeigten nicht nur eine Proliferation von Glykosomen, sondern auch auffällige Mitochondrien mit besserer Ausprägung der Cristae. Dies wäre nach 16 h Inkubation eigentlich nicht zu erwarten gewesen, da sich Blutform-Zellen zu diesem Zeitpunkt noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Kontrollzellen nach entsprechender Inkubationszeit besitzen kleinere Mitochondrien mit nur wenigen Cristae, da sie ihre Energie ausschließlich aus der Glykolyse beziehen. Untersuchungen mittels FACS-Analyse bestätigten die morphologisch sichtbare Weiterentwicklung und zeigten eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung der Zellen mit Thiazolidindionen. Dies könnte gegenüber unbehandelten Zellen den Import von Enzymen ins Mitochondrium begünstigen, der neben ATP und speziellen Rezeptoren auch ein ausreichendes Membranpotential benötigt (Priest and Hajduk, 1996). Näheren Untersuchungen der behandelten Blutformen zufolge besitzen die Zellen einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, der durch KCN wesentlich deutlicher inhibiert werden konnte als der der Kontrollzellen. Für Blutformen der stationären Phase wurde diese erhöhte Cyanosensitivität schon beschrieben (Hamm *et al.*, 1990). Dies deutet tatsächlich auf eine Aktivierung der Atmungskette hin, wie sie bei der Differenzierung von slender- zu stumpy-Blutformen auftritt. Auch die Erhöhung der SDH-Aktivität sowie die gesteigerte Expression der DHLADH und Transkription von Cytochrom C und 9S rRNA bestätigen diese Hypothese und sind konform mit Untersuchungen des Transkriptionsmusters verschiedener Lebensstadien (Michelotti und Hajduk, 1987; Priest und Hajduk, 1994).

Aufgrund ihrer Selektion auf schnelles Wachstum im Blut, können monomorphe Stämme zwar metabolisch eine Differenzierung durchlaufen, morphologisch sind sie aber deutlich schwieriger in slender- und stumpy-Formen zu unterscheiden, als die pleomorphen Blutformen. Da die Morphologie jedoch ein wichtiges Kriterium zur Identifizierung einer Differenzierung darstellt (Vickerman, 1965), wurden zusätzlich Experimente mit pleomorphen Zellen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bestanden behandelte Populationen zu 64% aus stumpy-Formen, während in der Kontrolle erst 22% der Zellen differenziert waren. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten, die zur artifiziellen Einleitung von slender zu stumpy-ähnlichen Parasiten führten (Giffin *et al.*, 1986; Penketh *et al.*, 1991), traten weder in pleomorphen noch in monomorphen Kulturen nach Behandlung mit Troglitazon eine erhöhte Anzahl an Zellen mit größeren Nuclei oder multinucleäre Zellen auf.

Auch, wenn normale stumpy-Parasiten in der G_1/G_0 -Phase des Zellzyklus arretiert sind, stellten Mutomba und Wang (1998) die Hypothese auf, dass ein Arrest in jeder beliebigen Zellzyklusphase eine Differenzierung einleiten würde. So entstehen Zellen mit stumpy-Morphologie beispielsweise als Folge der Aushungerung nach Behandlung mit DFMO mit einem Block in der G_1/S -Phase (Giffin *et al.*, 1986), durch Induktion von DNA-Schäden nach Behandlung mit 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-methylhydrazin (Penketh *et al.*, 1991) mit einem Block in der G_2 -Phase, durch das Antibiotikum Aphidicolin mit einem Block in der G_2/M -Phase und durch Hydroxyharnstoff mit einem Block in der M/G_1 -Phase (Mutomba und Wang, 1998). Mit Troglitazon konnte allerdings kein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden, was sowohl durch FACS-Analysen als auch durch Färbung der Kerne mit Bisbenzimid bestätigt wurde. Dies spricht einerseits dafür, dass die Substanz keinen toxischen Effekt auf die Zellen besitzt oder etwa Schäden an der DNA verursacht. Andererseits stellt der Zellzyklusarrest in der G_1/G_0 -Phase einen wesentlichen stumpy-Marker dar (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002), der eindeutig bei Troglitazon-behandelten Parasiten zu fehlen scheint.

Ein weiteres Kriterium für eine Differenzierung der Blutformen ist die Fähigkeit, unter den entsprechenden Bedingungen, wie sie von Overath *et al.* (1986) publiziert worden waren, zu prozyklischen Zellen zu transformieren. Parasiten, die beispielsweise mit DFMO behandelt worden waren, zeigten zwar Zellzyklusarrest und stumpy-Morphologie, scheiterten aber in der Umwandlung zur prozyklischen Fliegenformen (Giffin *et al.*, 1986). Dies legt eine ungenügende Aktivierung des Mitochondriums nahe, die als Präadaption für die veränderten Bedingungen im Darm der Fliege notwendig ist. Um die mitochondrialen und morphologischen Veränderungen der Troglitazon-behandelten Zellen weiter zu untersuchen, wurden diese ebenfalls dem genannten Transformationsprotokoll unterzogen. Dabei zeigte sich, dass sie tatsächlich eine weitaus bessere Transformation zur prozyklischen Form durchführten als die entsprechenden Kontrollzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Letztere starben entweder infolge der veränderten Nahrungs- und Temperatur-Bedingungen oder wuchsen nur langsam, was sich sowohl in der Entwicklung der Zelldichte als auch in ihrer Morphologie während des Transformationsprozesses widerspiegelte. Troglitazon induziert also offensichtlich eine Aktivierung des Mitochondriums, die den Blutformen als Präadaption für veränderte Umgebungsbedingungen genügt, um in das Stadium der Fliegenformen überzugehen, ohne allerdings vorher in der G_1/G_0 -Phase aufzulaufen. Dies entspricht einem Differenzierungsprozess, der nicht zu Zellzyklus-arretierten stumpy-Formen, sondern zu intermediären Formen führt.

Während der Differenzierung von slender- zu stumpy-Formen durchlaufen Trypanosomen ein

Stadium, das schon Vickerman (1965) als „intermediär“ bezeichnete, das aber wesentlich schwerer erfassbar ist. Während slender-Formen eine schlanke Morphologie besitzen, proliferieren und nur durch Glykolyse überleben, sind stumpy-Parasiten eindeutig dicker, zellzyklusarretiert und besitzen ein teilweise aktiviertes Mitochondrium. Bisher konnte man zeigen, dass slender-Formen im Darm der Fliege zugrunde gehen, stumpy-Formen sich hingegen in Fliegenformen umwandeln können. Doch ist die Differenzierung ein transients Prozess, der während der letzten Zellteilung stattzufinden scheint (Matthews und Gull, 1994). Sind intermediäre Parasiten als Zwischenstadium der beiden Extreme schon morphologisch schwer zu definieren, so stellt sich die Frage, inwiefern man sie metabolisch erfassen kann. Meist werden sie aufgrund dieser Problematik zu der stumpy-Population dazugezählt. Es konnte gezeigt werden, dass ihre mitochondriale Entwicklung eher den stumpy-Formen entspricht (Tyler *et al.*, 1997). Statistische Arbeiten von Savill und Seed (2004) über den Infektionsverlauf der Parasiten bestärken die Betrachtung, die eine Subpopulation intermediärer Zellen als wichtigen Faktor mit einbezieht. Zudem häufen sich Evidenzen dafür, dass es sich bei eigentlichen stumpy-Formen vielmehr um ein „dead end“ der Entwicklung handelt, deren eigentliche Aufgabe durch Zellzyklusarrest und Sensitivität gegenüber Prostaglandin-induziertem Zelltod eine Kontrolle der Parasitämie darstellt (Tyler, 2003; Figarella *et al.*, 2005 und 2006; Duszenko *et al.*, 2006). Dies rückt die Bedeutung intermediärer Formen, wie sie etwa durch Troglitazon induziert werden, in ein anderes Licht, da diese metabolisch bereits differenziert sind, aber keinen Zellzyklusarrest zeigen und so das für das Überleben in der Fliege eigentlich verantwortliche Stadium darstellen könnten.

4.4 Die Induktion der Differenzierung erfolgt über einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus

Zahlreiche Publikationen berichten über Induktion einer Differenzierung in höheren eukaryontischen Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten und Karzinomzellen durch Thiazolidindione, sowohl durch PPAR γ -abhängige (Tontonoz *et al.*, 1994 und 1997; Willson *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2004) als auch unabhängige Signalwege (Fröhlich *et al.*, 2005; Weng *et al.*, 2006).

Analog zu Troglitazon waren auch andere Thiazolidindione, Ciglitazon und Rosiglitazon, in der Lage, das Zellwachstum von *Trypanosoma brucei* zu hemmen, das mitochondriale Membranpotential zu erhöhen und die Transformationsfähigkeit der Blutformen zu prozyklischen Parasiten zu verbessern. Dies suggeriert einen strukturspezifischen Effekt der

Diskussion

Substanzen, beruhend auf den gemeinsamen Thiazolidindion-Rest. Allerdings unterscheiden sich die Wirkungen der drei Substanzen in ihrer Stärke, mit Troglitazon als eindeutig potentesten Differenzierungsinduktor, gefolgt von Ciglitazon und Rosiglitazon. Dies steht im Widerspruch zu den Affinitäten der jeweiligen Thiazolidindione hinsichtlich PPAR γ , unter denen Rosiglitazon mit einer EC₅₀ von 43 nM (humaner Rezeptor) die größte besitzt (Shearer und Hoekstra, 2002; Weng *et al.*, 2006). Dieses Phänomen wurde schon bezüglich anderer Zelltypen wie Thyrozyten beobachtet (Fröhlich *et al.*, 2005) und spricht für eine strukturspezifische, aber PPAR γ -unabhängige Differenzierung, bei der der lipophile Rest der Thiazolidindione modulierend auf die Wirkung eingreifen könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde zusätzlich der hochaffine PPAR γ -Antagonist T0070907 (Lee *et al.*, 2002) eingesetzt, der durch kovalente Bindung am Cystein der Position 313 des Rezeptors wirkt und dessen Effekt sich durch Thiazolidindione nicht aufheben lässt. Dieser hatte jedoch keinen Einfluß auf die Wirkung von Troglitazon. Zudem induzierte der natürliche PPAR γ -Ligand 15-desoxy-PGJ₂ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995) keine Differenzierung der Blutformen. Im Gegensatz dazu starben die Zellen schneller in Transformationsmedium als die entsprechenden Kontrollzellen, was die Arbeiten von Figarella *et al.* (2006) bestätigt, die zeigten, dass Prostaglandin-Derivate programmierten Zelltod, aber keine Differenzierung induzieren. Auch Datenbankrecherchen bestärken einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus, der die Wirkung von Troglitazon in Trypanosomen bedingt, da sie keinen signifikanten Treffer für ein potentielles PPAR γ -Ortholog ergaben.

Es erscheint jedoch interessant, dass die beobachteten Effekte auf die Differenzierung der Parasiten sehr ähnlich zu den Berichten in höheren Eukaryonten sind. Auch dort häufen sich die Evidenzen für PPAR γ -unabhängige Mechanismen und andere Targetproteine der Thiazolidindione (Weng *et al.*, 2006). So vermögen sie an mitochondriale Proteine zu binden (Colca *et al.*, 2005) oder führen durch verstärkten Abbau von Cyclin D1 zu einer Hemmung der Proliferation von Mammakarzinom-Zellen (Huang *et al.*, 2005). *De facto* erscheinen viele Effekte als ein Resultat aus Übereinanderlagerungen PPAR γ -abhängiger und -unabhängiger Wege wie die Aktivierung von *extracellular-signal regulated kinases* (ERKs), die zu der Familie der MAP-Kinasen gehören, oder der Aktivierung der mitochondrialen AMP-aktivierten Proteinkinase (mAMK), die eukaryontischen Zellen als Schutz vor Energiemangel dient (He *et al.*, 2006; Turturro *et al.*, 2007). Auch in *Trypanosoma brucei* spielen offensichtlich MAP-Kinasen eine wichtige Rolle (Naula *et al.*, 2005), wohingegen eine Regulationen der Expression durch Transkriptionsfaktoren nur einen geringeren Stellenwert in den Parasiten besitzt (Clayton, 2002). Von den drei bisher identifizierten MAP-Kinasen,

gehören zwei zur Gruppe der ERKs und scheinen in Differenzierungsprozesse und Wachstumsgeschwindigkeit der Parasiten involviert zu sein (Hua und Wang, 1994 und 1997; Muller *et al.*, 2002; Domenicali-Pfister *et al.*, 2006). Die dritte, TbECK1, besitzt sowohl Eigenschaften der MAP- als auch der CD-Kinasen und greift in den Zellzyklus der Parasiten ein (Ellis *et al.*, 2004). Bisher ist allerdings noch wenig über diese Signalkaskaden aufgedeckt, da sich selbst nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Trypanosoma brucei* deren Identifikation als schwierig erweist (Naula *et al.*, 2005). Eventuell könnte Troglitazon über die Aktivierung oder Hemmung einer entsprechenden Kinase wirksam werden und so entweder die Funktion des *stumpy induction factor* (SIF) simulieren oder dessen Effekt verstärken. Eine synergistische Wirkung scheint dabei näher zu liegen, da die Zugabe von Troglitazon zu einem späteren Zeitpunkt der Kultur (mit höherer Zelldichte und angereichertem SIF) im Gegensatz zur sofortigen Zugabe einen spontanen wachstumsinhibitorischen Effekt zeigte.

4.5 Regulation auf Transkriptionsebene – Expression von ESAG 8

Ähnlich den Signalwegen der MAP-Kinasen, ist auch der Mechanismus der Differenzierungs-Induktion von slender- zu stumpy-Formen bislang lückenhaft aufgeklärt. Es ist bekannt, dass sowohl die Zelldichte als auch die Produktion eines Pheromon-artigen Faktors durch die slender-Formen (SIF) einen Einfluss auf die Differenzierung besitzen (Hesse *et al.*, 1995; Reuner *et al.*, 1997; Vassella *et al.*, 1997). Auch wenn es bisher nicht gelungen ist, diesen Faktor zu isolieren, wird seine Präsenz sowohl durch experimentelle als auch statistische Untersuchungen untermauert (Savill und Seed, 2004). Durch eine Art *quorum sensing*, wie es bei Bakterien beobachtet werden kann (Visick und Fuqua, 2005), wird nach bisherigen Erkenntnissen durch Bindung des SIF an einen Rezeptor die Bildung von cAMP in den Zellen induziert, das seinerseits als *second messenger* die Umwandlung zu stumpy-Parasiten einleitet (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002). Untersuchungen auf Transkriptionsebene nach Behandlung der Blutformen mit Troglitazon im Vergleich zu unbehandelten Zellen der logarithmischen und späten stationären Phase sollten Hinweise auf weitere Details dieser Signalkaskade geben. Das Transkriptionsmuster der behandelten Zellen gliederte sich zwischen dem der logarithmischen und der stationären Kontrolle ein und bestätigte so die Ergebnisse der anderen Experimente. Dabei ähnelte die Genexpression nach Troglitazon Zugabe mehr der der logarithmischen Kontrollzellen. Dies könnte in einer Kombination aus zwei Faktoren begründet sein: die Veränderungen durch Behandlung mit Troglitazon

induzieren eher die Entwicklungen von intermediären als von stumpy-Formen wie sie in der stationären Phase vorliegen. Zudem beginnen Zellen der späten stationären Phase wahrscheinlich mit der Expression von Genen, die am programmierten Zelltod beteiligt sind und im Gegensatz zu Prostaglandin-Derivaten durch Troglitazon nicht induziert werden.

Am deutlichsten durch Troglitazon reguliert waren Gene der *VSG-expression site*. Im Gegensatz zur generellen Aktivierung inaktiver *expression sites* nach Beschädigung der DNA (Shedder *et al.*, 2004), waren die einzelnen *expression site associated genes* jedoch unterschiedlich reguliert. Eine von VSG unabhängige posttranskriptionale Regulation wurde schon für ESAG 3 und 8 gezeigt, wohingegen ESAG 6/7 analog zu VSG exprimiert werden (Vanhamme *et al.*, 2000). Dies erklärt die gleichzeitig unterdrückte Expression von ESAG 3 in behandelten Zellen, während die von ESAG 8 deutlich erhöht war. Während über ESAG 3 noch nicht viel bekannt ist, belegen zahlreiche Publikationen eine zellregulatorische Rolle für ESAG 8. Auf der *expression site* liegt das Gen für dieses Protein in unmittelbarer Nähe zu ESAG 4, einer Adenylatzyklase, und besitzt große Homologie zur Ras-interagierenden Domäne der Adenylatzyklase in Hefe (Revelard *et al.*, 1990). Daher ist die Struktur von ESAG 8 durch Regionen ausgezeichnet, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen von Bedeutung sind, wie Leucin-reiche *repeats* und ein Ring-Finger-Motiv. Da das Protein in der Zelle in sehr geringer Konzentration vorliegt und vorwiegend im Nucleolus lokalisiert ist, wird ihm eine regulatorische Funktion zugesprochen (Lips *et al.*, 1996; Hoek *et al.*, 2000). Bisher wurden zwar Interaktionen von ESAG 8 mit einem Protein der *Pumilio*-Familie und mit PIE8, das bei der slender- zu stumpy-Differenzierung zur Aktivierung des Mitochondriums beiträgt, nachgewiesen (Hoek *et al.*, 2002; Perez-Morga *et al.*, 1999), seine eigentliche Rolle aber noch nicht geklärt. Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird die Funktion von ESAG 8 in der Zellzyklusregulation vermutet (Pays *et al.*, 2001), was mit den Effekten von Troglitazon im Einklang stünde.

ESAG 4, das große Homologie zur katalytischen Domäne der Hefe-Adenylatzyklase besitzt, wurde sowohl in der Kontrolle der logarithmischen Phase als auch in der behandelten Zellpopulation gegenüber den Zellen aus dem Blut hochreguliert. Im Gegensatz zu dieser Enzymfamilie in höheren Eukaryonten ist ESAG 4 nicht G-Protein-gekoppelt und besitzt eine große extrazelluläre Liganden-Bindedomäne. Da das Genom von *Trypanosoma brucei* eine Vielzahl solcher Adenylatzyklasen (GRESAGs) beinhaltet, die in ihren extrazellulären Domänen differieren, liegt es nahe, dass sie durch unterschiedliche Liganden unter den jeweiligen Bedingungen spezifisch reguliert werden (Alexandre *et al.*, 1996). Für ESAG 4 wird eine Aktivierung über einen niedermolekularen Effektor angenommen, da dieser

Rezeptor entlang des Flagellums lokalisiert ist (Paindavoine *et al.*, 1992; Pays *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass die Bildung von cAMP ein wichtiger Parameter für die slender-stumpy Differenzierung darstellt (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002). Aus diesem Grund entstand die Hypothese, ESAG 4 würde durch SIF aktiviert werden, so die Bildung von cAMP induzieren und die Differenzierung einleiten, da es als einzige Isoform ausschließlich in Blutformen exprimiert wird (Vassella *et al.*, 1997). Andererseits könnte es auch eine Rolle in der Transformation von Blutformen zu Prozyklischen Zellen spielen (Paindavoine *et al.*, 1992; Pays *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass ESAG 4 auch in der Kontrolle aus der logarithmischen Phase in Kultur hochreguliert war, bestätigt Versuche, in der die Aktivität der Succinatdehydrogenase bestimmt worden war, denn auch diese zeigten eine beginnende Differenzierung zu stumpy-Formen im Gegensatz zu Zellen direkt nach der Isolierung aus dem Blut. Wahrscheinlich wird dies schon durch eine Veränderung der Umgebung zu Kulturbedingungen ausgelöst.

Neben den *expression site associated genes* zeigten die Microarrays auch eine Regulation zweier *heat shock* Proteine auf. Die erhöhte Expression von HSP60 ist stimmig mit Beobachtungen von Tyler *et al.* (1997). Mittels Immunofluoreszenz ermittelten sie eine Steigerung von 3% HSP60-positiver Zellen in slender-Populationen zu 88% bzw. 100% bezüglich intermediärer und stumpy-Formen. Dieses Protein besitzt unter anderem die Aufgabe, die korrekte Rückfaltung von Proteinen, nachdem sie die Membran des Mitochondriums passiert haben, durchzuführen (Nadeau *et al.*, 1993). Da Troglitazon behandelte Blutformen zudem ein erhöhtes Membranpotential aufwiesen, könnte so der Import und die korrekte Faltung mitochondrialer Enzyme begünstigt sein und einen Grund für die gesteigerte Aktivität dieses Organells darbieten.

Da näheres zu den Aufgaben des trypanosomalen HSP83, der *calpain-like peptidase* oder den Ionenkanälen noch unbekannt ist, bleibt dies ein interessanter Ansatzpunkt, um die Effekte von Troglitazon und die generellen Prozesse während der Differenzierung weiter zu untersuchen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Vorausgegangene Arbeiten von Figarella *et al.* (2005 und 2006) konnten die Induktion eines programmierten Zelltodes durch Prostaglandine der D- und J-Serie aufzeigen. Im Hinblick darauf wurde nach einem möglichen rezeptorvermittelten Mechanismus gesucht. Da Thiazolidindione analog zu 15-desoxy-PGJ₂ in höheren Eukaryonten zu einer Aktivierung

Diskussion

von PPAR γ führen, wurden diese synthetischen Agonisten für weitere Versuche diesbezüglich herangezogen. Im Gegensatz zu den Prostaglandin-Derivaten lösten diese synthetischen PPAR γ -Agonisten in Blutform-Parasiten jedoch keinen Zelltod, wohl aber eine Differenzierung der slender-Formen aus. Dies zeigte sich in der Aktivierung des Mitochondriums und einer besseren Transformation zur prozyklischen Fliegenform, gleichzeitig aber auch in der Entwicklung von Parasiten mit stumpy-Morphologie in pleomorphen Stämmen. Allerdings wurde nach Behandlung der Zellen mit Troglitazon kein Zellzyklusarrest erhalten, der unter anderem als Merkmal von stumpy-Parasiten gilt (Vassella *et al.*, 1997; Matthews, 1999). Basierend auf diesen Daten und neueren Publikationen (Savill und Seed, 2004) führt dies zu der Schlussfolgerung einer transienten Differenzierung, die zellzyklusarretierte stumpy-Formen zur Regulierung der Parasitämie hervorbringt, um den Wirt nicht vorzeitig zu töten, während die Aufgabe intermediärer Blutformen in der Weiterentwicklung zu prozyklischen Parasiten und somit in der Vollendung des Lebenszyklus liegt.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ausgelöste Differenzierung nicht über die Aktivierung eines trypanosomalen PPAR γ -Orthologs erfolgt. Eine alternative Möglichkeit bietet hier die Identifizierung und Charakterisierung neuer ER-Kinasen, die als Target von Troglitazon dienen könnten (Naula *et al.*, 2005). Dabei bieten Untersuchungen bezüglich der transkriptionellen Regulation weitere Ansatzpunkte zur Aufklärung der für die Differenzierung verantwortlichen Signalkaskade, da viele dieser Proteinprodukte bisher nicht oder nur lückenhaft charakterisiert sind.

5. Zusammenfassung

Seit dem 18. Jahrhundert wurden viele Menschen durch Krankheiten dahingerafft, die als „sleepy distemper“ oder „fly disease“ bezeichnet wurden. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der dafür verantwortliche Erreger, *Trypanosoma brucei* (Dutton, 1902) entdeckt, dessen Unterarten einerseits für die Nagana afrikanischer Zuchttiere als auch für die Schlafkrankheit des Menschen verantwortlich sind. Werden metazyklische Parasiten durch einen Stich der Tsetse-Fliege von deren Speicheldrüsen auf das Blut eines Vertebraten übertragen, so differenzieren sie sofort in Blutform-Parasiten, die als slender-Formen bezeichnet werden. Diese besitzen eine hohe Teilungsrate und sind für den Anstieg der Parasitämie verantwortlich. Haben sie eine gewisse Zelldichte im Blut ihres Wirts erreicht, so differenzieren sie in dickere, teilungsdefiziente Zellen, den stumpy-Formen (Vickerman, 1965). Diese Differenzierung verläuft transient über eine intermediäre Blutform, die metabolisch schon stumpy-Charakter besitzt, morphologisch jedoch schwer einzuordnen ist (Tyler *et al.*, 1997; Savill und Seed, 2004). Der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist noch nicht aufgedeckt, es scheint sich aber um eine Art *quorum sensing* zu handeln, bei dem von den Trypanosomen selbst ein Faktor von geringem Molekulargewicht produziert wird (Hamm *et al.*, 1990; Vassella *et al.*, 1997). Dieser aktiviert offensichtlich eine cAMP-abhängige Signalkaskade, die schließlich zur Differenzierung der Zellen führt (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002). Es folgt ein Abfall der Parasitämie. Die wenigen slender-Formen, die eine andere VSG-Variante auf ihrer Oberfläche exprimieren, überleben und sorgen für den nächsten Infektionspeak. Nimmt nun eine andere Tsetse-Fliege ihre Blutmahlzeit und mit ihr Parasiten auf, so gelangen sie in deren Gastrointestinaltrakt. Hier ist das Angebot an Glucose so stark reduziert, dass hier slender-Formen aufgrund ihres nur rudimentär ausgeprägten Mitochondriums nicht überleben können. Intermediäre und stumpy-Formen haben hingegen schon einen Teil der Atmungskette aktiviert (Bienen *et al.*, 1991; Priest und Hajduk, 1994). Sie können in der Fliege zu prozyklischen Parasiten differenzieren, tauschen ihren VSG-Mantel gegen Prozyklin aus und vervollständigen die Atmungskette. Nun stellt Prolin ihre hauptsächliche Kohlenstoffquelle dar.

Diese Arbeit behandelt die Wirkung von Thiazolidindionen auf Blutformen von *Trypanosoma brucei*. Diese Substanzklasse wird therapeutisch bei Diabetes mellitus (Avandia[®], GSK; Actos[®], Takeda) eingesetzt und auch als Insulinsensitizer bezeichnet. In höheren Eukaryonten, wie den Menschen, binden sie unter anderem an den Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , der zusammen mit dem Retinoidrezeptor ein Heterodimer bildet und als

Zusammenfassung

Transkriptionsfaktor wirkt (Willson *et al.*, 2001). Natürliche Agonisten sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (Shearer and Hoekstra, 2002) oder 15-desoxy-PGJ₂ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995), die so z.B. metabolische Veränderungen des Glucosestoffwechsels und auch Differenzierung induzieren.

In Arbeiten von Figarella *et al.* (2005 und 2006) wurde gezeigt, dass PGD₂ und seine Metabolite wie 15-desoxy-PGJ₂ in den Blutformen von *Trypanosoma brucei* einen programmierten Zelltod hervorrufen. Da die Thiazolidindione das gleiche Targetprotein (PPAR γ) wie 15-desoxy-PGJ₂ besitzen, aber bei wesentlich höherer Affinität, wurden die Effekte von Troglitazon, Ciglitazon und Rosiglitazon untersucht, um einen möglichen Mechanismus der Prostaglandine aufzudecken. In Kultur verursachten alle Substanzen eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung. Dabei lagen die halbinhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀) nach 24 h für Troglitazon bei 42 μ M, für Ciglitazon bei 63 μ M und für Rosiglitazon bei ca. 175 μ M. Da Troglitazon den hydrophoben Molekülrest mit α -Tocopherol teilt, wurde auch der Effekt dieser Substanz auf Blutformen getestet. Da α -Tocopherol in seinem Löslichkeitsbereich jedoch kaum eine Wirkung auf die Zelldichte besaß, konnte die IC₅₀ hier nicht bestimmt werden. So reduzierte sich der für die Wirkung bedeutsame Teil auf den Thiazolidindion-Rest der Substanzen.

Troglitazon besaß den größten Effekt auf das Zellwachstum und wurde daher hauptsächlich für die folgenden Experimente eingesetzt. Um auf apoptotische oder nekrotische Vorgänge zu untersuchen, wurden das mitochondriale Membranpotential (ψ_m), die Permeabilität der Zellmembran und der DNA-Gehalt der Zellkerne mittels FACS-Analyse untersucht. Im Gegensatz zu den Prostaglandinen der D- und J-Serie gab es keinerlei Anzeichen auf Verlust von ψ_m , Schäden der Zellmembran oder DNA-Degradierung. Vielmehr erhöhte sich jedoch das mitochondriale Membranpotential, was eine Aktivitätssteigerung nahe legte. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden zusätzlich Transmissions-Elektronenmikroskopie-Experimente durchgeführt. In Übereinstimmung mit den bisherigen Daten waren weder DNA-Kondensation noch eine erhöhte Anzahl an Lysosomen oder Autophagosomen erkennbar. Die Mitochondrien der Troglitazon-behandelten Zellen waren nach 16 h jedoch größer und wiesen mehr Cristae als die der Kontrollzellen auf, was für eine Aktivierung des Mitochondriums sprach, die in der logarithmischen Phase des Zellwachstums normalerweise noch nicht aufzufinden ist.

Durch Aktivitätsmessung der Succinatdehydrogenase, Inhibierung des Sauerstoffverbrauchs mit KCN und Northern-Blot-Analyse von Cytochrom C- und 9S rRNA-Transkripten konnte diese Aktivierung nach Troglitazon-Behandlung auch auf enzymatischem Niveau bestätigt

werden.

Schließlich wurden behandelte und Kontrollzellen einem Transformationsversuch nach Overath *et al.* (1986) unterzogen. Dabei wurden sie nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (8 h, 16 h, 24 h) in Blutformmedium in Transformationsmedium umgesetzt, das bei stumpy-Formen durch cis-Aconitat und Citrat die Umwandlung zu prozyklischen Formen triggern kann. Hierbei zeigte sich der deutlichste Unterschied in der Transformationseffizienz nach 16 h Inkubation in Blutformmedium. Die Zelldichte Troglitazon-behandelter Kulturen stieg in Transformationsmedium deutlich schneller an, was sich auch in prozyklischem Medium ohne Glucose fortsetzte. Gleichzeitig wurde die erfolgreiche Umwandlung zu prozyklischen Zellen durch paralleles Monitoring des VSG-Verlusts untermauert. Dieser Effekt konnte auch bei den anderen Thiazolidindionen Ciglitazon und Rosiglitazon beobachtet werden, wenn auch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Troglitazon. PPAR γ -Antagonisten wie SR-202 (Rieusset *et al.*, 2002) und T0070907 (Lee *et al.*, 2002) konnten die durch die Thiazolidindione verbesserte Transformationseffizienz der Zellen jedoch nicht aufheben. Diese Tatsache spricht neben vergeblichen *in silico* Recherchen nach einem PPAR γ -Ortholog für ein anderes Targetprotein dieser Substanzen in Trypanosomen.

Um dem Mechanismus der Troglitazon-induzierten Differenzierung trotzdem näher zu kommen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Diese offenbarten unter anderem eine erhöhte Anzahl an Transkripten des Ubiquitin-Aktivierungsenzyms, der ESAGs 4 und 8, des mitochondrialen HSP60, des HSP83 im Cytosol und einiger noch nicht charakterisierter Proteine. Dabei betraf die deutlichste Regulation ESAG 8, ein Protein der VSG-*expression site*, das nach bisherigen Vermutungen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen regulatorisch in die Differenzierung eingreift (Ross *et al.*, 1991; Pérez-Morga und Pays, 1999; Pays *et al.*, 2001).

Mit Troglitazon lässt sich somit *in vitro* eine Differenzierung von Blutformen induzieren. Allerdings konnten behandelte Parasiten nicht alle Kriterien von stumpy-Formen erfüllen, da kein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich handelt es sich eher um intermediäre Blutformen, die aufgrund ihrer weniger eindeutigen Morphologie bisher noch nicht gut charakterisiert sind, aber schon ausreichende metabolische Veränderungen durchlaufen haben, um sich gut zu prozyklischen Zellen zu entwickeln.

Somit könnten die Ergebnisse eine bedeutende Hilfe zur Entschlüsselung des für die Differenzierung von Blutformen verantwortlichen Mechanismus darstellen. Sowohl Regulationen auf Transkript- als auch auf Proteinebene können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen, die schließlich das Phänomen dieses Differenzierungsprozesses und

die Rolle von intermediären und stumpy-Blutformen klären könnten.

5. Summary

In the 18th century, diseases called “sleepy distemper“ or „fly disease“ became well-known and were responsible for many deaths. However, not before the beginning of the 20th century the cause of infection, *Trypanosoma brucei*, was found by Dutton (1902). Subspecies of this protozoan are the reason for Nagana in African cattle and sleeping sickness in human beings. When metacyclic parasites enter the bloodstream of the vertebrate host, they differentiate immediately to slender bloodstream forms. They divide very rapidly and are responsible for the increase of the parasitemia. When they have reached a certain cell density, they change into stumpy forms which cease in proliferation (Vickerman, 1965). This differentiation is a transient process traversing an intermediate state already featured with the metabolism of the stumpy form, but morphologically difficult to determine (Tyler *et al.*, 1997; Savill und Seed, 2004). The mechanism is still an enigma, but it is likely to be a way of quorum sensing with the trypanosomes themselves producing a factor of low molecular weight (Hamm *et al.*, 1990; Vassella *et al.*, 1997). This factor initiates a cAMP-dependent pathway, last but not least leading to a differentiation (Vassella *et al.*, 1997; Breidbach *et al.*, 2002). As a result, the parasitemia decreases and only some slender cells expressing a different VSG-variant survive and cause the next peak of infection. When the next tsetse-fly takes its bloodmeal, the bloodstream parasites enter the midgut where the supply of glucose is not sufficient for slender forms anymore. As they rely exclusively on glucose for energy generation and their mitochondrion is still rudimentary, these forms eventually die. In contrast, intermediate and stumpy forms already have activated parts of their respiratory chain (Bienen *et al.*, 1991; Priest and Hajduk, 1994) and can transform easily to procyclic fly forms. During this process they change their VSG-coat into procyclin and complete their respiratory chain, which correlates with a change to proline as their main carbon source.

This thesis deals with effects of thiazolidinediones on the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Substances of this class are used as antidiabetic drugs (Avandia[®], GSK; Actos[®], Takeda) and are called “insulin sensitizers”. In higher eukaryotes they bind to the Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ which forms a heterodimer with the retinoid receptor (RXR) and acts as a transcription factor (Willson *et al.*, 2001). Polyunsaturated fatty acids (Shearer and Hoekstra, 2002) and 15-deoxy-PGJ₂ (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995) are natural ligands of this receptor and this way e.g. induce changes in glucose metabolism or

lead to differentiation of the respective cells.

As Figarella *et al.* (2005 and 2006) could prove, prostaglandin D₂ and its metabolites like 15-deoxy-PGJ₂ cause a programmed cell death (PCD) in bloodstream form parasites. Since the thiazolidinediones share the target protein (PPAR γ) with 15-deoxy-PGJ₂ but exhibit a much higher affinity, troglitazone, ciglitazone and rosiglitazone were used for further studies in order to discover a possible mechanism for the prostaglandin-effects.

All three substances induced a concentration-dependent growth inhibition in bloodstream form cells. The correspondent IC₅₀s, detected after 24 h, were 42 μ M for troglitazone, 63 μ M for ciglitazone and about 175 μ M for rosiglitazone, respectively. As troglitazone shares the hydrophobic residue of the molecule with α -tocopherol, additionally the effect of the latter compound was tested. Nevertheless, the IC₅₀ of α -tocopherol could not be detected because it revealed no effect on cell growth in its area of solubility. This fact led to the conclusion that the thiazolidinedione part of troglitazone is responsible for the effects on the cells.

Troglitazone had the strongest effect of the substances mentioned above and was therefore used for the following experiments. In order to test for necrotic or apoptotic events, mitochondrial membrane potential (ψ_m), permeability of the cell membrane and DNA-content of the nuclei were measured by FACS analysis. In contrast to the prostaglandins, the obtained results didn't indicate a loss of ψ_m , an increase of membrane-permeability or degradation of DNA. In fact, an increase of ψ_m could be observed, rather a sign of mitochondrial activation. For verification., transmission EM experiments were performed. In agreement with previous data the cells showed no DNA degradation, increase of lysosomes or autophagosomes. Interestingly, already after 16 h troglitazone-treated cells had larger mitochondria with more cristae in comparison to the control. This is a fact which argues for a further development of these organells, normally occurring in cells of the stationary phase, when they are differentiated to stumpy forms.

By measurement of SDH-activity, KCN-mediated inhibition of oxygen-consumption and the amounts of cytochrome c and 9S rRNA transcripts, the mitochondrial activation was confirmed on an enzymatic level.

Finally, treated and non-treated cells were subject to the transformation protocol after Overath *et al.* (1986). After different incubation times in bloodstream form medium (8 h, 16 h and 24 h), cells were transferred to transformation medium, containing citrate and cis-aconitate as a trigger for the change into procyclic forms. Troglitazone-treated cells grew notably better in transformation medium and this was getting even clearer after transferring them a second time into procyclic medium without supplement of glucose. Additionally the better transformation

of troglitazone-treated bloodstream forms into procyclic forms was supported by detection of VSG-loss during this process. This effect could also be observed after treatment with the other two thiazolidinediones, even though not as strong as in the case of troglitazone. Addition of PPAR γ antagonists like T0070907 (Lee *et al.*, 2002) or SR-202 (Rieusset *et al.*, 2002) could not prevent cells from transforming into procyclics. Together with inavailing results of *in silico* studies which revealed no protein or gene with significant homology to PPAR γ , this argues for a PPAR γ -independent mechanism of these substances in trypanosomes.

In order to characterize the mechanism triggered by troglitazone treatment on the level of gene expression, microarray analyses were performed. These investigations showed a higher amount of the ubiquitin-activating enzyme, ESAG 4 and 8, the mitochondrial precursor HSP60, the cytosolic HSP83 and various unknown proteins. Most obvious was the upregulation of ESAG 8, a member of the VSG-expression site and likely to be a regulatory protein involved in the differentiation process (Ross *et al.*, 1991; Pérez-Morga and Pays, 1999; Pays *et al.*, 2001).

As a result, troglitazone is able to induce a differentiation of bloodstream forms *in vitro*. Nevertheless, treated parasites couldn't reveal all characteristics of stumpy-forms because a cell cycle arrest was elusive. It stands to reason that troglitazone triggers the development of intermediate forms, which are not very well characterized so far, but exhibit a stumpy-like metabolism and therefore can easily transform into procyclics.

This way, the results could be a valuable help to find out the responsible mechanism of the differentiation process in bloodstream forms. Both, the regulation on transcriptional and on protein-level could serve as a starting point for further investigations to clarify the phenomenon of differentiation and the roles of intermediate and stumpy-forms.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alexandre, S., Paindavoine, P., Hanocq-Quertier, J., Paturiaux-Hanocq, F., Tebabi, P., Pays, E. (1996). Families of adenylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **77**, 173-182.

Bae, M. A., Rhee, H., Song, B. J. (2003). Troglitazone but not rosiglitazone induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human and rat hepatoma cell lines. *Toxicol Lett.* **139**, 67-75.

Becker, J., Delayre-Orthez, C., Frossard, N., Pons, F. (2006). Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol.* **20**, 429-447.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., et al. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416-422.

Bieger, B., Essen, L.O. (2001). Structural analysis of adenylate cyclases from *Trypanosoma brucei* in their monomeric state. *EMBO J.* **20**, 433-445.

Bienen, E. J., Hammadi, E., Hill, G.C. (1981). *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. *Exp Parasitol* **51**, 408-417.

Bienen, E. J., Saric, M., Pollakis, G., Grady, R. W., Clarkson A. B. Jr. (1991). Mitochondrial development in *Trypanosoma brucei brucei* transitional bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol.* **45**, 185-192.

Bitter, W., Gerrits, H., Kieft, R., Borst, P. (1998). The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature.* **391**, 499-502.

Blattner, J., Clayton, C. E. (1995). The 3'-untranslated regions from the *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase-encoding genes mediate developmental regulation. *Gene.* **162**, 153-156.

Blattner, J., Dorsam, H., Clatyon, C. E. (1995). Function of N-terminal import signals in trypanosome microbodies. *FEBS Lett.* **360**, 310-314.

Bodley , A. L., McGarry, M.W., Shapiro, T.A. (1995). Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and Leishmania species. *J Infect Dis.* **172**, 1157-1159.

Borst, P., Ulbert, S. (2001). Control of VSG gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol.* **114**, 17-27.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Breidbach, T., Ngazoa, E., Steverding, D. (2002). Trypanosoma brucei: in vitro slender-to-stumpy differentiation of culture-adapted, monomorphic bloodstream forms. *Exp Parasitol.* **101**, 223-230.

Brems, S., Guilbride, D.L., Gundlesdodjir-Planck, D., Busold, C., Luu, V.D., Schanne, M., Hoheisel, J., Clayton, C. (2005). The transcriptomes of Trypanosoma brucei Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* **139**, 163-172.

Brittingham, A., Miller, M. A., Donelson, J. E., Wilson, M. E. (2001). Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated Leishmania chagasi. *Mol Biochem Parasitol.* **112**, 51-59.

Bruce, D. (1895). Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zululand. *Bennett and David, Durban, South Africa.*

Bruce, D. (1903). Further report on sleepin sickness in Uganda. *Rep. Sleeping Sickness Comm. R. Soc.* **4**, 3-6.

Brun, R., Schonenberger, M. (1981). Stimulating effect of citrate and cis-Aconitate on the transformation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms to procyclic forms in vitro. *Z Parasitenkd.* **66**, 17-24.

Brun, R., Schumacher, R., Schmid, C., Kunz, C., Burri, C. (2001). The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Trop Med Int Health.* **6**, 906-914.

Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.* **24**, 136-141.

Campbell, D. A., Sturm, N. R., Yu, M. C. (2000). Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol Today.* **16**, 78-82.

Castillo, G., Brun, R. P., Rosenfield, J. K., Hauser, S., Park, C. W., Troy, A. E., Wright, M. E., Spiegelman, B. M. (1999). An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma. *EMBO J.* **18**, 3676-3687.

Chandoga, J., Petrovic, R. (2001). Peroxisomes--characteristics, biogenesis and regulation of peroxisomal genes. *Cas Lek Cesk.* **140**, 8-12.

Charest, H., Zhang, W. W., Matlashewski, G. (1996). The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem.* **271**, 17081-17090.

Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M., Tontonoz, P. (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* **7**, 161-171.

Cheron, A., Peltier, J., Perez, J., Bellocq, A., Fouqueray, B., Baud, L. (2004). 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits glucocorticoid binding and signaling in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent process. *J Immunol.* **172**, 7677-7683.

Clayton, C. E. (1987). Import of fructose bisphosphate aldolase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol.* **105**, 2649-2654.

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

Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T., Voncken, F. (2006). Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*. *Proteomics.* **6**, 3275-3293.

Colca, J. R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Leone, J.W., Lull, J.M., Bannow, C.A., Lund, E.T., Mathews, W.R. (2004). Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**, 252-260.

Cornelissen, A. W., Johnson, P. J., Kooter, J. M., Van der Ploeg, L. H., Borst, P. (1985). Two simultaneously active VSG gene transcription units in a single *Trypanosoma brucei* variant. *Cell.* **41**, 825-832.

Coughlin, B. C., Teixeira, S. M., Kirchhoff, L. V., Donelson, J. E. (2000). Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J Biol Chem.* **275**, 12051-12060.

Cross, G. A., Manning, J. C. (1973). Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology.* **67**, 315-331.

Cross, G. A. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology.* **71**, 393-417.

Dantonei, J. C., Quintin, S., Lakatos, L., Labouesse, M., Tora, L. (2000). TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Mol Cell.* **6**, 715-722.

Das, A., Bellofatto, V. (2003). RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 80-85.

De Walque, S., Kiel, J. A., Veenhuis, M., Opperdoes, F. R., Michels, P. A. (1999). Cloning and analysis of the PTS-1 receptor in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **104**, 106-119.

Diehl, S., Diehl, F., El-Sayed, N.M., Clayton, C., Hoheisel, J.D. (2002). Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Mol Biochem Parasitol.* **123**, 115-123.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Ullu, E. (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA.* **7**, 1522-1530.

Domenicali-Pfister, D., Burkard, G., Morand, S., Renggli, C.K., Roditi, I., Vassella, E. (2006). A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* **5**, 1126-1135.

Duszenko, M., Ferguson, M. A., Lamont, G. S., Rifkin, M. R., Cross, G. A. (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *J Exp Med.* **162**, 1256-1263.

Duszenko, M., Muhlstadt, K., Broder, A. (1992). Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol.* **50**, 269-273.

Duszenko, M. (1998). Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit. *Biol. in unserer Zeit* **28**, 72-81.

Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E. T., Welburn, S. C. (2006). Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol.* **22**, 536-542.

Dutton, J. E. (1902). Preliminary note on the trypanosomes occurring in the blood of man. *Br. Med. J.* **2**, 881.

Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science.* **130**, 432-437.

El-Sayed, N. M., Ghedin, E., Song, J., et al. (2003). The sequence and analysis of *Trypanosoma brucei* chromosome II. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4856-4863.

Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C. A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D. E., Berger, J. (1996). Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun.* **224**, 431-437.

Ellis, J., Sarkar, M., Hendriks, E., Matthews, K. (2004). A novel ERK-like, CRK-like protein kinase that modulates growth in *Trypanosoma brucei* via an autoregulatory C-terminal extension. *Mol Microbiol.* **53**, 1487-1499.

Ersfeld, K., Barraclough, H., Gull, K. (2005). Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol.* **61**, 742-757.

Eucker, J., Sterz, J., Krebbel, H., Zavrski, I., Kaiser, M., Zang, C., Heider, U., Jakob, C., Elstner, E., Sezer, O. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit proliferation and induce apoptosis in mantle cell lymphoma. *Anticancer Drugs.* **17**, 763-769.

Fajas, L., Fruchart, J. C., Auwerx, J. (1998). PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* **438**, 55-60.

Fantoni, A., Dare, A. O., Tschudi, C. (1994). RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol Cell Biol.* **14**, 2021-2028.

Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Neutzner, A., Hoheisel, J.D., Vingron, M. (2001). Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 10781-10786.

Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Hoheisel, J.D., Vingron, M. (2002). Microarray data warehouse allowing for inclusion of experiment annotations in statistical analysis. *Bioinformatics*. **18**, 423-433.

Ferguson, M. A., Cross, G. A. (1984). Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem*. **259**, 3011-3015.

Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N.L., Kubata, B.K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., Duszenko, M. (2005). Prostaglandin D(2) induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ* **12**, 335-346.

Figarella, K., Uzcategui, N.L., Beck, A., Schoenfeld, C., Kubata, B.K., Lang, F., Duszenko, M. (2006). Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ*. **13**, 1802-1814.

Flaspohler, J. A., Rickoll, W. L., Beverley, S. M., Parsons, M. (1997). Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes. *Mol Cell Biol*. **17**, 1093-1101.

Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812.

Freedman, L. P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*. **97**, 5-8.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? *Curr Biol*. **10**, R84-87.

Frohlich, E., Machicao, F., Wahl, R. (2005). Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture. *Endocr Relat Cancer*. **12**, 291-303.

Fuqua, C., Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**, 685-695.

Geiser, F., Luscher, A., de Koning, H.P., Seebeck, T., Maser, P. (2005). Molecular pharmacology of adenosine transport in *Trypanosoma brucei*: P1/P2 revisited. *Mol Pharmacol*. **68**, 589-595.

Giffin, B. F., McCann, P.P., Bitonti, A.J., Bacchi, C.J. (1986). Polyamine depletion following exposure to DL-alpha-difluoromethylornithine 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.

Gottesdiener, K., Chung, H. M., Brown, S. D., Lee, M. G., Van der Ploeg, L. H. (1991). Characterization of VSG gene expression site promoters and promoter-associated DNA rearrangement events. *Mol Cell Biol*. **11**, 2467-2480.

Green, H. P., Del Pilar Molina Portela, M., St Jean, E.N., Lugli, E.B., Raper, J. (2003). Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. *J Biol Chem*. **278**, 422-427.

Guillebault, D., Sasorith, S., Derelle, E., Wurtz, J. M., Lozano, J. C., Bingham, S., Tora, L., Moreau, H. (2002). A new class of transcription initiation factors, intermediate between TATA box-binding proteins (TBPs) and TBP-like factors (TLFs), is present in the marine unicellular organism, the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J Biol Chem*. **277**, 40881-40886.

Hall, N., Berriman, M., Lennard, N. J., et al. (2003). The DNA sequence of chromosome I of an African trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism. *Nucleic Acids Res*. **31**, 4864-4873.

Hamm, B., Schindler, A., Mecke, D., Duszenko, M. (1990). Differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. *Mol Biochem Parasitol.* **40**, 13-22.

Hammarton, T. C., Mottram, J.C., Doerig, C. (2003 A). The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res.* **5**, 91-101.

Hammarton, T. C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., Mottram, J.C. (2003 B). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem.* **278**, 22877-22886.

Hammarton, T. C., Engstler, M., Mottram, J.C. (2004). The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. *J Biol Chem.* **279**, 24757-24764.

Hannaert, V., Michels, P. A. (1994). Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr.* **26**, 205-212.

He, G., Sung, Y.M., Fischer, S.M. (2006). Troglitazone induction of COX-2 expression is dependent on ERK activation in keratinocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **74**, 193-197.

Hesse, F., Selzer, P.M., Muhlstadt, K., Duszenko, M. (1995). A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* **70**, 157-166.

Hihl, A. K., Michalik, L., Wahli, W. (2002). PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* **59**, 790-798.

Hirumi, H., Hirumi, K. (1989). Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol.* **75**, 985-989.

Hoek, M., Engstler, M., Cross, G.A. (2000). Expression-site-associated gene 8 (ESAG8) of *Trypanosoma brucei* is apparently essential and accumulates in the nucleolus. *J Cell Sci.* **113**, 3959-3968.

Hoek, M., Zanders, T., Cross, G.A. (2002). *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. *Mol Biochem Parasitol.* **120**, 269-283.

Hofmann, C., Lorenz, K., Williams, D., Palazuk, B. J., Colca, J. R. (1995). Insulin sensitization in diabetic rat liver by an antihyperglycemic agent. *Metabolism.* **44**, 384-389.

Horn, D. (2001). Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol.* **31**, 1157-1165.

Hotz, H. R., Hartmann, C., Huober, K., Hug, M., Clayton, C. (1997). Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3017-3026.

Hotz, H. R., Biebinger, S., Flaspohler, J., Clayton, C. (1998). PARP gene expression: control at many levels. *Mol Biochem Parasitol.* **91**, 131-143.

Hua, S. B., Wang, C.C. (1994). Differential accumulation of a protein kinase homolog in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biochem.* **54**, 20-31.

Hua, S. B., Wang, C.C. (1997). Interferon-gamma activation of a mitogen-activated protein kinase, KFR1, in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* **272**, 10797-10803.

Huang, J. W., Shiau, C.W., Yang, Y.T., Kulp, S.K., Chen, K.F., Brueggemeier, R.W., Shapiro, C.L., Chen, C.S. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin D1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* **67**, 1342-1348.

Icre, G., Wahli, W., Michalik, L. (2006). Functions of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and beta in skin homeostasis, epithelial repair, and morphogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **11**, 30-35.

Ilyin, G. P., Rialland, M., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C. (1999). Identification of a novel Skp2-like mammalian protein containing F-box and leucine-rich repeats. *FEBS Lett.* **459**, 75-79.

Jardim, A., Bergeson, S. E., Shih, S., Carter, N., Lucas, R. W., Merlin, G., Myler, P. J., Stuart, K., Ullman, B. (1999). Xanthine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular cloning, biochemical characterization, and genetic analysis. *J Biol Chem.* **274**, 34403-34410.

Kato, M., Kusumi, T., Tsuchida, S., Tanaka, M., Sasaki, M., Kudo, H. (2004). Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 73-79.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 2160-2164.

Kliwer, S. A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819.

Krazy, H., Michels, P. A. (2006). Identification and characterization of three peroxins--PEX6, PEX10 and PEX12--involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta.* **1763**, 6-17.

Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., Hayaishi, O. (2000). Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med.* **192**, 1327-1338.

Kurtz, T. W., Gardner, D. G. (1998). Transcription-modulating drugs: a new frontier in the treatment of essential hypertension. *Hypertension*. **32**, 380-386.

Lamont, G. S., Tucker, R. S., Cross, G. A. (1986). Analysis of antigen switching rates in *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. **92**, 355-367.

Landfear, S. M. (2003). Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7-9.

Lanteri, C., Stewart, M., Brock, J., Alibu, V. P., Meshnick, S., Tidwell, R. R., Barrett, M. P. (2006). Roles for the *Trypanosoma brucei* P2 transporter in DB75 uptake and resistance. *Mol Pharmacol*. **70**, 1585-1592.

Le Ray, D., Barry, J. D., Easton, C., Vickerman, K. (1977). First tsetse fly transmission of the "AnTat" serodeme of *Trypanosoma brucei*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* **57**, 369-381.

Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., Chen, J.L., Li, Y. (2002). T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem*. **277**, 19649-19657.

Lee, K. S., Park, J. H., Lee, S., Lim, H. J., Jang, Y., Park, H. Y. (2006). Troglitazone inhibits endothelial cell proliferation through suppression of casein kinase 2 activity. *Biochem Biophys Res Commun*. **346**, 83-88.

Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*. **270**, 12953-12956.

Lemley, C., Yan, S., Dole, V.S., Madhubala, R., Cunningham, M.L., Beverley, S.M., Myler, P.J., Stuart, K.D. (1999). The *Leishmania donovani* LD1 locus gene ORFG encodes a biopterin transporter (BT1). *Mol Biochem Parasitol*. **104**, 93-105.

Li, M., Lee, T. W., Yim, A. P., Mok, T. S., Chen, G. G. (2006). Apoptosis induced by troglitazone is both peroxisome proliferator-activated receptor-gamma- and ERK-dependent in human non-small lung cancer cells. *J Cell Physiol.* **209**, 428-438.

Lips, S., Geuskens, M., Paturiaux-Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Pays, E. (1996). The esag 8 gene of *Trypanosoma brucei* encodes a nuclear protein. *Mol Biochem Parasitol.* **79**, 113-117.

Liu, A. Y., Van der Ploeg, L. H., Rijsewijk, F. A., Borst, P. (1983). The transposition unit of variant surface glycoprotein gene 118 of *Trypanosoma brucei*. Presence of repeated elements at its border and absence of promoter-associated sequences. *J Mol Biol.* **167**, 57-75.

Liu, J. J., Liu, P. Q., Lin, D. J., Xiao, R. Z., Huang, M., Li, X. D., He, Y., Huang, R. W. (2006). Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Ann Hematol* **86**, 173-183.

Lohrer, H., Krauth-Siegel, R.L (1990). Purification and characterization of lipamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* **194**, 863-869.

Lorenz, P., Maier, A. G., Baumgart, E., Erdmann, R., Clayton, C. (1998). Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. *EMBO J.* **17**, 3542-3555.

Luo, H., Gilinger, G., Mukherjee, D., Bellofatto, V. (1999). Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element. *J Biol Chem.* **274**, 31947-31954.

Lutz, T. (2003). Assemblierung metallbindender Proteine im Intermembranraum und in der Matrix von Mitochondrien. Diss. **23**, (2.4.3.3).

Matthews, K. R., Gull, K. (1994). Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today.* **10**, 473-476.

Matthews, K. R. (1999). Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*. **15**, 76-80.

McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Kronen, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* **12**, 3357-3368.

Mehlhorn, H., Piekarski, G. (1998). Grundriß der Parasitenkunde. *Gustav Fischer Verlag* **5. Auflage**, 33-59.

Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N. S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J. M., Kaya, G., Gonzalez, F. J., Zakany, J., Metzger, D., Chambon, P., Duboule, D., Wahli, W. (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol.* **154**, 799-814.

Michelotti, E. F., Hajduk, S. L. (1987). Developmental regulation of trypanosome mitochondrial gene expression. *J Biol Chem* **262**, 927-932.

Michelotti, E. F., Harris, M.E., Adler, B., Torri, A.F., Hajduk, S.L. (1992). *Trypanosoma brucei* mitochondrial ribosomal RNA synthesis, processing and developmentally regulated expression. *Mol Biochem Parasitol.* **54**, 31-41.

Ming, M., Yu, J.P., Meng, X.Z., Zhou, Y.H., Yu, H.G., Luo, H.S. (2006). Effect of ligand troglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and cellular growth in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* **12**, 7263-7270.

Mitchell, P., Tollervey, D. (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev.* **10**, 193-198.

Monneret, G., Li, H., Vasilescu, J., Rokach, J., Powell, W.S. (2002). 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandins D2 and J2 are potent activators of human eosinophils. *J Immunol.* **168**, 3563-3569.

Morgan, G. W., Hall, B.S., Denny, P.W., Carrington, M., Field, M.C. (2002). The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol.* **18**, 491-496.

Morgan, G. W., Hall, B.S., Denny, P.W., Field, M.C., Carrington, M. (2002). The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends Parasitol.* **18**, 540-546.

Mottram, J. C., Smith, G. (1995). A family of trypanosome cdc2-related protein kinases. *Gene.* **162**, 147-152.

Muller, I. B., Domenicali-Pfister, D., Roditi, I., Vassella, E. (2002). Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biol Cell.* **13**, 3787-3799.

Murata, Y., Wharton, R.P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell.* **80**, 747-756.

Mutomba, M. C., Wang, C.C. (1998). The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Mol Biochem Parasitol.* **93**, 11-22.

Myler, P. J., Lodes, M.J., Merlin, G., de Vos, T., Stuart, K.D. (1994). An amplified DNA element in *Leishmania* encodes potential integral membrane and nucleotide-binding proteins. *Mol Biochem Parasitol.* **66**, 11-20.

Nadeau, K., Sullivan, M.A., Bradley, M., Engman, D.M., Walsh, C.T. (1992). 83-kilodalton heat shock proteins of trypanosomes are potent peptide-stimulated ATPases. *Protein Sci.* **1**, 970-979.

Nadeau, K., Das, A., Walsh, C.T. (1993). Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem.* **268**, 1479-1487.

Nagy, L., Tontono, P., Alvarez, J. G., Chen, H., Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. **93**, 229-240.

Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E., Tschudi, C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Mol Cell Biol*. **14**, 6736-3742.

Nakaar, V., Tschudi, C., Ullu, E., (1995). An unusual liaison: small nuclear and cytoplasmic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa. *Parasitol Today*. **11**, 225-228.

Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E., Tschudi, C. (1997). Structure of the Trypanosoma brucei U6 snRNA gene promoter. *Mol Biochem Parasitol*. **88**, 13-23.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. **79**, 1193-1226.

Naula, C., Parsons, M., Mottram, J.C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. *Biochim Biophys Acta*. **1754**, 151-159.

Nolan, J. J., Ludvik, B., Beerdsen, P., Joyce, M., Olefsky, J. (1994). Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med*. **331**, 1188-1193.

Nolan, D. P., Geuskens, M., Pays, E. (1999). N-linked glycans containing linear poly-N-acetyllactosamine as sorting signals in endocytosis in Trypanosoma brucei. *Curr Biol*. **9**, 1169-1172.

Nolan, D. P., Rolin, S., Rodriguez, J. R., Van Den Abbeele, J., Pays, E. (2000). Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *Eur J Biochem*. **267**, 18-27.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. **87**, 953-959.

Oli, M. W., Cotlin, L.F., Shiflett, A.M., Hajduk, S.L. (2006). Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. **5**, 132-139.

Opperdoes, F. R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*. **41**, 127-151.

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.

Padilla, J., Kaur, K., Cao, H. J., Smith, T. J., Phipps, R. P. (2000). Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* **165**, 6941-6948.

Pagano, M. (1997). Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J*. **11**, 1067-1075.

Paindavoine, P., Rolin, S., Van Assel, S., Geuskens, M., Jauniaux, J.C., Dinsart, C., Huet, G., Pays, E. (1992). A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. **12**, 1218-1225.

Palenchar, J. B., Liu, W., Palenchar, P. M., Bellofatto, V. (2006). A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot Cell*. **5**, 293-300.

Pandhare, J., Cooper, S.K., Phang, J.M. (2006). Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone: Evidence for both PPARgamma -dependent and independent mechanisms. *J Biol Chem*. **281**, 2044-2052.

Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., Kessler, P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **115**, 19-28.

Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol.* **53**, 717-724.

Patton, E. E., Willems, A.R., Tyers, M. (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends Genet.* **14**, 236-243.

Pays, E., Rolin, S., Magez, S. (1996). Cell signalling in trypanosomatids. In: Hide, G., Mottram, J. C., Coombs, G. H., Holmes, P. H., editors. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control.* Oxford: British Society for Parasitology/ CAB International., 199-225.

Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L., Perez-Morga, D. (2001). The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Mol Biochem Parasitol.* **114**, 1-16.

Penketh, P. G., Divo, A.A., Shyam, K., Patton, C.L., Sartorelli, A.C. (1991). The effects 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.

Pentreath, V. W., Rees, K., Owolabi, O. A., Philip, K. A., Doua, F. (1990). The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **84**, 795-799.

Perez-Morga, D., Pays, E. (1999). A protein linked to mitochondrion development in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **101**, 161-172.

Priest, J. W., Hajduk, S. L. (1994). Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Bioenerg Biomembr.* **26**, 179-191.

Priest, J. W., Hajduk, S.L. (1996). In vitro import of the Rieske iron-sulfur protein by trypanosome mitochondria. *J Biol Chem.* **271**, 20060-20069.

Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., Spiegelman, B. M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* **286**, 1368-1371.

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.

Revelard, P., Lips, S., Pays, E. (1990). A gene from the VSG expression site of *Trypanosoma brucei* encodes a protein with both leucine-rich repeats and a putative zinc finger. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7299-7303.

Rickman, L. R., Robson, J. (1970). The blood incubation infectivity tests: a simple test which may serve to distinguish *Trypanosoma brucei* from *T. rhodesiense*. *Bull. W. H. O.* **42**, 650-651.

Rieusset, J., Touri, F., Michalik, L., Escher, P., Desvergne, B., Niesor, E., Wahli, W. (2002). A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol.* **16**, 2628-2644.

Rifkin, M. R. (1978). Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3450-3454.

Rigden, D. J., Herman, M., Gillies, S., Michels, P. A. (2005). Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans.* **33**, 972-974.

Robinson, K. M., von Kieckebusch-Guck, A., Lemire, B.D. (1991). Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant disrupted for the succinate dehydrogenase flavoprotein subunit. *J Biol Chem.* **266**, 21347-21350.

Robinson, D. R., Gull, K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature*. **352**, 731-733.

Ross, D. T., Raibaud, A., Florent, I.C., Sather, S., Gross, M.K., Storm, D.R., Eisen, H. (1991). The trypanosome VSG expression site encodes adenylate cyclase and a leucine-rich putative regulatory gene. *EMBO J.* **10**, 2047-2053.

Roth, M., Black, J. L. (2006). Transcription factors in asthma: are transcription factors a new target for asthma therapy? *Curr Drug Targets*. **7**, 589-595.

Ruan, J. P., Arhin, G. K., Ullu, E., Tschudi, C. (2004). Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol.* **24**, 9610-9618.

Salmon, D., Geuskens, M., Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Nolan, D., Ruben, L., Pays, E. (1994). A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. *Cell*. **78**, 75-86.

Savill, N. J., Seed, J. R. (2004). Mathematical and statistical analysis of the *Trypanosoma brucei* slender to stumpy transition. *Parasitology* **128**, 53-67.

Schimanski, B., Laufer, G., Gontcharova, L., Gunzl, A. (2004). The *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA and rRNA gene promoters have interchangeable TbSNAP50-binding elements. *Nucleic Acids Res.* **32**, 700-709.

Schimanski, B., Nguyen, T. N., Gunzl, A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* **25**, 7303-7313.

Schimanski, B., Brandenburg, J., Nguyen, T. N., Caimano, M. J., Gunzl, A. (2006). A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1676-1684.

Seed, J. R., Black, S. J. (1997). A proposed density-dependent model of long slender to short stumpy transformation in the African Trypanosomes. *J Parasitol.* **83**, 656-662.

Shader, K., te Vrugte, D., Rudenko, G. (2004). Bloodstream form-specific up-regulation of silent vsg expression sites and procyclin in *Trypanosoma brucei* after inhibition of DNA synthesis or DNA damage. *J Biol Chem.* **279**, 13363-13374.

Shearer, B. G., Hoekstra, W.J. (2002). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Choreographers of Metabolic Gene Transcription. *Celltransmissions* **18**, 3-10.

Shiau, C. W., Yang, C.C., Kulp, S.K., Chen, K.F., Chen, C.S., Huang, J.W., Chen, C.S. (2005). Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res.* **65**, 1561-1569.

Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K. (2002). 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem.* **277**, 10459-10466.

Shimada, M., Nakadai, T., Tamura, T. A. (2003). TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF) negatively regulates cell cycle progression and is required for the stress-mediated G(2) checkpoint. *Mol Cell Biol.* **23**, 4107-4120.

Solbach, W., Forberg, K., Rollinghoff, M. (1986). Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in *Leishmania major*-infected, genetically susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* **54**, 909-912.

Sommer, J. M., Cheng, Q. L., Keller, G. A., Wang, C. C. (1992). In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutational analysis of the C-terminal targeting signal. *Mol Biol Cell* **3**, 749-759.

Stephens, J. W. W., Fantham, H. B. (1910). On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **4**, 343-350.

Steverding, D., Stierhof, Y.D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickingher, 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.

Stojdl, D. F., Clarke, M.W. (1996). *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol.* **83**, 134-146.

Sturm, N. R., Yu, M. C., Campbell, D. A. (1999). Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. *Mol Cell Biol.* **19**, 1595-1604.

Suter, S. L., Nolan, J. J., Wallace, P., Gumbiner, B., Olefsky, J. M. (1992). Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care.* **15**, 193-203.

Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* **79**, 1147-1156.

Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B.M., Sarraf, P., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Brun, R.P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., Evans, R.M., Spiegelman, B.M. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 237-241.

Tugwood, J. D., Issemann, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L., Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* **11**, 433-439.

Turturro, F., Oliver, R. 3rd, Friday, E., Nissim, I., Welbourne, T. (2007). Troglitazone and pioglitazone interactions via PPAR- γ -independent and -dependent pathways in regulating physiological responses in renal tubule-derived cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**, C1137-1146.

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 Biol Sci.* **264**, 1481-1490.

Tyler, K. M. (2003). Maintenance of parasitaemia - is it to die for? *Kinetoplastid Biol Dis.* **2**, 2.

Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Hotamisligil, G. S. (1998). Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology.* **139**, 4832-4838.

Van Hellemond, J. J., Neuville, P., Schwarz, R.T., Matthews, K.R., Mottram, J.C. (2000). Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *J Biol Chem.* **275**, 8815-8823.

Vanhamme, L., Poelvoorde, P., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Pays, E. (2000). Differential RNA elongation controls the variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* **36**, 328-340.

Varley, C. L., Stahlschmidt, J., Lee, W.C., Holder, J., Diggle, C., Selby, P.J., Trejdosiewicz, L.K., Southgate, J. (2004). Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J Cell Sci* **117**, 2029-2036.

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.

Veenstra, G. J., Weeks, D. L., Wolffe, A. P. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science.* **290**, 2312-2315.

Vercest, A. E., Grijalba, M. T., Docampo, R. (1997). Inhibition of Ca²⁺ release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J.* **328**, 479-482.

Vickerman, K. (1965). Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature*. **208**, 762-766.

Visick, K. L., Fuqua, C. (2005). Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. *J Bacteriol*. **187**, 5507-5519.

Wang, Y. L., Frauwirth, K. A., Rangwala, S. M., Lazar, M. A., Thompson, C. B. (2002). Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival. *J Biol Chem* **277**, 31781-31788.

Way, J. M., Harrington, W. W., Brown, K. K., Gottschalk, W. K., Sundseth, S. S., Mansfield, T. A., Ramachandran, R. K., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (2001). Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*. **142**, 1269-1277.

Wen, L. M., Xu, P., Benegal, G., Carvalho, M. R., Buck, G. A. (2000). PPB1, a putative spliced leader RNA gene transcription factor in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. **110**, 207-221.

Weng, J. R., Chen, C.Y., Pinzone, J.J., Ringel, M.D., Chen, C.S. (2006). Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocr Relat Cancer*. **13**, 401-413.

Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D., Henke, B. R. (2000). The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*. **43**, 527-550.

Willson, T. M., Lambert, M. H., Kliewer, S. A. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* **70**, 341-367.

Woodward, R., Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **95**, 49-57.

Xong, H. V., Vanhamme, L., Chamekh, M., Chimfwembe, C.E., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Van Meirvenne, N., Hamers, R., De Baetselier, P., Pays, E. (1998). A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*. **95**, 839-846.

Young, P. W., Buckle, D.R., Cantello, B.C., Chapman, H., Clapham, J.C., Coyle, P.J., Haigh, D., Hindley, R.M., Holder, J.C., Kallender, H., Latter, A.J., Lawrie, K.W., Mossakowska, D., Murphy, G.J., Roxbee Cox, L., Smith, S.A. (1998). Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *J Pharmacol Exp Ther*. **284**, 751-759.

Yu, C., Chen, L., Luo, H., Chen, J., Cheng, F., Gui, C., Zhang, R., Shen, J., Chen, K., Jiang, H., Shen, X. (2004). Binding analyses between Human PPARgamma-LBD and ligands. *Eur J Biochem*. **271**, 386-397.

Zhang, D., Penttila, T. L., Morris, P. L., Teichmann, M., Roeder, R. G. (2001). Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene. *Science*. **292**, 1153-1155.

Zhou, Y., Wang, D., Li, F., Shi, J., Song, J. (2006). Different roles of protein kinase C-betaI and -delta in the regulation of adipocyte differentiation. *Int J Biochem Cell Biol*. **38**, 2151-2163.

AKADEMISCHE LEHRER

Biochemie:	Prof. M. Duszenko
Chemie:	Prof. E. Lindner
Mathematik:	Dr. H. Pommer
Pharmakologie:	Prof. G. Drews Prof. H.P.T. Ammon Dr. H. Safayhi
Pharmazeutische Analytik:	Prof. K.A. Kovar Dr. C. Beyer
Pharmazeutische Biochemie:	Prof. J.E. Schulz
Pharmazeutische Biologie:	Dr. E. Mechler Prof. L. Heide
Pharmazeutische Chemie:	Prof. S. Laufer Dr. W. Zimmermann
Pharmazeutische Technologie:	Prof. P.C. Schmidt Prof. K. Wagner Prof. M.A. Wahl
Physikalische Chemie:	Prof. G. Gauglitz
Terminologie:	Prof. A. Wankmüller

CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben:

Name, Vorname: Denninger, Viola

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 06. Januar 1978 in Aalen (Baden-Württemberg)

Familienstand: ledig

Schule und Studium:

Grundschule: 1984-1986 Grundschule Dillweißenstein
1986-1988 Grundschule Neuenbürg

Weiterführende Schule: 1988-1997 Gymnasium Neuenbürg

Allgemeine Hochschulreife: Abitur am 20. Juni 1997

Universitätsstudium: Oktober 1997- September 2001
Pharmaziestudium an der Universität Tübingen

Praktisches Jahr: November 2001 – März 2002
Galenical Department von Byk Gulden in Singen
(Seit 2002: Altana Pharma AG
Seit 2007: Nycomed)

April 2002 – Oktober 2002
Schönbuch-Apotheke in Tübingen

Examina: 1. Examen: 17. März 2000
2. Examen: 27. September 2001
3. Examen: 10. Dezember 2002
Approbation als Apothekerin: 11. Dezember 2002

Doktorarbeit: Januar 2003 – September 2007
Am Interfakultären Institut für Biochemie,
Universität Tübingen
Titel: „Effekte von Troglitazon und anderen
Thiazolidindionen auf die Blutform von
Trypanosoma brucei – Induktion der
Differenzierung von *slender*-Formen“
Betreuer: Prof. Dr. Micheal Duszenko

Sonstige Aktivitäten:

Praktikumsbetreuung: SS 2003 – SS 2007
Betreuung des Praktikums „Biochemie für
Mediziner“ – Teil „Molekularbiologie II“

Arbeitserfahrung: 2003 - 2007
als Apothekerin in der
„Apotheke an der Friedrichstrasse“ in Tübingen

Stipendien: Reisestipendium von GlaxoSmithKline 2005
(Kongress in Woods Hole vom 12.-15.04.2005)

Kongresse:

Posterpräsentation: “The effect of troglitazone in *Trypanosoma brucei*“, 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Würzburg, Deutschland, 17.-20.03.2004

Posterpräsentation: “Induction of differentiation in kinetoplastids by thiazolidinediones“, First Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting, Woods Hole, Massachusetts, USA, 12.-15.04.2005

Vortrag: “New insights into troglitazone-induced differentiation in *Trypanosoma brucei*“, 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Wien, Österreich, 22.-25.02.2006

Vortrag: “Life cycle interference as a therapeutical approach“, 8. Drug Design and Development Seminar, Tübingen, Deutschland, 19.-20.04.2007

Publikationen:

1. **Denninger, V.**, Figarella, K., Schönfeld, C., Brems, S., Busold, C., Lang, F., Hoheisel, J., Duszenko, M. (2007). Troglitazone induces differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Exp. Cell Research* **313**, 1805-1819.

2. Uzcátegui, N. L., Carmona-Gutiérrez, D., **Denninger, V.**, Schönfeld, C., Lang, F., Figarella, K., Duszenko, M. (2007). Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: Cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Epub ahead of print].

3. Uzcátegui, N. L., **Denninger, V.**, Merkel, P., Schönfeld, C., Figarella, K., Duszenko, M. (2007). Dihydroxyacetone Induces Autophagy in African Trypanosomes. *Autophagy*. [Epub ahead of print].

4. Figarella, K., Uzcátegui, N.L., **Denninger, V.**, Welburn, S., Duszenko, M. (2007). Programmed Cell Death in African Trypanosomes. *In: Programmed Cell Death: From Protozoan Diseases to Human Cancers. Editor: José Manuel Pérez Martín. In press.*

5. **Denninger, V.**, Figarella, K., Kubata, B., Duszenko, M. (2007). Differentiation and apoptosis in the sleeping sickness inducing parasite *Trypanosoma brucei*. *In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Editor: A. Méndez-Vilas. In press.*

6. Uzcátegui, N. L., Bassarak, B., Muhammad, K., Schönfeld, C., **Denninger, V.**, Figarella, K., Duszenko, M. (2007). Looking for new strategies: Aquaporins of Trypanosomes as a vehicle for drug delivery. *In: Protein Structure - Function Relationship. Editor: Abbasi A. & Ali S.A. International Center for Chemical Sciences, Karachi (Pakistan). In press.*