

Untersuchungen zur Autophagie bei
Trypanosomen unter besonderer
Berücksichtigung von
autophagierelevanten Proteinen und
deren *in vivo*-Kristallbildung

D I S S E R T A T I O N

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von

Rudolf Koopmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2010
Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1.Berichterstatter: Prof. Dr. M. Duszenko
2.Berichterstatter: Prof. Dr. T. Stehle

Luftveränderung

Fahre mit der Eisenbahn,
fahre, Junge, fahre,
Auf dem Deck vom Wasserkahn
wehen deine Haare.

Tauch in fremde Städte ein,
lauf in fremden Gassen;
höre fremde Menschen schreien,
trink aus fremden Tassen.

Flieh Betrieb und Telefon,
grab in alten Schmöckern,
sieh am Seinekai, mein Sohn,
Weisheit still verhökern.

Lauf in Afrika umher,
reite durch Oasen;
lausche auf ein blaues Meer,
hör den Mistral blasen!

Wie du auch die Welt durchflitzt
ohne Rast und Ruh-:
Hinten auf dem Puffer sitzt
du.

Kurt Tucholsky, 1924

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt und durch ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg unterstützt, wofür ich sehr dankbar bin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko für die Betreuung dieser Arbeit, die ausgezeichnete Unterstützung und große Bereitschaft Ideen nachzugehen, sowie für das gute Arbeitsklima im Labor.

Herrn Prof. Dr. Thilo Stehle danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ferner möchte ich den zahlreichen Kooperationspartnern (s. Anhang) für die Möglichkeit danken diese Arbeit in verschiedene Richtungen weiterzuentwickeln.

Der gesamten Arbeitsgruppe Duszenko möchte ich meinen großen Dank aussprechen für die exzellente Unterstützung und Hilfsbereitschaft von jedem, den guten freundschaftlichen Umgang miteinander und die nette Zeit neben dem Laboralltag.

Für die tolle Unterstützung und Motivation in schwierigen Phasen und für viele schöne Momente jenseits der Arbeit möchte ich Katrin Schwarz einen großen Dank aussprechen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich stets nach allen Möglichkeiten in meinen Plänen bestärkt und unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Trypanosomen und Schlafkrankheit	1
1.1.1 Die Schlafkrankheit	4
1.1.1.1 Infektionsverlauf und Krankheitsbild	4
1.1.1.2 Therapie	5
1.1.2 Biologie der Trypanosomen	6
1.1.2.1 Morphologie von <i>Trypanosoma spp.</i>	6
1.1.2.2 Entwicklungszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	8
1.1.3 Biochemische Besonderheiten von Trypanosomen	11
1.1.3.1 Antigenvariation	11
1.1.3.2 Das Genom der Trypanosomen	13
1.1.3.3 Besonderheiten des Glucosestoffwechsel: Glycosomen	14
1.2 Autophagie bei Trypanosomen	14
1.2.1 ATG8 bei <i>Trypanosoma brucei</i>	17
1.3 Cysteinproteasen und Trypanosomen	18
1.3.1 TbCatB - Cathepsin B-like protein in <i>T.brucei</i>	19
1.3.1.1 Charakterisierung	19
1.3.1.2 Sequenzhomologie	20
1.3.1.3 Struktur und Katalysemechanismus	22
1.3.1.4 Inhibitoren	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Bakterien	31
2.1.2 Insektenzellen	31

2.1.3	Antikörper	31
2.1.4	Chemikalien	32
2.1.5	Enzyme	34
2.1.5.1	Restriktionsenzyme	34
2.1.5.2	Sonstige Enzyme	34
2.1.6	Plasmide	34
2.1.7	Primer	35
2.1.8	Kits	36
2.1.9	Medien	37
2.1.9.1	Insektenzellen	37
2.1.9.2	Bakterien	37
2.1.10	Puffer und Lösungen	38
2.1.10.1	Gelelektrophorese	38
2.1.10.2	Proteine	38
2.1.10.3	Puffer für die Ni-NTA-Affinitätsreinigung	39
2.1.10.4	Puffer für SDS-PAGE-Gele	40
2.1.10.5	Western Blot	41
2.1.10.6	Elektronenmikroskopie	42
2.1.10.7	Sonstige Lösungen	42
2.1.11	Sonstige Materialien	43
2.2	Methoden	43
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.1.1	Reverse Transkription	43
2.2.1.2	Polymerasekettenreaktion	43
2.2.1.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	44
2.2.1.4	Gelextraktion	45
2.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	45
2.2.1.6	Restriktionsverdau	45
2.2.1.7	Minipräparation von Plasmid-DNA	45
2.2.1.8	Miniprep-Protokoll für Bacmid-DNA	46
2.2.1.9	Dephosphorylierung	46
2.2.1.10	Ligation	47
2.2.1.11	Transformation	47
2.2.1.12	Kolonie-PCR-Test	47

2.2.1.13	Anlegen von Kulturstabilaten <i>E.coli</i>	48
2.2.1.14	DNA-Sequenzierung	48
2.2.2	Kultivierung von Organismen	48
2.2.2.1	Bakterienzellkultur	48
2.2.3	Insektenzellkultur	49
2.2.3.1	Auftauen der Zellen	49
2.2.3.2	Kultivierung von Monolayerkulturen	49
2.2.3.3	Kultivierung von Suspensionskulturen	50
2.2.3.4	Herstellung von Stabilaten	50
2.2.3.5	Transformation in DH10Bac Zellen	50
2.2.3.6	Transfektion	51
2.2.3.7	Bestimmung des Virus-Titers nach der Ausverdün- nungsmethode	51
2.2.3.8	TEM-Einbettung	53
2.2.3.9	Raster-EM-Einbettung	53
2.2.3.10	Immun-EM-Einbettung	54
2.2.4	Allgemeine proteinchemische Methoden	54
2.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	54
2.2.4.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	55
2.2.4.3	SDS-PAGE	55
2.2.4.4	Coomassie-Färbung	55
2.2.4.5	Silberfärbung	55
2.2.4.6	Trocknung des Gels	56
2.2.4.7	Western Blot	56
2.2.5	TbATG8 in <i>E.coli</i>	57
2.2.5.1	Expression	57
2.2.5.2	Affinitätschromatographie	57
2.2.5.3	Abspaltung des His-tags	57
2.2.5.4	Kristallisierung	58
2.2.6	TbCatB in Sf9	58
2.2.6.1	Isolierung und Resolubilisierung der <i>in vivo</i> -Kristalle	58
2.2.6.2	Deglykosylierung	59
2.2.6.3	Tunicamycin-Behandlung	59
2.2.6.4	Rekristallisierung	59
2.2.6.5	Affinitätschromatographie mit TbCatB-His	60

2.2.6.6	Cathepsin B Aktivitätsassay	60
3	Ergebnisse	61
3.1	Strukturaufklärung von TbATG8	61
3.1.1	Klonierung	61
3.1.2	Expression und Aufreinigung	62
3.1.3	Kristallisierung und Datenanalyse	64
3.1.4	Molekularer Ersatz	64
3.1.5	Eigenschaften der Struktur von TbATG8	66
3.1.6	Interaktion von TbATG8 mit ATG4	67
3.2	Expression von TbCatB unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle und Bestimmung der Struktur	69
3.2.1	Expression von TbCatB als Preproform unter Bildung von „in vivo“-Kristallen	69
3.2.1.1	PCR	69
3.2.1.2	Ligation und Transformation	70
3.2.1.3	Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA	70
3.2.1.4	Transfektion in Sf9 Zellen	71
3.2.1.5	Auftreten von kristallartigen Strukturen während der Expression	71
3.2.1.6	Rasterelektronen-Mikroskopie	72
3.2.1.7	Transmissionselektronen-Mikroskopie	74
3.2.1.8	Isolierung und Solubilisierung der Kristalle	79
3.2.1.9	Analyse über SDS-Page und Western Blot	79
3.2.1.10	Massenspektrometrische Bestimmung	81
3.2.1.11	Bestimmung der Aktivität des resolubilisierten TbCatB	81
3.2.1.12	Deglykosylierung	82
3.2.2	Expression von TbCatB in modifizierter Form	83
3.2.2.1	Expression von TbCatB mit N-terminalem His-tag	83
3.2.2.2	Expression mit C-terminalem His-tag und gp64 Si- gnalpeptid	84
3.2.3	Strukturaufklärung von TbCatB	88
3.2.3.1	Diffractionsexperimente mit <i>in vivo</i> -Kristallen	88
3.2.3.2	Rekristallisierung von TbCatB	88
3.2.3.3	Proteinstruktur von TbCatB	89

3.3	Expression von TbIMPDH unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle in Insektenzellen	92
3.3.1	Klonierung	92
3.3.2	Auftreten von kristallartigen Strukturen	93
3.3.3	Analyse über SDS-Page und Western Blot	93
3.3.4	Massenspektrometrische Bestimmung	94
3.3.5	Deglykosylierung	95
3.3.6	Untersuchungen durch Elektronenmikroskopie	95
3.3.6.1	Rasterelektronen-Mikroskopie	95
3.3.6.2	Transmissionselektronen-Mikroskopie	96
3.3.6.3	Immunelektronenmikroskopie	100
4	Diskussion	101
4.1	Strukturaufklärung von TbATG8	101
4.2	Expression von TbCatB unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle	104
4.2.1	Charakterisierung der <i>in vivo</i> -Kristalle	104
4.2.2	Mögliche Ursachen der <i>in vivo</i> Kristallbildung in Insektenzellen	107
4.2.3	Struktur von TbCatB	109
4.2.4	Ausblick	110
4.3	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis	115
	Kooperationspartner	129

Abkürzungsverzeichnis

AIM	ATG8-family interaction motif
ATG	autophagy-related
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	base pair
C-terminus	Carboxy-terminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FAO	Food and Agriculture Organization
FEL	Freie-Elektronen-Laser
HCL	Salzsäure
His	Histidine
IEM	Immunelektronenmikroskopie
IgG	Immunglobulin G
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
kDa	kilo dalton
LB	Luria-Bertani
LC3	microtubule-associated light chain 3 protein
LM	Lichtmikroskop
MCS	multiple cloning site
ML	Monolayer
MVB	multivesicular bodies

N-terminus	Amino-terminus
NaOH	Natriumhydroxid
Ni-NTA	Nickel Nitrilotriacetic acid
NP40	Nonidet P40
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin
pi	post infection
PNGase F	Peptid N-Glycosidase F
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TbCatB	Cathepsin B-like protein in T.brucei
TCA	Trichloressigsäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Schlafkrankheit, ausgelöst durch die einzelligen eukaryotischen Trypanosomen, stellt nach wie vor ein großes Problem für die Menschen und Nutztiere des heutigen Afrika dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2006) sind über 60 Millionen Menschen in 36 Ländern südlich der Sahara direkt bedroht und man geht von 50.000 bis 70.000 neuer Fälle pro Jahr aus.

Eine effektive Therapie der Schlafkrankheit ist bis dato nicht möglich. Die aktuelle medikamentöse Behandlung basiert auf veralteten Medikamenten mit hoher Toxizität und zeigt eine mangelhafte Wirksamkeit gegen die Erreger nach dem Übertritt ins Zentrale Nervensystem (ZNS). Da für die Pharmakonzerne die Bekämpfung der Schlafkrankheit wirtschaftlich nicht interessant ist, findet ein Großteil der Forschung im akademischen Bereich statt, wo die Mittel allerdings bei weitem nicht ausreichen. Man geht davon aus, dass weltweit nur 10% des Forschungsaufwandes in die Erforschung von Krankheiten investiert wird, die 90% der globalen Krankheitslast ausmachen (Médecins Sans Frontières (MSF, 2005). Die Schlafkrankheit ist damit eine der wichtigsten Erkrankungen in der Gruppe der vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*).

Die Entwicklung neuer, effektiver und bezahlbarer Medikamente ist dringend erforderlich, nicht nur in Hinblick auf die betroffenen Menschen sondern auch als Beitrag zur nachhaltigen Verbesserung der sozialen und wirtschaftlichen Bedingungen in den Entwicklungsländern.

1.1 Trypanosomen und Schlafkrankheit

Die afrikanische humane Trypanosomiasis, auch Schlafkrankheit genannt, wird durch Trypanosomen, einzellige parasitisch lebende Eukaryonten ausgelöst. Diese geißeltragenden Protozoen (Flagellaten) kommen weltweit in Wirbeltieren, Arthropo-

den und Pflanzen vor. Sie gehören zur Ordnung der *Kinetoplastida* und verdanken ihren Namen „trypanosoma“ (Bohrkörper) den „bohrenden“ Drehbewegungen bei der Vorwärtsbewegung. Aufgrund der sehr frühen Abspaltung von der allgemeinen Eukaryonten-Entwicklung weisen die Trypanosomen eine Vielzahl von biochemisch interessanten Eigenschaften auf und sind zudem in den verschiedensten Lebensräumen vertreten. So kommen sie sowohl im hämolymphatischen System der Vertebraten als auch im Verdauungssystem von Arthropoden, die immer als Überträger fungieren, vor.

Trypanosomen durchlaufen in der Regel einen Lebenszyklus, bei dem es zu einem Wirtswechsel zwischen einem blutsaugenden Überträger und einem Vertebraten kommt. Sie spielen als Krankheitserreger sowohl beim Menschen, wie auch einigen Haus- und Nutztieren eine wichtige Rolle. Aus medizinischer Sicht besonders relevant sind die beiden humanpathogenen Arten *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* mit den jeweiligen Unterarten. Während *T. cruzi* der Auslöser für die hauptsächlich in Mittel- und Südamerika weit verbreitete Chagas-Krankheit ist, sind die Unterarten *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* die Erreger der afrikanischen Trypanosomiasis, die für den Menschen unbehandelt tödlich verläuft. Beide zählen zu den fünf weltweit bedeutendsten Parasitosen, so dass den Trypanosomen große epidemiologische Bedeutung zukommt.

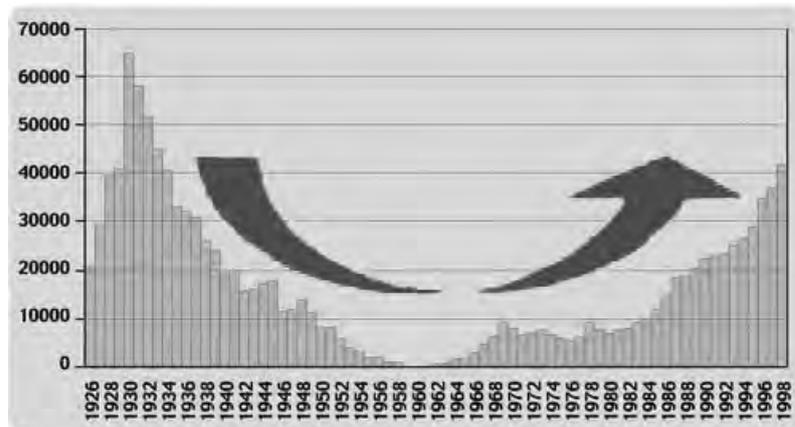


Abb. 1.1: Entwicklung der Todesfälle durch die Schlafkrankheit (EANETT, 2005)

Nachdem die Krankheit Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts fast ausgerottet schien, steigt die Anzahl der Todesfälle (Abb. 1.1) seit 1964 an. Dies ist unter anderem auf Bevölkerungswachstum, Vernachlässigung der Therapie, Kriege und die

damit verbundenen Massenfluchten sowie auf eine Lockerung der Bekämpfung der Insekten zurückzuführen.

Ein weiteres großes Problem aus volkswirtschaftlicher Sicht liegt in der durch bestimmte Trypanosomenstämme verursachten Viehseuche Nagana. Hierbei sind besonders *Trypanosoma vivax* und *Trypanosoma congolense* zu nennen, die Erreger der Nagana bei Rindern und Schafen. Nach Informationen der Welternährungsorganisation (FAO) sterben jährlich 3 Millionen Rinder an Nagana mit einem volkswirtschaftlichen Schaden von 4,8 Milliarden US-Dollar (FAO, 2005).

Für die Ausbreitung und das Vorkommen der Parasiten spielt der jeweilige Vektor eine große Rolle. Im Fall der afrikanischen Erregerstämme werden die Trypanosomen durch Insekten der Gattung *Glossina* (Tsetse-Fliegen) bei der Blutaufnahme auf den Wirt übertragen. Aufgrund der Kopplung in der geographischen Verbreitung von Vektor und Parasit spricht man auch von einem „Tsetse-Gürtel“, der sich auf dem afrikanischen Kontinent zwischen 15° n.Br. und 18° s.Br. erstreckt und in dem die Krankheit vorwiegend auftritt (Abb. 1.2.A).

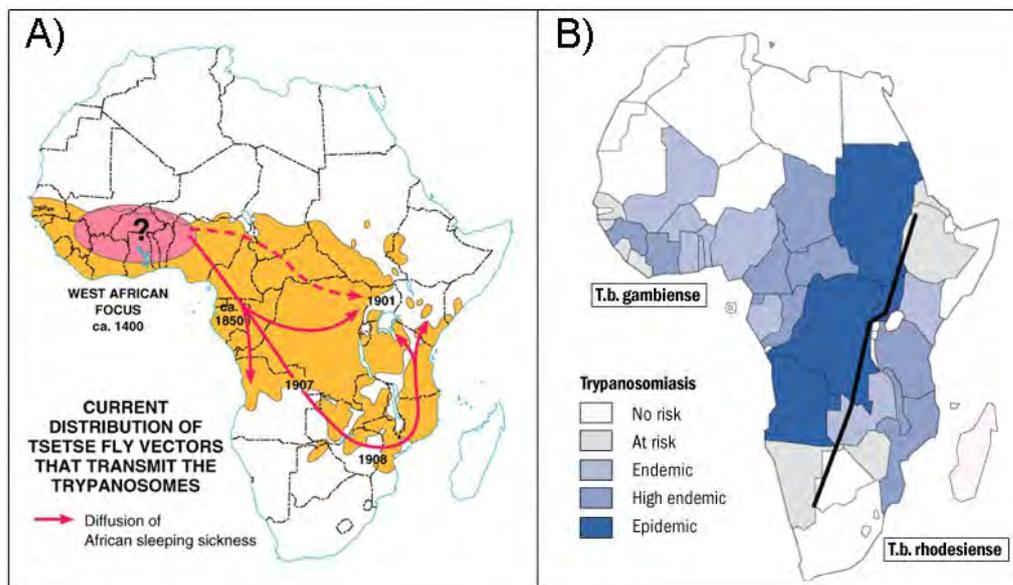


Abb. 1.2: A) Vorkommen und Ausbreitung der Tsetse-Fliege (CSUN, 2005), B) Vorkommen der beiden Formen der Schlafkrankheit (WHO, 2000)

Innerhalb dieser Zone können zwei Formen der Schlafkrankheit unterschieden werden (Abb. 1.2.B): im westlichen Teil Afrikas erfolgt die Übertragung hauptsächlich durch die beiden Arten *Glossina palpalis* und *Glossina tachinoides*, die Vektoren für

Trypanosoma brucei gambiense darstellen, während im Osten Afrikas *Glossina morsitans* Hauptüberträger von *T. brucei rhodesiense* ist. Die beiden Trypanosomen-Unterarten sind morphologisch und biochemisch kaum unterscheidbar, zeigen aber neben der unterschiedlichen Wirtsspezifität auch deutliche Unterschiede im Virulenzverhalten. Während sich der Krankheitsverlauf bei der Gambiense-Infektion zumeist über einige Jahre erstreckt, kann die Rhodesiense-Infektion bereits innerhalb weniger Monate zum Tod führen (Duszenko, 1998).

1.1.1 Die Schlafkrankheit

Wie eingangs schon erwähnt stellt die Schlafkrankheit, die unbehandelt zum Tod des Patienten führt, für einen Großteil der afrikanischen Bevölkerung eine massive Bedrohung dar. Obwohl die Krankheit schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts Gegenstand intensiver Forschung ist, konnten bis dato keine nachhaltigen Therapiemöglichkeiten gefunden werden. Die heute eingesetzten Medikamente sind teilweise sehr toxisch und aufgrund hoher Produktionskosten ist die Kontinuität ihrer Produktion ungesichert. Äußerst schwierig gestaltet sich zudem die Finanzierung der Erforschung neuer Therapeutika, da es offenbar keinen kommerziell attraktiven Markt für Medikamente in diesem Bereich gibt.

1.1.1.1 Infektionsverlauf und Krankheitsbild

Der Verlauf der Infektion kann in zwei Stadien unterteilt werden. Nach Ausbildung eines Primäraffektes an der Einstichstelle beobachtet man in der initialen Phase eine fieberhafte Erkrankung und die massive Vermehrung der Trypanosomen im Einstichbereich. Gleichzeitig treten die Erreger in die Blutbahn ein. Es kommt zur wellenförmig verlaufenden Parasitämie (s. Abb. 1.6) und damit assoziierten Fieberschüben. Anschließend folgt die Invasion des Lymphsystems. Akute Myokarditis, Polyserositis und Lymphknotenschwellungen gehören ebenfalls zum Krankheitsbild der afrikanischen Trypanomiasis (Beers et al., 1999; Witzel et al., 2007).

Die meningoenzephalitische Phase, das zweite Stadium der Erkrankung, beginnt mit dem Eindringen der Erreger in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Die nachfolgende

Schädigung des ZNS äußert sich in den charakteristischen Symptomen einer Meningoenzephalitis, wie dem Auftreten von Verwirrungszuständen, Kopfschmerzen, Apathie und Somnolenz (Beers et al., 1999; Witzel et al., 2007).

Im zeitlichen Verlauf der beiden Phasen und der Manifestation der einzelnen Merkmale unterscheiden sich die Infektion von *T.b. gambiense* und *T.b. rhodesiense*. Infektionen mit *T.b. rhodesiense* zeigen einen schnellen Anstieg der Erregerzahlen im Blut und hohe, oft anhaltende Parasitämien. Die Erreger sind schon nach wenigen Wochen im Liquor nachweisbar, was dazu führt, dass die Krankheitsdauer selten länger als sieben Monate anhält (Kayser, 1997). Infektionen mit *T.b. gambiense* hingegen, zeigen einen langsameren Anstieg der Parasitämie und einen auf niedrigem Niveau intermittierenden Verlauf. Der Übergang ins ZNS erfolgt meist erst nach 5 Monaten oder noch später.

1.1.1.2 Therapie

Eine effektive Therapie der Schlafkrankheit ist bis dato nicht möglich. Die wenigen Behandlungsmöglichkeiten haben starke Nebenwirkungen und stammen zum Teil noch aus der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, wie das Suramin (deutscher Handelsname Germanin[®] bzw. Bayer 205[®]), das der Chemiker Oskar Dressel 1916 entdeckte und das seit den 1920er Jahren eingesetzt wird. Suramin und das zeitgleich eingesetzte Pentamidin können beide die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und sind damit gegen die Parasiten im ZNS nicht wirksam.

Erst mit der Entwicklung des ZNS-gängigen Melarsoprols (Arsobal[®], 1949) wurde dieses Problem angegangen. Allerdings starben bis zu 20 % der Patienten an den Folgen der Therapie mit diesem arsenhaltigen Medikament (Friedheim, 1949). Auf der Suche nach besser verträglichen Alternativen fand man Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts das Eflornithin, welches die Erreger auch nach Passieren der Blut-Hirn-Schranke angreifen konnte. Dieses Mittel ist sehr teuer in der Produktion und schon Mitte der 90er Jahre verschwand es wieder vom Markt.

Erst als Eflornithin in einer Creme gegen pathologischen Haarwuchs bei Frauen (Vaniqa[®]) auf den Markt kam und aufwändig beworben wurde, wurde der Öffentlichkeit und Politik die Absurdität der Situation bewußt. Sanofi-Aventis, der vertreibende Konzern und die WHO einigten sich 2001 schließlich auf ein Programm, um das Mittel in Afrika wieder einzusetzen.

Gegen dieses Medikament sprechen jedoch die mangelhafte Wirksamkeit gegen *T. brucei rhodesiense*, die enormen Produktionskosten und, da es sehr schnell metabolisiert wird, die extrem hohen therapeutischen Dosen, so dass enorme Behandlungskosten entstehen.

Ein Ansatz für eine effizientere Therapie könnte die Kombination bereits bekannter Medikamente darstellen, wie eine Studie mit Eflornithin und Nifurtimox belegt (Priotto et al., 2009).

Das Problem einer effektiven und bezahlbaren Bekämpfung der Schlafkrankheit ist bisher nicht gelöst und die Suche nach spezifischen Angriffspunkten geht weiter.

1.1.2 Biologie der Trypanosomen

1.1.2.1 Morphologie von *Trypanosoma* spp.

Der Zellaufbau der Trypanosomen ist geprägt durch einige ungewöhnliche Eigenschaften. Zunächst weisen die spindelförmige Flagellaten von 15 - 40 μm Länge und 0,5 - 2 μm Durchmesser, wie in Abb. 1.3 gezeigt, einige für eukaryontische Zellen typische Organellen, wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum und Lysosomen auf. Daneben sind jedoch auch trypanosomenspezifische Strukturen auszumachen, wie die Glycosomen, die den überwiegenden Teil der Enzyme des Glukosestoffwechsels enthalten und im Zusammenhang mit der trypanosomenspezifischen Glycolyse (1.1.3.3) besprochen werden. Außerdem fallen auch parallel angeordnete mikrotubuläre Strukturen unterhalb der einfachen Plasmamembran auf. Sie bilden ein enges, aber dennoch verschiebbares Cytoskelett-Korsett, welches der Zelle eine außergewöhnliche mechanische Festigkeit und ihre charakteristische Form verleiht.

Morphologisch weiterhin interessant ist das langgestreckte, bei Trypanosomen nur singular vorkommende Mitochondrium, welches während des Entwicklungszyklus (1.1.2.2) wichtige Veränderungen erfährt, die mit der biochemischen Anpassung der einzelnen Stadien an ihr Milieu einhergehen. Während die im Säugetier vorkommende Blutform *long slender form* kaum Einstülpungen der inneren Membran zeigt, besitzt die im Verdauungstrakt auftretende prozyklische Form ein Mitochondrium mit vielen Cristae.

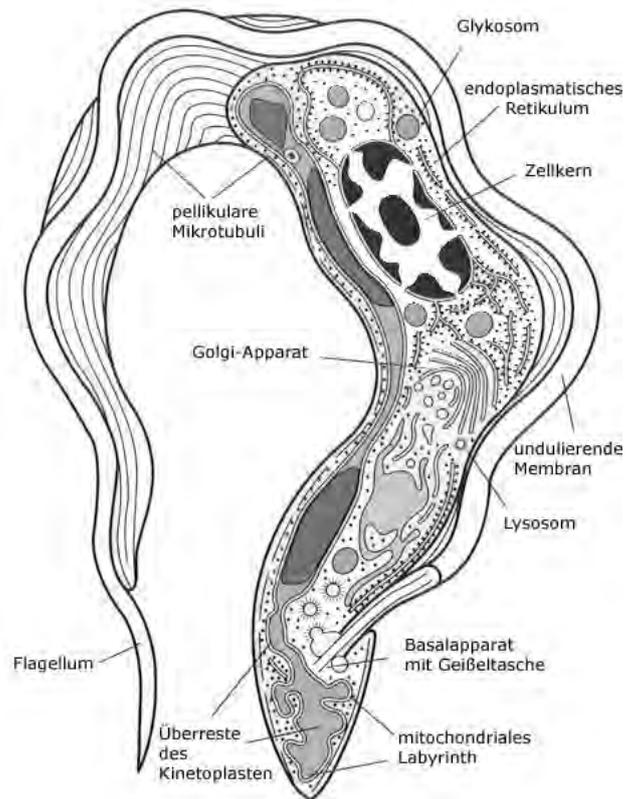


Abb. 1.3: Trypanosomen mit Zellorganellen (*T. evansi*, modifiziert nach Yaeger (2009))

Die Mitglieder der Ordnung Kinetoplastida besitzen als charakteristisches Merkmal den Kinetoplasten, ein im Mitochondrium lokalisiertes dichtes Netzwerk ineinanderhängender zirkulärer DNA-Moleküle. Es enthält die gesamte mitochondriale DNA, die in *T. brucei* aus etwa 50 *maxicircles* (ca. 20 Kilobasen) und mehreren *minicircles* (etwa 1 Kilobase) besteht (Hajduk et al., 1993). Die *maxicircles* codieren für einen Teil der mitochondrialen Enzyme, die *minicircles* hingegen für einen Teil der *guideRNAs*.

Die Zellkern-DNA liegt in 11 Chromosomen vor. Sie durchlaufen eine geschlossene Mitose und kondensieren während der Zellteilung nicht (Van der Ploeg et al., 1984).

In der *long slender* Blutform sind die Parasiten mit einer außen aufsitzenden Schicht aus Glycoproteinen (*surface coat*) ausgestattet, die dem Parasiten Schutz vor der unspezifischen Immunantwort des Wirtes gibt (1.1.3.1). Sowohl der Angriff phagozytierender Zellen als auch die komplementvermittelte Lyse werden dadurch verhin-

dert. Neben dem Zellkörper ist auch das Flagellum mit dieser Oberflächenschicht bedeckt und die Flagellumtasche damit ausgekleidet. Die prozyklische Form besitzt einen *surface coat* aus einer Schicht von Procyclin-Molekülen (1.1.3.1).

Ein besonders auffälliger Bestandteil der Zellstruktur ist die enganliegende Geißel, die im Cytosol wie üblich aus einem Basalapparat entsteht und am Hinterende der Zelle durch die Flagellumtasche nach außen tritt. Die Geißel ist über desmosomenartige Strukturen in regelmäßigen Abständen mit der Zelloberfläche verbunden und verläuft bis zum Vorderende des Zellkörpers, wo sie frei beweglich endet. Die Mikrotubuli der Geißel sind in der typischen 9 + 2 Struktur angeordnet. Die Flagellumtasche ist die einzige Region der Zelle, in der Endo- und Exocytose stattfinden. Daneben gibt es auf der gesamten Zelloberfläche aber auch Transportsysteme für die Aufnahme kleinerer Moleküle wie z.B. Glucose (Seyfang und Duszenko, 1991). Die Lage der Flagellumtasche ist vom Stadium im Lebenszyklus abhängig und tritt in der trypomastigoten Form hinter, in der epimastigoten vor dem Zellkern auf.

Aufgrund der Tatsache, dass Trypanosmen eine hohe Proteinbiosyntheserate haben, findet man ein entsprechend stark ausgebildetes rauhes endoplasmatisches Reticulum. Der Golgi-Apparat besteht in der Regel aus 4-6 Zisternen und zeigt auf der *cis*-Seite eine ausgeprägte Übergangszone (*transient zone*). Auf der *trans*-Seite liegt ein Trans-Golgi-ähnliches Netzwerk vor, welches aus einem System flacher Zysternen sowie tubulären und vesikulären Elementen besteht (Duszenko et al., 1988).

1.1.2.2 Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei*

Ein wichtiger Teil des Lebenszyklus von *T. brucei* ist geprägt durch den obligaten Wirtswechsel zwischen Wirbeltier und Tsetse-Fliege. Dabei erfahren die Trypanosomen verschiedene Formveränderungen, die im Lebenszyklus, der bei mittleren tropischen Temperaturen (28°C) etwa 20 Tage dauert, einer morphologischen und biochemischen Anpassung an den jeweiligen Wirtsorganismus entsprechen (Vickerman, 1985).

Im folgenden sei der Zyklus (Abb. 1.4 und Abb. 1.5) im Detail beschrieben:

Mit dem Stich einer infizierten Tsetse-Fliege werden über das Speichelsekret metazyklische Trypanosomen in das subkutane Gewebe des Wirbeltierwirtes übertragen (Abb. 1.4[1]). Die Trypanosomen vermehren sich im Einstichbereich und treten gleichzeitig in die hämolymphatische Flüssigkeit über (Abb. 1.4[2]), wobei sie sich

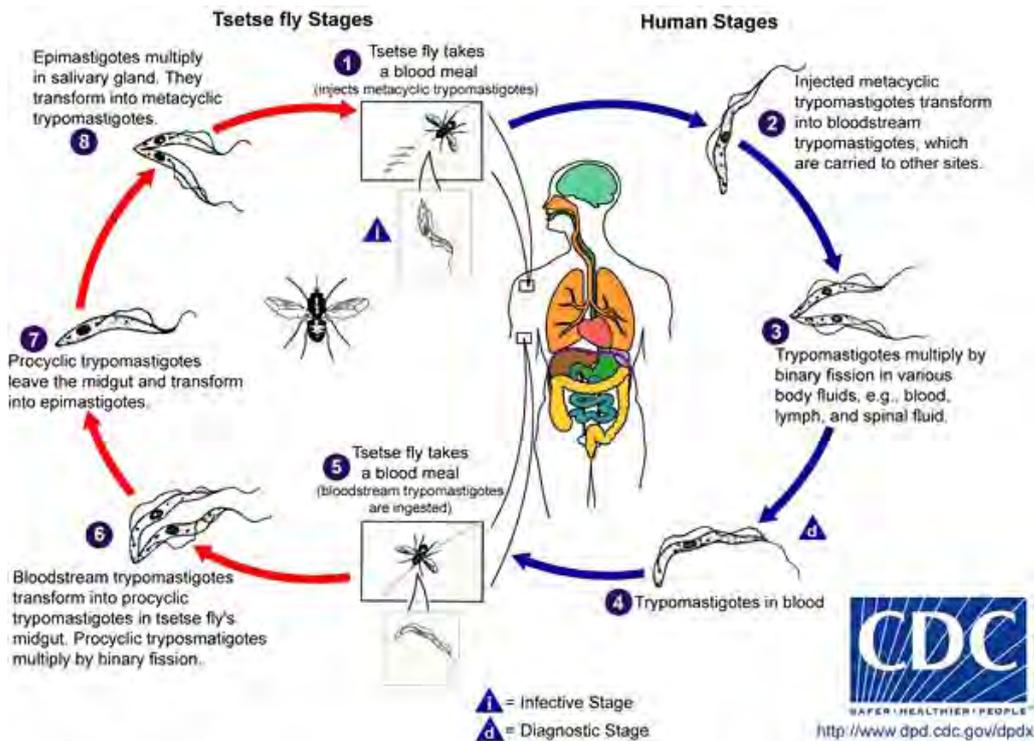


Abb. 1.4: Schema des Lebenszyklus einer *T. brucei* Zelle (CDC, 2009)

in Blut, Lymphe und später Liquor durch Zweiteilung vermehren (Abb. 1.4[3]). In der Blutbahn wandeln sich die Parasiten spontan in *long slender* Formen um (Abb. 1.5a). An der Einstichstelle bildet sich nach der ersten Woche ein Primäraffekt, der sog. Trypanosomenschanke. *Long slender* Formen zeichnen sich durch ein nur mit wenig Cristae ausgestattetes Mitochondrium aus, dem Cytochrome und sämtliche Enzyme des Citratzyklus fehlen (Fairlamb et al., 1989). In den Blutformen erfolgt die Energiegewinnung nun ausschließlich über die Glycolyse, und das Endprodukt Pyruvat wird aus der Zelle ausgeschieden (Wiemer et al., 1992). Mit steigender Parasitämie entstehen (über verschiedene Zwischenformen) gedrungene *short stumpy* Trypanosomen (Abb. 1.5b), die zwar nicht mehr teilungsfähig, für die Insekten aber infektiös sind. Um sich vor der unspezifischen Immunantwort des Wirtes zu schützen, haben alle Blutformen einen Oberflächenmantel aus Glycoproteinen. Da dieser *variant surface coat* in regelmäßigen Abständen verändert wird (Antigenvariation), gelingt es einem Teil der Population, der humoralen Immunantwort des Wirtes zu entkommen.

Im weiteren Verlauf des Zyklus werden die Trypanosomen bei der Blutmahlzeit von einer Tsetse-Fliege aufgenommen und transformieren im Mitteldarm der Fliege zur

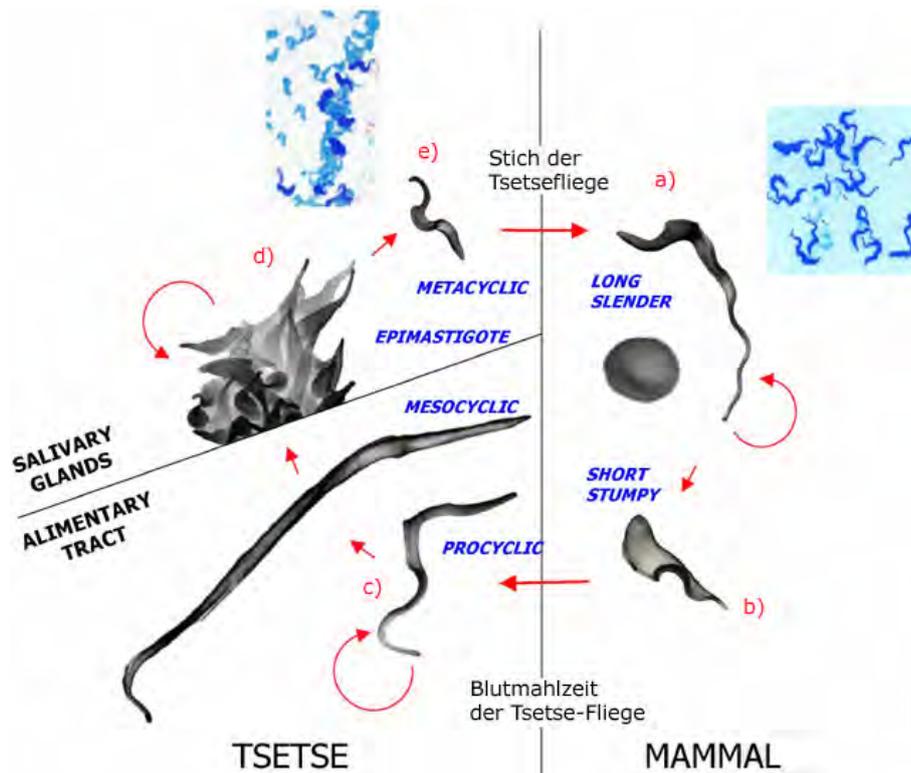


Abb. 1.5: Darstellung des Lebenszyklus einer *T. brucei*-Zelle, modifiziert aus Barry (2009)

prozyklischen Insektenform (Abb. 1.4[5,6] u. Abb. 1.5c). Mit dem Eintritt der Parasiten in das Insekt wird die Synthese des varianten Oberflächenglycoproteins (VSG) eingestellt und der in der Fliege überflüssig gewordene *surface coat* abgebaut (Overath et al., 1983). Stattdessen wird ein anderes dominantes Oberflächenprotein exprimiert, das als Procyclin (Roditi et al., 1989) bezeichnet wird. In den prozyklischen Trypanosomen findet man ein gut entwickeltes Mitochondrium, in dem Citratzyklus und Atmungskette vollständig ablaufen. Der Energiebedarf wird von den Zellen hauptsächlich durch den Abbau von Aminosäuren (Prolin), die im Verdauungstrakt der Fliege reichlich anfallen, gedeckt.

Im weiteren Verlauf vermehren sich die Parasiten aufgrund einer hohen Teilungsrate im Mitteldarm der Tsetse-Fliege rasch (Abb. 1.4[6]) und wandern in die Speicheldrüsen des Insekts. Hier differenzieren sie zur epimastigoten Form und heften sich am Speicheldrüsenepithel an (Abb. 1.4[7] u. Abb. 1.5d).

Morphologisch unterscheidet sich die epimastigote Form von den anderen Stadien durch ihren Geißelansatz: im Gegensatz zu allen anderen Stadien, deren Flagellum

nahe dem Hinterende des Zellkörpers hinter dem Zellkern entspringt (trypomastigote Formen), befindet sich hier der Ansatz der Geißel in der Mitte der Zelle vor dem Zellkern. Die epimastigoten Formen vermehren sich, füllen mit der Zeit die Speicheldrüse fast vollständig aus und wandeln sich in die für Vertebraten infektiöse metazyklische Form um (Abb. 1.4[8]). Bei den metazyklischen Trypanosomen lassen sich einige Veränderungen beobachten, wie z.B. ein reduziertes Mitochondrium und die Expression des für die Blutformen wichtigen VSG-Mantels, die als Präadaptation an den Wirbeltierwirt angesehen werden. Nach der Übertragung der metazyklischen Trypanosomen beginnt der Zyklus von neuem. Interessant ist die Tatsache, dass sich Trypanosomen offenbar nur durch asexuelle Längsteilung vermehren und es dennoch Hinweise auf eine genetische Rekombination während der Insektenphase gibt (Jenni, 1990).

1.1.3 Biochemische Besonderheiten von Trypanosomen

1.1.3.1 Antigenvariation

Schon im Jahre 1910 entwickelten die Ärzte Ross und Thomson ein Verfahren, die Parasitenkonzentration im Blut zu bestimmen. Man fand heraus, dass die Anzahl der Trypanosomen im Körper des Patienten starken, zyklischen Schwankungen unterliegt (Abb. 1.6) und nahm an, dass dies mit der Immunantwort des Patienten

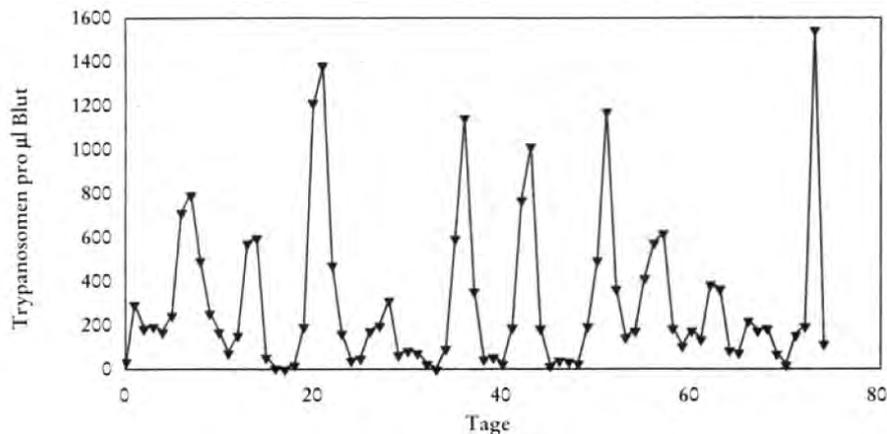


Abb. 1.6: Typischer Verlauf der Trypanosomenkonzentration im Blut eines männlichen Patienten, modifiziert nach (Ross und Thomson, 1910)

zusammenhängen könnte. Erst in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts gelang

es, die Hintergründe dieser Annahme im Experiment aufzuklären. So haben die afrikanischen Trypanosomen in ihrer Eigenschaft als extrazelluläre Parasiten einen besonderen Mechanismus entwickelt, der sie vor der unspezifischen Immunantwort des Wirtes schützt. Zusätzlich besteht für einen Teil der jeweiligen Population die Möglichkeit, durch Antigenvariation auch dem Immunglobulin G(IgG)-abhängigen Immunsystem des Wirtes zu entkommen.

Der Plasmamembran aufliegend befindet sich eine 12 - 15 nm dicke Schicht aus dichtgepackten Glycoproteinen, der Oberflächenmantel oder *surface coat*, der periodisch variiert werden kann (*variant surface glycoprotein*, VSG) (Cross, 1975). Über die gesamte Zelloberfläche verteilt findet man etwa 10^7 dieser VSG-Moleküle, die über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran befestigt sind und vermutlich die einzigen exponierten Antigene der Blutform-Trypanosomen darstellen. Von diesen Oberflächenantigenen sind etwa 1000 immunologisch verschiedene Varianten bekannt, deren Wechsel auf einer sequentiellen Expression von verschiedenen VSG-Genen beruht (Van der Ploeg et al., 1982; Borst, 1986).

Mit Zunahme der Trypanosomenkonzentration im Blut bildet der infizierte Wirt Antikörper gegen die exponierten Oberflächenantigene, die Parasiten werden abgetötet und die Befallsintensität sinkt. Gleichzeitig haben einige der Trypanosomen bereits ein neues, immunologisch unterschiedliches VSG auf ihrer Oberfläche exprimiert und sind damit vorerst vor der Immunantwort des Wirtes geschützt. Sie bilden den Ausgangspunkt einer sich erneut zunächst ungebremst vermehrenden Population. Der in Abb. 1.6 gezeigte wellenförmige Verlauf kommt daher, dass alle 7 - 10 Tage serologisch verschiedene Parasitenpopulationen auftreten (Seyfang et al., 1990). Alle 10^2 bis 10^3 Zellteilungen kommt es bei pleomorphen Trypanosomen zu einem Wechsel des exprimierten VSG (Robinson et al., 1999; Turner, 1997). Durch die große Zahl der möglichen VSG-Gene ist die Krankheit auf immunologischem Wege nicht zu bekämpfen.

Die 60 kDa schweren VSG-Moleküle bestehen aus einem nach außen gerichteten, variablen N-terminalen Ende und einem relativ konservierten, hydrophoben C-terminalen Teil, der etwa ein Drittel des Gesamtmoleküls ausmacht und über den das Oberflächenprotein als Homodimer mit einem GPI-Anker in der Plasmamembran befestigt ist. Die stäbchenförmige Struktur ermöglicht es, eine ca. 12-15 nm dicke, eng gepackte Schicht auszubilden, welche verhindert, dass der invariante C-terminale Bereich und konservierte Strukturen wie Transporter oder Rezeptoren für Antikörper zu-

gänglich sind. Somit ergibt sich als einziges erkennbares Antigen das N-terminale Ende des jeweils exprimierten VSG-Moleküls (Cross, 1975).

In der prozyklischen Form von *T. brucei* ist eine Antigenvariation nicht nachgewiesen. Der Erreger muss sich nicht vor dem Immunsystem des Vektors, d.h. der Tsetse-Fliege, schützen. Hier wird ein anderes dominantes Oberflächenprotein exprimiert, das Procyclin, was den Erreger vor dem Verdauungssystem schützt. Dieses besteht zu großen Teilen aus Prolin und Glutaminsäure und bildet einen Zylinder von 14 - 18 nm Länge und 0,9 nm Durchmesser (Roditi et al., 1989). Die Verankerung in der Plasmamembran erfolgt ebenfalls über einen GPI-Anker; dieser weist allerdings eine etwas andere Struktur als der VSG-Anker der Blutform-Trypanosomen auf (McConville und Ferguson, 1993).

1.1.3.2 Das Genom der Trypanosomen

Bei Trypanosomen lässt sich die genaue Anzahl der Chromosomen nicht optisch bestimmen, da während der Zellteilung eine geschlossene Mitose durchlaufen wird, bei der die Chromosomen nicht kondensieren. *T. brucei* besitzt 11 Megabasen-Chromosomen (0.9-5.7 Mbp) und ein unbestimmte Anzahl von „intermediate-sized“-Chromosomen (300-900 kbp). Die Größe des Genoms der 11 Megabasen-Chromosomen beträgt 26 Mbp und umfasst 9068 potentielle Gene (Berriman et al., 2005). Trypanosomen besitzen nur ein Mitochondrium, das sich schlauchartig durch die ganze Zelle zieht und in Höhe der Flagellumtasche eine Aussackung aufweist, in der ein paketartiges Aggregat mitochondrialer DNA lokalisiert ist. Diese auch als Kinetoplastid-DNA (kDNA) bezeichnete Struktur ist zusammengesetzt aus ringartig verbundenen DNA Molekülen, die aus mehreren tausend *minicircles* (465 bp - 10 kbp) und 20-50 *maxicircles* (23 - 36 kbp) besteht. Auf den *minicircles* sind die Informationen für die guide-RNAs als polycistronische Transkriptionseinheiten (Grams et al., 2000) abgelegt, während die *maxicircles* neben weiteren guide-RNA-Sequenzen, für wichtige Proteine der Mitochondrien kodieren, bei denen eine Translation ohne vorherige Editierung nicht möglich wäre, und die daher auch als Kryptogene bezeichnet werden (Simpson et al., 2000).

1.1.3.3 Besonderheiten des Glucosestoffwechsel: Glycosomen

Im Laufe des Lebenszyklus und des damit verbundenen Wirtswechsels, müssen die Trypanosomen sich an die unterschiedlichen Verhältnisse des sie umgebenden Milieus anpassen. Dies gilt insbesondere für den Energiestoffwechsel. Statt Peroxisomen besitzen Trypanosomen auf die Glycolyse spezialisierte Organellen, sogenannte Glycosomen (Oppendoes und Borst, 1977). Diese zahlreich vorkommenden Organellen (bei Blutformen etwa 80 pro Zelle) haben einem Anteil von 90% Glycolyseenzymen und ermöglichen eine äußerst effektive Glycolyse (Bakker et al., 1995). Dies scheint notwendig, da die Blutformen der Erreger ihre Energie ausschließlich auf diesem Weg beziehen. Ermöglicht wird dies durch die Tatsache, dass den Parasiten im Blut der Säuger genügend Glucose zur Verfügung steht. In den Blutformen ist die Expression mitochondrialer Cytochrome deshalb unterbunden (Priest und Hajduk, 1994).

Findet im weiteren Verlauf des Lebenszyklus der Übergang von der Blut- zur Insektenform statt, so wird die Synthese der mitochondrialen Cytochrome reaktiviert. Da den Parasiten in der basischen Umgebung des Mitteldarms der Arthropoden kaum Glucose zur Verfügung steht, wird für die ATP-Gewinnung nun Prolin metabolisiert, das in der Fliege ausreichend vorhanden ist. Es konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung von *T.brucei*, Glycosomen über autophagische Prozesse abgebaut werden und neue Glycosomen entstehen, deren Enzymzusammensetzung an die äußeren Bedingungen der jeweiligen Stadien angepasst ist (Herman et al., 2008).

1.2 Autophagie bei Trypanosomen

Autophagie ist der Oberbegriff für eine Gruppe komplexer und stark regulierter Prozesse innerhalb eukaryontischer Zellen, die für einen Großteil des Abbaus und Recyclings zellulärer Organellen und Proteine zuständig sind (Kundu und Thompson, 2008).

Der am besten beschriebene autophagische Prozess wird Makroautophagie oder wie im folgenden einfach Autophagie genannt. Dieser Mechanismus dient insbesondere der Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen unter Bedingungen in denen Nährstoffarmut herrscht. Hierzu können durch Abbau zelleigener Strukturen Energie und essentielle Nahrungsstoffe gewonnen werden (aus dem Griechischen: „auto“- selbst

und „phagy“-fressen). Außerdem spielt die Autophagie durch die damit verbundene dynamische Neuordnung von Membranen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und dem Wachstum von Zellen (Stromhaug und Klionsky, 2001).

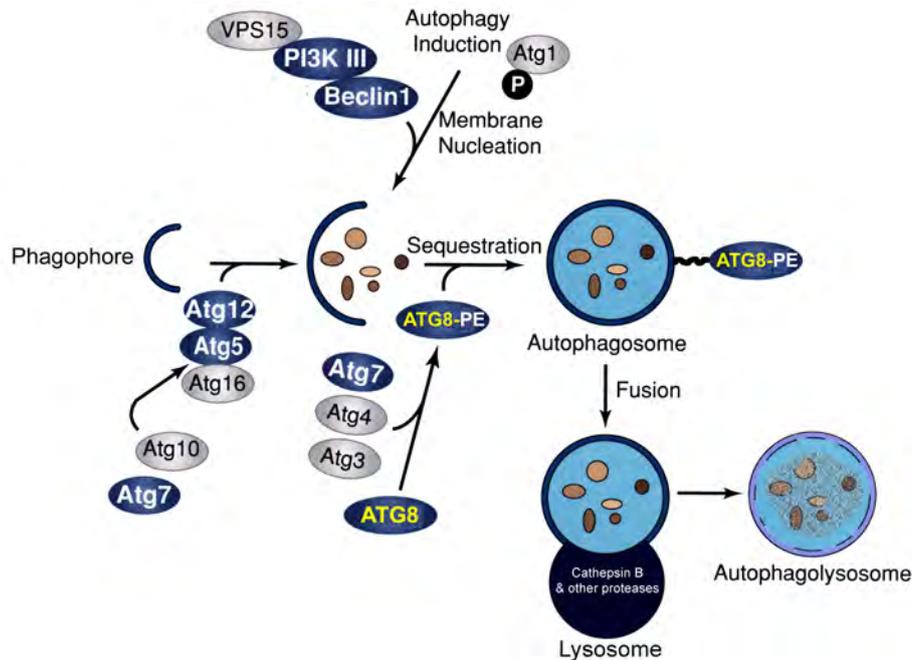


Abb. 1.7: Autophagie und beteiligte Proteine (modifiziert nach CST (2010))

Beim Beginn der Autophagie werden zunächst Teile des Zytoplasmas von Vesikeln mit einer Doppelmembran umschlossen. Diese Autophagosomen vereinigen sich dann mit Lysosomen, wodurch das enthaltene Zellmaterial durch die lysosomalen Proteasen abgebaut werden kann (Klionsky, 2005; Shintani und Klionsky, 2004; Klionsky und Ohsumi, 1999).

Als molekulare Basis des Prozesses konnten mehr als 30 autophagierelevante Proteine in Hefen ausgemacht werden, darunter zwei dem Mechanismus der Ubiquitinierung ähnliche Systeme (Klionsky et al., 2003). Die entsprechenden Proteine dieser Systeme spielen eine wichtige Rolle in der Biogenese der Autophagosomen (s. Abb. 1.7), hierbei ist besonders das Ubiquitin-ähnliche ATG8 (ATG=*autophagy-related*) zu nennen. Dieses Protein wird zunächst von der Cysteinprotease ATG4 prozessiert, wodurch ein C-terminaler Glycin-Rest freigelegt wird (Kirisako et al., 2000), der dann durch ein E1-ähnliches Enzym ATG7 aktiviert wird. Im Anschluss wird ATG8 auf das E2-ähnliche ATG3 übertragen und kovalent an Phosphatidylethanolamin

(PE) gebunden (Ichimura et al., 2000), wobei der E3-ähnliche Komplex aus ATG12-ATG5-ATG16 eine wichtige Rolle spielt (Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008). Das ATG8, welches zuvor frei im Zytosol vorlag, ist nun fest mit Membranen verankert, wodurch es ein wichtiges Markerprotein für die Autophagosomen-Membranen und damit für autophagische Prozesse insgesamt darstellt. ATG8-PE kann in der membrangebundenen Form durch ATG4 gespalten werden, sodass ATG8 als freies Protein zur Verfügung steht. Der Ablauf der Aktivierung, Lipidierung und Delipidierung von ATG8 ist in Abb. 1.8 schematisch dargestellt.

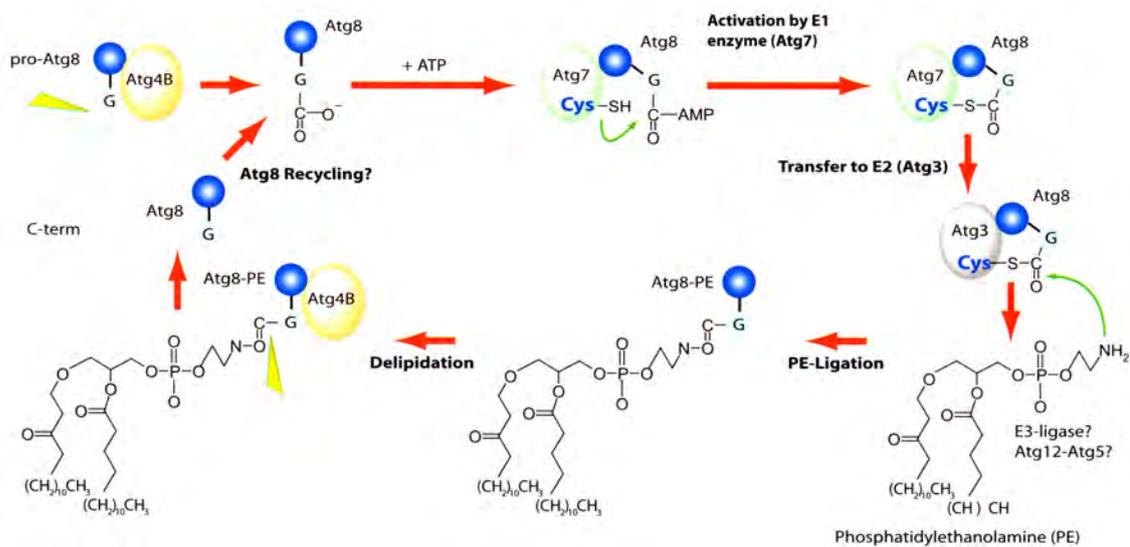


Abb. 1.8: ATG8 Pathway (modifiziert nach *Enzolifesciences (2010)*)

Trypanosomen sind während ihres Lebenszyklus von der Blutstrom- zur Insektenform und zurück unterschiedlichen Bedingungen des Mileus ausgesetzt. Dies ist verbunden mit vielen metabolischen und morphologischen Veränderungen, die mit autophagischen Prozessen in Verbindung gebracht werden (Herman et al., 2008). Es konnte überdies am Beispiel von *Trypanosoma cruzi* gezeigt werden (Alvarez et al., 2008b), dass unter Nährstoffarmut und bei Differenzierung die Autophagie hochreguliert ist und damit einen für das Überleben der Parasiten wichtigen Prozess darstellt. Für die Bekämpfung der Parasiten stellt die Autophagie somit einen interessanten Ansatzpunkt dar und ermöglicht es, alternative Targetproteine für die Entwicklung spezifischer Wirkstoffe zu identifizieren.

Bioinformatische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anzahl autophagierelevanter Gene in Trypanosomen geringer ist als in Hefen (Herman et al., 2006). Dies

wirft die Frage auf, ob in Parasiten möglicherweise eine evolutionär frühe Form der Autophagie vorliegt (Denninger et al., 2008). Andererseits gibt es bisher nur eine relativ geringe Anzahl von Veröffentlichungen zur Funktion von autophagierelevanten Proteinen bei Trypanosomen. Bei Leishmanien gibt es zudem Hinweise, dass einige autophagie-relevante Proteine deutliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz gegenüber ihren Gegenstücken in Hefen aufweisen (Williams et al., 2009).

1.2.1 ATG8 bei *Trypanosoma brucei*

Im Genom von *T. brucei* gibt es drei Gene ATG8A, ATG8B und ATG8.2 (GeneDB Nomenklatur), die aufgrund ihrer Homologie zum entsprechenden ATG8-Gen bei Hefen, Kandidaten für die Kodierung trypanosomaler ATG8-Proteine sind. Die Abbildung 1.9 zeigt ein Alignment der entsprechenden Aminosäuresequenzen zusammen mit verwandten Proteinen anderer Spezies.

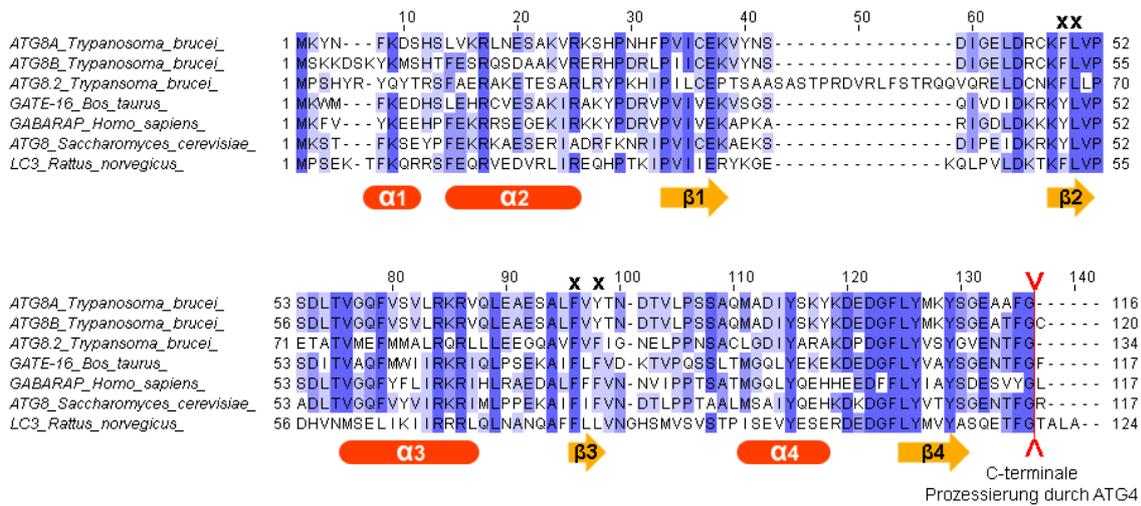


Abb. 1.9: Alignment von Proteinsequenzen der ATG8-Proteine und Homologe, mit „x“ sind Aminosäuren markiert, die wichtig für die Interaktion mit ATG4 sind

Das dem ATG8.2-Gen entsprechende Protein enthält eine 16-Aminosäuren lange Sequenz, die innerhalb der Ubiquitin-Domäne lokalisiert ist und stellt damit trotz starker Homologie aller Wahrscheinlichkeit nach kein Protein mit ATG8-Funktion dar. Dies wird ferner gestützt durch Ergebnisse, die für das entsprechende orthologe Protein in *L.major* eine ATG12-Funktion nachweisen (Williams et al., 2009).

Bei TbATG8A fällt auf, dass die Proteinsequenz C-terminal mit Glycin endet und daher eine Prozessierung durch ATG4 nicht erforderlich wäre, um das Protein zu aktivieren. Im Fall von TbATG8B hingegen konnte für das entsprechende orthologe Protein in *T. cruzi* gezeigt werden (Alvarez et al., 2008b), dass es in Hefen ein fehlendes ATG8 komplementieren konnte und damit wohl die funktionale Isoform für die Ausbildung der Autophagosomenmembranen darstellt. Daher wurde das Gen von TbATG8B auch für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

1.3 Cysteinproteasen und Trypanosomen

Eine wichtige Klasse von Proteinen für die Autophagie stellen Cysteinproteasen dar, die nicht nur für die Prozessierung autophagierelevanter Proteine, sondern auch für den Abbau des während der Autophagie anfallenden Zellmaterials in den Lysosomen wichtig sind (Williams et al., 2006; Kroemer und Jaattela, 2005).

Seit Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts gelten Cysteinproteasen aus der Papainfamilie außerdem als potentiell wichtige *drug targets* für Kinetoplastiden (North et al., 1990). Diverse Patentanmeldungen und Publikationen zu neuen Inhibitoren in den letzten Jahren (Dardonville, 2005; Steverding und Tyler, 2005; Bryant et al., 2009) zeigen, dass sie Gegenstand der aktuellen Entwicklung von chemotherapeutischen Verfahren zur Bekämpfung der Trypanosomen sind. Diese Klasse von ubiquitären Proteinen spielt eine wichtige Rolle im Ablauf des Lebenszyklus von Trypanosomen (McKerrow et al., 1993). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Funktion dieser Proteine durch Inhibitoren bzw. durch Knockdown mittels RNA-Interferenz (RNAi) ein Absterben der Parasiten in den Blutformen zur Folge hat (Scory et al., 1999; Mackey et al., 2004).

Lange Zeit wurde angenommen, dass das hauptsächliche Ziel der Hemmung durch Cysteinprotease-Inhibitoren, das Enzym Brucipain sei, eine Cysteinprotease der Cathepsin L-Familie. Mackey *et al.* konnten bei einem vergleichenden RNAi-Knockdown von Brucipain und dem *cathepsin-B like protein* aus *Trypanosoma brucei* (TbCatB) jedoch zeigen, dass ein Knockdown des Gens von Brucipain keine Folgen auf den Phänotyp der Parasiten hatte (Mackey et al., 2004). Im Gegensatz dazu verursachte der Knockdown von TbCatB via RNAi einen gestörten Abbau von Transferrin und zeigte einen letalen Phänotyp.

Dieses Enzym ist somit essentiell für das Überleben der Parasiten im Blut und damit ein interessantes Target für mögliche Wirkstoffe, welche zu einem Ende der Parasitämie im Endwirt führen. Zudem wäre durch Wegfall des Reservoirwirtes der trypanosomale Lebenszyklus unterbrochen. Im folgenden Abschnitt wird dieses Protein näher beschrieben.

1.3.1 TbCatB - Cathepsin B-like protein in *T.brucei*

1.3.1.1 Charakterisierung

Das *cathepsin-B like protein* aus *Trypanosoma brucei* (TbCatB), wurde erstmals durch (Mackey et al., 2004) beschrieben und gehört zur C1-Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen des CA-Clans. Diese lysosomalen Proteasen katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen und haben einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum. Cathepsin B hat primär Carboxydipeptidaseaktivität und ist damit eine Endopeptidase hat aber strukturbedingt auch Exopeptidaseaktivität (Barrett et al., 2004) (s.a. 1.3.1.3). Eine der Hauptaufgaben der Clan-CA Cystein Proteasen in den Parasiten ist der Abbau von Wirts-Proteinen im Lysosom zur Aufrechterhaltung des eigenen Energie- oder Aminosäurebedarfs. Hier konnte für TbCatB gezeigt werden, dass es insbesondere eine wichtige Rolle für den Abbau von Transferrin spielt (Mackey et al., 2004), das für das Wachstum der Blutformen von *T.brucei* wichtig ist (Steverding, 2000).

Das 1023 bp-lange Gen wird als Präproenzym translatiert, d.h. das fertige Protein besitzt laut SignalP-Server (Bendtsen et al., 2004) ein 22 Aminosäuren-langes Signalpeptid (s. Abb.1.10), welches bewirkt, dass das Protein während der Translation in das endoplasmatische Retikulum gelangt. Dort wird das Signalpeptid abgespalten, so dass die 71-Aminosäuren-lange Proregion am N-terminus vorliegt. Dieses Propeptid enthält N-Glykolisierungsstellen und ist für den zielgerichteten Transport in das endosomal-lysosomale Kompartiment von Bedeutung. Dieser Transport geschieht üblicherweise bei Cysteinproteasen über Mannose-6-phosphat, bei *T.cruzi* (Huete-Perez et al., 1999) und *L.major* (Sajid und McKerrow, 2002) gibt es jedoch Arbeiten, die auf einen Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Transport hindeuten. Das Propeptid hat außerdem die wichtige Funktion, als endogener Inhibitor eine Aktivierung des Enzyms während des Transports in das Lysosom zu verhindern. Erst im sauren

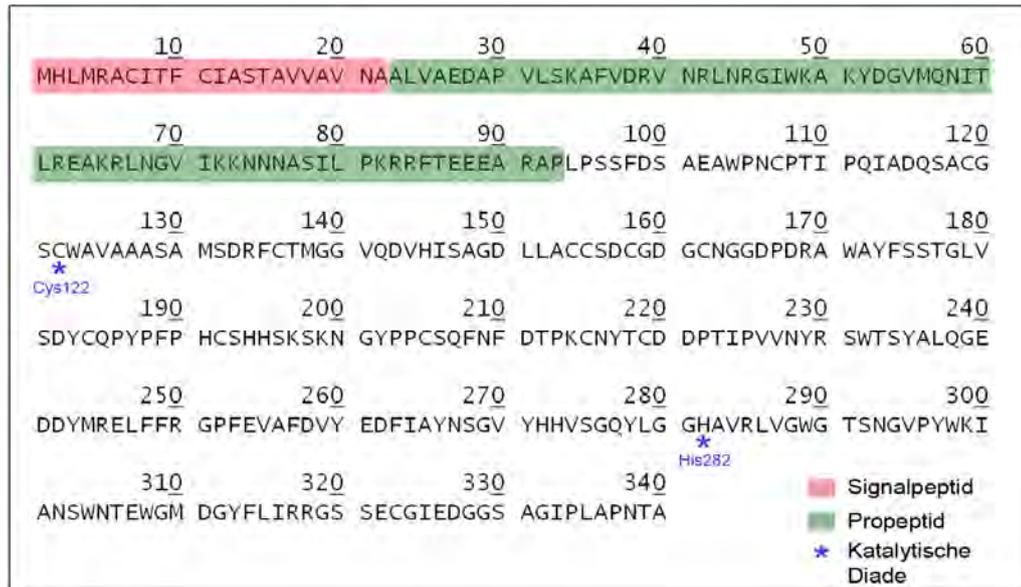


Abb. 1.10: Aminosäuresequenz und Domänenstruktur von *TbCatB*

Milieu des Lysosoms wird das Propeptid durch andere Proteasen oder durch Autoaktivierung abgespalten. Hierdurch wird der katalytische Spalt freigelegt und das Enzym kann nun Peptide als Substrat binden. Das reife Protein besteht aus 247 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 28,5 kDa.

1.3.1.2 Sequenzhomologie

Die Cathepsin B-Proteine haben sich in der Evolution früh von anderen Papain-ähnlichen Proteasen abgespalten (Berti und Storer, 1995), dabei bilden insbesondere die Proteine der Kinetoplastiden einen eigenen Zweig. Ein multiples Alignment von Cathepsin-B-ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Spezies, die homolog zu *TbCatB* sind, wurde mit Hilfe von ClustalW (Larkin et al., 2007) erstellt (s. Abb.1.11). Hierbei wurden in den ersten drei Reihen, neben *TbCatB* aus *Trypanosoma brucei*, die entsprechenden orthologen Proteine von *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania major* miteinander verglichen. Ferner sind Sequenzen von Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Fischen (*Cyprinus carpio*), Spinnentieren (*Ixodes ricinus*) und Mensch (*Homo sapiens*) Bestandteil des Vergleichs.

Im Sequenzbereich des reifen Proteins ist allgemein eine hohe Homologie zu erkennen, besonders im Bereich der katalytisch aktiven Reste. Die beiden Homologe aus *T. cruzi* und *L. major* sind erwartungsgemäss am ähnlichsten zu *TbCatB*. Die

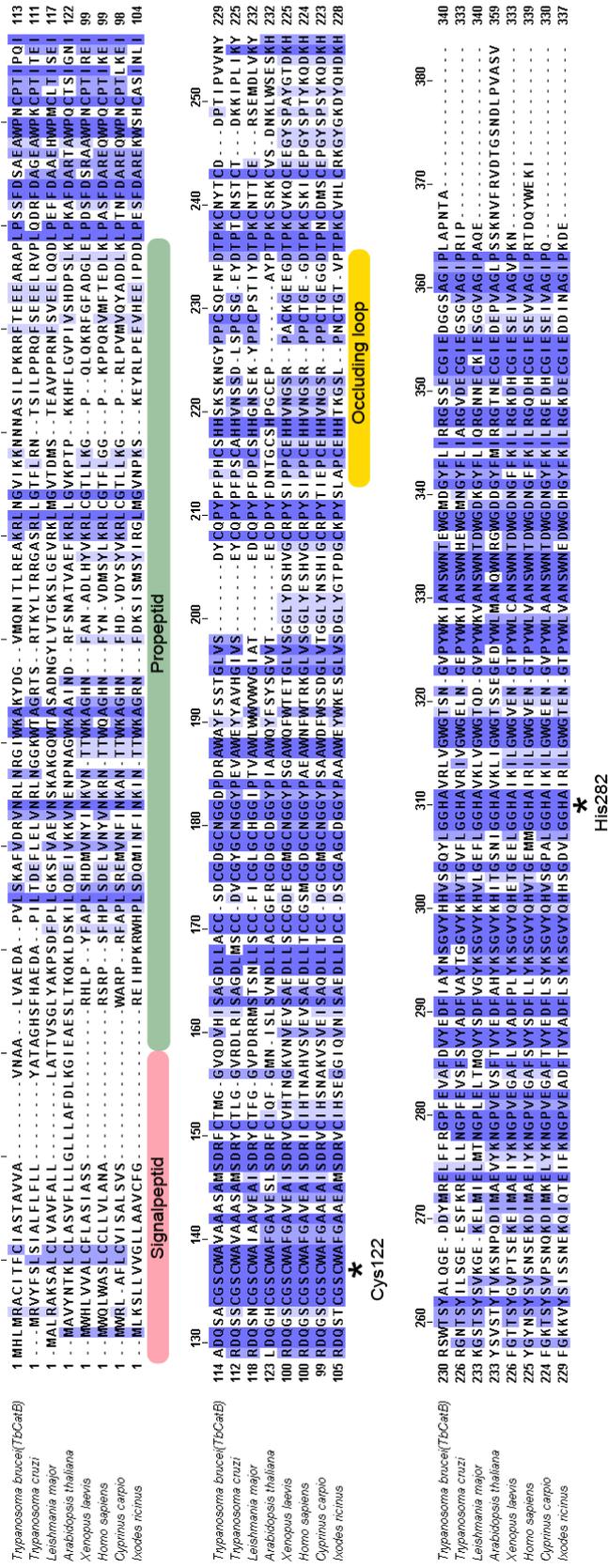


Abb. 1.11: Multiples Alignment homologer Sequenzen von TbCatB

Proteine der Kinetoplastiden bilden zu dritt eine Gruppe von zueinander ähnlichen Proteinen, welche sich von den restlichen Proteinen in bestimmten Sequenzbereichen unterscheiden. Außerdem fällt auf, dass Pflanzen einen eigenen Subtyp gegenüber den anderen eukaryontischen Spezies aufweisen und einen deutlich längeren C-terminus haben.

1.3.1.3 Struktur und Katalysemechanismus

Die Tertiärstruktur der reifen monomeren Cathepsin B-Proteine besteht aus zwei Domänen (L/R), die über Disulfidbrücken stabilisiert sind. Dazwischen verläuft der V-förmige katalytische Spalt. Die L-Domäne wird durch drei alpha-Helices dominiert, während die R-Domäne ein *beta-barrel*-Motiv bildet (McGrath, 1999). In der

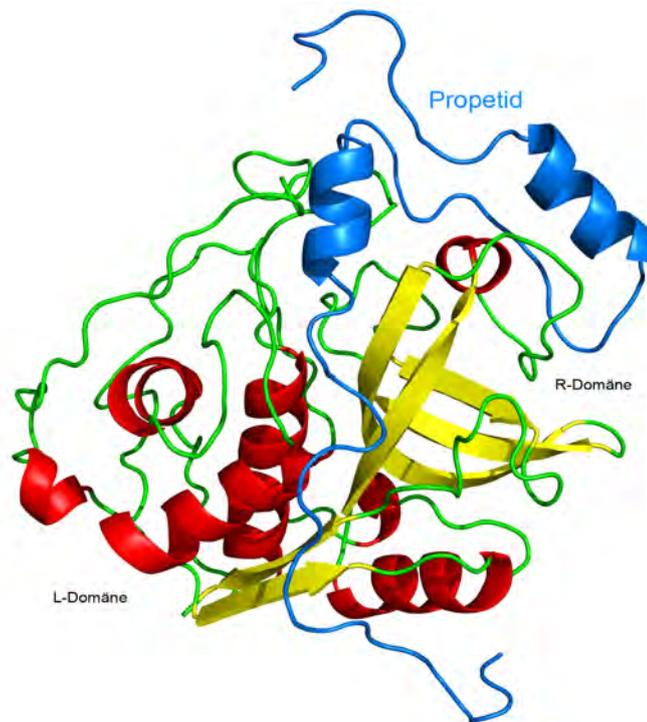


Abb. 1.12: Homology model aus MODBASE von *TbCatB*,
Sekundärstrukturdarstellung: Konstruktion humanes Propeptid auf
TbCatB

inaktiven zymogenen Form verläuft das Propetid durch den katalytischen Spalt in der umgekehrten Orientierung, im Vergleich zur Peptidkette des Substrats, und blockiert so den Zugang zur bereits fertig ausgebildeten katalytischen Diade (s.Abb.1.12). Beim Übergang zur aktiven Form, ändert sich die Struktur abgesehen vom Abspal-

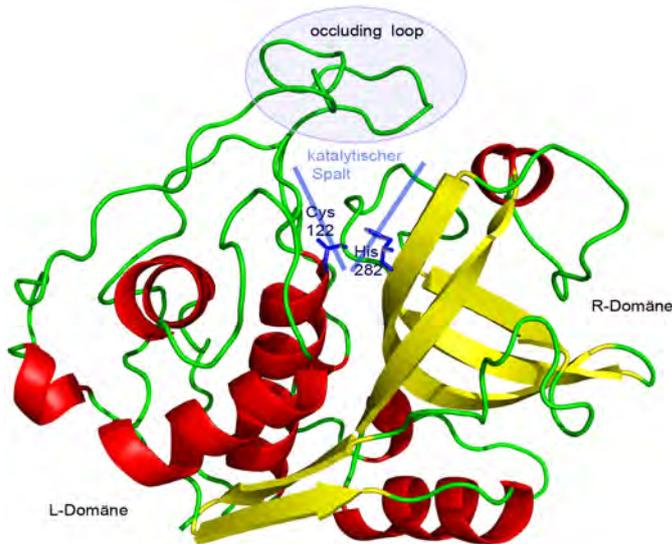


Abb. 1.13: Homology model aus MODBASE von *TbCatB*,
Sekundärstrukturdarstellung: reifes *TbCatB*

ten des Propeptids wenig. Einzig im Bereich des *occluding loop* sieht man (bei bisher veröffentlichten Strukturen des humanen Cathepsins B) Unterschiede zwischen Pro- und aktiver Form. Die strukturelle Besonderheit des *occluding loop* mit den beiden Histidinresten 194, 195 verleiht Cathepsin B Proteinen eine zusätzliche Exopeptidase-Aktivität, in diesem Falle eine Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität. Das bedeutet, dass der *occluding loop* den katalytischen Spalt verkürzen kann. Dies ermöglicht es Substraten mit ihrem C-terminalem Carboxylat zu binden, sodass dann Dipeptide abgespaltet werden können. Wie aus dem Homologiemodell von *TbCatB* aus der MODBASE-Datenbank (Pieper et al., 2004) ersichtlich (s. Abb. 1.13), befindet sich das katalytische Cystein-122 am N-terminalen Ende der längsten alpha-Helix der L-Domäne, während das Histidin-282 Bestandteil des β -Faltblatts der R-Domäne ist.

Nach Schechter und Berger (1967) werden die Peptide des Substrates von der Spaltstelle aus in Richtung des N-Terminus mit P1,P2,P3... usw. und in Richtung des C-Terminus mit P1',P2',P3'..usw. bezeichnet (s. Abb. 1.14). Entsprechend werden auf der Enzymseite die Bindetaschen (*subsites*) der Aminosäuren, die dort binden als S1,S2...bzw. S1',S2'.. benannt. Der Aufbau der S2-Bindetasche ist bei den Cysteineproteasen von entscheidender Bedeutung für die Spezifität (McGrath, 1999; Sajid und McKerrow, 2002).

Für Cathepsin B und L gibt es dabei eine Präferenz für große hydrophobe Amino-

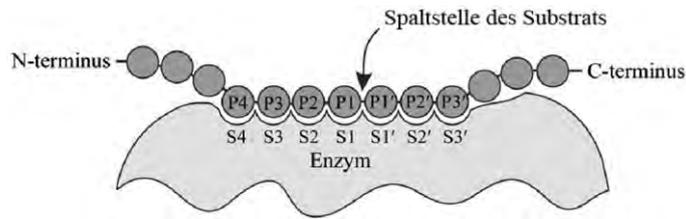


Abb. 1.14: Nomenklatur nach *Schechter und Berger (1967)*

säurenreste wie Phenylalanin, Cathepsin B bindet aber auch Substrate mit Arginin an P2. Entscheidend dafür ist die Aminosäure am Boden der S2-Bindetasche, die bei Cathepsin B der Vertebraten eine saure Aminosäure wie z.B. Glutamat enthält, welche die polare Guanidino-Gruppe des Arginins stabilisieren kann. TbCatB enthält an dieser Stelle einen Glycin-Rest (Position 328). Bei einem orthologen Cathepsin B aus *Leishmania major*, konnte gezeigt werden, dass durch Mutation dieses Glycins zu Glutamat die Hydrolyse eines Substrates mit Arginin an P2, verglichen mit dem Wildtypenzym, deutlich erhöht war (*Chan et al., 1999*). Dies spricht dafür, dass auch TbCatB in der Spezifität der S2-Bindetasche eher Cathepsin L-ähnlich ist (*Mallari et al., 2008b*) und damit einen Phenylalaninrest an P2 bevorzugt, obwohl es von der Sequenz und Struktur klar zu den Cathepsin B-Proteinen zählt.

Die Hydrolyse der Peptidbindung findet zwischen P1 und P1' statt und wird hauptsächlich durch das Ionenpaar aus Cys122 und His282 katalysiert. Während der Proteolyse greift das nucleophile Thiolat des Cys122 die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung an und bildet ein negativ geladenes tetraedrisches Thiohalbacetal (s. Abb. 1.15). Im nächsten Schritt wird das Enzym unter Abspaltung des C-terminalen Teils des Substrats an der Thiolgruppe acyliert (Thioester). Schließlich wird das Acyl-Enzym über ein zweites tetraedrisches Zwischenprodukt in das freie Enzym und den N-terminalen Teil des Substrats hydrolisiert.

1.3.1.4 Inhibitoren

Die Entwicklung und Synthese von Inhibitoren für Cysteinproteasen ist besonders in den letzten beiden Jahrzehnten intensiv vorangetrieben worden, wobei viele unterschiedliche Typen entdeckt und getestet wurden (*Lecaille et al., 2002*). Ein Großteil der synthetischen Cathepsin B-Inhibitoren besteht typischerweise aus einem Di- oder Tripeptid verbunden mit einer elektrophilen Kopfgruppe, dem sogenannten *warhead*,

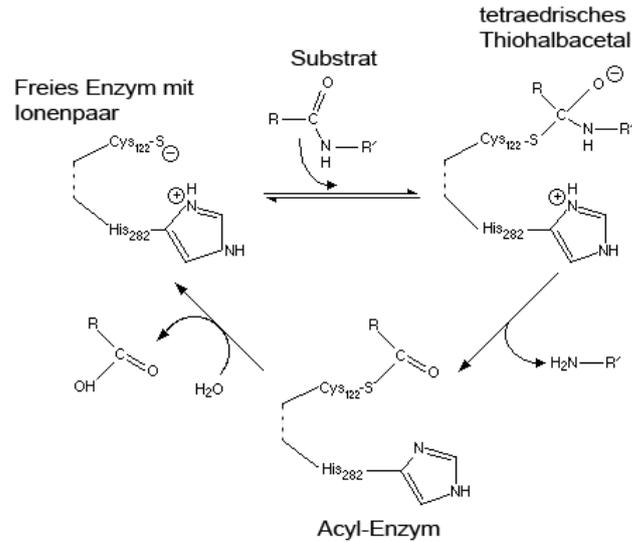


Abb. 1.15: Katalysemechanismus von Cathepsin B

welche das funktionelle Thiol des Cysteins im aktiven Zentrum reversibel oder irreversibel kovalent bindet. Diese Inhibitoren versuchen die spezifischen Interaktionen des normalen Substrates mit dem Enzym (primär sind dies hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken) zu imitieren. Ein Beispiel ist das in Abb.1.16 gezeigte Tripeptidylaldehyd, das bei der Bindung über eine Halbacetalbildung mit dem Enzym den tetraedrischen Übergangszustand imitiert und damit eine reversible Hemmung bewirkt. Diese Inhibitoren auf Peptidbasis haben in Hinblick auf die

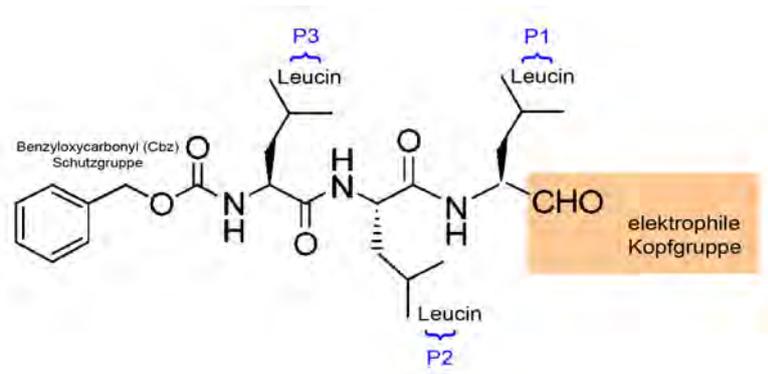


Abb. 1.16: Tripeptidylaldehyd mit elektrophiler Kopfgruppe

Entwicklung zu einem nicht-peptidalem Arzneistoff den Nachteil einer schlechten Applizierbarkeit und Stabilität, da sie leicht über Hydrolyse und enzymatischen Abbau gespalten werden. Daher gab es in den letzten Jahren eine verstärkte Tendenz in

Richtung peptidomimetischer Inhibitoren, bei denen die Stabilität durch Modifikationen des Peptidteils verbessert wird (Brak et al., 2008; Bryant et al., 2009). Eine der

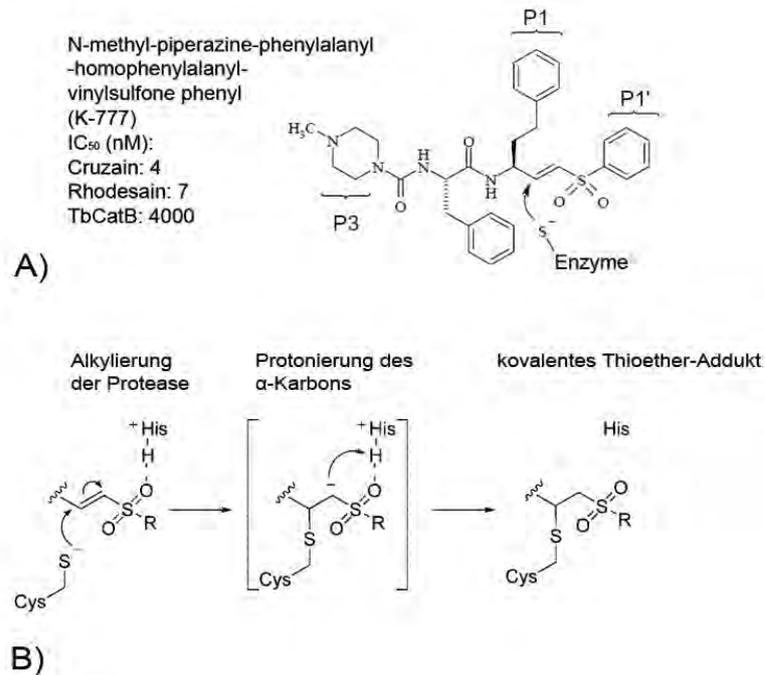


Abb. 1.17: A) *Vinylsulfon Inhibitor K-777* B) *Reaktionsmechanismus Vinylsulfone*

am weitesten entwickelten Inhibitorclassen ist dabei die Klasse der Peptidylvinylsulfone (Kerr et al., 2009). Sie zeigen eine Selektivität für Cysteinproteasen gegenüber Serinproteasen (Rasnick, 1996), eine stabile irreversible Hemmung des Enzyms und gute pharmakokinetische Eigenschaften in Nagern, Hunden und Primaten (McKerrow et al., 2008; Renslo und McKerrow, 2006). Ein Vertreter dieser Klasse ist das in Abb.1.17 dargestellte K-777, welches ein vielversprechender Inhibitor des Cruzains in *T.cruzi* ist (Engel et al., 1998), dessen Entwicklung aber als Wirkstoff aufgrund von Hepatotoxizität und Herstellungsschwierigkeiten eingestellt wurde (OneWorldHealth, 2009). Peptidylvinylsulfone haben als elektrophile Kopfgruppe ein α,β -ungesättigtes System, dessen β -Kohlenstoffatom mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum in einer Michael-Reaktion ein kovalentes Thioetheraddukt ausbildet und damit eine stabile, irreversible Hemmung erreicht (Brak et al., 2008). Hierbei wird nach der Alkylierung der Protease durch den nucleophilen Angriff des Cysteinats das α -Kohlenstoffatoms des Vinylsulfones durch das Histidin des aktiven Zentrums protoniert (s.Abb.1.17). Aktuelle Arbeiten zeigen auf Basis von Röntgenstrukturen der Enzym-Inhibitor-

Komplexe neue Möglichkeiten Vinylsulfone als Inhibitoren zielgenauer einzusetzen (Kerr et al., 2009).

Im Zusammenhang mit TbCatB wurden als erste Inhibitoren vom Purin abgeleitete Nitrile untersucht (Mallari et al., 2008b). Neben der Tatsache, das Purin-Nitrile als Cysteinprotease-Inhibitoren verifiziert wurden (Altmann et al., 2004), sind diese Inhibitoren besonders interessant, da *T. brucei* Purine und Purinanaloge des Wirtes über Transporter aufnimmt (Carter und Fairlamb, 1993; Maser et al., 1999) und so eine gute Bioverfügbarkeit des Inhibitors am Wirkort möglich erscheint. Die gefundenen Inhibitoren hemmen im nanomolaren Bereich reversibel TbCatB und eine Trypanosomen-Proliferation in Kultur. Die Struktur in Abb.1.18 weist beispielsweise eine IC_{50} von 110 nM gegen *T. brucei*-Blutstromformen auf, während bei eukaryontischen Zelllinien bis zu 20 μ m keine Toxizität beobachtet werden konnte. Der Nitrilteil des Inhibitors fungiert als „warhead“ und geht eine kovalente Bindung mit dem Cystein des aktiven Zentrums ein, während der 3,4-dichlorophenyl-Ring mit der S2-Bindetasche van der Waals-Wechselwirkungen ausbildet. Diese Leitstruktur wurde von Mallari et al. (2009) anhand von Röntgenstrukturen optimiert, so dass die S2-Spezifität für TbCatB verbessert werden konnte. Die allgemein hohe Homologie



Abb. 1.18: Purin-Nitril mit Interaktionen zu TbCatB

der Cysteinproteasen aus den Parasiten zu den entsprechenden Wirtsproteinen wirft die Frage nach Nebenwirkungen einer möglichen Therapie mit Protease-Inhibitoren auf. Ein Argument ist dabei, dass die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren im Blut ausreichen, um die Parasiten zu töten, jedoch zu niedrig sind, um Auswirkungen auf die Wirtsproteasen zu haben, die in intrazellulären Kompartimenten abgeschottet sind (McKerrow, 1999; Sajid und McKerrow, 2002). Ferner wird mit der Redundanz der Wirtsproteasen argumentiert. Wird hier eine Protease stark inhibiert, können andere Proteasen deren Aufgabe übernehmen, während beim Parasiten eine Hemmung aufgrund der geringeren Bandbreite an Proteasen gravierende

Folgen haben sollte. Hinzu kommt, dass die Proteasen bei den Parasiten zum Teil andere Funktionen erfüllen, die oft extra-lysosomal sind und trotz allgemein hoher Homologie in wichtigen Strukturbereichen Unterschiede aufweisen, die eine Spezifität der Inhibitoren erlauben. Bei irreversibler Hemmung durch peptidische Inhibitoren besteht theoretisch die Gefahr, dass der Peptidteil als Epitop zu Autoimmunerkrankungen führen kann. Dabei wird von [McKerrow \(1999\)](#) angenommen, dass dieses Problem nur bei Langzeitbehandlungen mit peptidischen Cysteinproteaseinhibitoren bei chronischen Krankheiten auftritt. Bei der Therapie von Parasiteninfektionen ist dagegen eine sehr kurze Behandlungszeit avisiert, bei der Autoimmunkrankheiten zunächst keine wesentliche Rolle spielen sollten ([McKerrow, 1999](#)). Ein anderes Problem könnten Nebenwirkungen in Zusammenhang mit der Hemmung des Proteasoms sein. Ein Grund warum keine Probleme mit der Toxizität beschrieben sind, könnte darin liegen, dass die Threoninprotease-Einheit im Proteasom durch Inhibitoren, welche drei hydrophobe Aminosäuren tragen, gehemmt wird, während die meisten entwickelten Cysteinprotease-Inhibitoren Di-Peptide sind ([McKerrow, 1999](#)).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte Autophagie bei Trypanosomen anhand autophagie-relevanter Proteine untersucht werden. Hierzu sollte zunächst das für autophagische Prozesse wichtige Markerprotein TbATG8 im Expressionssystem *E.coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Mit dem gereinigten Protein sollten (in Zusammenarbeit mit DESY, Hamburg) Proteinkristalle genügender Qualität erzeugt werden, um Beugungsdaten zu erhalten, die anschließend für eine Strukturaufklärung verwendet werden sollten. Diese Daten sollten erste wichtige strukturelle Hinweise über Autophagie bei Protozoen liefern. Für den Ablauf der Autophagie in Trypanosomen ist eine funktionierende ATG8-Konjugation entscheidend. Detaillierte Informationen über die Struktur von ATG8 aus *Trypanosoma brucei* könnten Hinweise für die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie dieser Erkrankung geben.

Wichtige Proteine für die Autophagie sind auch die lysosomalen Proteasen. Dabei ist die Cysteinprotease TbCatB von besonderer Bedeutung, da sie für das Überleben der Trypanosomen essenziell ist. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, TbCatB mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen (*Spodoptera*

frugiperda) zu exprimieren und aufzureinigen.

Eine anschließende Strukturaufklärung dieses Protein sollte es ermöglichen, Unterschiede zum humanen Cathepsin B zu identifizieren. Diese könnten für ein rationales Wirkstoffdesign genutzt werden.

Insgesamt sollte es die Aufklärung der Protein-Strukturen von TbATG8 und TbCatB ermöglichen, Autophagie in Trypanosomen dahingehend besser zu verstehen, dass potenzielle Ansatzpunkte für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren gegen *T.brucei* gefunden werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien

Für die Klonierungen wurden kompetente Zellen des Stammes XL1-Blue (Novagen) sowie TOP10 One Shot *E. coli* Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt. Für die Expression kamen BL21-DE3 (Invitrogen) zum Einsatz. Zum Herstellen des rekombinanten Virus wurden die im Bac-to-Bac[®]-Kit (Invitrogen) enthaltenen DH10-Bac Zellen verwendet.

2.1.2 Insektenzellen

Für die heterologe Expression wurden zunächst SF21-Zellen aus *Spodoptera frugiperda* aus dem BacPAK-Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet. Später wurde dann ausschliesslich mit Sf9-Zellen von Invitrogen gearbeitet, welche an serumfreies Medium adaptiert sind.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
6-His-Antibody (Rabbit)	Bethyl Laboratories
Anti-Cathepsin B Polyclonal (Rabbit)	Chemicon International
Anti-Cathepsin B Human Liver (Rabbit)	Calbiochem
Anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate	Sigma Aldrich

2.1.4 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Ammoniumpersulfat	FMC
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Cellfectin [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue G-250	Roth, Karlsruhe
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Eisessig (100 %)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Ethanol (100 %)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (ED-TA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma, Deisenhofen
Gentamicin	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin (99 %)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
HCl	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Magermilchpulver Fink	Roth, Karlsruhe
Methanol (100 %)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
MgCl ₂	Merck, Eurolab GmbH Deutschland

Fortsetzung

Produkt	Hersteller
NaCl	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Natriumthiosulfat-5-hydrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Sigma, Deisenhofen
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs (CH)
Penicillin/Streptomycin, 100fach	Sigma, Deisenhofen
Pepton	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
Propylenoxid	Plano, Marburg
Rotiphorese (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Eurolab GmbH Deutschland
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SDS	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Serva, Heidelberg
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Enzyme

2.1.5.1 Restriktionsenzyme

Enzymbezeichner	Hersteller
EcoRV, Eam1105I, Pst I, Nco I, HindIII, BamHI, XhoI, Kpn I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Sac I/II, Sap I, Sph I	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.1.5.2 Sonstige Enzyme

Enzymbezeichner	Hersteller
T4-DNA-Ligase, Alkalische Phosphatase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PNGase F	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
DNase I	Roche, Mannheim
Benzonase	Novagen ,Darmstadt
AcTEVProtease, AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.6 Plasmide

Zur Subklonierung wurde das TOPO TA Kit mit dem Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Als Expressionsvektor für *E. coli* kam pProEx-HTa mit His-tag (Invitrogen) zur Anwendung. Für die Herstellung des rekombinanten Virus in den Insektenzellen wurden die Vektoren des Bac-to-Bac[®]-Kits verwendet, pFastBac1, pFastBac-HTa/HTb und von dieser Gruppe abgeleitet der Vector pFastBac11-Cpo His von der Plasmid Information Database der Universität Harvard (s. Abb. 2.1, <http://plasmid.hms.harvard.edu>).

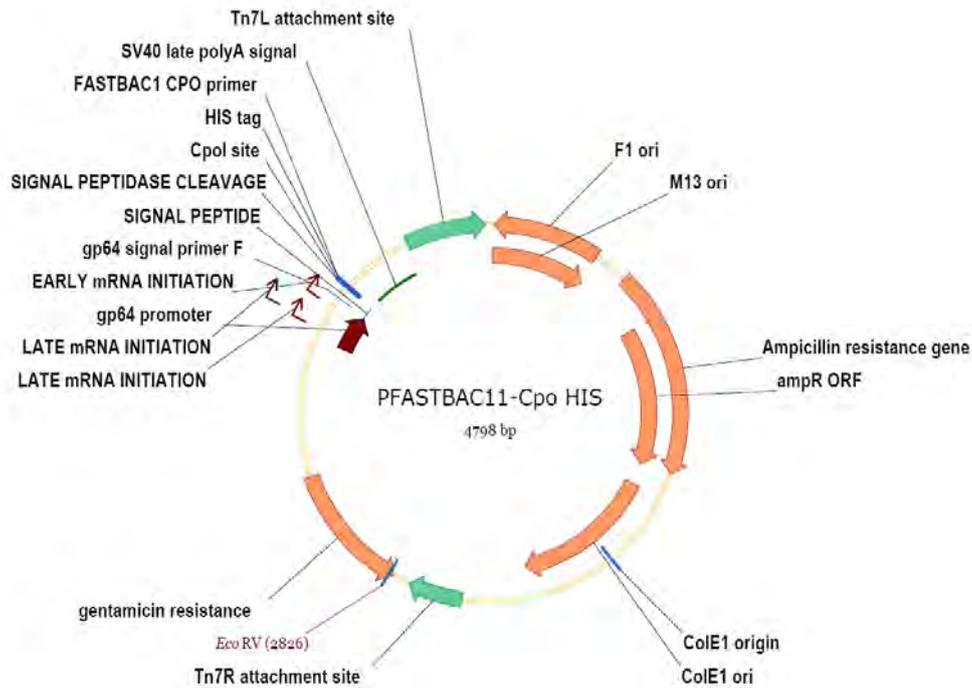


Abb. 2.1: Karte des Vektors *pFastBac11*

2.1.7 Primer

Primer wurden nach [Abd-Elsalam \(2003\)](#) und den darin genannten Webprogrammen bestimmt und von der Firma Operon hergestellt.

1. Primer für die Expression von TbATG8b im Vektor pProEX-HTa (Invitrogen) in *E. coli*

fw-NcoI-TbATG8: 5'-TGCCATGGGCATGAGTAAAAAAGATAGCA-3'

rv-PstI-TbATG8: 5'-TACTGCAGTTATCCAAATGTCGCCTCACC-3'

2. Primer für die Expression von TbCatB in Insektenzellen

Für den Vektor pFastBac11-Cpo His:

fw-CpoI-proTbcatB: 5'-TACGGTCCGGCCCTCGTTGCTGAAGACGC-3'

rv-proTbcatB-CpoI: 5'-TACGGACCGGCCGTGTTGGGTGCAAGAGG-3'

Für den Vektor pFastBac-1/HTB:

fw-BamHI-TbCatB: 5'-TAGGATCCATGCATCTCATGCGTGCCT-3'

rv-XhoI-TbCatB: 5'-TAACTCGAGCTACGCCGTGTTGGGTG-3'

3. Primer für die Expression von IMPDH in Insektenzellen

IMPDH_long im Vektor pFastBac HTB:

IMPDH-long-fw-BamHI: 5'-GGATCCATGGAAAACACCAACCTACGC-3'

IMPDH-long-rv-HindIII: 5'-GCAAGCTTAGAGCTTCGAGGCAAAGAG-3'

IMPDH_short im Vektor pFastBac HTB:

IMPDH_short-fw-BamHI: 5'-TAGGATCCATGGACACAGTGACGGAGA-3'

IMPDH_short-rv-HindIII: 5'-GCAAGCTTGCTTAGAGCTTCGAGG-3'

IMPDH_short im Vektor pFastBac HTA:

IMPDH_short-fw-BamHI: 5'-TCGGATCCGATGGACACAGTGAC-3'

IMPDH_short-rv-HindIII: 5'-GCAAGCTTGCTTAGAGCTTCGAGG-3'

4. Primer für die Sequenzierung

M13 Forward (-40): 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

pBakPAC-FP: 5'-TAAAATGATAACCATCTCGC-3'

pfbac1-rv-nterm-tbcadb: 5'-ATGAGATGCATGGATCCGCG-3'

pfbac1-fw-cterm-tbcadb: 5'-TATCTCGGAGGACATGCGG-3'

2.1.8 Kits

Produkt	Hersteller
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Cathepsin B Activity Assay Kit	BioVision, Inc., Mountain View, USA
Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.9 Medien

2.1.9.1 Insektenzellen

Für die Insektenzellkultur wurde EX-CELL 420 Serumfreies Medium mit L-Glutamine (Sigma, Deisenhofen), versetzt mit 5 ml/l Penicillin/Streptomycin Lösung, verwendet. Während der Lipofektion wurde z.T. Grace's Insect Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

2.1.9.2 Bakterien

LB-Medium, pH 7,4

Pepton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %

Die angegebenen Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Gegebenenfalls wurde das Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin versetzt (aus 1000X Stammlösung in 70% Ethanol).

SOC-Medium, pH 7

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

LB-Agarplatten

Die Kultivierung der *E. coli* auf Festmedium wurde mit 0,8 % Agarplatten durchgeführt. Vor Gebrauch wurden die Platten aus 2x LB-Medium und einer 1,6 % Agarlösung jeweils frisch hergestellt. Vor dem Gießen wurde das Medium mit Ampicillin bzw. für die DH10Bac-Platten mit Kanamycin, Gentamicin und Tetracyclin versetzt.

2.1.10 Puffer und Lösungen

2.1.10.1 Gelelektrophorese

TE-Puffer, pH 8

Tris	40 mM
EDTA	2 mM

EB-Puffer, pH 8,5

Tris-Cl	10 mM
---------	-------

TAE-Puffer (50x) pH 8,0

Tris / Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

Agarose Gel

TAE-Puffer (1x)	
Agarose	0,8 %
Ethidiumbromid	0,025 %

DNA-Probenpuffer, pH 8

5%	Glycerin
0,025%	Bromphenolblau
0,1M	EDTA

2.1.10.2 Proteine

RIPA-Lyse-Puffer, pH 7,4

50 mM	Tris-HCL
150 mM	NaCl
1,0% (v/v)	Igepal CA-630 (früher Nonidet P-40)
0,25% (w/v)	Natriumdeoxycholat
0,01% (w/v)	Natriumazid
0,1% (w/v)	SDS
1 mM	EDTA

AcTEV-Protease-Puffer, pH 7,5

50 mM	HEPES
100 mM	NaCl
0,5 mM	EDTA
0,5 mM	DTT

Kristall-Solubilisierungs-Puffer, pH 3,5

50 mM	Natriumacetat
-------	---------------

Rekristallisierungspuffer, pH 7

10 mM	HEPES
20 mM	NaCl

TbCatB-Aktivitäts-Puffer, pH 6

50 mM	Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄)
1 mM	DTT
1 mM	EDTA

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	7,7 mM
KH ₂ PO ₄	2,3 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM

Tris Buffered Saline (TBS), pH 7,4

Tris-HCL	25 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

2.1.10.3 Puffer für die Ni-NTA-Affinitätsreinigung**NPI-10-Bindepuffer pH 7,6**

50 mM NaH₂PO₄
 500 mM NaCl
 10 mM Imidazol

NPI-20-Waschpuffer pH 7,6

50 mM NaH₂PO₄
 500 mM NaCl
 20 mM Imidazol

NPI-500-Elutionspuffer pH 7,6

50 mM NaH₂PO₄
 500 mM NaCl
 500 mM Imidazol

Die NPI-Puffer wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und anschließend entgast. Für die Aufreinigung von TbCatB wurde pH 6,7 verwendet.

2.1.10.4 Puffer für SDS-PAGE-Gele

Zusammensetzung für vier 10%-Gele:

Lösung	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
Aqua bidest.	8,4 ml	6,6 ml
30% Acrylamid	2,0 ml	7,6 ml
1,0 M Tris/HCl(pH 8,8)		8,6 ml
1,0 M Tris/HCl(pH 6,8)	1,5 ml	
10% SDS	120 µl	120 µl
10% APS*	60 µl	60 µl
TEMED	12 µl	12 µl

Laufpuffer, pH 8,3 (10fach)

30 g Tris-Base
 144 g Glycin
 10 g SDS

mit aqua dest auf einen Liter auffüllen; pH-Wert sollte bei 8,9 liegen

Coomassie-Färbelösung

300 mg Coomassie brillant blue G-250
405 ml Methanol
70 ml Eisessig
auf einen Liter mit aqua dest. auffüllen

Entfärbelösung

400 ml Methanol
100 ml Eisessig
auf einen Liter mit aqua dest. auffüllen

Geltrocknungslösung

250 ml Ethanol p. a.
30 ml Glycerin (87%)

2.1.10.5 Western Blot**Transferpuffer, pH 9,2**

48 mM Tris
39 mM Glycin
3,75 ml/l 10% SDS
200,00 ml/Methanol

Waschpuffer, pH 7,4

10 mM Tris-HCL
150 mM NaCl
0,1 % Tween 20

AP-Puffer, pH 8,9

20 mM Tris-HCL
150 mM NaCl
10 mM MgCl₂ x 6 H₂O

Entwicklungslösung

0,38 mM BCIP, Toluidin-Salz (28,16 mg/ml in DMF)

0,40 mM NBT (32,7 mg/ml in 70% DMF)

ad 100 ml AP-Puffer

2.1.10.6 Elektronenmikroskopie**Cacodylatpuffer 2fach, pH 7,4**

200 mM Na-Cacodylat x 3 H₂O

234 mM Saccharose

Osmiumtetroxid-Lösung, 3%

0,25 g Osmiumtetroxid

8,18 ml Aqua bidest.

IEM-Fixier-Puffer, pH 7,2

0,1 M Pipes

4 % PFA (Paraformaldehyd)

0,05 % Glutaraldehyd

2.1.10.7 Sonstige Lösungen

Produkt	Hersteller
BugBuster Protein Reagent	Novagen
Ni-NTA Agarose beads	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzym-puffer I-IV	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protein Marker SM0431,SM1811	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific , Waltham, USA

2.1.11 Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
Slide-A-Lyzer 10 kDa Dialyse Kassetten	Fisher Scientific, Ulm
Ni-NTA Superflow Cartridge 1ml/5ml	Qiagen GmbH, Hilden
10 kDa NMWL Zentrikons	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen (1,5 und 5 ml)	Greiner, Frickenhausen
Plastikküvetten 10 x 10 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
CELLSTAR Filter Top Zellkultur Flaschen	Greiner, Frickenhausen
CELLMASTER Polystyrol Filter Rollerflasche	Greiner, Frickenhausen
Falcon Tubes (15, 50 ml)	Becton Dickinson Labware Europe
PCR-Eppendorfgefäß	Roth, Karlsruhe
Schott-Glasflaschen (50 ml - 1l)	Fischer Scientific, Ulm

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Reverse Transkription

Bereits isolierte trypanosomale RNA wurde mittels „Omniscript Reverse Transcription Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt:

„AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity“ (Invitrogen). Das PCR-Programm lautete wie folgt:

PCR-Programm		
	Temperatur	Dauer
Hot Start	95°C	5 min
Denaturieren	94°C	45 sec
Annealing	60°C*	30 sec
Extension	68°C	2 min
35 Zyklen		
Finale Extension	68°C	3 min

*abhängig vom jeweiligen Primer

HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). Das PCR-Programm lautete wie folgt:

PCR-Programm		
	Temperatur	Dauer
Aktivierung	95°C	15 min
Denaturieren	94°C	1 min
Annealing	60°C*	3 min
Extension	72°C	1 min
35 Zyklen		
Final Extension	72°C	10 min

*abhängig vom jeweiligen Primer

2.2.1.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Es wurde 0,5 g Agarose mit 50 ml 1x TAE-Puffer versetzt (0,8 % Agarosegel) und im Mikrowellenherd erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde dann mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in eine Flachbettkammer ausgegossen. Die aufzutragenden Proben (20 µl) wurden mit je 5 µl Laufpuffer (5x) versetzt und anschließend in die Taschen des Gels gefüllt. Als Marker wurde in verschiedenen Konzentrationen das Produkt *1 kb GeneRuler* der Firma Fermentas benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung wurde 60 min bei einer Spannung von 80 V ausgeführt und mittels Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA mit langwelligem UV-Licht (312 nm) ausgewertet.

2.2.1.4 Gelextraktion

Die DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und ein Teil mit Ethidiumbromid angefärbt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Die weitere Reinigung erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für eine Bestimmung der Konzentration wurden UV-Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photospektrometer durchgeführt. Hierbei entspricht ein Absorptionwert von 1 AU bei einem Lichtweg von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml für eine Doppelstrang-DNA bzw. 20 µg/ml im Falle einer einzelsträngigen DNA. Um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen, sollte die Absorption bei der Wellenlänge 260 nm mindestens um den Faktor 1,5 bis 2 höher sein als diejenige bei 280 nm. Da bei Plasmiden zirkuläre Doppelstrang-DNA vorliegt, wird in dem Fall folgende Gleichung angewendet:

$$A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05 = \text{Plasmid-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Die Restriktion der DNA erfolgte jeweils als 20 µl Ansatz. Es wurden vom Hersteller angegebene Puffer und Puffervolumina verwendet. Die Enzymmenge wurde entsprechend der zu verdauenden DNA-Menge eingesetzt. Die Dauer und die Temperatur der Restriktion waren von Enzym zu Enzym verschieden und wurden nach Herstellerangaben gewählt.

2.2.1.7 Minipräparation von Plasmid-DNA

Je 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und für 1 min mit 13.000 g (Microzentrifuge MC-13, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Bakterien-Sedimente in je 150 µl P1-Puffer resuspendiert und mit dem Vortex geschüttelt und bei Raumtemperatur 5 min stehen gelassen. Hierauf folgte die alkalische Lyse (4-6 invertieren bei 5 min) der Zellen durch Zugabe von je 150 µl P2-Puffer. Nach Zugabe von je 210 µl N3-Puffer zur Neutralisation wurde gut gemischt (4-6 min) und für 10 min mit 13.000 g zentrifugiert, um die ausgefällten Zellbestandteile abzutrennen. Die Überstände wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zur DNA-Fällung mit

je 900 µl eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt und 10 min mit 13.000 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und die präzipitierte, glasig erscheinende DNA 15-45 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl EB Puffer aufgenommen und gut resuspendiert.

2.2.1.8 Miniprep-Protokoll für Bacmid-DNA

Grundlage des folgenden Protokolls sind die Puffer des Qiagen-Mini-Kits (s.o.). Von einer 6 ml Bakterien-Übernachtskultur von positiv transformierten DH10Bac-Zellen in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, und 10 µg/ml Tetracyclin, wurden je 1,5 ml in zwei Eppendorfcups überführt und für 1 min mit 13.000 g (Microzentrifuge MC-13, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, jeweils die restlichen 1,5 ml der Kultur zugegeben und erneut abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in je 300 µl P1-Puffer resuspendiert und mit dem Vortex leicht geschüttelt. Hierauf folgte die alkalische Lyse (4-6 invertieren bei 5 min) der Zellen durch Zugabe von je 300 µl P2-Puffer. Nach Zugabe von je 300 µl N3-Puffer zur Neutralisation wurde vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 13.000 g zentrifugiert, um die ausgefallenen Zellbestandteile abzutrennen. Die Überstände wurden in 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, welche zur DNA-Fällung 800 µl Isopropanol enthielten. Nach vorsichtigem Invertieren wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze 10 min mit 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die DNA-Pellets wurden nun mit 0,5 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Pellets unter der Sterilbank luftgetrocknet und schließlich 30 µl steriler EB Puffer zugegeben. Die Pellets wurden durch gelegentliches, leichtes Antippen des Eppendorfcups gelöst und bei 4°C für die folgende Analyse per PCR / Transfektion aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wurde die Bacmid-DNA bei -20°C eingefroren (um ein „DNA-*shearing*“ zu vermeiden, sollte die Probe nicht wiederholt aufgetaut/eingefroren werden).

2.2.1.9 Dephosphorylierung

Die Vektor-DNA wurde nach Linearisierung mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und vor der Reinigung mittels Gelextraktion mit alkalischer Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)) entsprechend den Angaben des Herstellers New England Biolabs behandelt.

2.2.1.10 Ligation

Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers Fermentas GmbH mittels „Rapid DNA Ligation & Transformation Kit“ durchgeführt. Es wurden verschiedene Mengen Vektor-DNA mit der Fragment-DNA in verschiedenen Verhältnissen (1:1 bis 1:3) von pmol ends ($1 \mu\text{g of } 1000 \text{ bp DNA} = 1,52 \text{ pmol}$, $\text{Linear DNA pmol ends} = \text{pmol DNA} \times (\text{number of cuts} \times 2 + 2)$) eingesetzt. Es wurden abweichend vom Herstellerprotokoll $2 \mu\text{l}$ T4-Ligase eingesetzt und der Ligationsansatz für 1 h bei 22°C , 4 h bei 16°C und danach bei 4°C inkubiert.

2.2.1.11 Transformation

Es wurden XL1-Blue (Stratagene), TOP10 One Shot[®] und DH10Bac *E. coli* Zellen (beides Invitrogen) verwendet. In Anlehnung des Hersteller-Protokolls für die Transformation mit *One Shot TOP10 Competent Cells* gab es einzelne Modifikationen:

- Hitze-Schock bei 42°C für 30 sec (TOP10) / 45 sec (XL1 Blue, DH10Bac)
- den Ansatz sofort wieder auf Eis für 2 min
- Zusatz von $250 \mu\text{l}$ SOC Medium bei Raumtemperatur (bei DH10Bac $900 \mu\text{l}$)
- Inkubation im Eppendorfcup bei 37° im Shaker (200 rpm) für 45 min (bei DH10Bac 4 h)
- Ausstreichen von $50/200 \mu\text{l}$ des Ansatzes auf einer LB-Platte (mit Ampicillin, für DH10Bac: Kanamycin, Gentamicin, Tetracyclin und IPTG)

2.2.1.12 Kolonie-PCR-Test

Zur schnellen Überprüfung, ob eine Bakterienkolonie einen bestimmten DNA-Bereich enthält, wurde die entsprechende Kolonie für eine PCR verwendet. Für 8 Reaktionen wurde dazu zuvor der folgende Mastermix angesetzt:

Mastermix

HotStar Taq master mix	100 μl
Sense Primer	8 μl
Anti-Sense Primer	8 μl
RNase freies Wasser	84 μl

Von diesem Mastermix wurde jeweils 25 µl in ein PCR-Cup gegeben, die jeweilige Kolonie mit einer Mikropipettenspitze gepickt und kurz in den PCR-Ansatz getaucht. Dieselbe Spitze wurde dann auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Als Negativkontrolle wurden die verbleibenden 25 µl Mastermix ohne Zusatz von DNA verwendet. Als Positivkontrolle wurde bereits verifizierte Plasmid-DNA verwendet. Die PCR wurde nach HotStarTaq-Protokoll (s.2.2.1.2) durchgeführt und die Proben anschließend mit Hilfe eines Agarosegels überprüft.

2.2.1.13 Anlegen von Kulturstabilaten *E.coli*

Nachdem eine Hauptkultur über Nacht in die stationäre Phase eingetreten war, wurde 1 ml der jeweiligen Kultur abzentrifugiert (10.000 g, 24°C, 1 min) mit LB-Medium gewaschen und in 1 ml frischem Medium aufgenommen, das aus 70 % Glycerin bestand. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Proben wurden über Gelextraktion gereinigt und für eine „Run 24 supreme“-Sequenzierung bei GATC Biotech eingesandt. Als Primer wurden GATC-Standardprimer verwendet bzw. als Probe mitgegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden per Sequenzalignment mit der jeweiligen Gen- /Vektorsequenz verglichen.

2.2.2 Kultivierung von Organismen

2.2.2.1 Bakterienzellkultur

Anzucht auf Platten

Die Bakterienzellen wurden auf LB-Platten Ampicillin (50 µg/ml) über Nacht bei 37°C kultiviert.

Anzucht in Flüssigkultur

Die Bakterienzellen wurden in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) über Nacht bei 37°C und 175 rpm des Schüttlers kultiviert.

Bestimmung der Bakterienzellzahl (Trübungsmessung)

Die Zellzahl wurde spektrometrisch bei 595 nm gegen LB-Medium als Leerwert bestimmt. Dabei entspricht eine Konzentration der Zellen von 10^9 /ml einem OD_{595} von 0,5 - 0,8.

2.2.3 Insektenzellkultur

Die Kultivierung und Transfektion der *Spodoptera frugiperda*(Sf9)-Insektenzellen erfolgte in der Regel nach den Vorgaben des Bac-to-Bac[®]-Kits bzw. nach den Empfehlungen des Herstellers Invitrogen. Dennoch gab es während der Etablierung dieses Systems im Labor einige Anpassungen der Methoden, welche im folgenden aufgeführt sind.

2.2.3.1 Auftauen der Zellen

Ein Kryoröhrchen mit 2×10^6 Sf9-Zellen wurde dem Stickstoffbehälter entnommen und unter laufendem warmen Wasser aufgetaut. Das Röhrchen wurde von außen mit 70 %igem Ethanol abgerieben und die aufgetauten Zellen unter der Sterilbank in eine 25cm² Zellkulturflasche mit 5 ml kaltem Insektenzell-Medium überführt. Nun sollten vitale Zellen am Boden der Kulturflasche als Monolayer anhaften. Nach 30 min Inkubationszeit bei 27°C im Brutschrank wurde das Medium zusammen mit nichtanhaftenden Zellen abgenommen und durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Nun wurde die Zellkultur wachsen gelassen bis etwa eine 90 %ige Konfluenz erreicht wurde und die Kultur für eine Passagierung verwendet werden konnte.

2.2.3.2 Kultivierung von Monolayerkulturen

Die Kultivierung der Insektenzellen als adhärierende Monolayer erfolgte in Kulturflaschen verschiedener Größen mit Sterilfilter-Deckeln bei 27°C im Brutschrank. Erreichten die Zellen eine 90 %ige Konfluenz, so wurde das alte Medium verworfen und neues Medium dazugegeben, die Zellen dann durch Abspülen mit der Pipette oder vorsichtigem Gebrauch des Zellschabers in Lösung gebracht. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde dann die Zellkonzentration bestimmt und visuell die Vitalität der Zellen überprüft. Nach den in der Tabelle 2.6 aufgeführten Angaben wurden dann Monolayer-/Suspensions-Kulturen angesät.

Gefäß	Anzahl der Zellen	Volumen des Mediums
25-cm ² Flasche	1.0×10^6	5 ml
75-cm ² Flasche	3.0×10^6	10 ml
150-cm ² Flasche	6.0×10^6	30 ml

Tab. 2.6: Zelldichten für das Ansäen verschiedener Monolayergrößen

Die Passagierung als Monolayer erfolgte bis Passage 30; dann wurden frische Zellen aus Stabilaten herangezogen (s. 2.2.3.1).

2.2.3.3 Kultivierung von Suspensionskulturen

Für größere Zelldichten wurden aus Monolayern, welche mindestens zweimal passagiert worden waren, Suspensionkulturen mit einer minimalen Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml angesät, welche bei 110 rpm im Schüttler bei 27°C inkubiert wurden. Erreichten diese eine Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml wurden sie in frischer Kulturflasche verdünnt auf 3×10^5 Zellen/ml. Es wurden die gleichen Kulturflaschen wie bei den Monolayerkulturen verwendet, sie wurden aufrecht im Schüttler fixiert. Dabei war darauf zu achten, das Gefäßvolumen gegenüber dem Kulturvolumen genügend groß zu wählen, um eine gute Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Für Kulturen die größer als 150 ml waren, wurden 2100 ml-Rollerflaschen verwendet.

2.2.3.4 Herstellung von Stabilaten

Regelmäßig wurden Zellen bei niedriger Passage als Stabilate eingefroren, um genügend frische Zellen in Reserve zu haben. Dazu wurde eine vitale Suspensionkultur ausgezählt, abzentrifugiert und mit frischem Medium auf die Dichte von 4×10^6 Zellen/ml gebracht. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt und mit demselben Volumen an kaltem Medium, welches 20 v/v% DMSO enthielt, gemischt. Von dieser Lösung wurden nun jeweils 1 ml in Kryoröhrchen gegeben, welche zunächst für 12 h bei -20°C, dann über Nacht bei -70°C und danach in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

2.2.3.5 Transformation in DH10Bac Zellen

Ein Eppendorfcup DH10Bac-Zellen (Invitrogen) wurde dem -80°C Kühlschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Es wurde dann 1 ng (entspricht 5 µl) der jeweiligen rekombinanten Plasmid-DNA dazugegeben und das Eppendorf zur Durchmischung leicht angetippt. Anschließend wurde zunächst analog zu 2.2.1.11 verfahren. Der Ansatz wurde dann in zwei verschiedenen Verdünnungen ($10^{-1}, 10^{-2}$) auf LB-Platten ausgestrichen, welche 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin und 40 µg/ml IPTG enthielten, und für mindestens 48 h bei 37°C inkubiert. Über Blau-Weiss Selektion (Sambrook et al., 2001) wurde eine weiße Kolonie gewählt und erneut auf einer LB-Platte mit den oben

genannten Zusätzen inkubiert. Waren die Kolonien der neuen Platte ebenfalls weiß, wurde die Kolonie für die Isolierung von Bacmid-DNA nach 2.2.1.8 verwendet.

2.2.3.6 Transfektion

Eine 6-Well-Platte wurde pro Well mit 2 ml einer Sf9-Suspensionskultur mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml angesät und etwa 30 min gewartet, bis sich die Zellen angehaftet hatten. Während dieser Zeit wurden der Transfektionsansatz aus Lipofektionslösung und Bacmid-DNA wie folgt vorbereitet:

5 μ l der nach 2.2.1.8 gereinigten Bacmid-DNA (entsprach ca. 1 μ g DNA) wurden in einem sterilen Eppendorfcup mit 100 μ l un-supplimentiertem Grace's Medium verdünnt. Daneben wurden 6 μ l einer vorher gut geschüttelten Cellfectin-Lipofektionslösung in ein Eppendorfcup mit ebenfalls 100 μ l un-supplimentiertem Grace's Medium zugegeben. Beide Ansätze wurden sodann gemischt, invertiert und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende dieser Zeit wurde zu dem ca. 210 μ l großen Lipofektionsansatz 0,8 ml un-supplimentiertes Grace's Medium gegeben, das Medium in der 6-Well-Platte abgezogen und durch den nun ca. 1 ml umfassenden Lipofektionsansatz ersetzt. Dabei wurde mindestens ein Well als Kontrolle mit lediglich regulärem Excell-Kulturmedium versehen. Anschließend wurde die Platte für 5 h im Brutschrank bei 27°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgezogen und durch 2 ml frisches, reguläres Kulturmedium ersetzt.

Die Platte wurde dann für mindestens 72 h oder aber bis Zeichen einer Infektion wie Wachstumsstopp, Zellschwellung oder Lyse der Zellen zu beobachten waren, im Brutschrank inkubiert. Die Zellen im Kontrollwell sollten im Laufe der Zeit die gesamte Fläche zuwachsen, während sich bei transfizierten Wells zunehmend Zellen ablösen und schließlich lysieren sollten.

2.2.3.7 Bestimmung des Virus-Titers nach der Ausverdünnungsmethode

Angelehnt an Reed und Muench (1938) wurden Insektenzellen mit verschiedenen Verdünnungen infiziert und diejenige Verdünnung ermittelt, welche in 50 % der Fälle zu einer Infektion führt, die sogenannte TCID₅₀ (50 % *tissue-culture infectious dose*). Hieraus lässt sich dann die Anzahl infektiöser Virenpartikel pro ml Virusüberstand (pfu/ml, *plaque forming units pro ml*) berechnen. Nachfolgend ist der Ablauf zu dem in Abb. 2.2 gezeigten Pipettierschema beschrieben:

1. Es wurden 6 Virusverdünnungen à 100 μ l von 10^{-3} bis 10^{-8} angesetzt.

2. Es wurden 7 Plastikröhrchen mit jeweils 1,4 ml Sf9-Zellen der Dichte $5 \times 10^4/\text{ml}$ mit jeweils 70 μl einer Virusverdünnung angeimpft (das siebte Röhrchen mit 70 μl Medium als Negativ-Kontrolle).
3. Pro Röhrchen/Verdünnung wurden nun 7 Wells einer Reihe der 96-Loch Platte mit 0,2 ml der infizierten Zelllösung angesät und, nach 7 Tagen Inkubationszeit bei 27°C , ausgezählt und ausgewertet (s.u.).

Ein Beispiel einer Auswertung findet sich in der Abb. 2.2. Für jede Verdünnung wurden infizierte (+) /nicht-infizierte (-) Wells anhand der Morphologie (z.B. Zellschwellung, -Lyse, Kristallbildung) bzw. der Zelldichte bestimmt. Zu den infizierten Kulturen einer Verdünnung wurden noch alle infizierten Wells der höheren Verdünnungen hinzugezählt, unter der Annahme, dass die aktuelle Verdünnung diese Wells ebenfalls infiziert hätte. Umgekehrt gilt, dass für eine bestimmte Verdünnung die nicht-infizierten Wells der niedrigeren Verdünnungen durch die aktuelle Verdünnung ebenfalls nicht infiziert worden wären und damit zur Anzahl der direkt nicht-infizierten Wells dieser Verdünnung addiert wurden. Damit ergibt sich an dem hier gezeigten Beispiel, dass z.B. die 10^{-6} -Verdünnung 3 Wells direkt infiziert hat, aber auch die 2 infizierten Wells der höheren Verdünnung 10^{-7} infiziert hätte und damit ein Gesamtzahl von 5 positiven Kulturen aufweist. Umgekehrt gab es für die 10^{-6} -Verdünnung 4 direkt nicht-infizierte zu denen noch die 2 nicht-infizierten Kulturen der niedrigeren Verdünnung 10^{-5} addiert wurden und es damit insgesamt 6 nichtinfizierte Kulturen für diese Verdünnung sind.

96-Loch Platte								Verdünnung	infiziert	nichtinfiziert	%-infiziert
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	10^{-3}	24	0	100,000%
Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	10^{-4}	17	0	100,000%
Kontrolle	-	+	-	+	+	+	+	10^{-5}	10	2	83,333%
Kontrolle	+	+	-	-	-	+	-	10^{-6}	5	6	45,455%
Kontrolle	-	+	-	-	-	+	-	10^{-7}	2	11	15,385%
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	10^{-8}	0	18	0,000%
								PD	0,880		
								TCID ₅₀	1,32E-06		
								pfu/ml	5,234E+07		

Abb. 2.2: Beispielrechnung

Anhand der sich ergebenden Prozentzahlen der infizierten Kulturen, lässt sich diejenige Verdünnung bestimmen, bei der 50 % aller Kulturen infiziert worden wäre. Im Beispiel liegt diese zwischen 10^{-5} (A) und 10^{-6} (B). Zunächst wird der PD-Wert (proportionale Distanz zwischen der 50%-Infektionsstärke und der Infektionsstärke bei Verdünnung A

(83%) nach der Gleichung $PD = (\%beiA - 50)/(\%beiA - \%beiB)$ bestimmt. Mit diesem Wert lässt sich die $TCID_{50}$ wie folgt bestimmen:

$TCID_{50} = 10^{\text{Verdünnung bei A} - PD}$, im Beispiel ist $TCID_{50} = 10^{-5 - 0,88} = 10^{-5,88}$.

Schließlich lässt sich der Virus-Titer nach folgender Formel bestimmen:

$\text{Virus-Titer (pfu/ml)} = 1/TCID_{50} * \ln(2) * 100$ (um auf 1 ml zu kommen, da 10 μ l des Original-Virusstocks eingesetzt wurden).

Im Beispiel ergäbe sich ein Titer von:

$758577,57 * 0,69 * 100 = 5 * 10^7$ pfu/ml

Der Viren-Titer geht ein in die Berechnung der MOI (multiplicity of infection), welche reproduzierbare Infektionen ermöglicht.

2.2.3.8 TEM-Einbettung

Es wurden 1×10^8 -Sf9 Zellen bei 1500g und 4°C für 3 min abzentrifugiert und 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 1 h bei 4°C in 2 % (vol/vol) Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert und dann viermal in Cacodylatpuffer (jeweils 10 min) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen 15 min lang bei 4°C in 1,5 % (wt/vol) Osmiumtetroxid fixiert und dann jeweils für 10 min einmal in Cacodylatpuffer und dreimal in dH₂O gewaschen. Anschließend wurde dann mit 0.5 %-Uranylacetat bei Raumtemperatur 1h lang kontrastiert. Nachdem im Anschluß einmal mit dH₂O gewaschen wurde, wurde die Probe über jeweils 5-minütige Waschschrte in 50 %-, 70 %-, 95 %- und dreimal in 100 %-Ethanol sowie dreimal in Propylenoxid entwässert. Die Probe wurde eine Stunde bei Raumtemperatur eingebettet in 50 % Eponharz (in Propylenoxid) und eine weitere Stunde in reinem Eponharz in einem Beem-Cup bis die Probe dann übernacht bei 45°C und dann noch einmal 24h bei 60°C auspolymerisierte. Nach dem Trimmen der Probe wurden mit dem Ultramikrotom Schnitte angefertigt und mit Uranylacetat gefärbt und mit Blei-Citrat kontrastiert. Ausführlichere Darstellung bei [Denninger \(2007\)](#)[2.4.11, S.64].

2.2.3.9 Raster-EM-Einbettung

Verlauf der Einbettung bis zur Entwässerung wie unter 2.2.3.8 beschrieben. Die Entwässerung erfolgte zunächst bis zum 70 %igen Ethanol. Die folgende Preparation und die Rasteraufnahmen wurden von Herrn Karl-Heinz Hellmer im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Betz (Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten, Auf der Morgenstelle 28E, Universität Tübingen) durchgeführt. Nach dem Aufbringen der Probe auf einen mit Polylysin beschichteten Träger, folgte eine jeweils 8 h-Inkubation in 96 %igem und 100

%igem Ethanol. Es folgte eine Kritische-Punkt-Trocknung, bevor die Probe dann mit einer Palladium-Gold-Mischung (Schichtdicke 20 nm) metallisiert wurde. Für die eigentliche Rasterelektronenmikroskopie kam ein Cambridge Stereo Scan 250 Mk2 zur Anwendung.

2.2.3.10 Immun-EM-Einbettung

Es wurde eine 75 cm² ML-Insektenzellkultur mit P3-TbCatB-Virusstock bzw. P3-TbIMPDH-Virusstock bei einer MOI von 0,1 pfu/cell infiziert und bei 27°C inkubiert. Nach 72 bzw. 93 h wurden die Zellen durch Schütteln/Benutzung des Zellschabers abgelöst, in PBS gewaschen und in 1 ml IEM-Fixier-Puffer für 1 h auf Eis inkubiert. Für die weitere Bearbeitung wurde die Probe an das Labor von Dr. York Stierhof (Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen ZMBP, Universität Tübingen) gegeben.

2.2.4 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Angelehnt an [Bradford \(1976\)](#) wurde mit diesem Assay die Proteinkonzentration näherungsweise bestimmt. Zunächst wurden mit Hilfe einer 0,2 mg/ml BSA Stammlösung mehrere Verdünnungen für eine Standard-Kurve erstellt.

Proteinmenge (µg)	Stammlösung (µl)	dH ₂ O(µl)
2	10	790
4	20	780
6	30	770
8	40	760
10	50	750

Tab. 2.7: Zusammensetzung der Standards

Die Standardproben wurden doppelt angesetzt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und gut gemischt 5 min stehen gelassen. Eine Leerprobe mit 800 µl dH₂O und 200 µl Bradford-Reagenz wurde ebenfalls vorbereitet. Im Anschluß wurden die Proben im GeneQuant Photometer bei Wellenlänge 595 nm gemessen und mit dem Programm „Bradford“ über Regression eine Standardkurve erstellt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer bestimmten Probe wurde von dieser nun ebenfalls ein definiertes Volumen auf 800 µl dH₂O ergänzt und mit 200 µl Bradford-Reagenz

versetzt. Nach 5 min wurde dann die Absorption bei 595 nm gemessen und anhand der entsprechenden Standard-Kurve die Konzentration bestimmt.

2.2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zur Aufkonzentration wurde die Proteinlösung mit 1/5 des Ausgangsvolumens 80%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend abzentrifugiert (15000 g, 15 min, 4°C) und zweimal mit -20°C kaltem Aceton gewaschen. Danach wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in dem gewünschten Puffer, z.B. PBS, aufgenommen.

2.2.4.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte in einer Hoefer *mighty small* Gelapparatur nach der Methode von Laemmli (1970). Je nach Größe des Proteins wurde ein bestimmter prozentualer Anteil an Acrylamid verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist am Beispiel eines 5%igen Sammelgels und eines 10%igen Trenngels unter 2.1.10.4 aufgeführt. Die Geldicke betrug 0,75 mm. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in reduzierendem Probenpuffer für 5 min bei 100°C erhitzt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden käufliche Standardprotein-Lösungen als Marker mit aufgetrennt. Die Gele wurden unter Wasserkühlung bei einer maximalen Spannung von 160 V und einer konstanten Stromstärke von 10 mA per Gel für etwa 2 h laufen gelassen und dann für eine Coomassie-/Silberfärbung bzw. direkt für einen Western Blot verwendet.

2.2.4.4 Coomassie-Färbung

Nach der erfolgten Auftrennung der Proteine wurde von dem Gel das Sammelgel entfernt und das verbliebene Trenngel mit der Coomassie Färbelösung für 45 min bis 1 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Alternativ konnte die Färbung auch über Nacht bei 4°C stattfinden. Zur Entfärbung wurde das Gel für 1 h in Entfärbelösung inkubiert.

2.2.4.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt:

	Vorgang	Lösung	Dauer
1	Fixieren	Fixierungslösung	mindestens 10 min
2	Waschen	50% Ethanol	3 x 10 min
3	Imprägnierung	Imprägnierlösung	1 min
4	Waschen	H ₂ O bidest.	3 x 20 sec.
5	Färbung	Silbernitratlösung	20 min
6	Waschen	H ₂ O bidest.	2 min
7	Entwickeln	Entwicklungslösung	variabel
8	Waschen	H ₂ O bidest.	2 x 2 min
9	Stoppen	Stopplösung	10 min
10	Waschen	50 % Ethanol	20 min

2.2.4.6 Trocknung des Gels

Zwei Einmachfolien wurden für 5 min in Geltrocknungslösung gelegt. Das Gel wurde zwischen die Folien positioniert und in einem Rahmen gespannt. Das Trocknen erfolgte über Nacht im Abzug.

2.2.4.7 Western Blot

Die Proteinproben wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und direkt im Anschluss mit einem Semi-Dry Apparat geblottet. Das Gel wurde kurz in Transfer-Puffer (2.1.10.5) getaucht und auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-ECL, Amersham) gegeben, welche auf drei Lagen Whatman Blotting Papier lag, die sich auf der Anode-Platte befanden. Darüber wurden ebenfalls noch drei Lagen Whatman Blotting Papier gegeben und schließlich die Kathoden-Platte aufgelegt. Die Membran und das Whatmanpapier wurden vorher ausgiebig in Transferpuffer getränkt. Beim Aufbau des Stapels wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den Schichten verblieben.

Es wurde nun eine Spannung von maximal 20 V und ein konstanter Strom von 400 mA für 1 h angelegt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 2xPBS mit 10% Milchpulver blockiert, während ggf. das Gel zur Kontrolle des Blotvorgangs silbergefärbt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran 5 x 5 min in Waschpuffer unter leichtem Schütteln gewaschen, um danach für eine Stunde mit dem Primärantikörper, welcher in TBS-Puffer verdünnt war, inkubiert zu werden. Wieder wurde die Membran wie zuvor 5 x 5 min gewaschen und im Anschluss für eine Stunde mit dem verdünnten Sekundärantikörper leicht schüttelnd inkubiert. Nach erneuten 5 x 5 min Waschschrritten wurde der Blot

schließlich in Entwicklungslösung inkubiert bis sich erste gefärbte Banden zeigten. Sofort wurde dann mit 2xPBS gestoppt, der Blot wurde eingescannt und auf Whatman Blotting Papier luftgetrocknet.

2.2.5 TbATG8 in E.coli

2.2.5.1 Expression

Eine über Nacht gewachsene 3 ml Vorkultur von BL21-TbATG8-Zellen wurde verwendet, um eine 450 ml Hauptkultur anzupfen. Erreichte diese eine optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,8, so wurde sie mit 0,4 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) versetzt und anschließend für 8 h bei 37°C bei 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 min geerntet und das Pellet mit 20 ml BugBuster[®]-Lysepuffer gelöst und Benzonase und Protease-Inhibitoren hinzugefügt. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur für 30 min im Schüttler bei 180 rpm inkubiert und dann für 20 min bei 16.000 g abzentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und im Anschluss für eine Säulenreinigung verwendet.

2.2.5.2 Affinitätschromatographie

Der Überstand wurde 1:1 mit NPI-10-Bindepuffer verdünnt und innerhalb des Äkta FPLC-Systems auf eine 5 ml Ni-NTA Fertigsäule gegeben, welche zuvor mit 20 ml NPI-10-Bindepuffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde dann mit NPI-20-Waschpuffer gewaschen bis die Extinktion bei 280 nm einen stabilen Wert nahe der Null-Linie erreicht hatte. Das Protein wurde anschließend mittels eines 10 ml Gradienten auf den NPI-500-Elutionspuffer von der Säule eluiert; hierbei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Durch Analyse des Chromatogramms und über SDS-PAGE konnten die Fraktionen, welche reines TbATG8 enthielten identifiziert und vereint werden.

2.2.5.3 Abspaltung des His-tags

Die Proteinprobe wurde mit Hilfe einer Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassette (10 kDa *nominal molecular weight limit* (NMWL)) über Nacht gegen AcTEV-Protease-Puffer ausgetauscht. Anschließend wurde durch Inkubation mit 200 U AcTEV-Protease für 4 h bei RT und dann über Nacht bei 4°C der His-tag abgespalten. Um nun das ungetaggte TbATG8 zu erhalten,

wurde der Ansatz nun 1:1 mit NPI-20-Waschpuffer versetzt und auf eine 1 ml Ni-NTA-Säule, welche mit Wasch-Puffer equilibriert worden war, gegeben. Dabei blieben His-tag, Reste von His-TbATG8 und die ebenfalls His-getaggte Protease an der Säule hängen, während das ungetaggte Protein in der Durchflussfraktion zu finden war. Wieder wurden die Peak-Fractionen gesammelt und über 10 kDa NMWL Zentrikons so aufkonzentriert, dass der Proteinansatz für folgende Anwendungen wie z.B. Kristallisation eine geeignete Konzentration aufwies.

2.2.5.4 Kristallisierung

Initiale Kristallisierungsbedingungen wurden mittels des kommerziellen Screening Kits (Classic Suite, Qiagen) gefunden und dann manuell weiter optimiert. Für die Anwendung der „hanging-drop“-Methode wurden 3 µl der Proteinlösung (8 mg/ml protein in 100 mM Tris/HCL Puffer, pH 6.5) mit 3 µl der Präzipitationslösung (22% v/v PEG 4000, 200 mM Ammoniumsulfat, 100 mM MES, pH 6.5) gemischt und gegen 500 µl der Präzipitationslösung equilibriert. Die Kristallisationsansätze wurden bei 16°C gelagert bis sich nach zwei Wochen Kristalle bildeten (s.a. Methodenteil [Koopmann et al. \(2009\)](#)).

2.2.6 TbCatB in Sf9

2.2.6.1 Isolierung und Resolubilisierung der *in vivo*-Kristalle

Suspensionskultur

Die infizierten Sf9-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 g für 5 min geerntet, das Pellet in RIPA-Lyse-Puffer resuspendiert, stark gevortext und bei 4°C für 15 min bzw. über Nacht inkubiert. Es folgten mindestens zwei Waschschrte mit destilliertem Wasser bzw. PBS mit zwischenzeitlichem starken Vortexen. Dann wurde das Pellet in Kristall-Resolubilisierungs-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 16.000 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand mit dem resolubilierten Protein abgenommen und per Zentrikon mit einem 10 kDa-cutoff aufkonzentriert. Gleichzeitig wurde der Ansatz auf den jeweiligen Puffer der weiteren Verwendung, z.B. TbCatB-Aktivitätspuffer, umgepuffert.

Monolayerkultur

Hier wurde zunächst das Medium abgenommen und freie Zellen/Kristalle abzentrifugiert. Die verbleibenden anhaftenden Zellen wurden durch direkte Zugabe von RIPA-Lyse-Puffer und anschließender Inkubation bei RT (alternativ wurde die gesamte mit RIPA-Puffer

überdeckte Kultur bei 4°C gelagert) auf einem Schüttler abgelöst und lysiert. Anschließend wurde diese Lösung mit dem vorherigen Zellpellet vereinigt und weiter wie für Suspensionskulturen verfahren.

Bei der Lyse bildete die DNA aus den Zellen teilweise mit den Kristallen Aggregate, hier wurde dann dem RIPA-Puffer 25 units/ml Benzonase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.6.2 Deglykosylierung

Abweichend von den Angaben des Herstellers New England Biolabs wurde die Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) unter nativen Bedingungen eingesetzt und dafür die Inkubationszeit verlängert. Hierbei zeigte sich, dass eine Menge von 50 U (units) / μg Protein im mitgelieferten G7-Aktivitätspuffer bei 25°C über Nacht inkubiert ausreichend war, um z.B. TbCatB vollständig zu deglykosylieren.

2.2.6.3 Tunicamycin-Behandlung

Es wurden zwei 75 cm² ML-Insektenzellkulturen mit P3-TbCatB-Virusstock bzw. P3-TbIMPDPH-Virusstock bei einer MOI von 0,1 pfu/cell infiziert und bei 27°C inkubiert. 28 h nach der Infektion wurde jeweils einer ML-Kultur der beiden jeweiligen Infektionen 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin zugegeben und diese Kulturen dann bei RT weiter inkubiert. Nach 72 h wurden die induzierten und unbehandelten Zellen mit dem Lichtmikroskop verglichen und anschließend durch Schütteln/Benutzung des Zellschabers abgelöst und in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für eine TEM-Einbettung nach 2.2.3.8 verwendet und hier ebenfalls verglichen.

2.2.6.4 Rekrystallisierung

Die Kristalle wurden wie oben beschrieben aus Zellen isoliert, resolubilisiert und über ein Zentrifugen mit einem 10 kDa-cutoff auf Rekrystallisierungspuffer gebracht. Anschließend wurde zur Deglykolisierung unter nativen Bedingungen N-Glycosidase F in der Menge 1 U/ μg Protein zugesetzt und der Ansatz bei 25°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz mittels Zentrifugen auf 2 mg/ml aufkonzentriert. Die anschließende Kristallisation und Messung der Beugungsdaten wurden von Karolina Cupelli (Stehle Gruppe, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) durchgeführt. Die Kristalle wurden mittels der „sitting-drop“-Methode erzeugt, wobei TbCatB-Proteinlösung (2

mg/ml Protein in 10mM HEPES, 20mM NaCl, pH 7) im Verhältnis 1:1 mit Präzipitationslösung (22-30% w/v PEG 3000 und 200-400 mM Diammoniumphosphat ((NH₄)₂HPO₄)) gemischt wurde.

2.2.6.5 Affinitätschromatographie mit TbCatB-His

Eine 50 ml Sf9-Suspensionskultur mit 10⁶ Zellen/ml wurde mit P2-TbCatB-Cpo-Virusstock infiziert (MOI = 0,1 pfu/cell) und dann für 110 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet und der Überstand nochmals bei 4°C und 16.000 g für 20 min abzentrifugiert, um nur die löslichen Proteine auf die Säule zu geben. Diese 40 ml wurden dann analog zu 2.2.5.2 über eine 1 ml Ni-NTA Säule mit den für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie beschriebenen Puffern (2.1.10.3) mittels der ÄktaPrime gereinigt. Zur Eluation wurde ein 10 ml Gradient auf den NPI-500-Eluationspuffer verwendet.

2.2.6.6 Cathepsin B Aktivitätsassay

Die Aktivität von TbCatB wurde mittels des „Cathepsin B Activity Assay Kit“ von Bio-Vision über die freigesetzte Fluoreszenz nach 1-stündiger Inkubation des Enzyms mit dem Substrat Ac-RR-AFC (Arg-Arg-amino-4-trifluoromethyl coumarin) bei 37°C gemessen. Hierzu wurden pro Ansatz 25 µl des mitgelieferten CB-Reaktionspuffers, dem 200 µM des Substrats Ac-RR-AFC beigesetzt waren, mit der jeweiligen Menge des Proteins (bzw. Inhibitor) in TbCatB-Aktivitätspuffer gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 4 ml Ampuwa verdünnt, in eine Quarzküvette gefüllt und die Fluoreszenzemission bei 495 nm in einem PerkinElmer LS 55 Fluoreszenz Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Strukturaufklärung von TbATG8

3.1.1 Klonierung

Aus den drei ATG8-Genen wurde für die Klonierung das Gen TbATG8B (GeneDB ID: Tb927.7.5910) ausgewählt, da es aufgrund der Sequenzhomologie und der C-terminalen Erweiterung, am ehesten für ein funktionales ATG8-Protein in *T.brucei* codiert (s. 1.2.1). Der Einfachheit halber wird TbATG8B im folgenden mit TbATG8 bezeichnet.

Aus trypanosomaler cDNA wurde mit den Primern für TbATG8 (s. 2.1.7) eine PCR nach dem Protokoll zur „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity“ von Invitrogen (2.2.1.2) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Die Primer wurden so konstruiert, dass sich am 5'-Ende des PCR-Produkts eine Nco I- und am 3'-Ende eine Pst I-Restriktionsschnittstelle befand, um das PCR-Produkt später in das Expressions-Plasmid pProEx-HTa ligieren zu können. Dieser Vektor besitzt am 5'-Ende der *multiple cloning*

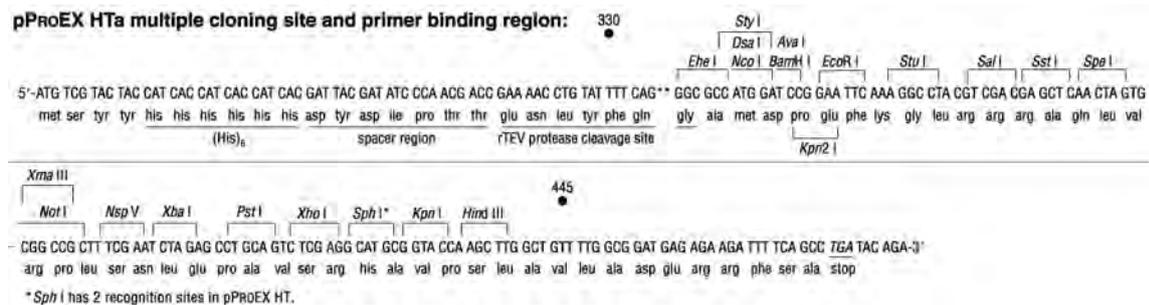


Abb. 3.1: MCS von pProEx-HTa

site (MCS) (s. Abb. 3.1) die Sequenz für einen dem exprimierten Protein N-terminal vorgeschalteten His-tag und eine Erkennungssequenz für die *tobacco etch virus*-Protease (TEV-Protease), welche es später ermöglicht den His-tag vom Protein abzuspalten. Um für weitere Untersuchungen die prozessierte Form des TbATG8 zur Verfügung zu haben, wurde

das entsprechende Codon für das C-terminale Cystein beim Primerdesign weggelassen. Der PCR-Ansatz wurde direkt für eine TOPO-TA-Subklonierung in XL1-Blue-*E.coli*-Zellen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Nach Überprüfung der Plasmid-DNA einer weissen Kolonie über Restriktionsanalyse wurde das Fragment mit Nco I und Pst I ausgeschnitten und über ein Gel aufgereinigt (2.2.1.4). Auf die gleiche Weise wurde die DNA des Expressionsplasmids pProEX-HTa behandelt. Der linearisierte Vektor (4678 bp) wurde zur Überprüfung der Reinheit zusammen mit dem TbATG8-DNA-Fragment (372 bp) auf ein Agarose-Gel aufgetragen (s. Abb. 3.2a) und anschließend für die Ligation (s. 2.2.1.10) verwendet.

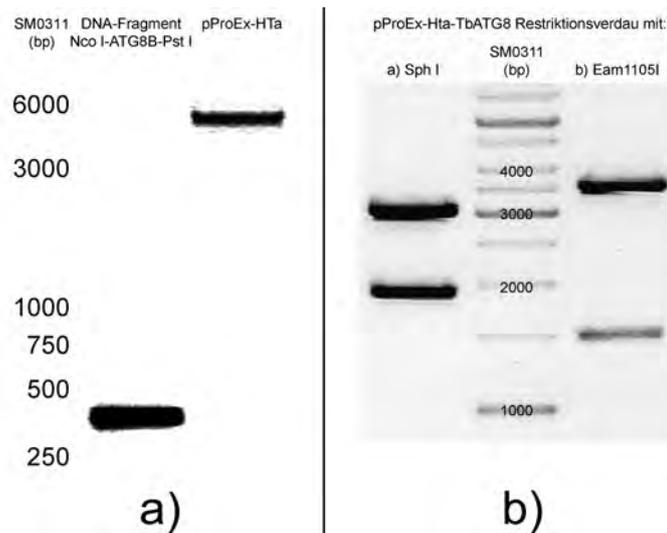


Abb. 3.2: Agarosegele: a) *pProEX-HTa* linearisiert und *ATG8B-DNA-Fragment*, b) Restriktionsanalyse

Vom Ligationsansatz wurden 2 μ l verwendet um TOP10-*E.coli*-Zellen zu transformieren. Über Restriktionsanalyse konnte eine Kolonie identifiziert werden, welche das korrekte Bandenmuster für den Einbau der TbATG8-DNA in pProEx-HTa aufwies. Für den Verdau mit dem Enzym Sph I waren dies Banden bei 3115 bp und 1935 bp, für Eam1105I Banden bei 3539 bp und 1511 bp (s. Abb. 3.2b)) Schließlich wurde Plasmid-DNA dieser Kolonie aufgereinigt und verwendet, um BL21-DE3-*E.coli*-Zellen zu transformieren (im Folgenden BL21-TbATG8 genannt).

3.1.2 Expression und Aufreinigung

Die Expression von TbATG8 wurde in BL21-TbATG8-Zellen wie unter 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die von Debris und unlöslichen Proteinen gereinigte Fraktion des Zelllysats

wurde im Anschluss, wie unter 2.2.5.2 dargestellt, für eine Affinitätschromatographie mittels einer Ni-NTA-Säule verwendet. Die Peak-Fractionen der Elution wurden vereinigt

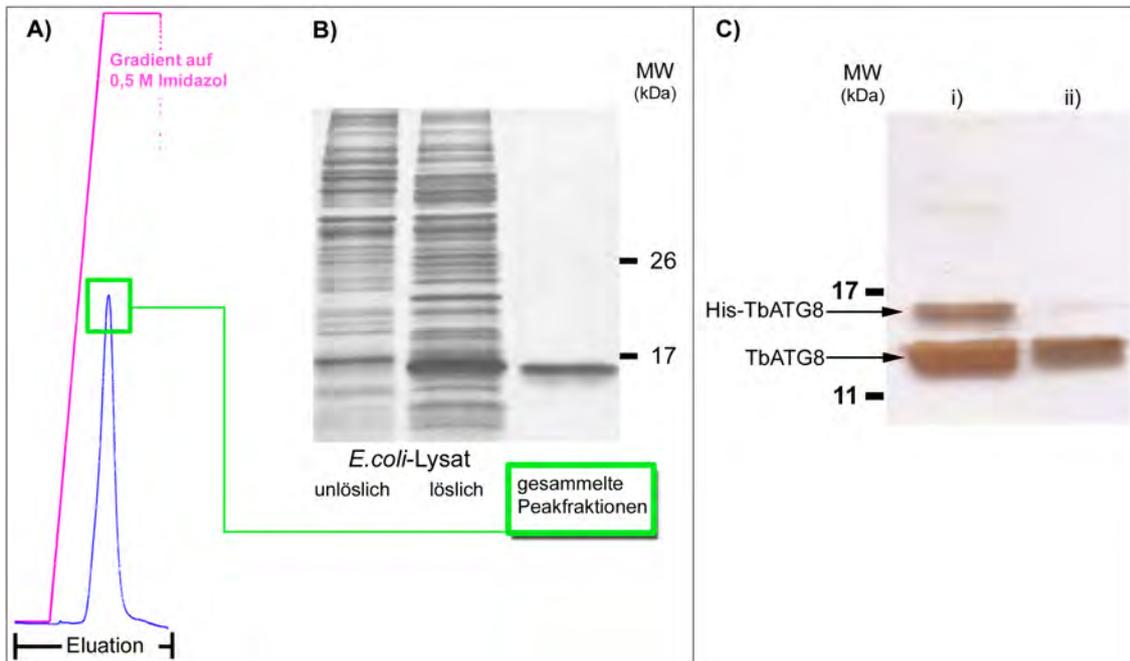


Abb. 3.3: A) Ni-NTA Elution, B) SDS-PAGE Analyse Zellysate und Peakfraktionen der Elution, C) Abspaltung des His-tags mit AcTEV-Protease, i) gereinigtes His-TbATG8 inkubiert mit AcTEV-Protease, ii) reines TbATG8 durch zweiten Säulendurchlauf

und ein Teil dieser Probe zusammen mit Überstand- und Pelletfraktion des Zellysates auf einem 15 %-SDS-Gel aufgetrennt (s. Abb. 3.3.B). Das isolierte His-TbATG8 ist bei ca. 16 kDa als singuläre Bande zu sehen.

Da sich der His-tag bei späterer Verwendung des Proteins für die Kristallisation als hinderlich erwiesen hatte, wurde dieser mit der spezifischen AcTEV-Protease abgespalten und der Proteinansatz erneut über eine Ni-NTA-Säule gereinigt (s. hierzu 2.2.5.3). Nach dieser Prozedur enthielt der Proteinansatz nur noch das aufgereinigte TbATG8. Die Abb. 3.3.C zeigt His-TbATG8 vor der Abspaltung des Tags (i) und in der ungetaggten Form als Proteinbande bei ca. 14 kDa (ii). Die Ausbeute an reinem TbATG8 nach allen Arbeitsschritten lag bei etwa 5 mg/l Kulturvolumen. Das gereinigte Protein wurde nun für Kristallisationsversuche eingesetzt.

3.1.3 Kristallisierung und Datenanalyse

Die Kristallisierung und Messung der Kristalldaten wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Christian Betzel an der Universität Hamburg bzw. dem Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) durchgeführt. Die Kristallisationsbedingungen wurden mit Hilfe eines kommerzielles Screening Kits gefunden und optimiert (s. 2.2.5.4). Die Kris-



Abb. 3.4: TbATG8-Kristalle unter dem Lichtmikroskop

talle (s. Abb. 3.4) wurden durch Dampfdiffusion nach der „hanging-drop“-Methode erzeugt und am Synchrotron Labor ELETTRA in Triest auf einem MAR CCD-Detektor bei einer Wellenlänge von 1 Å gemessen.

3.1.4 Molekularer Ersatz

Die gemessenen Beugungsdaten wurden mit dem Programm *imosfm* (Leslie, 1992) indiziert, integriert und skaliert. Dabei stellte sich heraus, dass der TbATG8-Kristall zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ gehört. Die Einheitszelle hatte eine Dimension von $a = 48.1$ Å, $b = 48.6$ Å, $c = 127.92$ Å und enthielt zwei Moleküle pro asymmetrischer Einheit.

Für den molekularen Ersatz wurde das Programm-Paket MOLREP (CCP4, 1994) und als Modell die Koordinaten des bovinen GATE-16 („golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa“, PDB ID: 1EO6, Paz et al. (2000)) verwendet. Das Modell der Struktur von TbATG8 wurde über mehrere Zyklen der Modifikation und des „Refinements“ mit der Software REFMAC (Murshudov et al., 1999) verfeinert. Daten oberhalb einer Auflösung von 2,3 Å wurden nicht verwendet, da der Kristall eine erhöhte Fragilität gegenüber dem

Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	48.10
b (Å)	48.60
c (Å)	127.92
V _M (Å ³ /Da)	2.67
Solvent content (%)	54.0
Completeness of data (%)	97.4 (92.9)
No. of total reflections	52190
Average I/sigma Intensity	18.7 (4.8)
Resolution (Å)	25-2.3
R _{merge} (%) ^a	5.8 (25.9)
No. of reflections used in refinement	12834
R _{crystal} (%) ^b	23.4 (27.5)
No. of reflections used in R _{free}	677
R _{free} (%) ^c	30.1 (47.0)
Protein atoms	1864
Solvent atoms	165
Average B factor (Å ²):	
Main-chain atoms	31.2
side-chain atoms	33.1
Solvent molecules	33.4
Root mean square deviation:	
bonds (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.414
Residues in regions of the Ramachandran plot (%):	
Most favoured	97.7
Allowed	1.4
Disallowed	0.9

Values in parentheses are for the highest resolution shell (2.3-2.36 Å).

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - [I(hkl)] \frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}{\sum_{hkl}}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ and $[I(hkl)]$ are the observed individual and mean intensities of a reflection with indices hkl respectively, \sum_i is the sum over the individual measurements of a reflection with indices hkl and \sum_{hkl} is the sum over all reflections.

^b $R_{crystal} = \frac{\sum ||F_{obs} - F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$, where F_{obs} and F_{calc} are observed and calculated structure factors, respectively.

^c R_{free} was calculated using randomly selected 5 % of the reflections.

Tab. 3.1: *Datensammlung und Refinement-Statistik*

Kryoprotektant zeigte bzw. Eisringe auftraten. Der Fortschritt der Verfeinerung wurde während des Prozesses anhand einer kontinuierlichen Abnahme des R und R_{free} Werts gemessen (Brunger, 1993). Lösungsmittelmoleküle wurden nach jedem Refinement-Zyklus manuell bzw. automatisch mit dem Programm wARP (Perrakis et al., 1999) an Stellen, wo es der Elektronendichte nach wahrscheinlich war, in das Modell eingefügt. Die stereochemische Qualität des finalen Modells wurde durch die Software PROCHECK (Laskowski et al., 1993) bestimmt; eine detaillierte Zusammenstellung darüber und der Parameter des

Refinementprozesses finden sich in der Tabelle 3.1. Die Koordinaten der Struktur wurden bei der RCSB-Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>, Berman et al. (2000)) mit dem ID-Code 3H9D hinterlegt.

3.1.5 Eigenschaften der Struktur von TbATG8

Die Struktur von TbATG8 (s.Abb.3.5.a) zeigt eine Ubiquitin-ähnliche Faltung, die aus einem zentralen β -Faltblattbereich ($\beta 1$ bis $\beta 4$) und zwei dazwischen gelagerten α -Helices ($\alpha 3$ - $\alpha 4$) besteht und am N-terminus durch zwei zusätzliche α -Helices (α -1 und α -2) ergänzt wird.

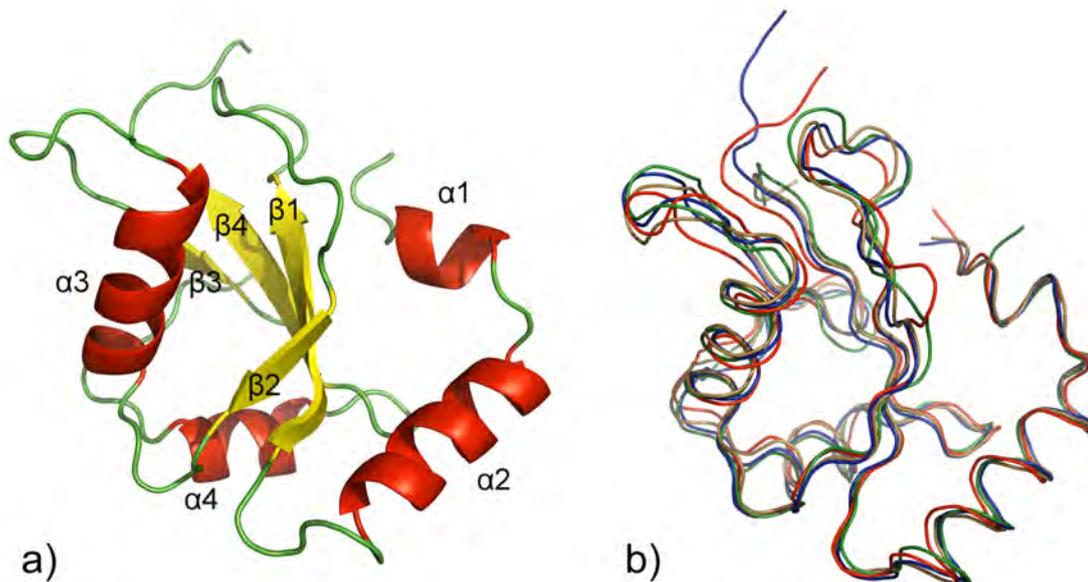


Abb. 3.5: a) Kristallstruktur von TbATG8 in Ribbon-Darstellung der Sekundärstrukturen, b) Überlagerung von TbATG8-verwandten Strukturen verschiedener Organismen (rot = TbATG8, blau = Gate-16 (*Bos taurus*, PDB-ID 1e06), grün = LC3 (*Rattus norvegicus*, PDB-ID 1ugm), braun = GABA(A) Receptor Associated Protein (*Rattus norvegicus*, PDB-ID 1kjt).

TbATG8 gehört damit zu der Untergruppe der strukturell stark konservierten Ubiquitin-like modifiers (Ubl, Ponder und Bogyo (2007)) innerhalb der Ubiquitin-Familie, wie z.B. das GATE-16 (Paz et al., 2000). In der Abbildung 3.5.b) ist eine Überlagerung von TbATG8 mit verwandten Strukturen zu sehen deren *root-means square distance* (r.m.s.d.) von 111 α -C-Atomen einen Wert von 1,26 Å ergab (berechnet mit SUPERPOSE (Maiti et al., 2004)).

3.1.6 Interaktion von TbATG8 mit ATG4

ATG8 aus Hefen geht mit einer Reihe von Proteinen Wechselwirkungen ein, wobei über Mutationsstudien potentielle Interaktionsstellen und daran beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden konnten (Nakatogawa et al., 2007). Insbesondere Amar et al. (2006) konnten zwei für die Interaktion wichtige Bereiche und beteiligte Reste in der Proteinstruktur des ATG8 aus Hefen bestimmen.

Der erste Bereich umfasst die Reste TbATG8-Phe80 und -Tyr82, die beide Teil des Erkennungsbereich für ATG4 sind und für die Prozessierung durch ATG4 essenziell sind (Amar et al., 2006). Diese Erkenntnisse wurden durch die Strukturuntersuchungen des Komplexes von *microtubule-associated light chain 3*-Protein (LC3) aus *Rattus norvegicus* und humanem ATG4 bestätigt (Satoo et al., 2009), die diese Reste eindeutig als Teil der Binderegion der beiden Proteine auswiesen.

Um eine potentiell mögliche Interaktion zwischen TbATG8 und ATG4 darzustellen, wurde die Struktur von TbATG8 mit der Struktur des RnLC3 aus dem Komplex mit HsATG4 (Satoo et al., 2009) räumlich mithilfe der Alignmentfunktion von PyMOL (DeLano, 2002) überlagert. Dabei stellte sich heraus, dass TbATG8-Phe80, welches innerhalb der ATG8-Familie gut konserviert ist, eine sehr ähnliche Orientierung gegenüber ATG4 zeigt, wie das entsprechende RnLC3-Phe80. Hingegen findet sich statt des hydrophoben Leu82 beim LC3 von *R. norvegicus* beim ATG8 von *T. brucei* das polarere Tyr82, wodurch an dieser Stelle eine andere Wechselwirkung zum entsprechenden ATG4 bei Trypanosomen erklärbar wäre.

Der zweite von Amar et al. (2006) gefundene Interaktionsbereich von ATG8 wird durch die beiden Reste TbATG8-Phe52 und -Leu53 gebildet. Dieser Teil der Proteinoberfläche ist wichtig für die Aktivierung der lipidierten Form von ATG8 durch ATG7 und ATG3. Ferner konnten Nakatogawa et al. (2007) zeigen, dass Mutationen in den Resten TbATG8-Asp105, -Phe107, -Tyr109 die Zusammenlagerung von Membranen während der Autophagie stören. Diese Reste werden durch eine Änderung der Struktur der N-terminalen Region während der Konjugation des Phosphatidylethanolamin zugänglich (Ichimura et al., 2004). Diese geschlossene bzw. geöffnete Form der N-terminalen Domäne bei Mitgliedern der ATG8-Familie ist auf struktureller Ebene bei GABARAP bekannt (Coyle et al., 2002). Da all diese Reste bei TbATG8 in identischer Weise vorkommen, ist die Annahme berechtigt, dass der Mechanismus der Aktivierung und Lipidierung auch bei *T. brucei* konserviert ist.

Für ein erstes, simples Modell des Komplexes aus TbATG8 und TbATG4.1 wurde mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers (Arnold et al., 2006) ein Homology-Modell erstellt und damit

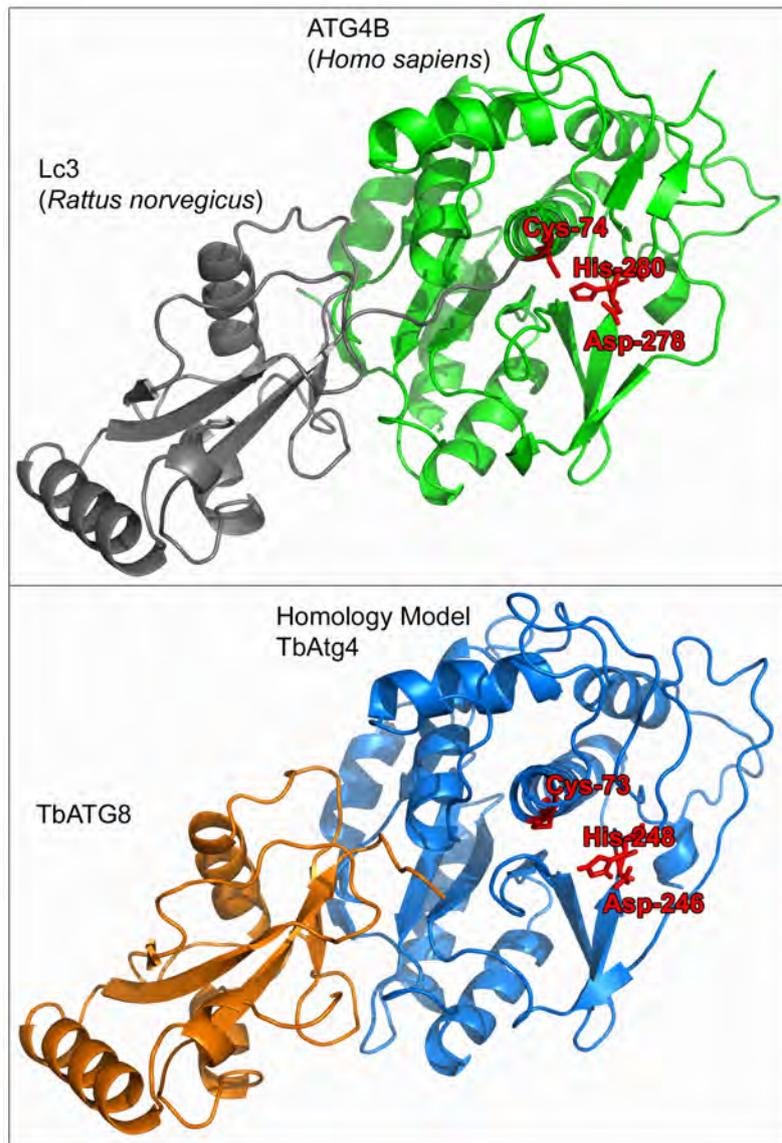


Abb. 3.6: 3D-Struktur des ATG4B-LC3 Komplex (oben) verglichen mit dem Docking des Homologie Modells von TbATG4.1 gegen TbATG8 (unten)

ein Proteindocking mittels des HADDOCK-Dockingservers (Dominguez et al., 2003) gegen die Struktur von TbATG8 durchgeführt. In der Abb. 3.6 ist das nach HADDOCK wahrscheinlichste Docking zusammen mit dem Komplex aus RnLC3 und HsATG4.1 dargestellt (da TbATG8 nicht im Komplex mit ATG4 kristallisiert wurde, kommt der C-terminus nicht in der gestreckten Form in der katalytischen Domäne zu liegen, im realen Komplex wäre dies u.a. durch Protein-Protein Wechselwirkungen möglich). Im Vergleich wird deutlich, dass die Komplexbildung bei den trypanosomalen Proteinen auf sehr ähnliche Weise wie in den höheren Eukaryonten zustandekommen kann.

3.2 Expression von TbCatB unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle und Bestimmung der Struktur

Die heterologe Expression von TbCatB in *E.coli* führte trotz Verwendung verschiedener Vektoren und Proteintags stets zu Proteinaggregaten (*inclusion bodies*). Aus diesen Einschlusskörpern konnte durch Denaturierung und anschließende Rückfaltung nicht ausreichend lösliches Protein für weitere Untersuchungen gewonnen werden. Daher wurden im Verlaufe dieser Arbeit zusätzlich Insektenzellen zur Proteinexpression verwendet, die eine für eukaryontische Proteine in vielen Fällen geeignetere Proteinbiosynthese, einschließlich postrationaler Modifikationen aufweisen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche beschrieben, TbCatB mit Hilfe des Bacto-Bac[®]-Expressionssystem in Insektenzellen aus *Spodoptera frugiperda* heterolog zu exprimieren.

3.2.1 Expression von TbCatB als Preproform unter Bildung von „in vivo“-Kristallen

Bei der Expression der Preproform von TbCatB in Insektenzellen kam es zur Bildung von intrazellulären kristallartigen, stäbchenförmigen Strukturen, die drei Tage nach der Infektion unter dem Lichtmikroskop zu sehen waren. Nachfolgend sind die Arbeitsschritte und Ergebnisse dieses Untersuchungsgangs dargestellt.

3.2.1.1 PCR

Aus trypanosomaler cDNA wurde mit den Primern (2.1.7) für den 1023 bp großen *open reading frame* (ORF) der Preproform von TbCatB und pFastBac-1 eine PCR nach dem Protokoll zur „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity“ (s. 2.2.1.2) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde direkt für eine TOPO-TA-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Gen-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten und über Gelextraktion (s. 2.2.1.4) gereinigt (F5 in Abb.3.7.A). Gleichzeitig wurde pFastBac1-Plasmid DNA per Miniprep aus XL1-Blue *E.coli* Zellen gewonnen, mit BamHI und XhoI über Nacht verdaut und per Gelextraktion aufgereinigt (P2 in Abb.

3.7.A). Die beiden aufgereinigten und linearisierten DNA-Fragmente P2 und F5 wurden für die folgende Ligation verwendet.

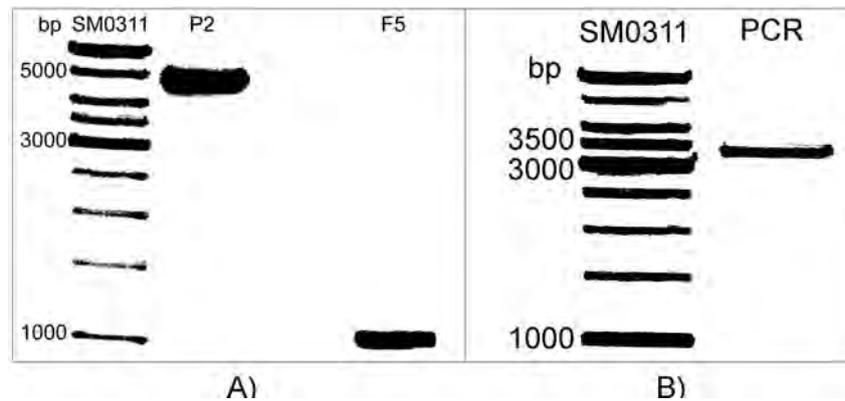


Abb. 3.7: A) Gelextrahierter Vektor (P2) und gelextrahierte Fragment-DNA (F5),
B) PCR-Test - erwartetes Fragment: 3300 bp

3.2.1.2 Ligation und Transformation

Für P5 und F2 wurde eine Konzentration von je 70 ng/ μ l hergestellt und anschließend im 1:3 Verhältnis von Plasmid zu Fragment für eine Ligation nach dem Protokoll aus 2.2.1.10 verwendet. Vom Ligationansatz wurden dann 5 μ l für eine Transformation in XL1-Blue-*E.coli* Zellen eingesetzt (s. 2.2.1.11).

Die auf den ausgestrichenen Platten gewachsenen Kolonien wurden mittels des Kolonie-PCR-Test (s. 2.2.1.12) auf Einbau des Plasmids überprüft. Von einem positiven Klon wurde im Anschluss die Plasmid-DNA per Miniprep gewonnen und über Restriktionsverdau mit HindIII auf korrekte Orientierung des Inserts getestet. Dieser Test zeigte die erwarteten Banden bei 4981 bp und bei 737 bp.

Weiterhin konnte über eine Sequenzierung der klonierten Sequenz im Vektor (s. 2.2.1.14) mit den Primern pBakPAC-FP und pfbac1-fw-cterm-tbcata die korrekte Klonierung verifiziert werden. Das Plasmid konnte nun für eine Transformation in DH10Bac-Zellen verwendet werden.

3.2.1.3 Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA

Es wurde nun Plasmid-DNA des rekombinanten pFastBac1-TbCatB für eine Transformation in chemisch kompetente DH10Bac-Zellen nach 2.2.3.5 eingesetzt. Die Bacmid-DNA ei-

ner transformierten Kolonie wurde nach dem modifizierten Miniprep-Protokoll (s. 2.2.1.8) gewonnen. Mit Hilfe einer HotStar-PCR (s. 2.2.1.2) wurde nun überprüft, ob TbCatB erfolgreich über homologe Rekombination in das Bacmid eingefügt worden war. Hierbei wurden die M13 Forward/Reverse Primer verwendet. Auf dem zugehörigen Agarosegel war die für den korrekten Einbau erwartete Bande bei 3300 bp zu sehen (Abb. 3.7.B).

3.2.1.4 Transfektion in Sf9 Zellen

Die gewonnene pFastBac1-TbCatB-Bacmid-DNA wurde für eine Transfektion nach 2.2.3.6 verwendet. Nach 3 Tagen zeigten die transfizierten Zellen Anzeichen einer Infektion (Zellschwellung, Hemmung der Zellteilung). Aus den entsprechenden *wells* wurde je 1,2 ml Medium entnommen und verwendet, um eine 30 ml Suspensionskultur mit einer Zellkonzentration von 2×10^6 /ml anzupflanzen. Diese wurde nach 76 h abzentrifugiert und der Überstand (P2-Virus-Stock) für die Herstellung eines Virus mit genügend hohem Titer zur Infektion größerer Kulturvolumina verwendet. Dazu wurden 100 µl des P2-Virus-Stocks benutzt um eine 50 ml Sf9 Suspensionkultur der Dichte 1×10^6 Zellen/ml anzupflanzen. Nach 150 h Infektionszeit wurde die Kultur abzentrifugiert und der Überstand als P3-Stock bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Der Titer dieses P3-TbCatB-Virusstock wurde nach 2.2.3.7 mit 1×10^8 pfu/ml bestimmt.

3.2.1.5 Auftreten von kristallartigen Strukturen während der Expression

Der P3-TbCatB-Virusstock wurde für eine Infektion einer etwa 70 %-konfluenten Monolayerkultur von Sf9-Insektenzellen verwendet (*multiplicity of infection* (MOI) = 0,1 pfu/cell). Die MOI wurde hier niedrig gewählt, da für das humane Cathepsin B gezeigt werden konnte, dass hiermit eine verbesserte Expression erreicht werden kann (Steed et al., 1998; Liebman et al., 1999).

Nach 72 h Infektionszeit konnten unter dem Lichtmikroskop luzide, gut sichtbare stäbchenförmige Strukturen ausgemacht werden (s. Abb. 3.8). Da sich später herausstellen sollte, dass diese kristalliner Natur waren, werden sie folgend als Kristalle bezeichnet. In der Zellkultur sah es so aus, als würden die Kristalle aus den Zellen regelrecht „herauswachsen“. Im weiteren Verlauf der Infektion erhöhte sich der Anteil an lysierten Zellen und die Kristalle lagen nun auch frei im Medium vor.

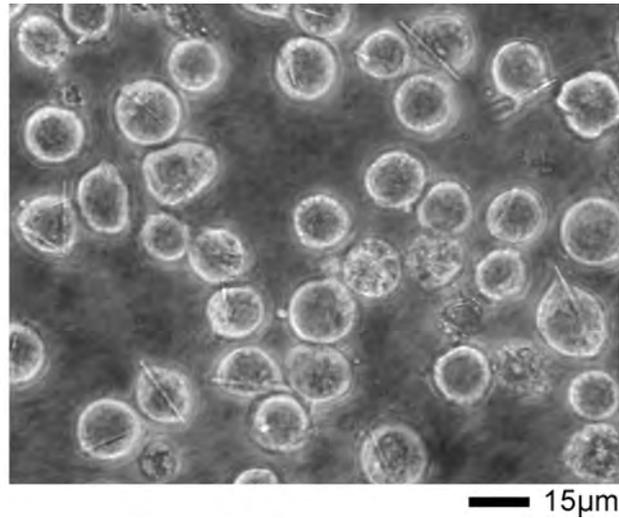


Abb. 3.8: Sf9 90h pi unter dem LM

3.2.1.6 Rasterelektronen-Mikroskopie

Die Sf9-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 pfu/cell mit P3-TbCatB-Virusstock infiziert und nach 80 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen dann für eine Einbettung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet (s. 2.2.3.9). Im Vergleich von gesunden Sf9-Kontrollzellen (s. Abb. 3.9.A) mit infizierten Sf9-Zellen (s. Abb. 3.9.B) sind bei den letzteren starke Veränderungen der Zelloberfläche sowie stäbchenförmige Kristalle zu erkennen, die die Plasmamembran ausweiten und gelegentlich durchbrechen. Abb. 3.10 zeigt

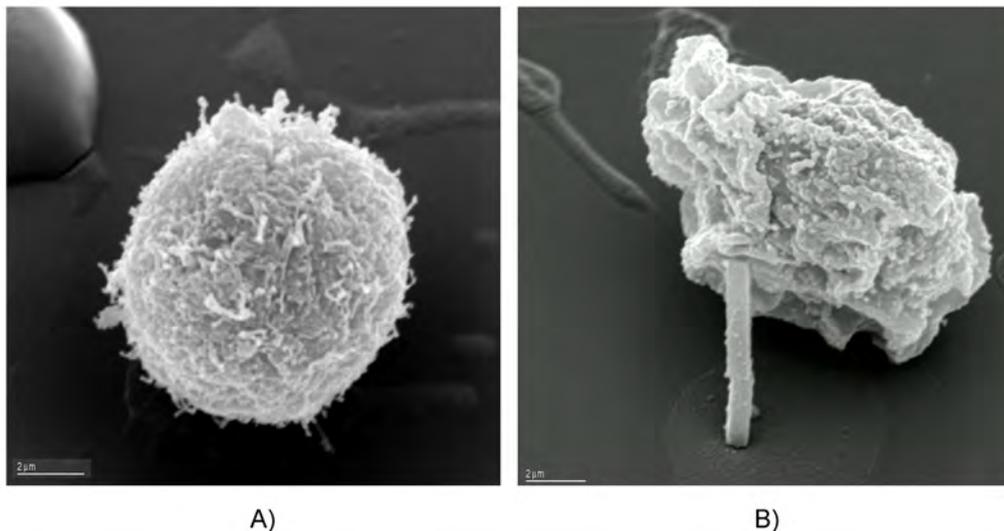


Abb. 3.9: Raster-EM-Bild: A) Sf9-Kontrollzelle B) Sf9 (80h nach der Infektion mit P2-TbCatB-Stock-Virus)

mehrere infizierte Zellen und Kristalle. In der Mitte ist eine Sf9 Zelle mit mehreren Kristallen zu sehen, die zum Teil schon frei oder nur mit Zellresten bedeckt im Medium vorliegen. Außerdem ist auf der rechten Seite eine andere, mehr rhomboide Kristall-Morphologie zu

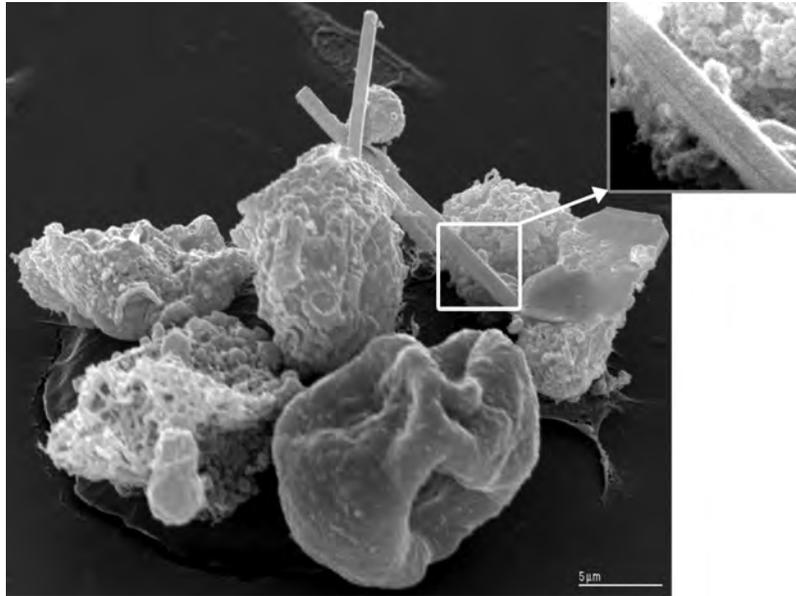


Abb. 3.10: Gruppe infizierter Sf9 Zellen, vergrößerter Bereich: Bruchkante im Kristallwachstum

erkennen. Einer der Kristalle zeigt auf seiner Oberfläche eine Kante (s. Vergrößerung in Abb. 3.10), die daher rühren könnte, dass der Kristallisierungsprozess unterbrochen und dann wieder aufgenommen wurde.

Ein einzelner Kristall hatte ungefähr eine Länge von 10-20 µm und einen Durchmesser von 0,5-2 µm (s. Abb. 3.11). Nach dieser Abbildung lässt sich vermuten, dass die Kristalle einen quaderförmigen Aufbau haben. Dies wird durch die Aufnahmen mit dem Transmissionselektronen-Mikroskop im nächsten Abschnitt bestätigt.

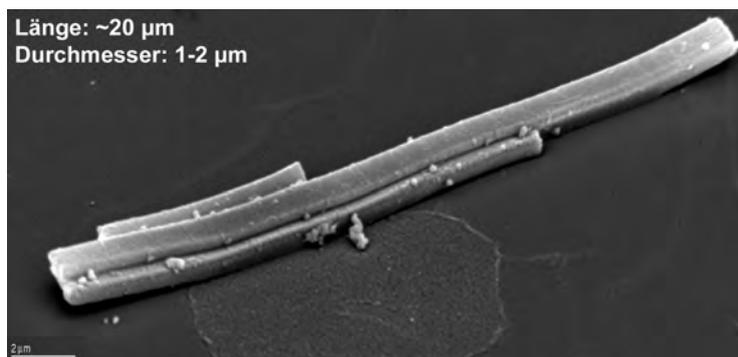


Abb. 3.11: REM-Aufnahme einzelner Kristall

3.2.1.7 Transmissionselektronen-Mikroskopie

Für eine genauere Untersuchung der Kristalle innerhalb der Insektenzellen wurden analog zu 3.2.1.6 infizierte Sf9-Zellen für die Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) eingebettet (s. Protokoll unter 2.2.3.8) und die erhaltenen Mikrotomschnitte unter dem Elektronenmikroskop betrachtet. Die Abbildung einer Sf9-Kontrollzelle (Abb. 3.12) zeigt

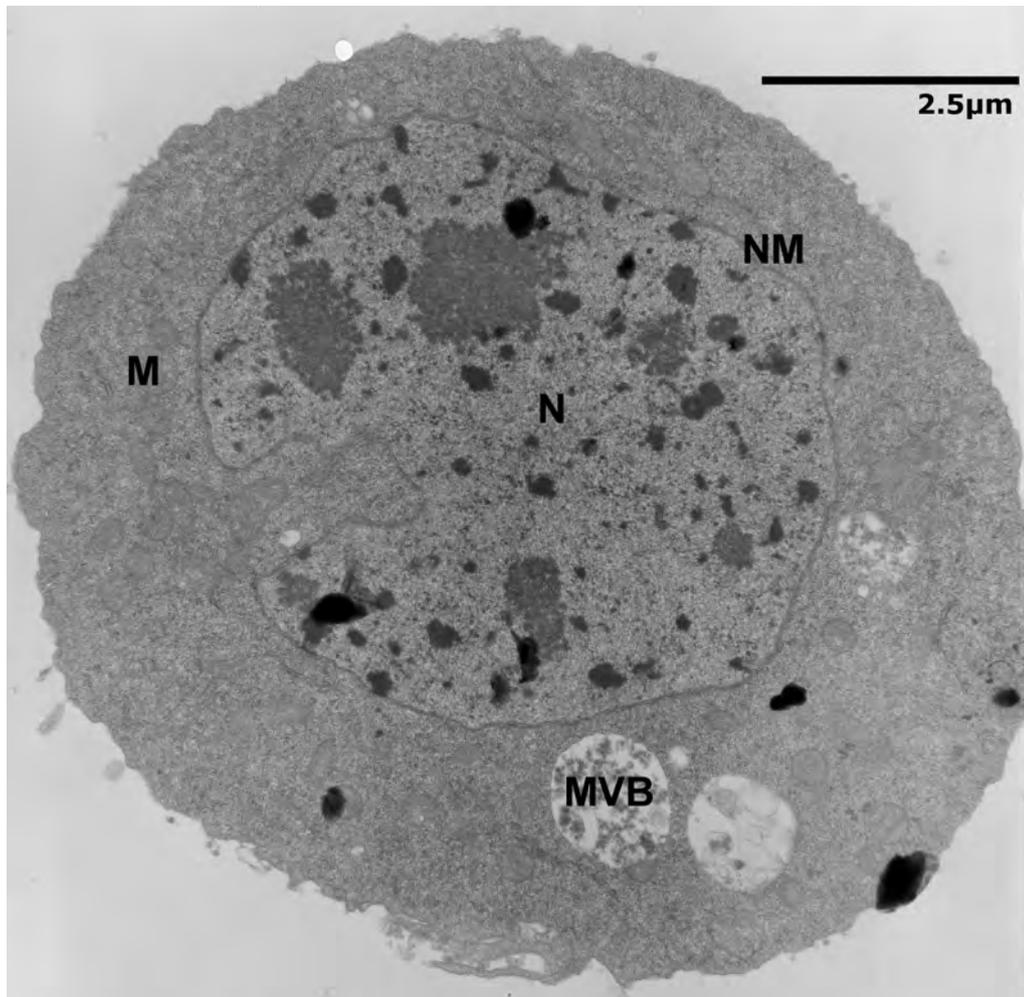


Abb. 3.12: TEM Bild Kontrollzelle Sf9, N=Nukleus, NM=Kernmembran, M=Mitochondrium, MVB Multivesikuläre Körper

einen Nukleus mit intakter Kernmembran, sowie Organellen wie z.B. Mitochondrien.

Betrachtet man die infizierte Zelle aus Abb. 3.13 so sieht man im Bereich des Zellkerns viele Viruspartikel in Form von einzelnen und zusammengelagerten Nucleocapsiden. Neben einer erhöhten Anzahl von Lysosomen bzw. multivesikulärer Körper (MVB) fallen außerhalb des Zellkerns deutlich abgegrenzte, eckige Strukturen auf. Diese entsprechen den in

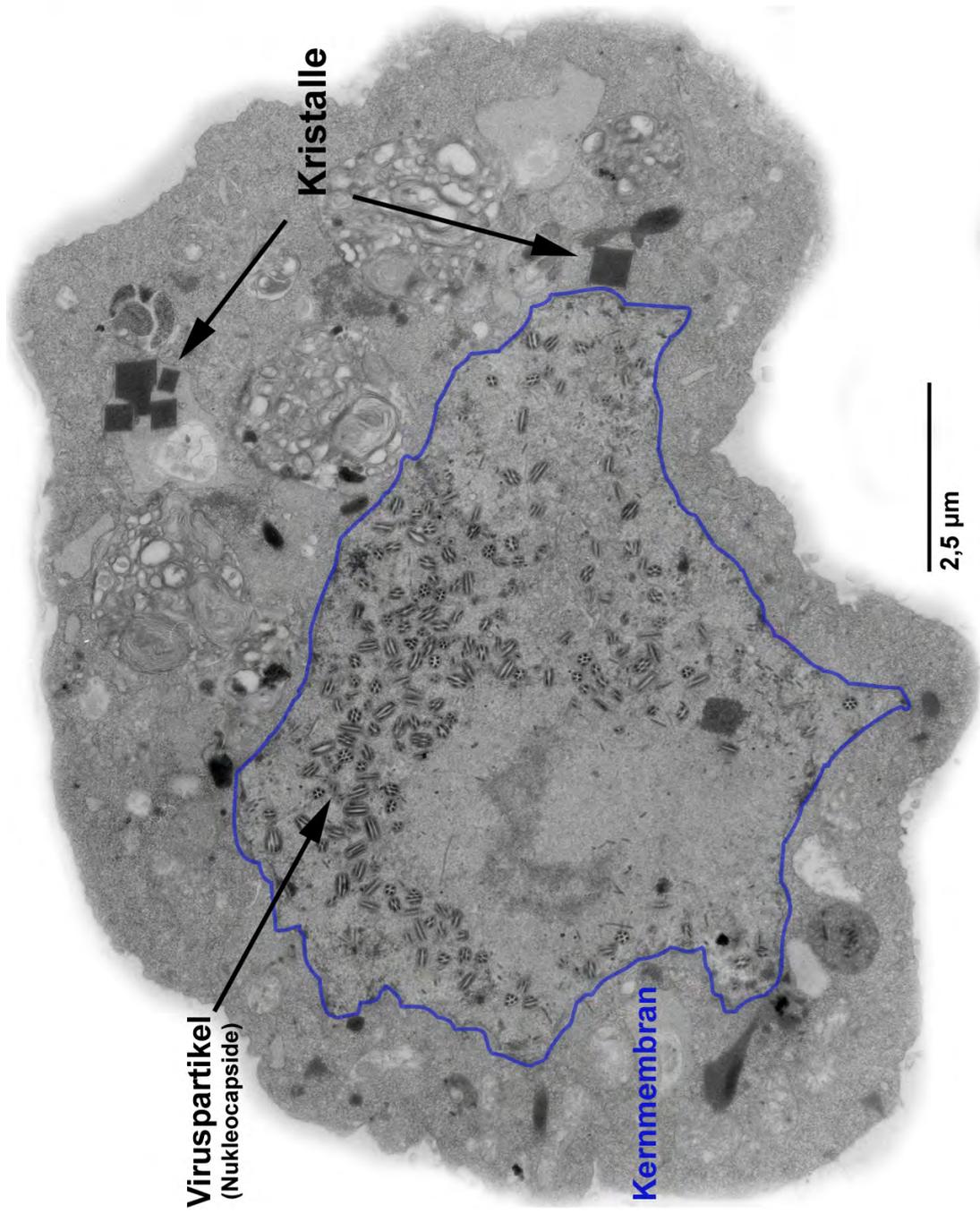


Abb. 3.13: TEM Aufnahme einer infizierten Sf9-Zelle mit Kristallen (die Kernmembran ist zur Verdeutlichung nachgezeichnet)

verschiedenen Winkeln angeschnittenen Kristallen unterschiedlicher Größen (Pfeile).

Bei noch intakten Zellen lässt sich beobachten, dass die Kristalle oft von einer Membran umgeben sind (s. Abb. 3.14.A). In Abb. 3.14.B sieht man ferner, dass die Kristalle in einer Art Membranvesikel vorliegen können. Ein weiteres Vesikel desselben Typs ohne Kristall ist ebenfalls zu erkennen.

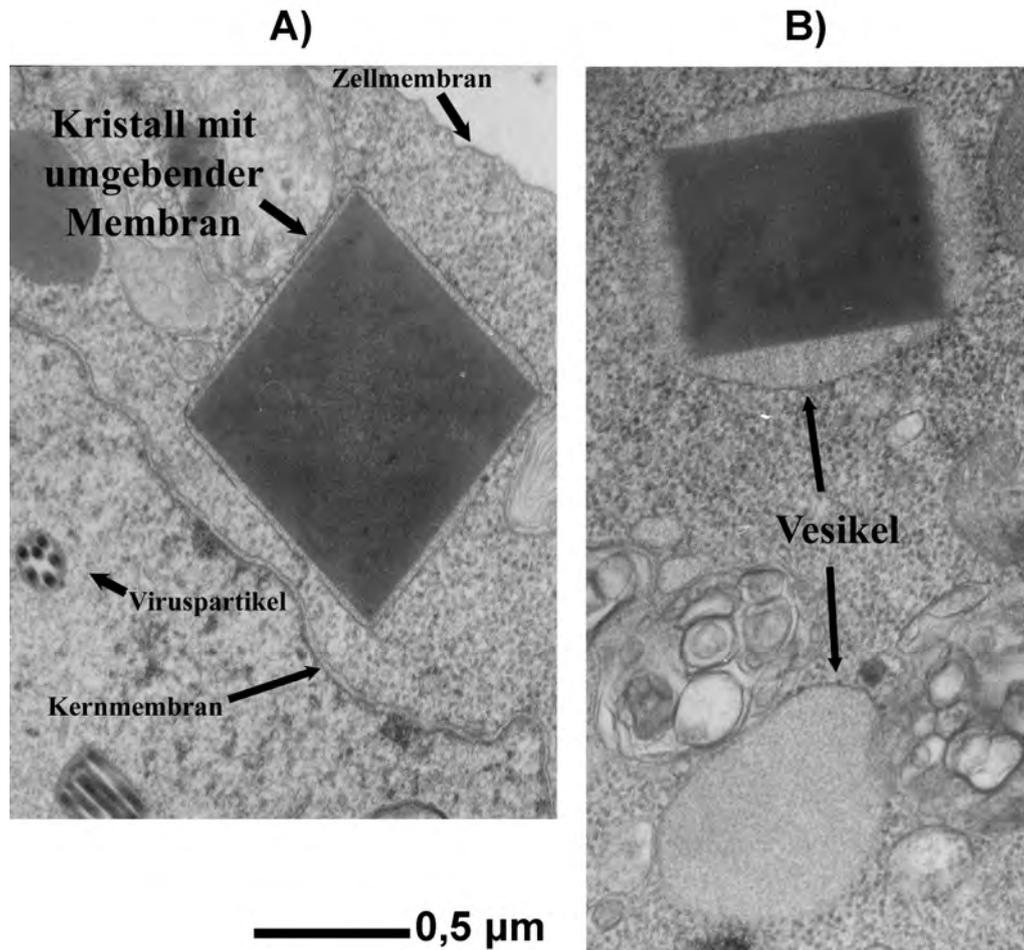


Abb. 3.14: Kristall mit umgebender Membran zwischen Kern- und Zellmembran, Kristall in einem Vesikel

Eine Möglichkeit für den Ursprung dieser Membranen/Vesikel könnte die Kernmembran bzw. daran angrenzend das rauhe endoplasmatische Retikulum sein. Anzeichen für diese Variante lassen sich in der Abb. 3.15 (schwarze Pfeile) erkennen.

Da TbCatB normalerweise in Lysosomen lokalisiert ist, könnte die Membran auch lysosomalen Ursprungs sein. Denkbar ist eine steigende Proteinkonzentration in diesen Organellen im Verlauf der Expression, die schließlich zur Ausbildung eines Kristallkeims führt.

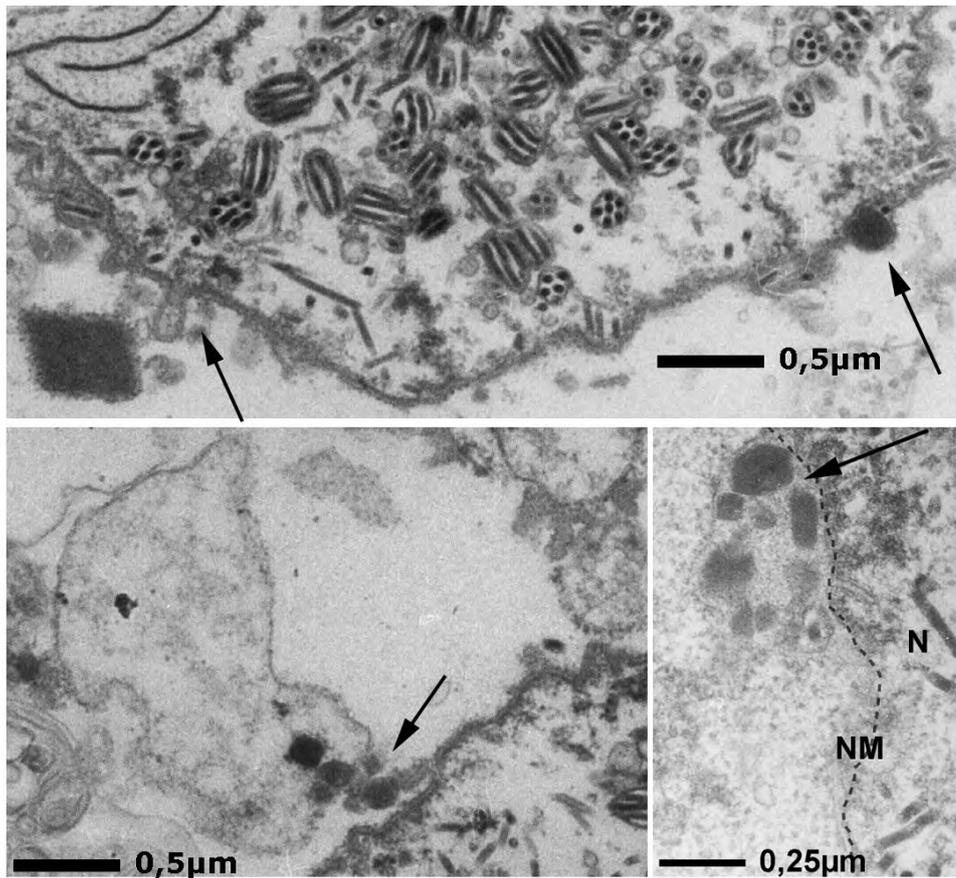


Abb. 3.15: Potentielle Abschnürvorgänge an der Kernmembran (Pfeile)

In der Abb. 3.16.A ist ein Kristall im Längsschnitt zu sehen, welcher fast den gesamten Zelldurchmesser durchspannt. Der rechte Endbereich ist scharf abgegrenzt und es sind Reste einer Membran zu erkennen. Das linke Ende, welches in der Abbildung vergrößert dargestellt ist (Abb. 3.16.B), zeigt einen weicheren Übergang zu dem umliegenden Teil der Zelle. Dies ist sicherlich hauptsächlich bedingt durch die Lage des Kristalls in der Schnittebene. Dennoch sieht es an dieser Stelle so aus, als würde hier Proteinmaterial an den bestehenden Kristall angelagert, der Kristall also von links nach rechts aus der Zelle „herauswachsen“.

Bei einigen Kristallen lassen sich Gitterstrukturen erkennen, wie z.B. bei der Abb. 3.16.C, welche zwei unterschiedlich angeschnittene Kristalle zeigt. Hieran sieht man, dass die Lagen nur bei einem bestimmten Anschnittwinkel zu erkennen sind.

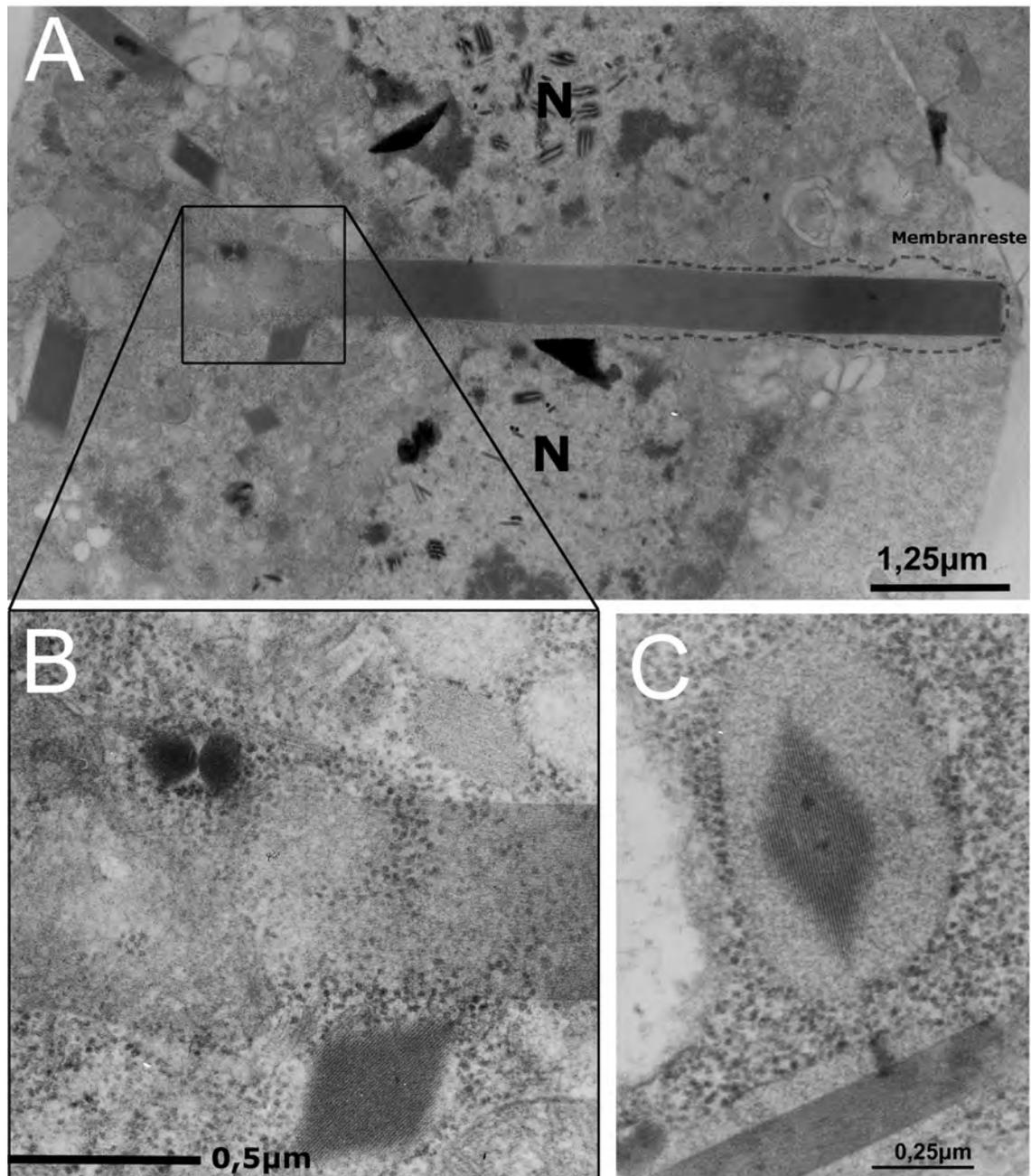


Abb. 3.16: A) Langer Kristall und B) vergrößerter linker Bereich, C) Unterschiedliche Anschnittswinkel von Kristallen und sichtbarer Gitterstruktur

3.2.1.8 Isolierung und Solubilisierung der Kristalle

Für eine nähere Untersuchung der Kristalle wurden diese nach der unter 2.2.6.1 dargestellten Prozedur isoliert. Durch die Waschschrirte ließen sich die löslichen Proteine und ein Großteil der Zellbestandteile abtrennen. Für eine Verbesserung der Aufreinigung wurde zudem probiert mittels Ultraschall-Stab eine bessere Abtrennung zellulären Materials zu erzielen. Hierbei ließ sich ein Zerschneiden der Kristalle beobachten, so dass diese Prozedur nicht weiter angewendet wurde. Durch Resuspendieren in Wasser, PBS oder anderen Puf-

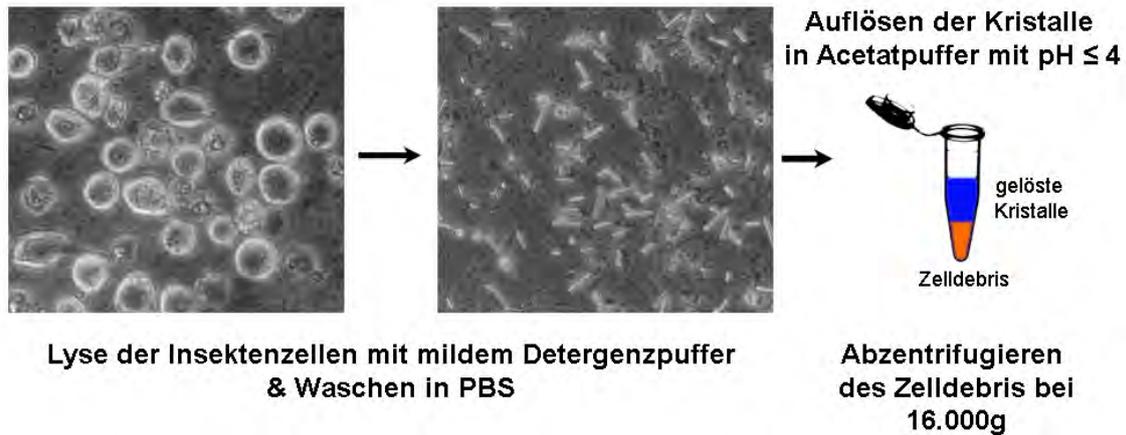


Abb. 3.17: Ablauf der Resuspendierung

fern mit milden Detergenzien konnte das Protein aus den Kristallen nicht wieder in Lösung gebracht werden. Bei dem Versuch die Kristalle mit Coomassie-Färbelösung anzufärben, lösten sich diese plötzlich auf. Hierbei konnte die Essigsäure-Komponente und damit der niedrige pH als Grund für die Resolubilisierung ausgemacht werden. Es stellte sich heraus, dass ein Puffer mit genügend niedrigem pH (≤ 4) die Kristalle auflösen konnte. Das nun lösliche Protein wurde dann über Zentrifugation vom Rest getrennt und der Überstand per Zentrifuge mit einem 10 kDa-cut-off in einen für die weitere Anwendung günstigen Puffer, z.B. Aktivitätspuffer getauscht (s. Abb 3.17).

3.2.1.9 Analyse über SDS-Page und Western Blot

Es sollte nun überprüft werden, welche Proteine in den Kristallen enthalten sind. Hierzu wurde eine Monolayer-Kultur in einer 75 cm²-Kulturflasche mit P3-TbCatB-Virusstock bei einer MOI von 0,1 pfu/cell infiziert und 4 Tage inkubiert. Die Kristalle wurden wie unter 2.2.6.1 beschrieben resolubilisiert und in TbCatB-Aktivitätspuffer aufgenommen. Nach 2.2.4.1 wurde die Konzentration bestimmt und ca. 250 ng auf ein 15 %-SDS-Gel

gegeben (s. Abb. 3.18B). Das silbergefärbte Gel zeigt eine Doppelbande im Bereich von

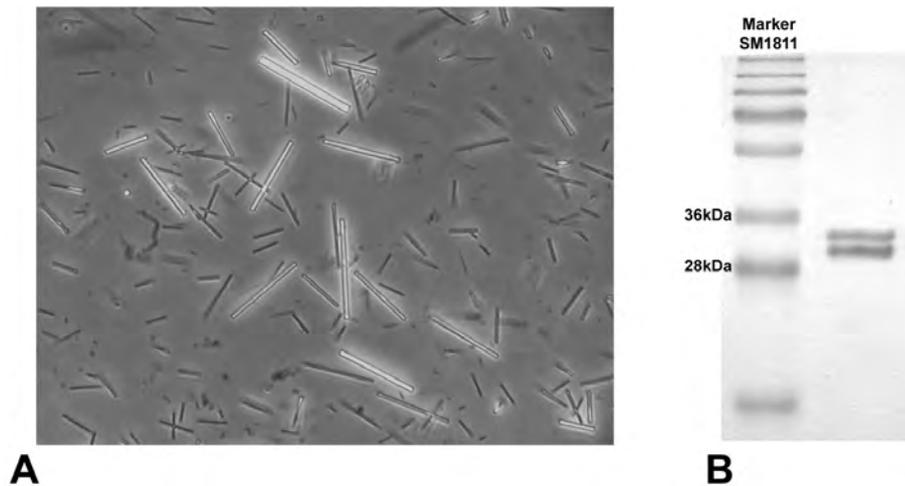


Abb. 3.18: A) gereinigte Kristalle B) SDS-Gel resolubilisierte Proteine aus den Kristallen

30-34 kDa. Aufgrund dieses Molekulargewichts war anzunehmen, dass es sich bei dem in den Kristallen enthaltenen Protein tatsächlich um TbCatB handelt.

Für eine nähere Bestimmung wurden gereinigte Kristalle mit Ladepuffer gekocht und auf ein 12 %-SDS-Gel gegeben und danach ein Western Blot unter Verwendung eines polyclonalen Cathepsin-B-Antikörpers (Chemicon) durchgeführt (2.2.4.7). Als Kontrolle wurde bovines Cathepsin B (Sigma, ca. 30 kDa, Deval et al. (1990)) mit aufgetragen. Wie man in Abb. 3.19 erkennt, wird das resolubilisierte Protein von dem Antikörper erkannt, so dass es sich wohl um ein Cathepsin-B ähnliches Protein handelt.

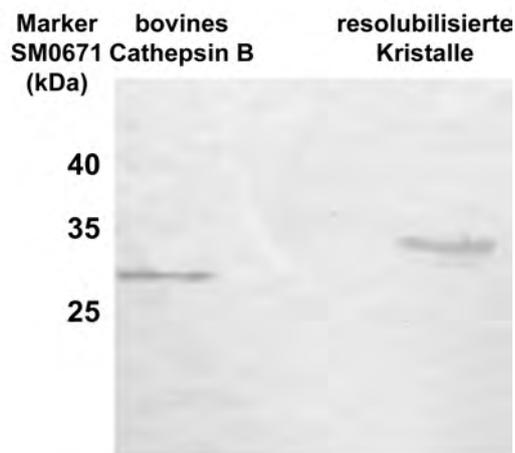


Abb. 3.19: Western Blot resolubilisierte Kristalle

3.2.1.10 Massenspektrometrische Bestimmung

Als weiteren Nachweis von TbCatB in den Kristallen, wurden Gelstücke aus beiden Banden eines 15 %-SDS-Gel (Durchführung siehe 3.2.1.9) ausgeschnitten, Trypsin verdaut und am Proteom Zentrum Tübingen über massenspektrometrische Verfahren analysiert (s. Abb. 3.20). Das entsprechende Protein in den beiden Banden konnte eindeutig TbCatB zuge-

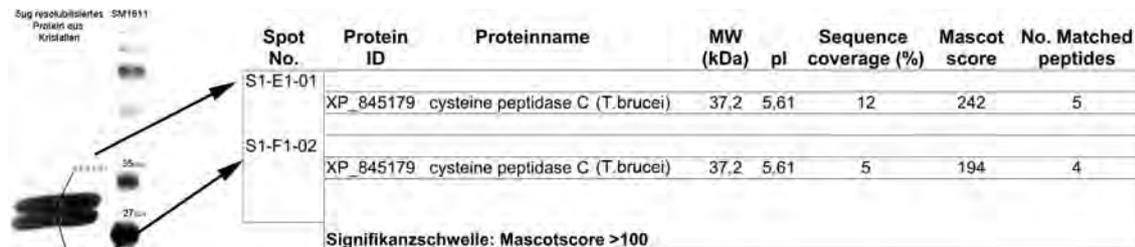


Abb. 3.20: SDS-Page und Identifizierung der Proteine in der Doppelbande

ordnet werden. Anhand der Abbildung 3.21 sind die für die Identifizierung verwendeten Peptide und deren Lage auf der Sequenz von TbCatB dargestellt. Dies gibt einen ersten

S1-E1-01

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MHLMRACITF CIASTAVVAV NAALVAEDAP VLSKAFVDRV NRIINRGINKA
51 KYDGVNQNIIT LREAKRLNGV IKKNNNASIL FKRRFTEEEA RAPLPSSEFDS
101 AEAWFNCPTI PQIADQSACG SCWAVAAASA MSDRFCTMGG VQDVHISAGD
151 LLACCSDCGD GCNGGDPDRA WAYFSSTGLV SDYCPYPFPF HCSHHSKSKN
201 GYPPCSQFNF DTPKCNITCD DPTIPVVNYR SWTSYALQGE DDYMRLEFFR
251 GPFEVAFDVY EDFIAYNSGV YHHVSGQYLG GHAVRLVWVG TSNQVPYWKI
301 ANSWNTEWGM DGYFLIRRGS SECCIEDGGS AGIPLAPNTA
    
```

S1-F1-02

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MHLMRACITF CIASTAVVAV NAALVAEDAP VLSKAFVDRV NRIINRGINKA
51 KYDGVNQNIIT LREAKRLNGV IKKNNNASIL FKRRFTEEEA RAPLPSSEFDS
101 AEAWFNCPTI PQIADQSACG SCWAVAAASA MSDRFCTMGG VQDVHISAGD
151 LLACCSDCGD GCNGGDPDRA WAYFSSTGLV SDYCPYPFPF HCSHHSKSKN
201 GYPPCSQFNF DTPKCNITCD DPTIPVVNYR SWTSYALQGE DDYMRLEFFR
251 GPFEVAFDVY EDFIAYNSGV YHHVSGQYLG GHAVRLVWVG TSNQVPYWKI
301 ANSWNTEWGM DGYFLIRRGS SECCIEDGGS AGIPLAPNTA
    
```

Abb. 3.21: Sequenz-Coverage der Peptide für beide Banden S1-E1-01 (obere), S1-F1-02 (untere)

Hinweis darauf, das beide Banden trotz unterschiedlicher Lauflänge auf dem Gel demselben Protein entsprechen. Die beiden Peptide der oberen Bande deuten darauf hin, dass das Protein zumindest einen Teil des Propeptids sowie die Sequenz des C-terminus enthält.

3.2.1.11 Bestimmung der Aktivität des resolubilisierten TbCatB

Es wurde eine 50 ml Sf9-Suspensionskultur mit P3-Stx-Virus-Stock bei einer MOI von 0,1 pfu/cell infiziert, nach 4 Tagen geerntet und die Kristalle nach 2.2.6.1 isoliert und resolubilisiert. Zur Messung der Aktivität des resolubilisierten TbCatB kam ein Cathepsin B Aktivitäts-Kit zur Anwendung (s. 2.2.6.6), mit dem die Proteaseaktivität über die Bestimmung der freigesetzten Fluoreszenz bei Abspaltung eines Fluorophors von einem Dipeptid-Substrat nachgewiesen werden konnte. Aus der Abb. 3.22 ist zu entnehmen, dass

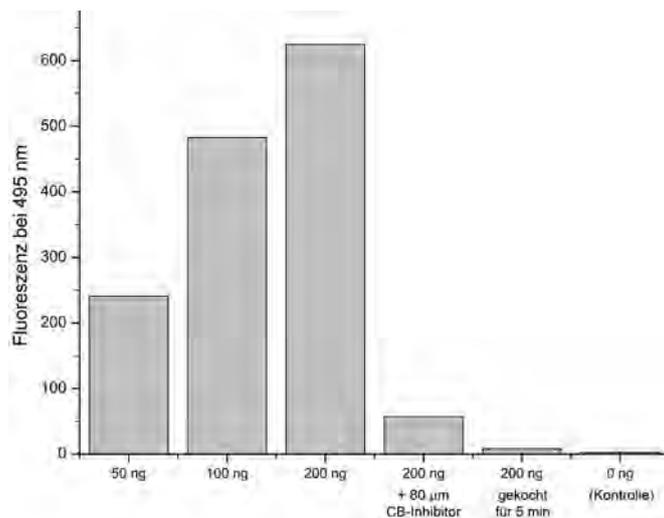


Abb. 3.22: Fluoreszenzmessung von resolubilisiertem *TbCatB*. Neben verschiedenen Proteinmengen wurde einem Ansatz vor Zugabe des Proteins $80 \mu\text{M}$ CB-Inhibitor zugegeben.

das Protein nach der Resolubilisierung aktiv ist und durch einen spezifischen Cathepsin B Inhibitor (Bestandteil des Kits) gehemmt werden kann. Ein vorher 5 min im Wasserbad gekochter Ansatz zeigte ebenfalls keine Aktivität mehr.

3.2.1.12 Deglykosylierung

Es ist bekannt, dass die biochemischen Eigenschaften von Cathepsin B-Proteinen durch Glykosylierung beeinflusst werden (Chi et al., 2010). Nach Analyse der Proteinsequenz von *TbCatB* mittels des NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al., 2004) hat das Protein drei potentielle N-Glykosylierungstellen mit der Konsensus-Sequenz Asparagin(N)-beliebige Aminosäure (X)-und Serin/Threonin (S/T), davon zwei im Propeptid (s. Abb. 3.23).

Die unterschiedliche Laufweite der beiden in den Kristallen enthaltenen Formen von *TbCatB* könnte durch eine unterschiedliche Glykosylierung erklärt werden. Um diese Annahme zu testen, wurde aus Kristallen resolubiliertes *TbCatB* mit verschiedenen Mengen N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt (s. 2.2.6.2). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde die Deglykosylierung unter nativen Bedingungen durchgeführt, um das Protein für spätere Rekrystallisationsversuche weiterverwenden zu können. Wie man im zugehörigen SDS-Gel erkennen kann (s. Abb. 3.24) läuft das deglykolisierte Protein als eine Bande bei ca. 30 kDa, was in etwa dem Molekulargewicht des aktiven Proteins entspricht.

In diesem Zusammenhang ergab sich auch, dass die Zugabe von Tunicamycin, das die N-Glykosylierung von Proteinen blockiert, einen Einfluss auf die Menge an gebildeten

Name: TbCatB Length: 340

```

MHLMRACITFCIASTAVVAVNAALVAEDAPVLSKAFVDRVNRRLNRGIWKAKYDGMQNITLREAKRLNGVIKKNNASIL 80
PKRRFTEEEARAPLPSFDSAEAWPNCPTIPQIADQSACGSCWAVAAASAMSDRFCTMGGVQDVHISAGDLLACCSDCGD 160
GCNGGDPDRAWAYFSSTGLVSDYCPYPFPHCSHHSKSKNGYPPCSQFNFDTPKCNYTCCDDPTIPVVNYRSWTSYALQGE 240
DDYMRELFFRGPFEVAFDVYEDFIAYNSGVYHHVSGQYLGGHAVRLVGVGTSNGVVPYWKIANSWNTEWGMDGYFLIRRGS 320
SECGIEDGGSAGIPLAPNTA

```

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
TbCatB	58 NITL	0.7373	(9/9)	++
TbCatB	76 NASI	0.5651	(5/9)	+
TbCatB	216 NYTC	0.6882	(8/9)	+

Abb. 3.23: NetNGlyc Vorhersage von N-Glykosylierungstellen bei TbCatB (N-X-S/T-Abfolgen sind blau hervorgehoben, potentiell N-glycosylierte Asparagine sind in rot dargestellt, der Bereich des Propeptids ist Grün unterlegt).

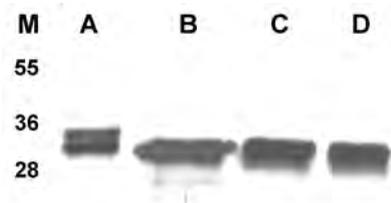


Abb. 3.24: silbergefärbtes 15 % SDS-Gel: M) Marker SM1811, A) 1 µg TbcabB, B) A + 750 U PNGase F, C) A + 100U PNGase F, D) A + 50 U

Kristallen hatte (s.2.2.6.3). Sowohl mit dem Lichtmikroskop als auch mit dem Elektronenmikroskop konnte für Zellen, die mit Tunicamycin behandelt worden waren, eine deutlich reduzierte Anzahl von Kristallen beobachtet werden.

3.2.2 Expression von TbCatB in modifizierter Form

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Veränderungen der Domänenstruktur des exprimierten TbCatB einen Einfluss auf die Kristallbildung haben. Hierzu wurde TbCatB in unterschiedlicher Form in infizierten Insektenzellen exprimiert.

3.2.2.1 Expression von TbCatB mit N-terminalem His-tag

Es wurde zunächst das gereinigte DNA-Fragment der PrePro-Form von TbCatB (F5 aus 3.2.1.1) für eine Ligation in den pFastBacHTB-Vektor verwendet. Dieser Vektor fügt dem

Protein am N-Terminus ein 6xHis-Tag an und wurde, wie unter 3.2.2.2 beschrieben, zur Herstellung eines rekombinanten Virus verwendet. Bei der Expression fand sich das Protein nur in der unlöslichen Pelletfraktion wieder, was möglicherweise damit zusammenhängt, dass der N-terminale His-tag und die folgende TEV-cleavage site die korrekte Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum beeinträchtigten. Auch die Klonierung und Expression der aktiven Form von TbCatB im pFastBacHTB-Vektor, bei welcher das Protein ohne Signalpeptid und Pro-Peptid synthetisiert wird, ergab ebenfalls nur ein unlösliches Produkt. In beiden Fällen ließ sich keinerlei Kristallbildung feststellen.

3.2.2.2 Expression mit C-terminalem His-tag und gp64 Signalpeptid

Da die Versuche des vorherigen Abschnitts TbCatB mit einem N-terminalem His-tag zu exprimieren lediglich unlösliches Protein ergaben, wurde das Protein, wie im Folgenden beschrieben, mit einem C-terminalen His-tag exprimiert. Gleichzeitig wurde das viruseigene Signalpeptid des Hüllproteins gp64 verwendet, um eine effiziente Sekretion des Proteins in das Medium zu erreichen. Die Pro-Form von TbCatB wurde daher mittels des Vektors



Abb. 3.25: Domänenstruktur verschiedener Expressionskonstrukte von TbCatB. a) Pre-ProTbCatB in pFastBac1, b) pro-TbCatB in pFastBac11 Cpo I

pFastBac11 Cpo I (2.1.6) exprimiert, welcher die Aminosäuresequenz des exprimierten Pro-TbCatB am N-Terminus durch ein gp64-Signalpeptid und am C-Terminus durch ein 6xHis-tag erweitert (s. Abb. 3.25).

PCR

Aus trypanosomaler cDNA wurde mit den Primern für die Proform von TbCatB (GeneDB:Tb927.6.560) und dem Vektor pFastBac11-Cpo His (2.1.7) eine PCR nach dem Protokoll zur „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity“ von Invitrogen (2.2.1.2) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde direkt für eine TOPO-TA-Subklonierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Überprüfung der Plasmid-DNA einer weissen Kolonie über Restriktionsanalyse wurde das Fragment

mit Cpo I ausgeschnitten und über ein Gel aufgereinigt (F1)(2.2.1.4). Ebenso wurde per Miniprep gewonnene Vektor-DNA von pFastBac11-Cpo His mit Cpo I verdaut und, um eine Selbstligation zu vermeiden, mit CI-Phosphatase für 60 min dephosphoriliert (2.2.1.9). Danach wurde der Vektor ebenfalls per Gelextraktion aufgereinigt (P1). Die beiden aufgereinigten und linearisierten DNA-Fragmente P1 und F1 (s. Abb.3.26.A) wurden für die nachfolgende Ligation verwendet.

Ligation und Transformation

Analog zu 3.2.1.2 wurde der Ligationsansatz mit P1 und F1 nach dem Protokoll aus 2.2.1.10 vorbereitet und anschließend für die Transformation (s. 2.2.1.11) verwendet. Vier der auf den ausgestrichenen Platten gewachsenen Kolonien wurden für das Anziehen einer Vorkultur verwendet und die Plasmid-DNA per Miniprep gewonnen. Der Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen ergab für die Kolonie RT4a eine korrekte Orientierung des Fragments innerhalb des Plasmids (s. Abb. 3.26.B).

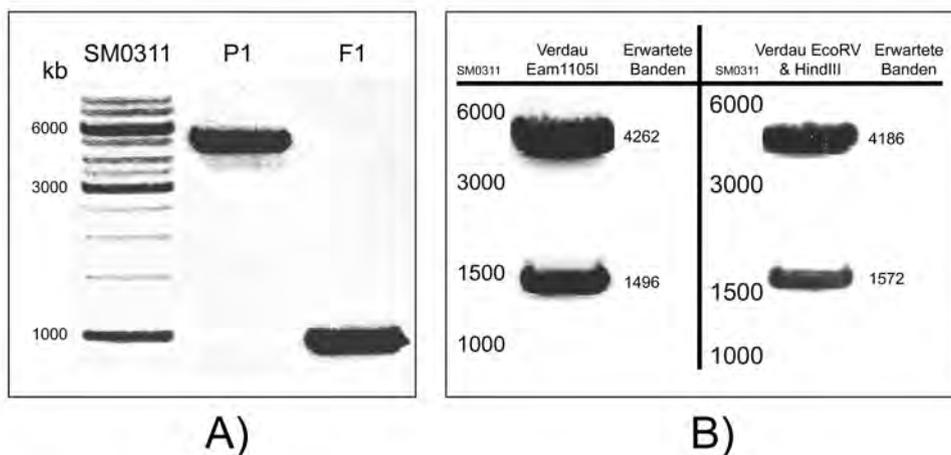


Abb. 3.26: A) Gelextrahierte Vektor und Fragment-DNA, B) Restriktionsanalyse von RT4a

Transformation in DH10Bac

Die Plasmid-DNA von RT4a wurde analog zu 3.2.1.3 für eine Transformation in DH10Bac-Zellen eingesetzt (2.2.3.5) und rekombinante Bacmid-DNA aufgereinigt (2.2.1.8). Mit Hilfe einer HotStar-PCR (s. 2.2.1.2) wurde nun überprüft, ob die DNA-Sequenz von TbCatB in das Bacmid über homologe Rekombination eingefügt wurde. Hierbei wurden sowohl die M13 Forward / Reverse Primer als auch die für das Gen spezifischen Primer fw/rv-CpoI-proTbcatB verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde Bacmid-DNA mit bereits auf-

genommenen pFastBac1-TbCatB verwendet. Auf dem zugehörigen Agarosegel waren die erwarteten Banden zu sehen (s. Abb. 3.27). Der PCR-Ansatz B (s. Abb. 3.27) wurde

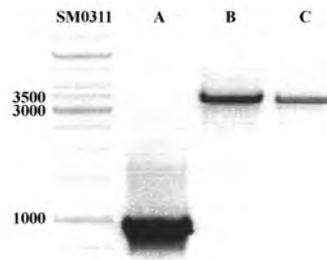


Abb. 3.27: PCR-Test: A) *fw/rv-CpoI-proTbcatB-Primer* - erwartetes Fragment: 960bp
 B) *M13 fw/rv Primer* - erwartetes Fragment: 3501 bp
 C) *pos.Control mit M13 fw/rv Primer und pFastBac1-TbCatB-Bacmid* - erwartetes Fragment: 3360 bp

schließlich noch mit Cpo I verdaut, die TbCatB-Bande über Gelextraktion gewonnen und mittels Sequenzierung (2.2.1.14) überprüft.

Transfection in Sf9 Zellen

Eine 6-well Platte wurde mit Sf9-Zellen angesät und für eine Transfektion nach 2.2.3.6 mit der im vorherigen Abschnitt analysierten pFastBac11-Cpo His-Bacmid-DNA verwendet. Nach 3 Tagen waren in den transfizierten wells erste Zeichen einer Infektion zu sehen (Zellschwellung, Hemmung der Zellteilung). Aus einem well mit erfolgreich infizierten Zellen wurden 0,8 ml Medium entnommen und verwendet, um eine 30 ml Suspensionskultur mit einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml anzupflanzen. Diese wurde nach 70 h abzentrifugiert und der Überstand als P2-TbCatB-Cpo-Virusstock (Titer: 2×10^7 pfu/ml) bei 4°C gelagert.

Analyse über Western Blot

Für eine Analyse der Expression wurde eine 25 ml Sf9-Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von 2×10^6 /ml mit P2-TbCatB-Cpo-Virusstock infiziert (MOI) = 0,1 pfu/cell). Es war hier beabsichtigt, mit relativ wenig Viren bei geringer Zelldichte zu infizieren und erst spät zu ernten, damit es zu einer hohen Sekretion des Proteins in das Medium kommt (s.a. Steed et al. (1998); Liebman et al. (1999)). Nach 90 h waren die Zellen größtenteils durch den Infektionsverlauf lysiert und die Zellbestandteile wurden abzentrifugiert, in PBS gewaschen und eingefroren. Vom Überstand wurden 30 µl entnommen, mit 15 µl reduziertem SDS-Puffer gekocht und im Anschluss auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrolle

wurde der Überstand einer infizierten Insektenzellkultur genommen, die ein anderes Protein (TbPIA2) exprimierte. Das SDS-Gel wurde für einen Western Blot verwendet, wobei als Primärantikörper ein 6-His-Antikörper in der Verdünnung 1:4.000 und als Sekundär-Antikörper ein Rabbit IgG-Antikörper in der Verdünnung 1:20.000 verwendet wurde (s. Abb. 3.28.A).

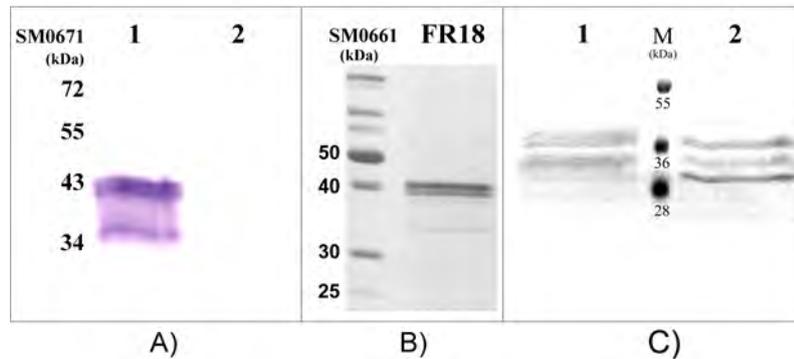


Abb. 3.28: A) Western Blot, Überstand infizierter Kulturen (90h):
 1) 0,1 ml P2-C6-Stock. 2) Kontrolle
 B) Silbergefärbtes SDS-Gel mit Eluatfraktion der
 Affinitätschromatographie
 C) Silbergefärbtes SDS-Gel: 1) gereinigtes TbCatB-His, 2) deglykosyliert

Es lassen sich drei Banden detektieren. Theoretisch kann es nach Compute pI/Mw (Gasteiger et al., 2005) bei der Expression von TbCatB in pFastBac11 zu folgenden Molekulargewichten kommen: Prepro-TbCatB-His 38 kDa, pro-TbCatB-His 36 kDa, active-TbCatB-His 29,5 kDa. Es gibt eine Doppelbande im Bereich 40 kDa, welche dem Prepro-Enzym entspräche und eine Bande in der Höhe von ungefähr 36 kDa, welche der Proform entspricht. Für die aktive Form wurde dagegen keine entsprechende Bande bei 29,5 kDa detektiert.

Mittels Affinitätschromatographie ließ sich TbCatB-His aufreinigen (s.2.2.6.5). Die zum Eluationspeak gehörenden Fraktionen 18-21 wurden auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen (s. Abb.3.28.B). Die Proteinbanden decken sich mit denen des vorangegangenen Western Blots. Das gereinigte Protein wurde mit PNGase F nach Angaben des Herstellers deglykosyliert (s.Abb. 3.28.C). Neben der PNGase F-Bande bei 36 kDa sind zwei weitere Banden zu sehen, welche von der Masse der Proform und der aktivierten Form von TbCatB entsprechen. Insgesamt ließ sich TbCatB also mit einem C-terminalem His-Tag in Insektenzellen in löslicher Form exprimieren und aufreinigen, es konnten jedoch bei der Expression in dieser Form keine Anzeichen von Kristallbildung beobachtet werden.

3.2.3 Strukturaufklärung von TbCatB

3.2.3.1 Diffraktionsexperimente mit *in vivo*-Kristallen

Die *in vivo*-Kristalle aus 3.2.1.8 sollten dahingehend analysiert werden, ob sie sich direkt für eine röntgenkristallographische Untersuchung eignen. Hierzu nahmen wir Kontakt zu Dr. Clemens Schulze-Briese am Synchrotron der Swiss Light Source am Paul-Scherrer-Institut in Villigen (Schweiz) auf. Freundlicherweise konnten wir eine erste Testmessung mit gereinigten Kristallen relativ zeitnah durchführen. Es konnten erfolgreich Diffraktionsmuster für die *in vivo*-Kristalle gemessen werden, welche allerdings nur eine geringe Dichte an Reflexen aufwies. Bedingt durch die geringe Größe der Kristalle wurde ein relativ energiereicher Röntgenstrahl eingesetzt, was zur Folge hatte, dass es schon nach wenigen Messungen zu Kristallschäden kam, so dass für eine exakte Strukturanalyse auf diesem Wege nicht genügend Diffraktionsdaten gesammelt werden konnten.

Außerdem wurden gereinigte Kristalle für Messungen mit dem Freie-Elektronen Laser (FEL) der Linac Coherent Light Source (LCLS) der Universität Stanford in Zusammenarbeit mit dem DESY-Hamburg eingesetzt. Die Analyse der gemessenen Daten war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen, allerdings zeigten erste Auswertungen Proteinbeugungsmuster.

3.2.3.2 Rekrystallisierung von TbCatB

Mit dem Ziel für eine Strukturaufklärung stabilere und größere Kristalle zu erzeugen, wurde versucht aus Kristallen gewonnenes TbCatB zu rekrystallisieren. In ersten Pilotversu-

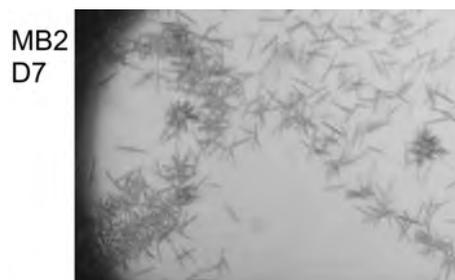


Abb. 3.29: Rekrystallisierung von TbCatB als feine Nadeln

chen konnten lediglich kleine, nadelförmige Kristalle erzeugt werden (s. Abb. 3.29). Erst als das Protein zusätzlich vorher deglykolisiert wurde (s. 2.2.6.4), bildeten sich größere Kristalle, die für eine Datenmessung an der SLS Beamline (Villigen, Schweiz) genutzt werden

konnten. Die Rekristallisierung und die folgende Strukturaufklärung wurde von Karolina Cupelli (Stehle Gruppe, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) durchgeführt. Die Proteinstruktur von TbCatB konnte durch Molekularen Ersatz mit der bovinen Cathepsin B Struktur (Yamamoto et al., 2000) bis zu einer Auflösung von 2,6 Å bestimmt werden. Die Koordinaten der Struktur wurden bei der RCSB-Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>, Berman et al. (2000)) mit dem ID-Code 3MOR hinterlegt.

3.2.3.3 Proteinstruktur von TbCatB

Allgemein entspricht die TbCatB-Struktur der unter 1.3.1.3 beschriebenen charakteristischen Cathepsin B-Faltung, mit der L- und R-Domäne, dem *occluding loop* und V-förmigen katalytischen Spalt (s. Abb.3.30). Es gibt jedoch auch einige Besonderheiten in der Struk-

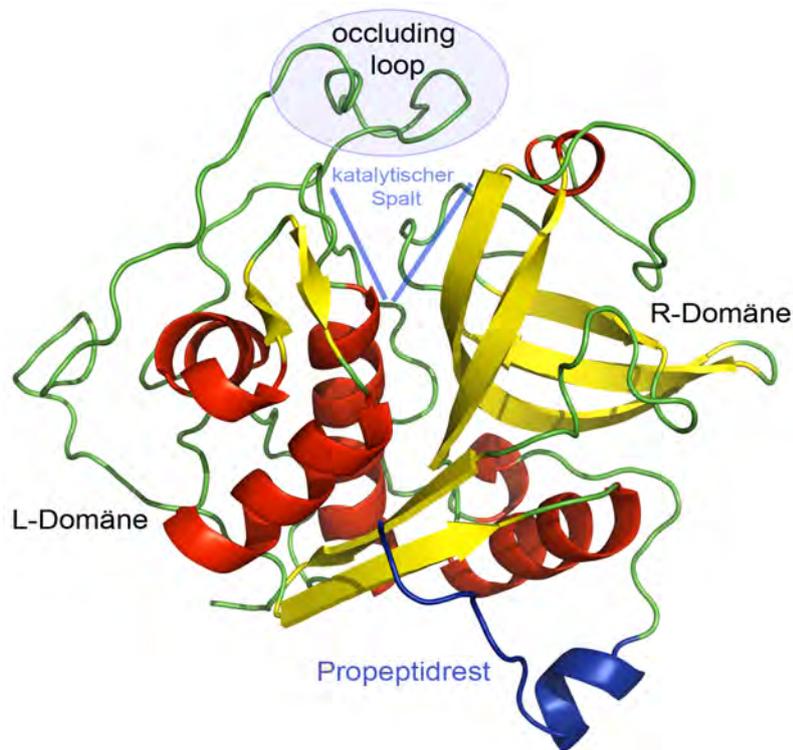


Abb. 3.30: Sekundärstrukturdarstellung der TbCatB-Proteinstruktur

tur von TbCatB und außerdem Unterschiede zur veröffentlichten Struktur des humanen Cathepsin B (Greenspan et al., 2001), welche für die Wirkstoffentwicklung interessant sind und im folgenden aufgezeigt werden.

Die TbCatB-Struktur trägt am N-terminalen Ende ein Teil des Propeptids, welches im aktiven Protein normalerweise vollständig abgespalten ist. Dieser Teil der Struktur endet

in der Nähe der S2-Bindetasche und verkürzt so den katalytischen Spalt. Interessant ist ferner, dass dieser N-terminale Bereich auch Bestandteil der Verbindungsfläche zwischen zwei Molekülen im Kristall ist und damit eine wichtige Rolle für das Zustandekommen der Kristallpackung spielt.

Protease	S2				S1				Katalytische Triade				S1'	S2'
<i>Homo sapiens</i>														
Cathepsin B	A156	E324	V326	Y154	P155	A252	A279	C108	H278	N298	Q102	W300	W189	H190
TbCatB	D168	G328	S330	D166	P167	A256	A283	C122	H282	N302	Q116	W304	H194	H195

Abb. 3.31: Strukturelles Alignment des aktiven Zentrums von *TbCatB* und humanem *Cathepsin B*

Das strukturelle Alignment von *TbCatB* und humanem *Cathepsin B* in Abb. 3.31 zeigt, dass die Reste des aktiven Zentrums größtenteils konserviert vorliegen, sich jedoch in der S2-Bindetasche unterscheiden. Dieser Bereich ist, wie unter 1.3.1.3 erwähnt, wichtig für die Substratspezifität. Die Abb. 3.32 zeigt die Unterschiede im Bereich der S2-Bindetasche in der Proteinstruktur zwischen *TbCatB* und humanem *Cathepsin B* (PDB-Code 1GMV).

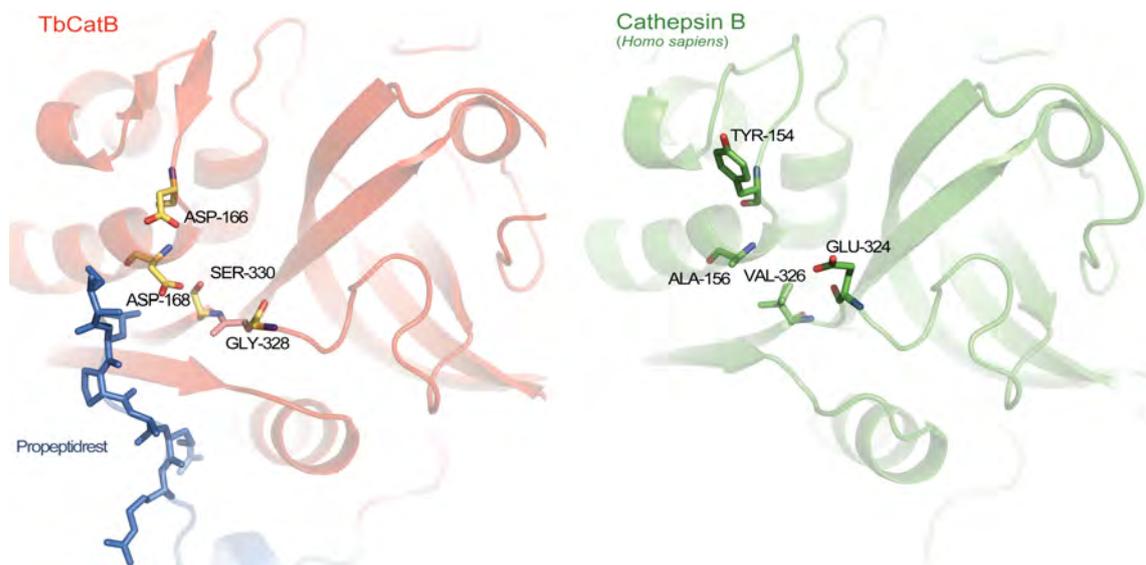


Abb. 3.32: Aminosäuren der S2-Bindetasche von *TbCatB* und humanem *Cathepsin B* im Vergleich

Während beim humanen Cathepsin B mit dem Glutamat (GLU-324) eine saure Aminosäure den Boden der S2-Bindetasche bildet, ist bei TbCatB an dieser Stelle ein Glyzinrest (GLY-328) zu finden. Dadurch ist in der Tasche mehr Raum und Inhibitoren mit großen unpolaren Aminosäuren, wie z.B. Phenylalanin, an Position P2 könnten so besser an TbCatB binden, als an das humane Cathepsin B. Ferner sind die Aminosäuren der S2-Bindetasche bei TbCatB polarer, was ebenfalls für eine verbesserte Affinität potentieller Leitstrukturen gegenüber des trypanosomalen Proteins genutzt werden könnte.

Die Oberflächendarstellung des S2-Bereichs in Abb. 3.33 zeigt, dass hauptsächlich die Reste TYR-154 und GLU-324 des humanen Cathepsin B zu räumlichen Veränderungen gegenüber dem entsprechenden Bereich in der TbCatB-Struktur führen und so in einer kleiner dimensionierten S2-Bindetasche resultieren. Deutlich ist in dieser Ansicht zu erkennen, dass der Propeptidrest den Bereich des katalytischen Spalts bei der Struktur von TbCatB von links her begrenzt und somit auch einen Einfluss darauf hat, welche Substrate von TbCatB gebunden werden können.

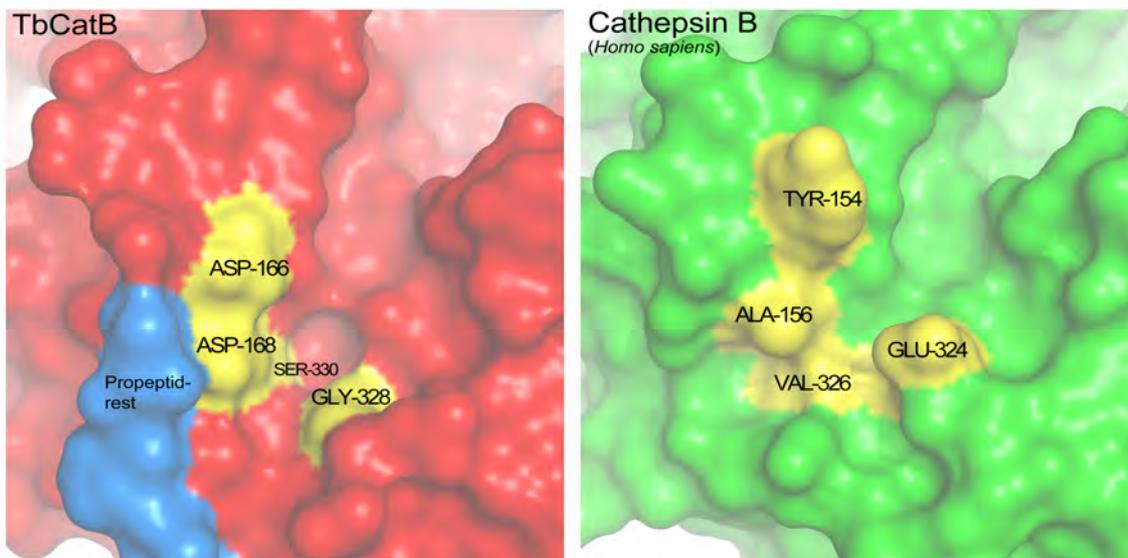


Abb. 3.33: Oberflächendarstellung von *TbCatB* und humanem *Cathepsin B* (Aminosäuren der S2-Bindetasche in gelb)

3.3 Expression von TbIMPDH unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle in Insektenzellen

Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen konnte bei der Überexpression einer bestimmten Form der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) aus *T.brucei* in Insektenzellen ebenfalls eine vergleichbare Kristallbildung, wie oben für TbCatB beschrieben, beobachtet werden.

In der Genom-Datenbank für *T.brucei* (<http://tritrypdb.org>) findet sich auf dem Chromosom 10 das 1539 bp-lange Gen mit der Nummer Tbg972.10.19740, das für ein TbIMPDH-Protein (nachfolgend TbIMPDH_long genannt). Ebenfalls auf dem Chromosom 10 befindet sich das 1344 bp-lange Gen mit der Nummer Tb927.10.16120 (nachfolgend TbIMPDH_short genannt). Dessen zugehörige Protein-Sequenz findet sich komplett in der entsprechenden des ersten längeren Gens wieder (s. 3.34). Beide Gene wurden in Insektenzellen exprimiert,

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
TbIMPDH_long 1 MENTNLRKTLRDGTAAELFSQDGLSFNDF I I L P G F I D F D S S K V N V S G G F T K N I L L H L P L V S P M D T V T E S S M A R A M A L M G G I G V I H N N C T V E 94
TbIMPDH_short 1 -----MDTVTESSMARAMALMGG I G V I H N N C T V E 29

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
TbIMPDH_long 95 QQARMVRSVKLYRNGF I M K P K S V S P D V P V S T I R N I K S E K G I S G I L V T E G G K Y D G K L L G I V C T K D I D F V K D A S A P V S Q Y M T R R E N M T V E R Y P I K L 188
TbIMPDH_short 30 QQARMVRSVKLYRNGF I M K P K S V S P D V P V S T I R N I K S E K G I S G I L V T E G G K Y D G K L L G I V C T K D I D F V K D A S A P V S Q Y M T R R E N M T V E R Y P I K L 123

      190     200     210     220     230     240     250     260     270     280
TbIMPDH_long 189 EEAMDVLNRSRHGYLPVLNDKDEVVCLCSRRDAVRARDYPNSSLDRNGHLLCAAATSTREADKGRVAALSEAG I D V L V L D S S Q G N T I Y Q V S F I R 282
TbIMPDH_short 124 EEAMDVLNRSRHGYLPVLNDKDEVVCLCSRRDAVRARDYPNSSLDRNGHLLCAAATSTREADKGRVAALSEAG I D V L V L D S S Q G N T I Y Q V S F I R 217

      290     300     310     320     330     340     350     360     370
TbIMPDH_long 283 WVKKTYPHLEVVAGNVVTQDQAKNLI DAGADSLR I G M G S G S I C I T G E V L A C G R P Q A T A I Y K V A R Y A A S R G V P C V A D G G L R N V G D V C K A L A V G A N 376
TbIMPDH_short 218 WVKKTYPHLEVVAGNVVTQDQAKNLI DAGADSLR I G M G S G S I C I T G E V L A C G R P Q A T A I Y K V A R Y A A S R G V P C V A D G G L R N V G D V C K A L A V G A N 311

      380     390     400     410     420     430     440     450     460
TbIMPDH_long 377 VAMLGSM I A G T S E T P G E Y F F K D G M R L K G Y R G M G S I D A M L Q G R E S G K R Y L S E N E T L Q V A Q G V A G A V L D K G S V L K L L A Y I H K G L Q Q S A Q D I G E V S F 470
TbIMPDH_short 312 VAMLGSM I A G T S E T P G E Y F F K D G M R L K G Y R G M G S I D A M L Q G R E S G K R Y L S E N E T L Q V A Q G V A G A V L D K G S V L K L L A Y I H K G L Q Q S A Q D I G E V S F 405

      480     490     500     510
TbIMPDH_long 471 D A I R E K V Y E G G V L F N R R S L T A Q S E G A V H S L H H Y E R K L F A S K L 512
TbIMPDH_short 406 D A I R E K V Y E G G V L F N R R S L T A Q S E G A V H S L H H Y E R K L F A S K L 447

```

Abb. 3.34: Zwei Varianten des TbIMPDH-Proteins

wobei ein unterschiedliches Ergebnis hinsichtlich der Bildung von Kristallen auftrat.

3.3.1 Klonierung

Die unter 2.1.7 genannten Primer für die Expression der beiden TbIMPDH-Formen in Insektenzellen wurden für eine AccuPrime-PCR mit trypanosomaler cDNA nach 2.2.1.2 mit einer Annealing Temperatur von 62°C verwendet. Das Vorgehen bei der Klonierung

bis zum Erhalt des rekombinanten Virus wurde analog zu 3.2.1 durchgeführt. Abweichend wurden hier die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII verwendet. Der Titer des hergestellten P2-TbIMPDH_long-Virusstock wurde nach 2.2.3.7 mit $1,4 \times 10^7$ pfu/ml bestimmt.

3.3.2 Auftreten von kristallartigen Strukturen

Das Auftreten von Kristallen konnte bei Insektenzellen, die in einer Monolayerkultur für 120 h bei RT mit P2-TbIMPDH_long-Virusstock (MOI = 0,1 pfu/cell) infiziert wurden, beobachtet werden. Das Absenken der Inkubationstemperatur gegenüber den normalerweise verwendeten 27°C, führte insgesamt zu mehr und größeren Kristallen. Die TbIMPDH_long-Kristalle sind im Vergleich zu den TbCatB-Kristallen länger und haben einen größeren Durchmesser (s. Abb.3.35). Im Gegensatz zu TbIMPDH_long gab es bei Infektionen mit

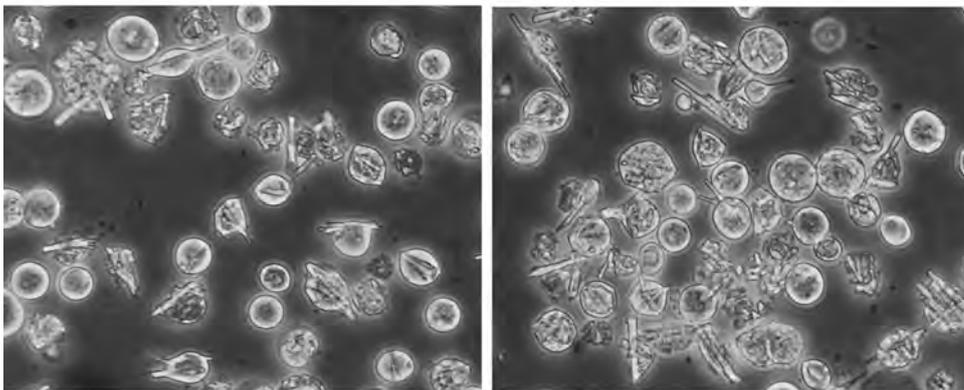


Abb. 3.35: Mit *TbIMPDH_long* infizierte Sf9-Zellen unter dem Lichtmikroskop (70 h pi)

TbIMPDH_short unter gleichen Bedingungen (MOI, Temperatur) zwar deutliche Anzeichen einer Infektion jedoch keine Kristallbildung, wie in Abb. 3.36 zu sehen ist.

Eine Wiederholung der Klonierung und Expression von *TbIMPDH_short* mit einem unterschiedlichen Vektor (pFastBacHTa) zeigte ebenfalls keine Kristallbildung, wodurch eine Beteiligung des Vektors pFastBacHTb bei der Bildung der Kristalle bei *TbIMPDH_short* ausgeschlossen wurde.

3.3.3 Analyse über SDS-Page und Western Blot

Eine 175 cm² ML-Kultur von Sf9-Insektenzellen wurde mit P2-TbIMPDH_long-Virusstock (MOI = 0,1 pfu/cell) infiziert und für 120 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Kris-

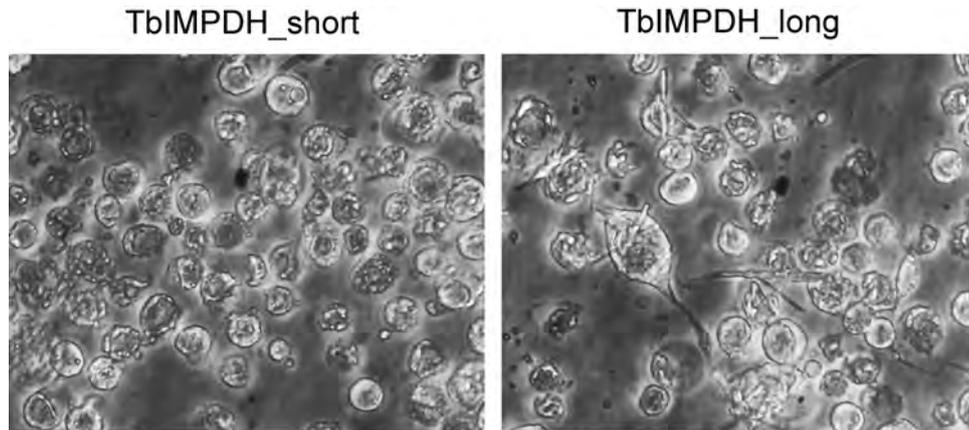


Abb. 3.36: Infizierte Sf9-Zellen (70 h pi) unter dem Lichtmikroskop

talle ließen sich ebenfalls nach 2.2.6.1 isolieren und resolubilieren. Anders als die TbCatB-Kristalle, welche sich komplett in saurem Puffer lösten, war bei den TbIMPDH-Kristallen jedoch eine unvollständige Resolubilisierung unter dem Lichtmikroskop zu beobachten. Die extrahierten Kristalle wurden hier alternativ in 1 ml PBS über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei ein kleiner Teil des Proteins aus den Kristallen in Lösung ging. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 13.000 g abzentrifugiert, über Proteinfällung (s.2.2.4.2) aufkonzentriert und in PBS gelöst. Diese Probe wurde über ein 10 %-SDS-Gel bzw. einen Western Blot und Detektion über His-Antikörper analysiert. Die über Coomassiefärbung des SDS-

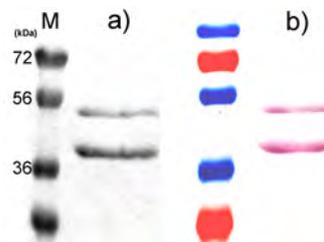


Abb. 3.37: SDS-PAGE Analyse der resolubilisierten TbIMPDH_long-Kristalle, a) Coomassie-Gel, b) Western Blot mit His-Antikörper

Gels sichtbaren beiden Banden (s. Abb.3.37.a)) werden auch durch den His-Antikörper erkannt (s. Abb.3.37.b) Neben der Bande für TbIMPDH_long bei 55 kDa, war eine Bande bei etwa 44 kDa zu erkennen.

3.3.4 Massenspektrometrische Bestimmung

Analog zu 3.2.1.10 konnte das aus den Kristallen gelöste Protein, welches als zwei Banden auf dem SDS-Gel erkennbar war, über massenspektrometrische Bestimmung der IMPDH

aus *T. brucei* (GI:1708476) zugeordnet werden. Dabei konnten für die untere Bande ebenfalls Peptidsequenzen detektiert werden, die in der N-terminalen Aminosäuresequenz von TbIMPDH_long enthalten sind.

3.3.5 Deglykosylierung

Die Proteinsequenz von TbIMPDH_long enthält kein Signalpeptid und es ist daher unwahrscheinlich, dass das Protein durch N-Glykosylierung modifiziert wird, obwohl es nach Analyse durch den NetNGlyc Server durchaus Sequenzmotive für eine potentielle Glykosylierung trägt. Zur Überprüfung dieser Annahme, wurden TbIMPDH_long-Kristalle nach 2.2.6.1 isoliert und ohne Resolubilisierung direkt für eine denaturierende Deglykosylierung mit PNGase F (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet (hierbei wurde die Probe für 10 min auf 100°C erhitzt, wobei sich die Kristalle auflösen). Anschließend wurde die Probe und eine unbehandelte Kontrolle über einen Western Blot mittels His-Antikörper analysiert (s. Abb. 3.38). Dabei war kein Unterschied zwischen Kontrolle und behandeltem Protein zu beobachten.

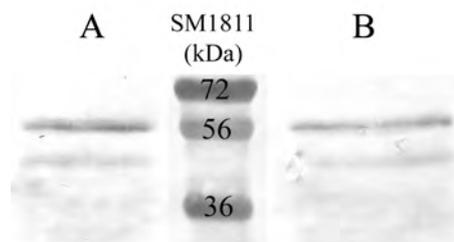


Abb. 3.38: Western blot mit His-AK: A = unbehandeltes IMPDH, B = deglykolyisiertes IMPDH

3.3.6 Untersuchungen durch Elektronenmikroskopie

3.3.6.1 Rasterelektronen-Mikroskopie

Sf9-Zellen wurden wie unter 3.3.3 infiziert, nach 80 h geerntet und nach 2.2.3.9 für die Analyse durch Rasterelektronenmikroskopie eingebettet. Die Abbildung 3.39 zeigt eine Sf9-Zelle mit einem freiliegendem, vierkantigen Kristall, welcher verglichen mit den TbCatB-Kristallen größer ist. Die Kristalle erscheinen oft zusammengesetzt aus mehreren kleinen

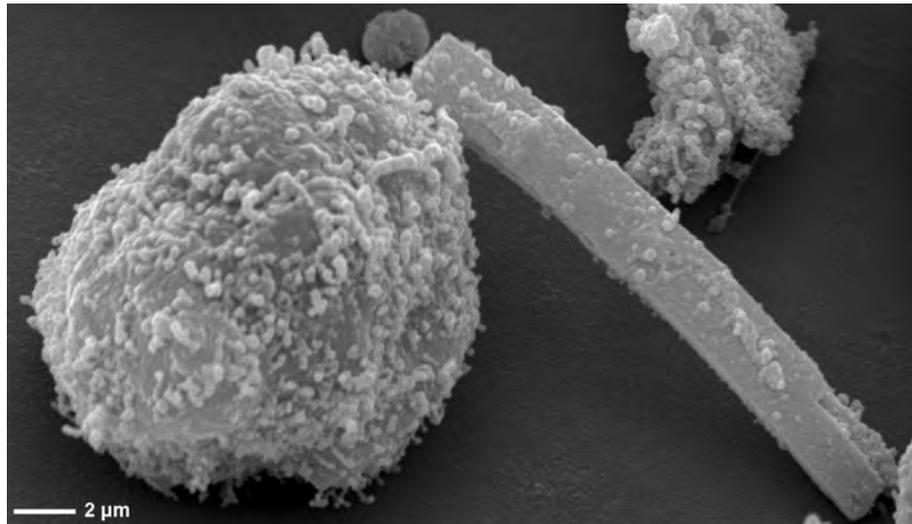


Abb. 3.39: REM-Aufnahme: Sf9 Zelle und freiliegender TbIMPDH_long Kristall

Schichten von Proteinmaterial und sind mehr oder weniger mit Zellresten bedeckt (s. Abb. 3.40).

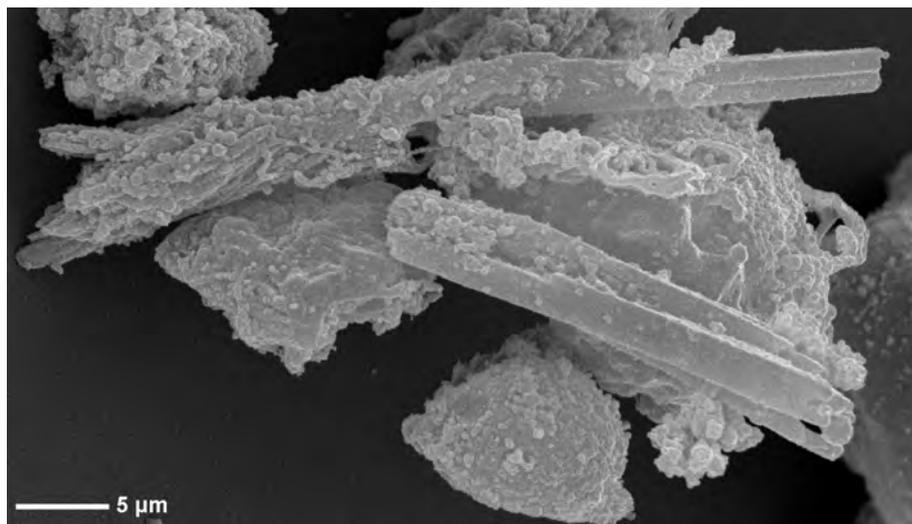


Abb. 3.40: TbIMPDH_long-Kristalle mit Zellresten assoziiert

3.3.6.2 Transmissionselektronen-Mikroskopie

Es wurden Sf9-Zellen wie unter 3.3.3 infiziert und bei 20°C für 132h inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich große Kristalle in den Zellen und es wurden Einbettungen nach 2.2.3.8 durchgeführt. Wie schon bei den Kristallen von TbCatB (3.2.1.7) konnte man

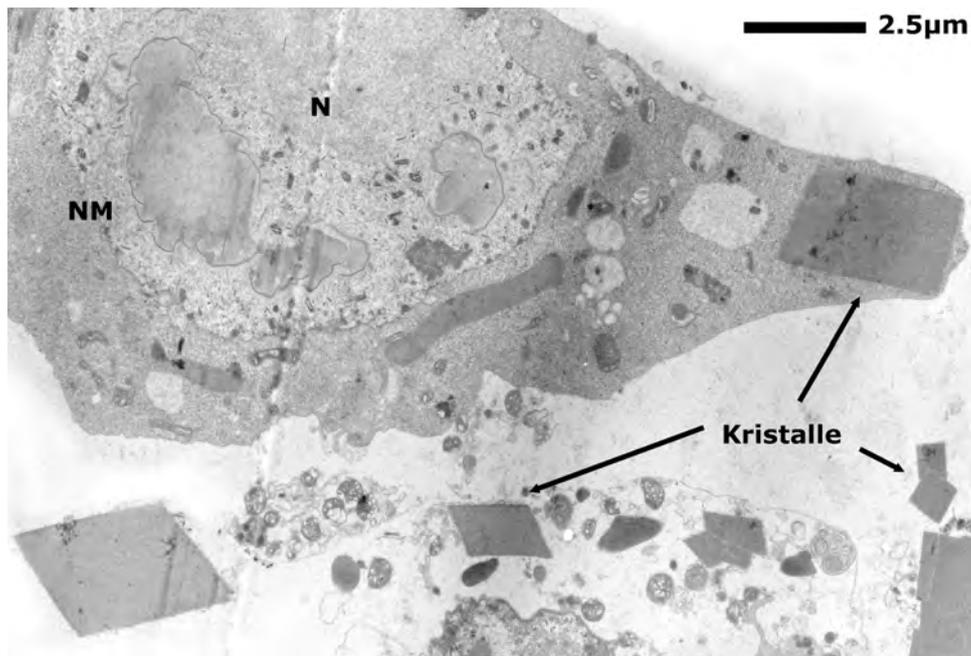


Abb. 3.41: Sf9 Zelle mit TbIMPDH_long-Kristallen

diese außerhalb des Zellkerns in verschiedener Morphologie vorfinden (s. Abb. 3.41).

Es gibt bei TbIMPDH_long-infizierten Zellen Strukturen im Zellkern, die Vorstufen der späteren Kristalle darstellen können (s. Abb. 3.42.1). Sie zeigen eine „faserartige“ Textur,

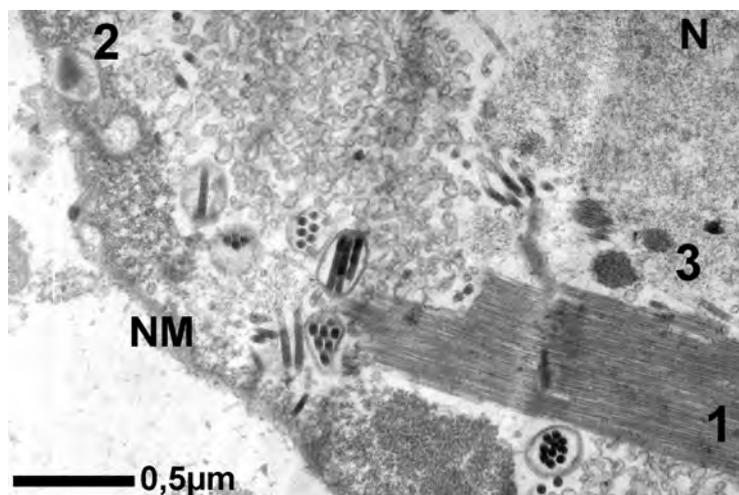


Abb. 3.42: Vergrößerter Bereich im Zellkern

die Ähnlichkeit mit Kristallbruchstücken ausserhalb des Zellkerns haben. Diese scheinen direkt aus den Viruspartikelhüllen hervorzugehen, wie es in Abb. 3.42 unter „3“ zu sehen ist. Andererseits ist ebenfalls in dieser Abbildung unter „2“ sichtbar, dass das bei TbCatB

beobachtete Abschnüren von Vesikel mit Proteininhalt ein denkbarer Mechanismus sein könnte. Die Lagenstruktur des Kristallgitters ist in der Abbildung 3.43 zu sehen.

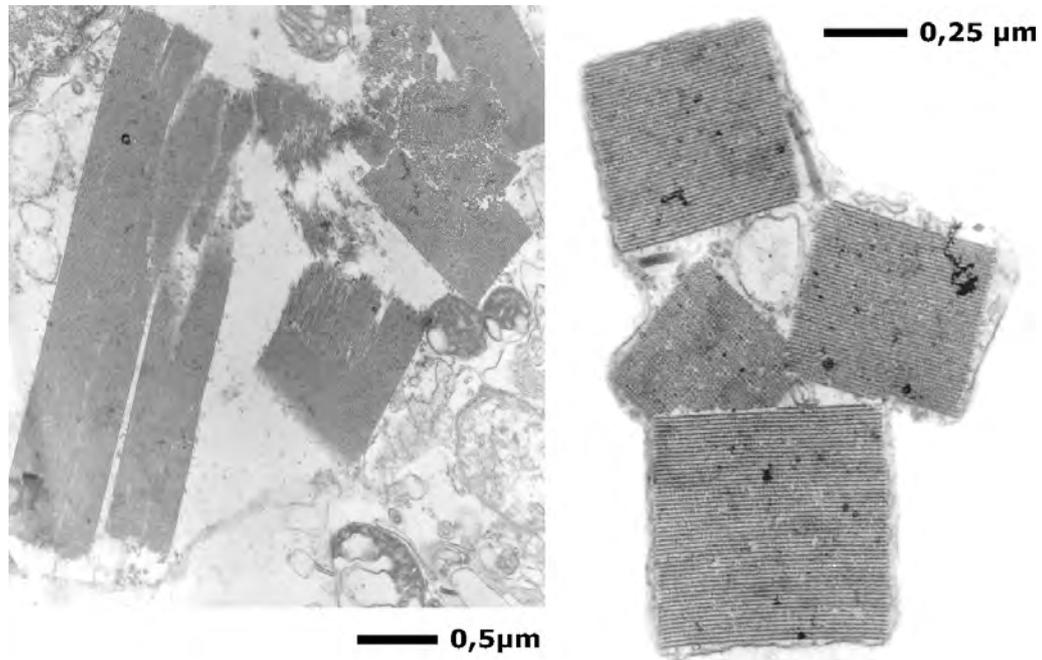


Abb. 3.43: Lagenstruktur von IMPDH-long Kristallen

Auch wenn es bei der Expression von TbIMPDH-short in infizierten Insektenzellen unter dem Lichtmikroskop keinerlei Anzeichen einer Kristallbildung gab, wurden für diese Zellen ebenfalls Bilder mit dem Elektronenmikroskop gemacht. Hierbei sollte untersucht werden, ob Ansätze von Kristallbildung zu erkennen lässt, welche im Lichtmikroskop nicht zu erkennen sind bzw. welche Strukturen bei einer regulären Expression zu erkennen sind, die nicht zu Kristallen führen.

In der Abbildung 3.44 sind in der Vergrößerung Vesikel zu erkennen, die teils kantige Partikel enthalten und eine Ähnlichkeit mit den membranumschlossenen Kristallen von TbCatB haben. Besonders auffallend ist der lang gestreckte dunkle Bereich im Zellkern, der den fibrillären Strukturen des Proteins p10 entspricht. (Rohrmann, 1992; Carpentier et al., 2008)

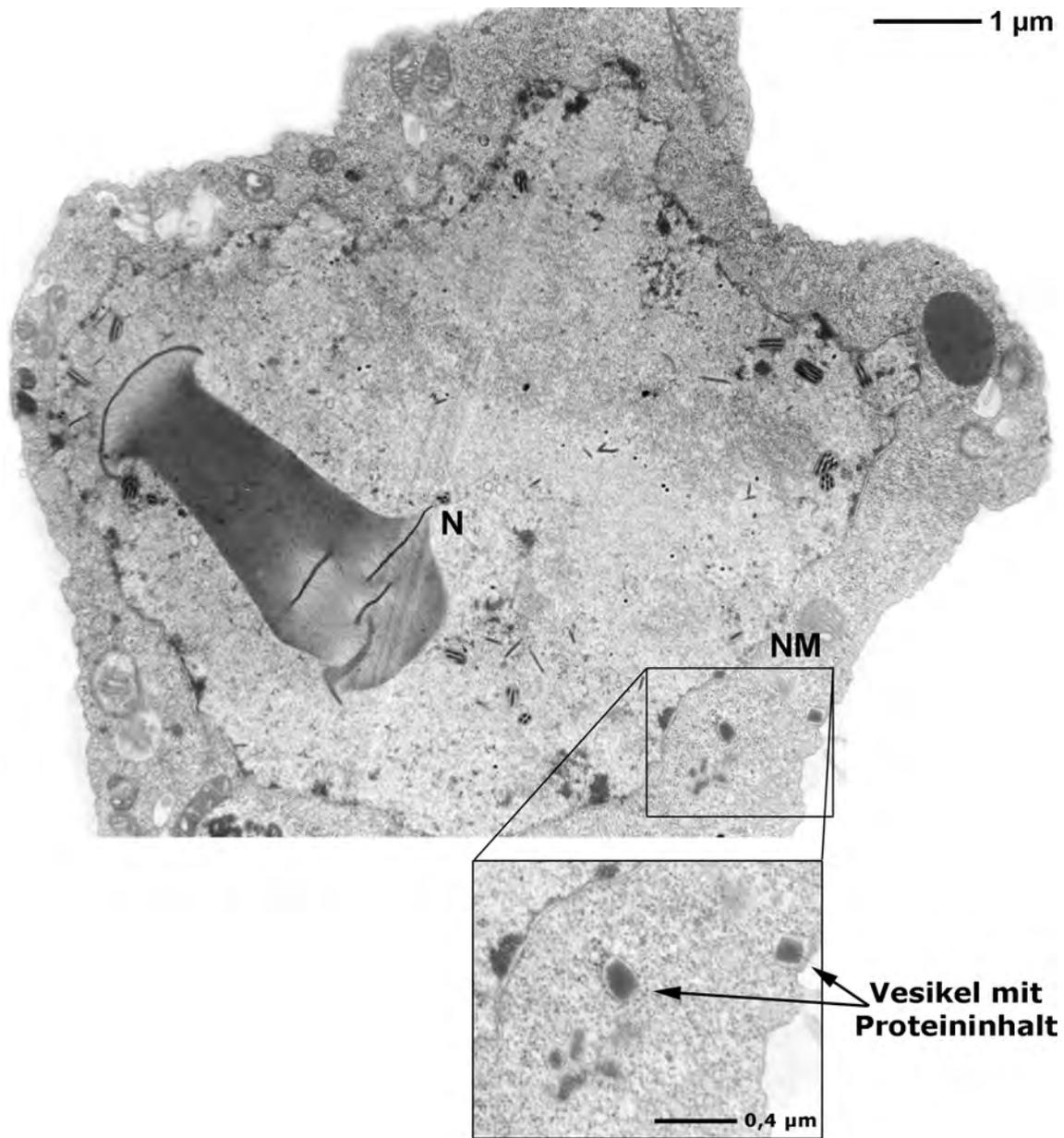


Abb. 3.44: Sf9-Zelle 90h mit TbIMPDH-short infiziert, vergrößerter Bereich zeigt Vesikel

3.3.6.3 Immunelektronenmikroskopie

Es wurden nach 2.2.3.10 infizierte Insektenzellen verwendet, um Cryoschnitte für die Immuno-TEM anzufertigen. Diese Arbeiten wurden von Dr. York Stierhof (Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen ZMBP, Universität Tübingen) und Mitarbeitern durchgeführt. Zur Immunmarkierung wurden dabei zunächst His-Antikörper eingesetzt, welche im zweiten Schritt durch Nanogold-gekoppelte Antikörper detektiert wurden. Auf den dabei entstandenen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Kristalle deutlich mit Gold markiert wurden (s. Abb. 3.45.A). Auch die länglichen Vorstufen von Kristallen, die bereits in Abb. 3.42.1 zu sehen sind, wurden markiert (s. Abb. 3.45.B).

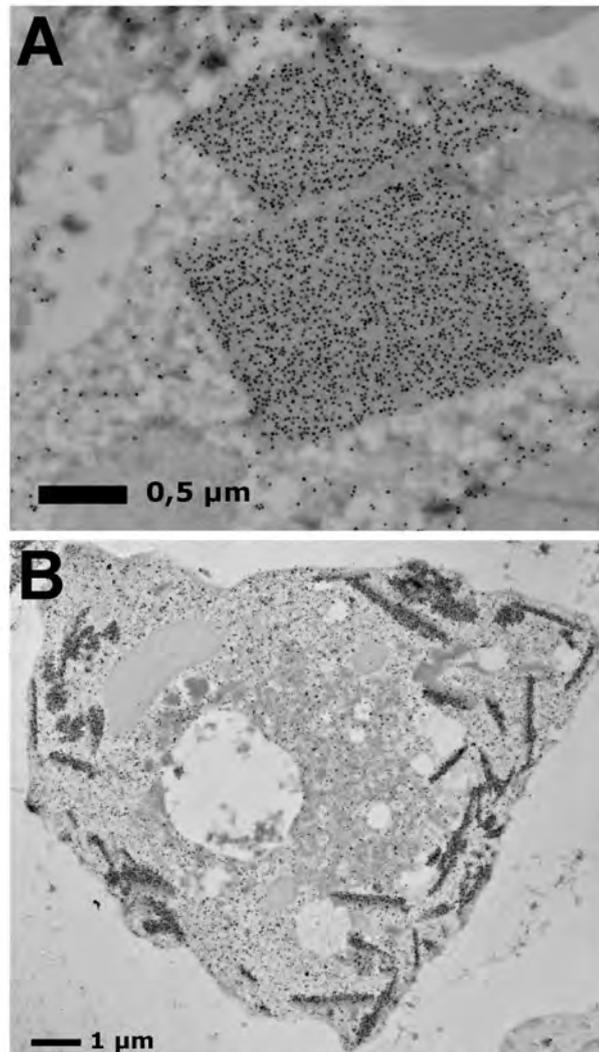


Abb. 3.45: Immunogold Labeling

4 Diskussion

4.1 Strukturaufklärung von TbATG8

Die Rolle der Autophagie bei Trypanosomen ist auf Proteinebene bis dato kaum bekannt und wenig erforscht worden. Neben den eingangs geschilderten genetischen Fakten, die besagen, dass ein Großteil der autophagie-beteiligten Gene aus Hefen auch bei Trypanosomen mit konservierten Sequenzen zu finden sind, gibt es bislang nur wenige funktionelle und keine strukturellen Analysen zu Autophagieproteinen.

In dieser Arbeit sollte mit der Aufklärung der Struktur des wichtigen Markerproteins TbATG8 ein Anfang gemacht werden, den Prozess der Autophagie in Protozoen von struktureller Seite her zu untersuchen. Das Protein konnte hierzu erfolgreich in löslicher Form in *E.coli* überexprimiert und in aufgereinigter Form für das Heranzüchten von Kristallen verwendet werden. Von diesen Kristallen konnten Beugungsdaten von guter Qualität gemessen werden. Auf Grundlage dieser Daten konnte die Kristallstruktur von TbATG8 bis zu einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt werden. Der relative hohe R_{free} Wert war durch die hohe Flexibilität der Aminosäuren am N- und C-Terminus bedingt. Dies deckt sich mit strukturellen Untersuchungen von ATG8 bei Hefen, wo ebenfalls eine Flexibilität in der Konformation der N-terminalen Domäne beobachtet wurde (Schwarten et al., 2010).

Es stellte sich heraus, dass die Struktur von TbATG8 eine große Ähnlichkeit zu den bereits bekannten verwandten Strukturen von Ubiquitin-like modifier-Proteinen (Ubl) aus höheren Eukaryonten hat (3.1.5). Dies ist nicht verwunderlich, da die Faltung innerhalb dieser Protein-Familie, trotz der z.T. unterschiedlichsten Funktionen sehr gut konserviert ist. Anhand der unter 3.1.6 dargestellten möglichen Interaktionen mit einem Homologie-Modell von TbATG4 wird zudem deutlich, dass eine Komplexbildung von TbATG8 zu TbATG4 möglich ist, die dem bei höheren Eukaryonten bestimmten Bindungsmodus sehr ähnlich ist.

Aus den gewonnenen Daten läßt sich ableiten, dass der mit TbATG8 zusammenhängende Teil der Autophagie in Trypanosomen im Prinzip sehr ähnlich abläuft, wie bereits bei

Hefen und höheren Eukaryonten beschrieben. Dennoch gibt es auch deutliche Hinweise, die darauf hindeuten, dass TbATG8 und die zugehörige Protease ATG4 möglicherweise eine andere Bedeutung in Trypanosomen haben könnten.

Dabei ist zunächst die Tatsache zu nennen, dass es im Genom von *T. brucei* zwei ATG8-homologe Gene gibt (ein drittes homologes Gen wird, aufgrund seiner Sequenz und aufgrund von Untersuchungen bei *Leishmania major* eher einer ATG12-Funktion zugeordnet). Eines dieser Gene liegt als Protein bereits in der prozessierten Form vor. Dies ist auch bei Apicomplexa, wie z.B. *Plasmodium falciparum*, wo es nur ein ATG8-Protein gibt, der Fall (Ponder und Bogyo, 2007). Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass zweierlei Modi der Nutzung von ATG8 in Trypanosomen vorkommen.

Zum einen ist eine basale, konstitutiv ablaufende Autophagie denkbar, bei der das synthetisierte und schon für die Aktivierung und Lipidierung fertige TbATG8 (TbATG8A) dafür sorgt, dass über autophagische Prozesse Schwankungen in der Nährstoffversorgung ausgeglichen werden bzw. „alte“ Organellen recycelt werden. In diesem Fall wäre ATG4 lediglich für die Dekonjugation von ATG8 von der Autophagosomenmembran nötig.

Darüber hinaus könnte der zweite Typ von ATG8-Protein (TbATG8B) eine Art Reserve darstellen, welche bei schnell eintretenden Veränderungen des zellumgebenden Milieus oder umfangreichen Remodellierungsprozessen bei der Differenzierung, eine Möglichkeit bietet, über Induktion von ATG4 größere Mengen aktivierbares ATG8 zur Verfügung zu stellen. Die Induktion von ATG4 unter Hungerbedingungen konnte bei dem Pilz *Magnaporthe oryzae* nachgewiesen werden (Liu et al., 2010). Ferner haben Betin und Lane (2009) die Regulation bzw. Aktivierung von ATG4 untersucht. Diese zweite Möglichkeit des Einsatzes von ATG8 würde durch den Zwischenschritt über ATG4 eine feinere Steuerung der Autophagie erlauben, welche sich in der Evolution später entwickelt und dabei die basale Autophagie in ihrer Funktion abgelöst haben könnte.

Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass die Menge an gebildetem ATG8 in *T. brucei* im Vergleich zu den anderen Kinetoplastiden *T. cruzi* und *L. major* (Alvarez et al., 2008b; Besteiro et al., 2006; Williams et al., 2009) sehr gering ist und auch während der Differenzierung kaum Veränderungen unterworfen ist, sowie keine lipidierten Formen des TbATG8 detektiert werden konnten (Herman et al., 2008). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu dem, was über Hefen bekannt ist und deuten darauf hin, dass TbATG8 möglicherweise eine andere Bedeutung und Funktion innerhalb von *T. brucei* hat.

Für die Interaktion von ATG8 findet sich bei bestimmten anderen autophagie-relevanten Proteinen das von Noda et al. (2008) eingeführte ATG8-family interaction motif (AIM). Bei der Struktur von TbATG8 sind die zwei hydrophoben Bereiche für die Erkennung dieses

Motivs zwar konserviert (Noda et al., 2010), aber die entsprechenden AIM bei TbATG4 und TbATG3 sind nicht zu finden, bei letzterem fehlt im Vergleich zum ATG3 aus Hefen dieser Bereich der Aminosäuresequenz sogar vollständig. Dies legt nahe, dass durchaus Unterschiede in der Interaktion von TbATG8 mit anderen autophagierelevanten Proteinen möglich sind.

Ein weiterer Unterschied in der Autophagie zwischen Trypanosomen und höheren Eukaryonten liegt in der Sequenz der ATG4-Proteine. Für *T. cruzi* konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von autophagie-relevanten Proteinen bei der Differenzierung hochreguliert sind (Alvarez et al., 2008b). Daher wird auch diskutiert, ob ATG4 möglicherweise ein interessantes Targetprotein für spezifische Inhibitoren sein kann (Alvarez et al., 2008a; Rubinsztein et al., 2007). *T. brucei* enthält zwei homologe Gene für ATG4. Die größte Homologie zum humanen ATG4B weist das trypanosomale TbATG4.1 (GeneDB-ID: Tb11.01.7970) mit einer Sequenzähnlichkeit von ca. 30 % auf, wobei die Triade, bestehend aus Cys73, Asp246, His248 (TbATG4.1-Nummerierung s. a. Abb. 4.1), die an der Katalyse der Prozessierung beteiligt ist, ebenfalls konserviert vorliegt. Interessant ist die Tatsache, dass der Sequenz-

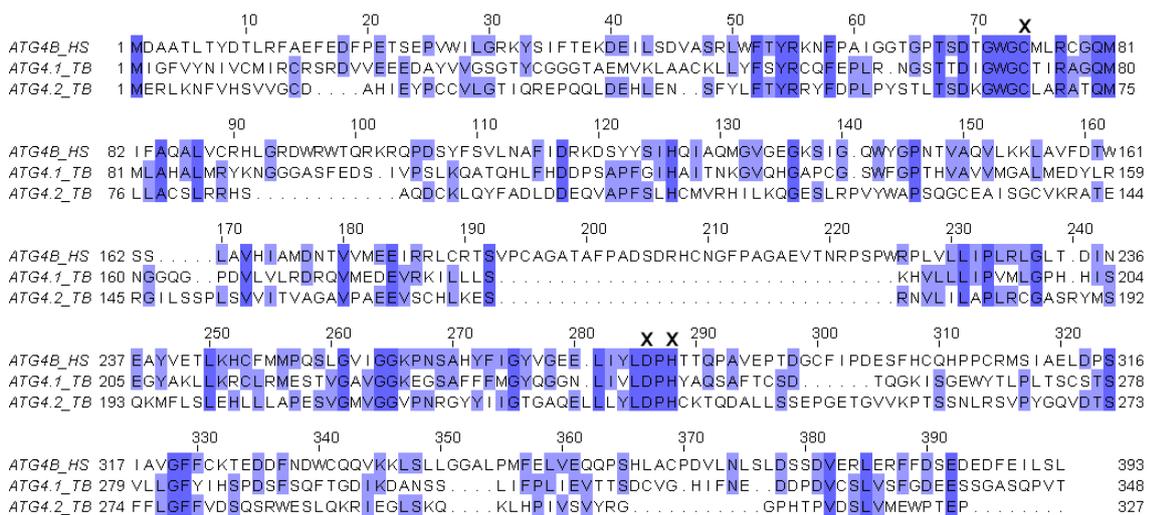


Abb. 4.1: Sequenzalignment der ATG4 Proteine von *H. sapiens* und *T. brucei*, Katalytische Triade markiert mit X.

bereich des humanen HsATG4B von Ser186 bis Pro216 in beiden trypanosomalen ATG4-Proteinen komplett fehlt. Eine persönliche Nachfrage bei den Autoren von Satoo et al. (2009) ergab, dass die Region eine hohe Flexibilität aufweist und daher auch in keiner der veröffentlichten Strukturen von ATG4 enthalten ist. Für die Entwicklung von Inhibitoren gegen trypanosomales ATG4 könnten die oben aufgezeigten Sequenzunterschiede einen wichtigen Beitrag zur Spezifität gegenüber humanen Cysteinproteasen leisten. Für

ein besseres Verständnis der Autophagie bei Trypanosomen ist es wichtig, die Bedeutung der beiden ATG8-Proteine im Zusammenhang mit ATG4 weiter zu untersuchen.

4.2 Expression von TbCatB unter Bildung intrazellulärer Proteinkristalle

Ein wichtiges Organell für autophagische Prozesse stellt das Lysosom mit den zugehörigen Proteasen dar. Von den lysosomalen Proteinen bei *T.brucei* ist die Cysteinprotease TbCatB besonders interessant, da sie, wie eingangs unter 1.3 dargestellt, für das Überleben des Parasiten im Blut des Wirts essentiell ist. Daher ist TbCatB auch ein wichtiges Target für die Entwicklung von Wirkstoffen. Obwohl schon diverse Proteinstrukturen von ähnlichen Cathepsin-B-Proteasen bekannt sind, bieten genaue Daten über die Proteinstruktur von TbCatB die Möglichkeit, Unterschiede zum humanen Cathepsin B aufzudecken und damit bestehende Inhibitoren (Mallari et al., 2008b,a, 2009) in ihrer Spezifität an die Trypanosomen anzupassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde TbCatB in Insektenzellen exprimiert, um Daten über die Struktur des Proteins zu erhalten. Hierbei konnte beobachtet werden, wie sich nadelförmige Kristalle innerhalb der infizierten Zellen bildeten und auch nach der Lyse der Zellen im Medium verblieben. Da dieses Phänomen in dieser Form bislang nicht beschrieben worden ist und möglicherweise alternative Wege der Proteingewinnung bzw. Kristallisierung bietet, wurden diese Kristalle auf verschiedene Weise näher untersucht.

4.2.1 Charakterisierung der *in vivo*-Kristalle

Die beobachteten *in-vivo* Kristalle entstehen in infizierten Insektenzellen und sind ab ca. 70 h im Lichtmikroskop als nadelförmige Mikrostrukturen sichtbar. Im weiteren Verlauf der Infektion steigt die Anzahl der Kristalle sowohl insgesamt als auch in den einzelnen Zellen deutlich an. Die Schädigung der Zellen durch die Baculovirusinfektion und schließlich deren Lyse führen dazu, dass zunehmend Kristalle auch frei im Medium vorliegen, wo sie sich auch über längere Zeit (etwa eine Woche) hinweg nicht auflösen.

Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen (s. 3.2.1.6, 3.2.1.7) konnte Morphologie und Lokalisation innerhalb der Zellen näher bestimmt werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ließen erkennen, dass die 10-20 µm langen und 0,5-2 µm breiten

Kristalle aus dem Inneren der Zellen herauswachsen und dabei die Zellmembran durchstoßen. Dies zieht interessanterweise keine sofortige Lyse der Zelle nach sich, was darauf hindeutet, dass die Kristalle mit Teilen einer dehnbaren oder wachsenden Membran assoziiert sind, welche einen Austritt des Zytosols bzw. ein Einströmen der Mediumflüssigkeit an der Durchbruchstelle verhindert.

Außerdem sind auf der Oberfläche der Kristalle Kanten zu erkennen, die darauf hindeuten, dass der Kristallisierungsprozess nicht einheitlich verläuft und die Kristalle damit in sich keinen homogenen Aufbau der Kristalllagen bilden. Diese Annahme wird ferner gestützt durch Bilder, die mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen wurden und belegen, dass die Gitterstruktur an einigen Stellen unterbrochen bzw. inhomogen ist.

Aus den TEM-Bildern ergibt sich außerdem, dass die Kristalle in ihrer fertigen Form außerhalb des Zellkerns im Zytosol vorkommen und dabei oft von einer Membran umgeben sind. Ferner lassen sich dunkel kontrastierte Bereiche ausmachen, die Ansammlungen von Protein und damit Vorstadien zur Kristallbildung darstellen könnten. Anders als bei Polyhedrinkristallen sind keine Einschlüsse von Viren-Partikeln in den Kristallen zu erkennen, was eine Folge der Lokalisierung außerhalb des Zellkerns sein kann.

Innerhalb des Zellkerns sind ebenfalls amorphe, dunkel kontrastierte Bereiche zu erkennen, die im Rahmen der Expression von viruseigenen Proteinen und der Verpackung von Nukleokapsiden während der Infektion entstehen und auch in früheren Untersuchungen von infizierten Sf9-Zellen beobachtet wurden (Eason et al., 1998; Fang et al., 2007).

Die direkte Verwendung der Kristalle für eine Röntgen-Strukturanalyse stellte sich aufgrund der kleinen Dimensionen und der Unregelmässigkeiten in der Struktur der Kristalle mit den bis dato verfügbaren Verfahren als schwierig dar (3.2.3.1). Möglicherweise lassen sich mit der Verwendung eines Freie-Elektronen Lasers solcherart Mikrokristalle zukünftig direkt messen. Erste Pilotversuche wurden dazu in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Christian Betzel am DESY in Hamburg initiiert.

Um das Protein in den Kristallen dennoch für weitere Analysen und der Generierung von Strukturdaten nutzen zu können, konnte ein Verfahren entwickelt werden, mit dem sich die Kristalle aus den Zellen isolieren und durch Inkubation in saurem Puffer resolubilisieren ließen (2.2.6.1). Unter verschiedenen Bedingungen, wie wässrigen Puffern mit leichten Detergenzien, sowie in neutralen oder alkalischen Lösungen, waren die Kristalle hingegen stabil und lösten sich nicht auf. Dies steht im Kontrast zu den Polyhedrinkristallen, die sich in alkalischen Puffern auflösen (Brandt, 1948; Coulibaly et al., 2007).

Durch die Resolubilisierung konnte das im Kristall enthaltene Protein näher untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Kristalle nach massenspektrometrische Analyse aus

dem exprimierten TbCatB bestanden, das allerdings in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen auftrat. Wurde das resolubilisierte TbCatB enzymatisch deglykosyliert und über eine SDS-Gelelektrophorese analysiert, war das Protein als einzelne Bande auf dem SDS-Gel zu erkennen, die dem Molekulargewicht des reifen Proteins entsprach. Über einen Aktivitätsassay konnte zudem nachgewiesen werden, dass das resolubilisierte TbCatB eine Proteaseaktivität zeigte.

In der deglykosylierten Form konnte das Protein schließlich erfolgreich für eine Rekrystallisierung eingesetzt und die entstehenden Kristalle für eine Strukturbestimmung verwendet werden. Dabei war interessant, dass vorherige Versuche das noch glykosylierte Protein zu rekristallisieren, nur kleine, nadelförmige Kristalle ergaben. Dies könnte bedeuten, dass die Glykosylierung die Ausbildung größerer Kristalle verhindert und die zwei Typen des Enzyms nur in einer bestimmten Konformation auskristallisieren, die die charakteristische Nadelstruktur hervorruft. Beide Formen könnten unterschiedlich kristallisieren, so dass es zu Mischkristallen käme, was zu der beobachteten inhomogenen Packung führte. Allgemein scheint die Glykosylierung von TbCatB für die Kristallbildung wichtig zu sein, da eine Hemmung der Glykolysierung mit Tunicamycin die Kristallbildung in den Zellen deutlich reduzierte.

Das TbCatB-Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit einem His-Tag an verschiedenen Positionen exprimiert. Bei der Expression von TbCatB als Protein mit N-terminalem His-tag in Insektenzellen wurde das Protein nur in unlöslicher Form gebildet. Wie unter [3.2.2.1](#) angedeutet, scheint im Fall der Expression von der PrePro-Form mit N-terminalem His-tag eine Veränderung bzw. Erweiterung des N-terminus die Translation und postranslationale Modifikation dahingehend negativ zu beeinflussen, dass kein korrekt gefaltetes Protein entstehen kann. Wurde die aktive Form von TbCatB mit N-terminalem His-tag exprimiert, verhinderte die fehlende Prodomäne vermutlich die Ausbildung der korrekten Faltung, wie auch schon von [Muntener et al. \(2005\)](#) gezeigt worden ist.

Die Expression von TbCatB mit einem C-terminalem His-tag und einem viruseigenem Signalpeptid ergab TbCatB in löslicher Form, das durch Affinitätschromatographie hervorragend gereinigt werden konnte. Bei diesem Konstrukt konnte jedoch, wie schon bei den zwei vorher genannten, keinerlei Anzeichen von Kristallbildung beobachtet werden. Daraus lässt sich schliessen, dass dem N-terminalen Bereich mit dem TbCatB-Signalpeptid, und damit dem Beginn der Translation, eine wichtige Bedeutung für die Ausbildung der *in vivo*-Kristalle zukommt.

Dies wird ferner gestützt durch Beobachtungen bei einem zweiten Protein aus *Trypanosoma brucei*, der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (TbIMPDH), bei der ebenfalls Unterschiede im N-terminalem Bereich zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der

Bildung intrazellulärer Proteinkristalle führten. Von den zwei Varianten des TbIMPDH-Proteins, TbIMPDH_{short} und TbIMPDH_{long} entstanden nur bei der Expression von TbIMPDH_{long} Proteinkristalle in den Insektenzellen. TbIMPDH_{long} unterscheidet sich von TbIMPDH_{short} durch eine N-terminale Erweiterung von 65 Aminosäuren. Da dies der einzige Unterschied zwischen beiden Protein-Varianten ist, lässt sich vermuten, dass dieser Sequenzbereich maßgeblich zur Bildung der Kristalle beiträgt. Anders als bei TbCatB hat TbIMPDH kein Signalpeptid und wird nicht posttranslational durch Glykosylierung modifiziert. Eine Hemmung der Glykosylierung mit Tunicamycin hatte, verglichen mit TbCatB, daher auch keine Auswirkung auf die Menge der gebildeten Kristalle. Ein weiterer Unterschied zu TbCatB war, dass die Kristalle nicht in Vesikeln vorlagen bzw. auch nicht von einer Membran umgeben waren.

4.2.2 Mögliche Ursachen der *in vivo* Kristallbildung in Insektenzellen

Auf der Suche nach einer Erklärung für die Ausbildung von Proteinkristallen in Insektenzellen ist es nützlich, zunächst darzustellen, in welchem Zusammenhang Kristallbildung in ähnlicher Weise bei Baculovirusinfektionen in freier Natur bzw. innerhalb des Baculovirus-Expressionsystems im Labor bereits bekannt sind.

Bei der Infektion von Insektenzellen durch Wildtyp-Baculoviren vom Typ Nucleopolyhedrovirus, werden die Virionen in eine Proteinmatrix aus dem Hüllprotein Polyhedrin verpackt. Diese Polyhedrinmatrix ist kristalliner Natur und erlaubt es dem Virus auf Pflanzen auch widrige Umweltbedingungen zu überstehen. Werden die Blätter dieser Pflanzen von einer Motte gefressen, so löst sich die Polyhedrinmatrix in der alkalischen Umgebung des Verdauungstraktes auf und die Viren befallen das Insekt (Vogel, 1986). Daher lässt sich sagen, dass Insektenzellen in Kombination mit Baculoviren und deren Verpackungsprozess einen intrazellulären Kristallisations-Mechanismus bieten. Dieser Mechanismus konnte in der Vergangenheit dazu genutzt werden, um Polyhedrin mit einem anderen rekombinanten Protein zu koppeln und aus den entstehenden Mischkristallen Strukturdaten dieser Proteinchimäre zu erhalten (Coulibaly et al., 2007).

Die Bildung von Proteinkristallen ohne Polyhedrinanteil in Sf9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) bei der Anwendung des Baculovirus-Expressionsystems ist ein bisher nur einmal beobachtetes Phänomen. Fan et al. (1996) haben beschrieben, dass es bei der Co-expression von zwei Untereinheiten des Calcineurins, einer Serin-/Threoninphosphatase, zur Ausbildung von kristallartigen Körpern in infizierten Insektenzellen kam. Hierbei entstanden jedoch keine Kristalle, wenn einzelne Untereinheiten exprimiert wurden. Erst mit

der gleichzeitigen Expression der Untereinheit NorfA aus *Neurospora crassa* mit der Untereinheit CNB aus *Homo sapiens* kam es nach 48 h zu diesen Gebilden. Die Autoren beobachteten eine Größenzunahme der Kristalle über die Zeit. Die Länge der bis zu drei Kristallen pro Zelle lag unter 10 μm und konnte damit den gesamten Durchmesser der Zelle ausmachen. Ferner war das Entstehen der Kristalle nicht von der verwendeten Zelllinie abhängig. Bei kleinen Kristallen war eine umgebende Membran zu erkennen. Die Kristalle waren in wässrigem Puffer unlöslich.

Diese Beobachtungen haben eine Ähnlichkeit mit der Kristallbildung bei der Expression von TbCatB. Da aber weitergehende Untersuchungen über die Calcineurinkristalle bisher nicht bekannt sind, ist ein Vergleich schwierig. Gemeinsamkeiten mit den in dieser Arbeit beobachteten *in vivo*-Kristallen lassen sich dennoch in der Entstehung außerhalb des Zellkerns im Cytosol und dem zunehmenden Wachstum im Verlaufe der Infektion finden. Interessant ist ferner die Gemeinsamkeit, dass kleine Kristalle, die erst am Anfang ihres Wachstums sind, von einer Membran umgeben sind. Anders als bei den in dieser Arbeit beobachteten Kristallen, konnten die Calcineurinkristalle nur in Monolayerkulturen erzeugt werden, was mit einer Sensibilität gegenüber den erhöhten Scherkräften der Suspensionkulturen zusammenhängen kann.

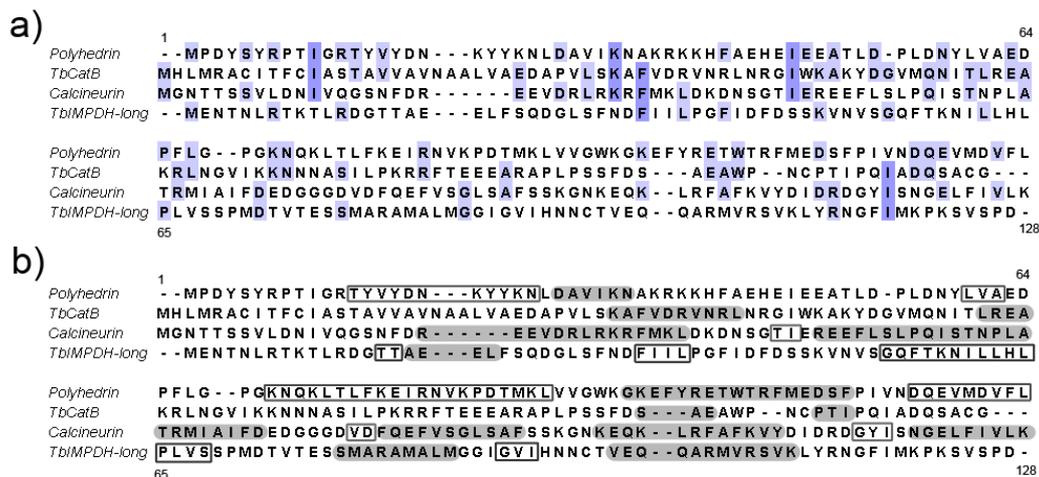


Abb. 4.2: Alignment des N-terminalen Teils der kristallbildenden Proteine:
a) Prozentuale Übereinstimmung farblich unterlegt,
b) Verteilung der Sekundärstrukturen (grau unterlegt = α -Helix, schwarzer Rahmen = β -Faltblatt)

Naheliegender wäre es nun, die Gemeinsamkeiten der Proteine, bei denen es zur Kristallbildung kommt, zu analysieren. Diese Proteine haben jedoch unterschiedliche Funktionen und zeigen auch keinerlei Ähnlichkeit in ihrer Proteinsequenz. Vergleicht man in einem

multiplen Sequenzalignment den N-terminalen Teil der kristallbildenden Proteine, welcher sich sowohl für TbCatB als auch für IMPDH als entscheidend für die Kristallbildung erwiesen hatte, so ergibt sich, dass zwar einzelne Aminosäuren übereinstimmen (s. Abb. 4.2.a), es jedoch kein gemeinsames, prägnantes „Kristallisations-Motiv“ gibt. Auch die Zusammensetzung der Sekundärstrukturen ist unterschiedlich (s. Abb. 4.2.b) und bietet sich nicht offensichtlich als Grund für die Kristallisation an.

Beim Matrixprotein Polyhedrin ist dagegen bekannt, dass die Proteinsequenz eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation und Morphologie der kristallinen Polyhedra (Carstens et al., 1986; Slavicek et al., 1998) spielt. Schon eine Punktmutation im Polyhedringen und ein damit verbundener Austausch einer Aminosäure ist ausreichend für deutliche Veränderungen in der Morphologie (Lin et al., 2000) der Polyhedrin-Kristalle. Die Lokalisation von Polyhedrinkristallen im Nukleus ist bedingt durch eine Kernlokalisierungssequenz (Jarvis et al., 1991), welche sowohl bei TbCatB als auch bei TbIMPDH nicht vorhanden ist. Durch Mischformen mit anderen Matrixproteinen wie Granulin konnten verschiedene Morphologien und Lokalisationen der Polyhedra beobachtet werden (Eason et al., 1998), wobei man annahm, dass neben der reinen Aminosäuresequenz bestimmte Wechselwirkungen mit viralen Proteinen ebenfalls für die Ausbildung der Kristalle wichtig sind. Daher ist es auch denkbar, dass im Fall des Baculovirusexpressions-Systems, bei welchem das Polyhedringen faktisch durch das jeweilige rekombinante Gen ausgetauscht wird, die Primärstruktur dieses „Fremdproteins“ eine untergeordnete Rolle bei der Kristallbildung spielt. Ausschlaggebend könnten vielmehr die viralen Hilfsproteine und deren Interaktionsmöglichkeiten mit dem jeweiligen Protein sein, das nun an Stelle des Polyhedrins als Matrixprotein verwendet wird.

Mit den bisher gewonnenen Daten über die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Kristalle lässt sich vermuten, dass der N-terminale Teil bzw. der Start der Translation eine entscheidende Rolle bei der Kristallbildung spielt. Für eine genauere Aufklärung, inwieweit und welche Primär- bzw. Sekundärstrukturbereiche für das Auftreten der Kristalle erforderlich sind und das Verfahren für andere Proteine genutzt werden kann, müssen weitere Experimente durchgeführt werden (s. 4.2.4).

4.2.3 Struktur von TbCatB

Die Proteinstruktur von TbCatB zeigt neben der charakteristischen Cathepsin B-Faltung in Hinblick auf die Wirkstoffentwicklung einige interessante Abweichungen zu der bekannten Cathepsin B-Struktur aus *Homo sapiens*.

Eine Besonderheit der TbCatB-Struktur ist, dass sich ein Teil des Propeptids am N-terminus befindet. Dies ist ungewöhnlich, da das Propeptid normalerweise bei der Aktivierung komplett abgespalten wird. Eine Erklärung könnte eine unvollständige Prozessierung bzw. Autoaktivierung während der Resolubilisierung des Proteins aus den *in vivo*-Kristallen sein. Andererseits zeigte das resolubilisierte Protein eine Proteaseaktivität (s.3.2.1.11), was bedeutet, dass der in der Struktur zu erkennende, übriggebliebene Teil des Propeptids in dem Fall keine deutliche Hemmung des Enzyms verursacht, wie es normalerweise beim vollständigen Propeptid der Fall ist. Das deckt sich auch mit Ergebnissen von Chagas et al. (1996), die belegen, dass nur bestimmte Teile des Propeptids eine Hemmung beim Cathepsin B bewirken. Da dieser N-terminale Teil des Propeptids an der Bindung innerhalb der Kristallpackung beteiligt ist, ist es denkbar, dass diesem Bereich bereits innerhalb der *in vivo*-Kristalle eine wichtige Bedeutung zukommt.

Obwohl die Aminosäuren des aktiven Zentrum von TbCatB und dem humanen Cathepsin B zum großen Teil identisch sind, so gibt es doch Unterschiede im Aufbau der S2-Bindetasche (s. 3.2.3.3). Die Aminosäuren der S2-Bindetasche haben eine große Bedeutung für die Spezifität bei Cathepsin B-Proteinen (McGrath, 1999; Sajid und McKerrow, 2002) und Unterschiede in diesem Bereich könnten ausgenutzt werden, um die Spezifität von Inhibitoren gegenüber dem Parasitenenzym zu erhöhen. Mithilfe der Strukturdaten von TbCatB kann ein Inhibitor an der P2-Position z.B. so auf die größer dimensionierte S2-Bindetasche beim TbCatB angepasst werden, dass dieser weniger gut an das humane Cathepsin B bindet.

4.2.4 Ausblick

Auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse über die Proteinstruktur von TbATG8 kann die Interaktion mit anderen Proteinen ein Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Hierbei wäre es insbesondere interessant, den Ablauf der Prozessierung und Aktivierung von TbATG8 durch TbATG4, TbATG7 und TbATG3 zu analysieren, dies auch in Hinblick auf Unterschiede zu höheren Eukaryonten. Die Aufklärung der Proteinstruktur des Komplexes aus TbATG8 und TbATG4 könnte klären, ob diese Interaktion aufgrund der oben angesprochenen Unterschiede zum humanen ATG4 ein lohnendes Ziel für die Entwicklung eines Wirkstoffes sein kann. Außerdem ist es nötig, in Zukunft genauer zu untersuchen welche Bedeutung ATG8 für Trypanosomen tatsächlich hat, z.B. durch Knockdown-Experimente und warum es bei Trypanosomen mehrere Proteine dieses Typs gibt, von denen eins schon in prozessierter Form vorliegt.

Die Aufklärung der Proteinstruktur von TbCatB ermöglicht es, den Bindemodus von bereits bekannten und neuen Inhibitoren zu TbCatB genauer zu untersuchen und die Spezifität zu verbessern. Dazu könnten neben *in silico* Verfahren wie Docking auch Proteinkristalle von TbCatB für Soaking-Experimente verwendet werden, um Strukturdaten über die Interaktion von Inhibitor zu TbCatB zu erhalten. Ferner lässt sich mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Expressionsprotokoll genügend Protein gewinnen, um z.B. die Hemmwirkung verschiedener Liganden in Enzymassays zu untersuchen.

Ein weiteres wichtiges Ziel ist die Aufklärung des Mechanismus der Bildung von *in vivo*-Kristallen exprimierter rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Naheliegender wäre hierbei zunächst die Untersuchung auf Sequenzebene, bei der durch gezielte Mutationsstudien essentielle Sequenzabschnitte identifiziert werden. Ferner muss auf höherer Ebene der Einfluss posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Glykosylierung im Fall von TbCatB, und die Wechselwirkungen mit anderen viralen Proteinen untersucht werden.

Insgesamt ist zu untersuchen, ob auch andere Proteine auf diesem Wege exprimiert und kristallisiert werden können.

Die direkte Verwendung der Mikrokristalle für eine Strukturaufklärung bietet die Möglichkeit, unter relativ natürlichen Bedingungen entstandene Proteinkristalle aus Zellen zu messen und mit herkömmlich gezogenen Kristallen zu vergleichen. Dabei liegt die Herausforderung darin, eine geeignete Technik zu entwickeln, welche es erlaubt trotz der geringen Dimensionen und der beobachteten Unregelmäßigkeiten der Kristalle verlässliche Strukturdaten zu messen. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung eines Freie-Elektronen-Lasers sein, hierzu wurden bereits Experimente mit der Gruppe von Prof. Christian Betzel am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) initiiert.

4.3 Zusammenfassung

Die afrikanische Schlafkrankheit ist trotz jahrzehntelanger Bemühungen zur Bekämpfung der Parasiten nach wie vor eine existenzielle Bedrohung für die Menschen und Nutztiere der betroffenen Regionen in Afrika. Aktuell verfügbare Therapiemöglichkeiten basieren auf veralteten Medikamenten, welche eine hohe Toxizität aufweisen und für die betroffene Bevölkerung nicht bezahlbar sind. Neue, effektive und bezahlbare Medikamente sind dringend nötig, auch als Beitrag zur nachhaltigen Verbesserung der sozialen und wirtschaftlichen Bedingungen der betroffenen Menschen.

Ein Ansatzpunkt ist der Eingriff in die für das Überleben des Parasiten essentielle Differenzierung während seines Lebenszyklus, bei welcher autophagische Prozesse eine große Rolle

spielen. Über die Rolle der Autophagie bei Trypanosomen ist bisher wenig bekannt, aber genomische Untersuchungen legen nahe, dass Trypanosomen eine primitivere Form der Autophagie, verglichen mit den höheren Eukaryonten, aufweisen. Nähere Untersuchungen der beteiligten Proteine können einen notwendigen Beitrag zum Verständnis dieses für den Parasiten kritischen Prozesses darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur von ATG8 aus *Trypanosoma brucei* (TbATG8), ein wichtiges ubiquitin-ähnliches Markerprotein für autophagische Prozesse, bestimmt. Die Struktur von TbATG8 bildet eine charakteristische Ubiquitin-Faltung aus und zeigt insgesamt eine große Ähnlichkeit zu den bekannten Strukturen der Ubiquitin-like modifier (Ubl) aus höheren Eukaryonten, was darauf hindeutet, dass dieser Teil der Autophagie in struktureller Hinsicht bereits in diesen evolutionsgeschichtlich sehr alten Einzellern konserviert vorliegt.

Mit dieser ersten Struktur eines Autophagieproteins aus Protozoen wurden ferner Interaktionsmöglichkeiten mit der zugehörigen Protease TbATG4 untersucht. Auch hier ergab sich, dass eine ähnliche Komplexbildung aus TbATG8 und TbATG4, wie in den höheren Eukaryonten, möglich ist. Dennoch weisen die homologen ATG4-Proteine gegenüber dem humanen ATG4 eine Deletion eines Sequenzbereichs auf, welche für die Entwicklung z.B eines Inhibitors interessant sein kann.

Für die Autophagie ebenfalls relevant sind die lysosomalen Proteasen, denen neben der Prozessierung autophagierelevanter Proteine, hauptsächlich beim Abbau des Zellmaterials eine große Bedeutung zukommt. Besonders interessant für die Entwicklung von Inhibitoren ist hier das *cathepsin-B like protein* aus *Trypanosoma brucei* (TbCatB), eine Cysteinprotease welche essenziell für das Überleben des Erregers im Blut des Menschen ist (Mackey et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein zunächst im bakteriellen Expressionssystem *E.coli* exprimiert, wobei trotz verschiedener Proteinkonstrukte auf diesem Wege nicht ausreichend lösliches rekombinantes Protein gewonnen werden konnte. Daher wurde das Protein anschließend mit dem eukaryotischen Baculovirus-Expressionssystem in SF9-Insektenzellen exprimiert. Bei der Überexpression der Preproform von TbCatB zeigten nadelförmige Mikrostrukturen innerhalb der Insektenzellen, welche im folgenden als Proteinkristalle identifiziert werden konnten. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die Morphologie und Lokalisation näher bestimmt werden. Die Kristalle ließen sich in ersten Pilotexperimenten nicht direkt für eine Strukturaufklärung mit Synchrotronstrahlung verwenden und so wurde eine Methode entwickelt, die Kristalle aufzureinigen und zu resolubilieren. Für das resolubilisierte Protein konnte eine Cathepsin B-Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kristalle das rekombinante TbCatB

in zwei Formen unterschiedlicher Glykosylierung enthalten. Enzymatisch deglykosyliertes Protein konnte anschließend erfolgreich für eine Rekristallisierung und Strukturaufklärung eingesetzt werden. Die Struktur von TbCatB zeigt im Vergleich zum humanen Cathepsin B Unterschiede im Bereich der Bindetasche und kann daher verwendet werden, um die Spezifität von Inhibitoren zu verbessern.

In einem weiteren Experiment konnte anhand von TbIMPDH gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchte neue Form intrazellulärer Kristallbildung nicht nur auf ein Protein beschränkt ist, und auch Proteine anderer Funktion und Lokalisierung solche *in vivo*-Kristalle in Insektenzellen bilden können.

Literaturverzeichnis

- [Abd-Elsalam 2003] ABD-ELSALAM, Kamel A.: Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. In: *African Journal of Biotechnology* 2 (2003), Nr. 5, S. 91–95
- [Altmann et al. 2004] ALTMANN, E. ; COWAN-JACOB, S. W. ; MISSBACH, M.: Novel purine nitrile derived inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. In: *J Med Chem* 47 (2004), Nr. 24, S. 5833–6
- [Alvarez et al. 2008a] ALVAREZ, V. E. ; KOSEC, G. ; SANT ANNA, C. ; TURK, V. ; CAZZULO, J. J. ; TURK, B.: Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? In: *Autophagy* 4 (2008), Nr. 3, S. 361–3
- [Alvarez et al. 2008b] ALVAREZ, V. E. ; KOSEC, G. ; SANT'ANNA, C. ; TURK, V. ; CAZZULO, J. J. ; TURK, B.: Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Nr. 6, S. 3454–64
- [Amar et al. 2006] AMAR, N. ; LUSTIG, G. ; ICHIMURA, Y. ; OHSUMI, Y. ; ELAZAR, Z.: Two newly identified sites in the ubiquitin-like protein Atg8 are essential for autophagy. In: *EMBO Rep* 7 (2006), Nr. 6, S. 635–42
- [Arnold et al. 2006] ARNOLD, K. ; BORDOLI, L. ; KOPP, J. ; SCHWEDE, T.: The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. In: *Bioinformatics* 22 (2006), Nr. 2, S. 195–201
- [Bakker et al. 1995] BAKKER, B. M. ; WESTERHOFF, H. V. ; MICHELS, P. A.: Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. In: *J.Bioenerg.Biomembr.* 27 (1995), Nr. 5, S. 513–525
- [Barrett et al. 2004] BARRETT, Alan J. ; RAWLINGS, Neil D. ; WOESSNER, J. F.: *Handbook of proteolytic enzymes*. Amsterdam; San Diego : Elsevier Academic Press, 2004
- [Barry 2009] BARRY, D.: *Antigenic variation in African trypanosomes*. <http://www.gla.ac.uk/>, 2009

- [Beers et al. 1999] BEERS, Mark H. ; BERKOW, Robert ; MERCK RESEARCH, Laboratories: *The Merck manual of diagnosis and therapy*. Whitehouse Station, N.J. : Merck Research Laboratories, 1999
- [Bendtsen et al. 2004] BENDTSEN, J. D. ; NIELSEN, H. ; HEIJNE, G. von ; BRUNAK, S.: Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. In: *J Mol Biol* 340 (2004), Nr. 4, S. 783–95
- [Berman et al. 2000] BERMAN, H. M. ; WESTBROOK, J. ; FENG, Z. ; GILLILAND, G. ; BHAT, T. N. ; WEISSIG, H. ; SHINDYALOV, I. N. ; BOURNE, P. E.: The Protein Data Bank. In: *Nucleic Acids Res* 28 (2000), Nr. 1, S. 235–42
- [Berriman et al. 2005] BERRIMAN, M. ; GHEDIN, E. ; HERTZ-FOWLER, C. ; BLANDIN, G. ; RENAULD, H. ; BARTHOLOMEU, D. C. ; LENNARD, N. J. ; CALER, E. et al.: The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. In: *Science* 309 (2005), Nr. 5733, S. 416–22
- [Berti und Storer 1995] BERTI, P. J. ; STORER, A. C.: Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. In: *J Mol Biol* 246 (1995), Nr. 2, S. 273–83
- [Besteiro et al. 2006] BESTEIRO, S. ; WILLIAMS, R. A. ; MORRISON, L. S. ; COOMBS, G. H. ; MOTTRAM, J. C.: Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 16, S. 11384–96
- [Betin und Lane 2009] BETIN, V. M. ; LANE, J. D.: Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis. In: *Autophagy* 5 (2009), Nr. 7, S. 1057–9
- [Borst 1986] BORST, P.: Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. In: *Annu.Rev.Biochem.* 55 (1986), S. 701–732
- [Bradford 1976] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–54
- [Brak et al. 2008] BRAK, K. ; DOYLE, P. S. ; MCKERROW, J. H. ; ELLMAN, J. A.: Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. In: *J Am Chem Soc* 130 (2008), Nr. 20, S. 6404–10
- [Brandt 1948] BRANDT, H.: Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. In: *Journal of Pest Science* 21 (1948), Nr. 3, S. 47–47

- [Brunger 1993] BRUNGER, A. T.: Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (1993), Nr. Pt 1, S. 24–36
- [Bryant et al. 2009] BRYANT, C. ; KERR, I. D. ; DEBNATH, M. ; ANG, K. K. ; RATNAM, J. ; FERREIRA, R. S. ; JAISHANKAR, P. ; ZHAO, D. ; ARKIN, M. R. ; MCKERROW, J. H. ; BRINEN, L. S. ; RENSLO, A. R.: Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. In: *Bioorg Med Chem Lett* 19 (2009), Nr. 21, S. 6218–21
- [Carpentier et al. 2008] CARPENTIER, D. C. ; GRIFFITHS, C. M. ; KING, L. A.: The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. In: *Virology* 371 (2008), Nr. 2, S. 278–91
- [Carstens et al. 1986] CARSTENS, E. B. ; KREBS, A. ; GALLERNEAULT, C. E.: Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. In: *J Virol* 58 (1986), Nr. 2, S. 684–8
- [Carter und Fairlamb 1993] CARTER, N. S. ; FAIRLAMB, A. H.: Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. In: *Nature* 361 (1993), Nr. 6408, S. 173–6
- [CCP4 1994] CCP4: The CCP4 suite: programs for protein crystallography. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (1994), Nr. Pt 5, S. 760–3
- [CDC 2009] CDC: *DPDx - Trypanosomiasis, African*. <http://dpd.cdc.gov/dpdx/>, 2009
- [Chagas et al. 1996] CHAGAS, J. R. ; FERRER-DI MARTINO, M. ; GAUTHIER, F. ; LALMANACH, G.: Inhibition of cathepsin B by its propeptide: use of overlapping peptides to identify a critical segment. In: *FEBS Lett* 392 (1996), Nr. 3, S. 233–6
- [Chan et al. 1999] CHAN, V. J. ; SELZER, P. M. ; MCKERROW, J. H. ; SAKANARI, J. A.: Expression and alteration of the S2 subsite of the *Leishmania major* cathepsin B-like cysteine protease. In: *Biochem J* 340 (Pt 1) (1999), S. 113–7
- [Chi et al. 2010] CHI, Y. H. ; KOO, Y. D. ; DAI, S. Y. ; AHN, J. E. ; YUN, D. J. ; LEE, S. Y. ; ZHU-SALZMAN, K.: N-glycosylation at non-canonical Asn-X-Cys sequence of an insect recombinant cathepsin B-like counter-defense protein. In: *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 156 (2010), Nr. 1, S. 40–7

- [Coulibaly et al. 2007] COULIBALY, F. ; CHIU, E. ; IKEDA, K. ; GUTMANN, S. ; HAEBEL, P. W. ; SCHULZE-BRIESE, C. ; MORI, H. ; METCALF, P.: The molecular organization of cytovirus polyhedra. In: *Nature* 446 (2007), Nr. 7131, S. 97–101
- [Coyle et al. 2002] COYLE, J. E. ; QAMAR, S. ; RAJASHANKAR, K. R. ; NIKOLOV, D. B.: Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. In: *Neuron* 33 (2002), Nr. 1, S. 63–74
- [Cross 1975] CROSS, G. A.: Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. In: *Parasitology* 71 (1975), Nr. 3, S. 393–417
- [CST 2010] CST, Inc: *Autophagy Signaling*. <http://www.cellsignal.com/>, 2010
- [CSUN 2005] CSUN: *Distribution of the Tsetse flies*. www.csun.edu/mv159570/wgeog/safrinotes.htm, 2005
- [Dardonville 2005] DARDONVILLE, Christophe: Recent advances in antitrypanosomal chemotherapy: patent literature 2002 - 2004. In: *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 15 (2005), Nr. 9, S. 1241–1257
- [DeLano 2002] DELANO, WL: *The PyMOL Molecular Graphics System*. <http://www.pymol.org>, 2002
- [Denninger et al. 2008] DENNINGER, V. ; KOOPMANN, R. ; MUHAMMAD, K. ; BARTH, T. ; BASSARAK, B. ; SCHONFELD, C. ; KILUNGA, B. K. ; DUSZENKO, M.: Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? In: *Methods Enzymol* 451 (2008), S. 373–408
- [Denninger 2007] DENNINGER, Viola: *Effekte von Troglitazon und anderen Thiazolidindionen auf die Blutform von Trypanosoma brucei : Induktion der Differenzierung von slender-Formen*. 2007
- [Deval et al. 1990] DEVAL, C. ; BECHET, D. ; OBLED, A. ; FERRARA, M.: Purification and properties of different isoforms of bovine cathepsin B. In: *Biochem Cell Biol* 68 (1990), Nr. 4, S. 822–6
- [Dominguez et al. 2003] DOMINGUEZ, C. ; BOELEN, R. ; BONVIN, A. M.: HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. In: *J Am Chem Soc* 125 (2003), Nr. 7, S. 1731–7
- [Duszenko 1998] DUSZENKO, M.: Aspekte der Infektionsbiologie: Afrikanische Trypanosomen und Schlafkrankheit. In: *Biol. in unserer Zeit* 28 (1998), S. 72–81

- [Duszenko et al. 1988] DUSZENKO, M. ; IVANOV, I. E. ; FERGUSON, M. A. ; PLESKEN, H. ; CROSS, G. A.: Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. In: *J. Cell Biol.* 106 (1988), Nr. 1, S. 77–86
- [EANETT 2005] EANETT: *Eastern Africa Network For Trypanosomosis*. <http://www.eanett.org/whatis/>, 2005
- [Eason et al. 1998] EASON, J. E. ; HICE, R. H. ; JOHNSON, J. J. ; FEDERICI, B. A.: Effects of substituting granulin or a granulin-polyhedrin chimera for polyhedrin on virion occlusion and polyhedral morphology in *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. In: *J Virol* 72 (1998), Nr. 7, S. 6237–43
- [Engel et al. 1998] ENGEL, J. C. ; DOYLE, P. S. ; HSIEH, I. ; MCKERROW, J. H.: Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. In: *J Exp Med* 188 (1998), Nr. 4, S. 725–34
- [Enzolifesciences 2010] ENZOLIFESCIENCES: *Ubiquitinlike pathways*. <http://www.enzolifesciences.com/catalogs-brochures/>, 2010
- [Fairlamb et al. 1989] FAIRLAMB, A. H. ; HENDERSON, G. B. ; CERAMI, A.: Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 (1989), Nr. 8, S. 2607–2611
- [Fan et al. 1996] FAN, G. Y. ; MALDONADO, F. ; ZHANG, Y. ; KINCAID, R. ; ELLISMAN, M. H. ; GASTINEL, L. N.: In vivo calcineurin crystals formed using the baculovirus expression system. In: *Microsc Res Tech* 34 (1996), Nr. 1, S. 77–86
- [Fang et al. 2007] FANG, M. ; DAI, X. ; THEILMANN, D. A.: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus EXON0 (ORF141) is required for efficient egress of nucleocapsids from the nucleus. In: *J Virol* 81 (2007), Nr. 18, S. 9859–69
- [FAO 2005] FAO: *PAAT the disease*. <http://www.fao.org/>, 2005
- [Friedheim 1949] FRIEDHEIM, Ernst A. H.: Mel B in the Treatment of Human Trypanosomiasis. In: *Am J Trop Med* s1-29 (1949), Nr. 2, S. 173–180
- [Fujita et al. 2008] FUJITA, N. ; ITOH, T. ; OMORI, H. ; FUKUDA, M. ; NODA, T. ; YOSHIMORI, T.: The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. In: *Mol Biol Cell* 19 (2008), Nr. 5, S. 2092–100
- [Gasteiger et al. 2005] GASTEIGER, E. ; HOOGLAND, C. ; GATTIKER, A. ; DUVAUD, S. ; WILKINS, M.R. ; APPEL, RD. ; BAIROCH, A.: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Humana Press, 2005 (The Proteomics Protocols Handbook)

- [Grams et al. 2000] GRAMS, J. ; MCMANUS, M. T. ; HAJDUK, S. L.: Processing of polycistronic guide RNAs is associated with RNA editing complexes in *Trypanosoma brucei*. In: *EMBO J.* 19 (2000), Nr. 20, S. 5525–5532
- [Greenspan et al. 2001] GREENSPAN, P. D. ; CLARK, K. L. ; TOMMASI, R. A. ; COWEN, S. D. ; MCQUIRE, L. W. ; FARLEY, D. L. ; DUZER, J. H. van ; GOLDBERG, R. L. et al.: Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. In: *J Med Chem* 44 (2001), Nr. 26, S. 4524–34
- [Gupta et al. 2004] GUPTA, R. ; JUNG, E. ; BRUNAK, S.: *Prediction of N-glycosylation sites in human proteins*. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, 2004
- [Hajduk et al. 1993] HAJDUK, S. L. ; HARRIS, M. E. ; POLLARD, V. W.: RNA editing in kinetoplastid mitochondria. In: *FASEB J.* 7 (1993), Nr. 1, S. 54–63
- [Hanada et al. 2007] HANADA, T. ; NODA, N. N. ; SATOMI, Y. ; ICHIMURA, Y. ; FUJIOKA, Y. ; TAKAO, T. ; INAGAKI, F. ; OHSUMI, Y.: The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Nr. 52, S. 37298–302
- [Herman et al. 2006] HERMAN, M. ; GILLIES, S. ; MICHELS, P. A. ; RIGDEN, D. J.: Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. In: *Autophagy* 2 (2006), Nr. 2, S. 107–18
- [Herman et al. 2008] HERMAN, M. ; PEREZ-MORGA, D. ; SHTICKZELLE, N. ; MICHELS, P. A.: Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. In: *Autophagy* 4 (2008), Nr. 3, S. 294–308
- [Huete-Perez et al. 1999] HUETE-PEREZ, J. A. ; ENGEL, J. C. ; BRINEN, L. S. ; MOTT-RAM, J. C. ; MCKERROW, J. H.: Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 23, S. 16249–56
- [Ichimura et al. 2004] ICHIMURA, Y. ; IMAMURA, Y. ; EMOTO, K. ; UMEDA, M. ; NODA, T. ; OHSUMI, Y.: In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 39, S. 40584–92
- [Ichimura et al. 2000] ICHIMURA, Y. ; KIRISAKO, T. ; TAKAO, T. ; SATOMI, Y. ; SHIMONISHI, Y. ; ISHIHARA, N. ; MIZUSHIMA, N. ; TANIDA, I. ; KOMINAMI, E. ; OHSUMI, M. ; NODA, T. ; OHSUMI, Y.: A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. In: *Nature* 408 (2000), Nr. 6811, S. 488–92

- [Jarvis et al. 1991] JARVIS, D. L. ; BOHLMAYER, D. A. ; GARCIA, Jr.: Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. In: *Virology* 185 (1991), Nr. 2, S. 795–810
- [Jenni 1990] JENNI, L.: Sexual stages in trypanosomes and implications. In: *Ann.Parasitol.Hum.Comp* 65 Suppl 1 (1990), S. 19–21
- [Kayser 1997] KAYSER, F.: *Medizinische Mikrobiologie*. 10.Aufl. Georg Thieme Verlag, 1997
- [Kerr et al. 2009] KERR, I. D. ; LEE, J. H. ; FARADY, C. J. ; MARION, R. ; RICKERT, M. ; SAJID, M. ; PANDEY, K. C. ; CAFFREY, C. R. ; LEGAC, J. ; HANSELL, E. ; MCKERROW, J. H. ; CRAIK, C. S. ; ROSENTHAL, P. J. ; BRINEN, L. S.: Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. In: *J Biol Chem* 284 (2009), Nr. 38, S. 25697–703
- [Kirisako et al. 2000] KIRISAKO, T. ; ICHIMURA, Y. ; OKADA, H. ; KABEYA, Y. ; MIZUSHIMA, N. ; YOSHIMORI, T. ; OHSUMI, M. ; TAKAO, T. ; NODA, T. ; OHSUMI, Y.: The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. In: *J Cell Biol* 151 (2000), Nr. 2, S. 263–76
- [Klionsky 2005] KLIONSKY, D. J.: The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. In: *J Cell Sci* 118 (2005), Nr. Pt 1, S. 7–18
- [Klionsky et al. 2003] KLIONSKY, D. J. ; CREGG, J. M. ; DUNN, Jr. ; EMR, S. D. ; SAKAI, Y. ; SANDOVAL, I. V. ; SIBIRNY, A. ; SUBRAMANI, S. ; THUMM, M. ; VEENHUIS, M. ; OHSUMI, Y.: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. In: *Dev Cell* 5 (2003), Nr. 4, S. 539–45
- [Klionsky und Ohsumi 1999] KLIONSKY, D. J. ; OHSUMI, Y.: Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 15 (1999), S. 1–32
- [Koopmann et al. 2009] KOOPMANN, R. ; MUHAMMAD, K. ; PERBANDT, M. ; BETZEL, C. ; DUSZENKO, M.: Trypanosoma brucei ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. In: *Autophagy* 5 (2009), Nr. 8, S. 1085–91
- [Kroemer und Jaattela 2005] KROEMER, G. ; JAATTELA, M.: Lysosomes and autophagy in cell death control. In: *Nat Rev Cancer* 5 (2005), Nr. 11, S. 886–97
- [Kundu und Thompson 2008] KUNDU, M. ; THOMPSON, C. B.: Autophagy: basic principles and relevance to disease. In: *Annu Rev Pathol* 3 (2008), S. 427–55

- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685
- [Larkin et al. 2007] LARKIN, M. A. ; BLACKSHIELDS, G. ; BROWN, N. P. ; CHENNA, R. ; MCGETTIGAN, P. A. ; MCWILLIAM, H. ; VALENTIN, F. ; WALLACE, I. M. ; WILM, A. ; LOPEZ, R. ; THOMPSON, J. D. ; GIBSON, T. J. ; HIGGINS, D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* 23 (2007), Nr. 21, S. 2947–8
- [Laskowski et al. 1993] LASKOWSKI, R. A. ; MACARTHUR, M. W. ; MOSS, D. S. ; THORNTON, J. M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. In: *J. Appl. Cryst.* 26 (1993), S. 283–291
- [Lecaille et al. 2002] LECAILLE, F. ; KALETA, J. ; BROMME, D.: Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. In: *Chem Rev* 102 (2002), Nr. 12, S. 4459–88
- [Leslie 1992] LESLIE, AGW: Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. In: *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl Protein Crystallogr* (1992), S. 26
- [Liebman et al. 1999] LIEBMAN, J. M. ; LASALA, D. ; WANG, W. ; STEED, P. M.: When less is more: enhanced baculovirus production of recombinant proteins at very low multiplicities of infection. In: *Biotechniques* 26 (1999), Nr. 1, S. 36–8, 40, 42
- [Lin et al. 2000] LIN, G. Y. ; ZHONG, J. ; WANG, X. Z.: Abnormal formation of polyhedra resulting from a single mutation in the polyhedrin gene of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. In: *J Invertebr Pathol* 76 (2000), Nr. 1, S. 13–9
- [Liu et al. 2010] LIU, T. B. ; LIU, X. H. ; LU, J. P. ; ZHANG, L. ; MIN, H. ; LIN, F. C.: The cysteine protease MoAtg4 interacts with MoAtg8 and is required for differentiation and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. In: *Autophagy* 6 (2010), Nr. 1, S. 74–85
- [Mackey et al. 2004] MACKEY, Z. B. ; O'BRIEN, T. C. ; GREENBAUM, D. C. ; BLANK, R. B. ; MCKERROW, J. H.: A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 46, S. 48426–33
- [Maiti et al. 2004] MAITI, R. ; VAN DOMSELAAR, G. H. ; ZHANG, H. ; WISHART, D. S.: SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. In: *Nucleic Acids Res* 32 (2004), Nr. Web Server issue, S. W590–4
- [Mallari et al. 2008a] MALLARI, J. P. ; SHELAT, A. ; KOSINSKI, A. ; CAFFREY, C. R. ; CONNELLY, M. ; ZHU, F. ; MCKERROW, J. H. ; GUY, R. K.: Discovery of trypanocidal

- thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and TbcacB. In: *Bioorg Med Chem Lett* 18 (2008), Nr. 9, S. 2883–5
- [Mallari et al. 2009] MALLARI, J. P. ; SHELAT, A. A. ; KOSINSKI, A. ; CAFFREY, C. R. ; CONNELLY, M. ; ZHU, F. ; MCKERROW, J. H. ; GUY, R. K.: Structure-guided development of selective TbcacB inhibitors. In: *J Med Chem* 52 (2009), Nr. 20, S. 6489–93
- [Mallari et al. 2008b] MALLARI, J. P. ; SHELAT, A. A. ; O'BRIEN, T. ; CAFFREY, C. R. ; KOSINSKI, A. ; CONNELLY, M. ; HARBUT, M. ; GREENBAUM, D. ; MCKERROW, J. H. ; GUY, R. K.: Development of potent purine-derived nitrile inhibitors of the trypanosomal protease TbcacB. In: *J Med Chem* 51 (2008), Nr. 3, S. 545–52
- [Maser et al. 1999] MASER, P. ; SUTTERLIN, C. ; KRALLI, A. ; KAMINSKY, R.: A nucleoside transporter from *Trypanosoma brucei* involved in drug resistance. In: *Science* 285 (1999), Nr. 5425, S. 242–4
- [McConville und Ferguson 1993] MCCONVILLE, M. J. ; FERGUSON, M. A.: The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. In: *Biochem.J.* 294 (Pt 2) (1993), S. 305–324
- [McGrath 1999] MCGRATH, M. E.: The lysosomal cysteine proteases. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28 (1999), S. 181–204
- [McKerrow 1999] MCKERROW, J. H.: Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. In: *Int J Parasitol* 29 (1999), Nr. 6, S. 833–7
- [McKerrow et al. 2008] MCKERROW, J. H. ; ROSENTHAL, P. J. ; SWENERTON, R. ; DOYLE, P.: Development of protease inhibitors for protozoan infections. In: *Curr Opin Infect Dis* 21 (2008), Nr. 6, S. 668–72
- [McKerrow et al. 1993] MCKERROW, J. H. ; SUN, E. ; ROSENTHAL, P. J. ; BOUVIER, J.: The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. In: *Annu Rev Microbiol* 47 (1993), S. 821–53
- [MSF 2005] MSF: *Forschungsinitiative-DNDI*. <http://www.aerzte-ohne-grenzen.de/>, 2005
- [Muntener et al. 2005] MUNTENER, K. ; WILLIMANN, A. ; ZWICKY, R. ; SVOBODA, B. ; MACH, L. ; BAICI, A.: Folding competence of N-terminally truncated forms of human procathepsin B. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Nr. 12, S. 11973–80

- [Murshudov et al. 1999] MURSHUDOV, G. N. ; VAGIN, A. A. ; LEBEDEV, A. ; WILSON, K. S. ; DODSON, E. J.: Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (1999), Nr. Pt 1, S. 247–55
- [Nakatogawa et al. 2007] NAKATOGAWA, H. ; ICHIMURA, Y. ; OHSUMI, Y.: Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. In: *Cell* 130 (2007), Nr. 1, S. 165–78
- [Noda et al. 2008] NODA, N. N. ; KUMETA, H. ; NAKATOGAWA, H. ; SATOO, K. ; ADACHI, W. ; ISHII, J. ; FUJIOKA, Y. ; OHSUMI, Y. ; INAGAKI, F.: Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. In: *Genes Cells* 13 (2008), Nr. 12, S. 1211–8
- [Noda et al. 2010] NODA, N. N. ; OHSUMI, Y. ; INAGAKI, F.: Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. In: *FEBS Lett* (2010), S. 0
- [North et al. 1990] NORTH, M. J. ; MOTTRAM, J. C. ; COOMBS, G. H.: Cysteine proteinases of parasitic protozoa. In: *Parasitol Today* 6 (1990), Nr. 8, S. 270–5
- [OneWorldHealth 2009] ONEWORLDHEALTH: *Chagas Disease*.
<http://www.oneworldhealth.org/chagas>, 2009
- [Opperdoes und Borst 1977] OPPERDOES, F. R. ; BORST, P.: Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. In: *FEBS Lett.* 80 (1977), Nr. 2, S. 360–364
- [Overath et al. 1983] OVERATH, P. ; CZICHOS, J. ; STOCK, U. ; NONNENGAESSER, C.: Repression of glycoprotein synthesis and release of surface coat during transformation of *Trypanosoma brucei*. In: *EMBO J* 2 (1983), Nr. 10, S. 1721–8
- [Paz et al. 2000] PAZ, Y. ; ELAZAR, Z. ; FASS, D.: Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 33, S. 25445–50
- [Perrakis et al. 1999] PERRAKIS, A. ; MORRIS, R. ; LAMZIN, V. S.: Automated protein model building combined with iterative structure refinement. In: *Nat Struct Biol* 6 (1999), Nr. 5, S. 458–63
- [Pieper et al. 2004] PIEPER, U. ; ESWAR, N. ; BRABERG, H. ; MADHUSUDHAN, M. S. ; DAVIS, F. P. ; STUART, A. C. ; MIRKOVIC, N. ; ROSSI, A. ; MARTI-RENOM, M. A. ; FISER, A. ; WEBB, B. ; GREENBLATT, D. ; HUANG, C. C. ; FERRIN, T. E. ; SALI, A.: MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. In: *Nucleic Acids Res* 32 (2004), Nr. Database issue, S. D217–22

- [Van der Ploeg et al. 1984] PLOEG, L. H. Van der ; SCHWARTZ, D. C. ; CANTOR, C. R. ; BORST, P.: Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. In: *Cell* 37 (1984), Nr. 1, S. 77–84
- [Van der Ploeg et al. 1982] PLOEG, L. H. Van der ; VALERIO, D. ; DE LANGE, T. ; BERNARDS, A. ; BORST, P. ; GROSVELD, F. G.: An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from *Trypanosoma brucei* shows that the genes for variant surface glycoproteins are clustered in the genome. In: *Nucleic Acids Res.* 10 (1982), Nr. 19, S. 5905–5923
- [Ponder und Bogyo 2007] PONDER, E. L. ; BOGYO, M.: Ubiquitin-like modifiers and their deconjugating enzymes in medically important parasitic protozoa. In: *Eukaryot Cell* 6 (2007), Nr. 11, S. 1943–52
- [Priest und Hajduk 1994] PRIEST, J. W. ; HAJDUK, S. L.: Developmental regulation of *Trypanosoma brucei* cytochrome c reductase during bloodstream to procyclic differentiation. In: *Mol.Biochem.Parasitol.* 65 (1994), Nr. 2, S. 291–304
- [Priotto et al. 2009] PRIOTTO, G. ; KASPARIAN, S. ; MUTOMBO, W. ; NGOUAMA, D. ; GHORASHIAN, S. ; ARNOLD, U. ; GHABRI, S. ; BAUDIN, E. ; BUARD, V. ; KAZADI-KYANZA, S. ; ILUNGA, M. ; MUTANGALA, W. ; POHLIG, G. ; SCHMID, C. ; KARUNAKARA, U. ; TORREELE, E. ; KANDE, V.: Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. In: *Lancet* 374 (2009), Nr. 9683, S. 56–64
- [Rasnick 1996] RASNICK, David: Small synthetic inhibitors of cysteine proteases. In: *Perspectives in Drug Discovery and Design* 6 (1996), Nr. 1, S. 47–63
- [Reed und Muench 1938] REED, L. J. ; MUENCH, H.: A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. In: *American Journal of Epidemiology* 27 (1938), Nr. 3, S. 493–497
- [Renslo und McKerrow 2006] RENSLO, A. R. ; MCKERROW, J. H.: Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. In: *Nat Chem Biol* 2 (2006), Nr. 12, S. 701–10
- [Robinson et al. 1999] ROBINSON, N. P. ; BURMAN, N. ; MELVILLE, S. E. ; BARRY, J. D.: Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. In: *Mol.Cell Biol.* 19 (1999), Nr. 9, S. 5839–5846
- [Roditi et al. 1989] RODITI, I. ; SCHWARZ, H. ; PEARSON, T. W. ; BEECROFT, R. P. ; LIU, M. K. ; RICHARDSON, J. P. ; BUHRING, H. J. ; PLEISS, J. ; BULOW, R. ; WILLIAMS, R. O.: Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. In: *J.Cell Biol.* 108 (1989), Nr. 2, S. 737–746

- [Rohrmann 1992] ROHRMANN, G. F.: Baculovirus structural proteins. In: *J Gen Virol* 73 (Pt 4) (1992), S. 749–61
- [Ross und Thomson 1910] ROSS, Ronald ; THOMSON, David: A Case of Sleeping Sickness Studied by Precise Enumerative Methods: Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 82 (1910), Nr. 557, S. 411–415
- [Rubinsztein et al. 2007] RUBINSZTEIN, D. C. ; GESTWICKI, J. E. ; MURPHY, L. O. ; KLIONSKY, D. J.: Potential therapeutic applications of autophagy. In: *Nat Rev Drug Discov* 6 (2007), Nr. 4, S. 304–12
- [Sajid und McKerrow 2002] SAJID, M. ; MCKERROW, J. H.: Cysteine proteases of parasitic organisms. In: *Mol Biochem Parasitol* 120 (2002), Nr. 1, S. 1–21
- [Sambrook et al. 2001] SAMBROOK, Joseph. ; RUSSELL, David W. ; LABORATORY., Cold Spring H.: *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell.* 3rd. ed. 2001
- [Satoo et al. 2009] SATOO, K. ; NODA, N. N. ; KUMETA, H. ; FUJIOKA, Y. ; MIZUSHIMA, N. ; OHSUMI, Y. ; INAGAKI, F.: The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. In: *EMBO J* 28 (2009), Nr. 9, S. 1341–50
- [Schechter und Berger 1967] SCHECHTER, I. ; BERGER, A.: On the size of the active site in proteases. I. Papain. In: *Biochem Biophys Res Commun* 27 (1967), Nr. 2, S. 157–62
- [Schwarten et al. 2010] SCHWARTEN, M. ; STOLDT, M. ; MOHRLUDER, J. ; WILLBOLD, D.: Solution structure of Atg8 reveals conformational polymorphism of the N-terminal domain. In: *Biochem Biophys Res Commun* 395 (2010), Nr. 3, S. 426–31
- [Scory et al. 1999] SCORY, S. ; CAFFREY, C. R. ; STIERHOF, Y. D. ; RUPPEL, A. ; STEVERDING, D.: Trypanosoma brucei: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. In: *Exp Parasitol* 91 (1999), Nr. 4, S. 327–33
- [Seyfang und Duszenko 1991] SEYFANG, A. ; DUSZENKO, M.: Specificity of glucose transport in Trypanosoma brucei. Effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. In: *Eur.J.Biochem.* 202 (1991), Nr. 1, S. 191–196
- [Seyfang et al. 1990] SEYFANG, A. ; MECKE, D. ; DUSZENKO, M.: Degradation, recycling, and shedding of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. In: *J. Protozool.* 37 (1990), Nr. 6, S. 546–552

- [Shintani und Klionsky 2004] SHINTANI, T. ; KLIONSKY, D. J.: Autophagy in health and disease: a double-edged sword. In: *Science* 306 (2004), Nr. 5698, S. 990–5
- [Simpson et al. 2000] SIMPSON, L. ; THIEMANN, O. H. ; SAVILL, N. J. ; ALFONZO, J. D. ; MASLOV, D. A.: Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000), Nr. 13, S. 6986–6993
- [Slavicek et al. 1998] SLAVICEK, J. M. ; MERCER, M. J. ; POHLMAN, D. ; KELLY, M. E. ; BISCHOFF, D. S.: Identification of a novel Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus mutant that exhibits abnormal polyhedron formation and virion occlusion. In: *J Invertebr Pathol* 72 (1998), Nr. 1, S. 28–37
- [Steed et al. 1998] STEED, P. M. ; LASALA, D. ; LIEBMAN, J. ; WIGG, A. ; CLARK, K. ; KNAP, A. K.: Characterization of recombinant human cathepsin B expressed at high levels in baculovirus. In: *Protein Sci* 7 (1998), Nr. 9, S. 2033–7
- [Steverding 2000] STEVERDING, D.: The transferrin receptor of Trypanosoma brucei. In: *Parasitol Int* 48 (2000), Nr. 3, S. 191–8
- [Steverding und Tyler 2005] STEVERDING, D. ; TYLER, K. M.: Novel antitrypanosomal agents. In: *Expert Opin.Investig.Drugs* 14 (2005), Nr. 8, S. 939–955
- [Stromhaug und Klionsky 2001] STROMHAUG, P. E. ; KLIONSKY, D. J.: Approaching the molecular mechanism of autophagy. In: *Traffic* 2 (2001), Nr. 8, S. 524–31
- [Turner 1997] TURNER, C. M.: The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of Trypanosoma brucei. In: *FEMS Microbiol.Lett.* 153 (1997), Nr. 1, S. 227–231
- [Vickerman 1985] VICKERMAN, K.: Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. In: *Br.Med.Bull.* 41 (1985), Nr. 2, S. 105–114
- [Vogel 1986] VOGEL, Sebastian: Baculo-Viren: Biologische Insektizide - Werkzeuge der Molekularbiologie. In: *Chemie in unserer Zeit* 20 (1986), Nr. 3, S. 77–83
- [WHO 2000] WHO: *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases*. <http://www.who.int>, 2000 (WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1)
- [WHO 2006] WHO: *Fact sheet Nr.259*. www.who.int, 2006
- [Wiemer et al. 1992] WIEMER, E. A. ; TER KUILE, B. H. ; MICHELS, P. A. ; OPPERDOES, F. R.: Pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of Trypanosoma brucei is mediated by a facilitated diffusion carrier. In: *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 184 (1992), Nr. 2, S. 1028–1034

- [Williams et al. 2006] WILLIAMS, R. A. ; TETLEY, L. ; MOTTRAM, J. C. ; COOMBS, G. H.: Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. In: *Mol Microbiol* 61 (2006), Nr. 3, S. 655–74
- [Williams et al. 2009] WILLIAMS, R. A. ; WOODS, K. L. ; JULIANO, L. ; MOTTRAM, J. C. ; COOMBS, G. H.: Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. In: *Autophagy* 5 (2009), Nr. 2, S. 159–72
- [Witzel et al. 2007] WITZEL, Simone ; DORNBLUETH, Otto ; PSCHYREMBEL, Willibald: *Pschyrembel Klinisches Woerterbuch*. 261., neu bearb. und erw. Aufl. Berlin [u.a.] : de Gruyter, 2007 (Klinisches Woerterbuch). – Nebent.: Klinisches Woerterbuch
- [Yaeger 2009] YAEGER, R.: *Protozoa: Structure, Classification, Growth, and Development*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed>, 2009
- [Yamamoto et al. 2000] YAMAMOTO, A. ; TOMOO, K. ; HARA, T. ; MURATA, M. ; KITAMURA, K. ; ISHIDA, T.: Substrate specificity of bovine cathepsin B and its inhibition by CA074, based on crystal structure refinement of the complex. In: *J Biochem* 127 (2000), Nr. 4, S. 635–43

Kooperationspartner

Partner	Projekt	Institut
Karolina Cupelli, Prof. Dr. Thilo Stehle	Mikrokristalle und Strukturaufklärung TbCatB	Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen
Dr. Markus Perbandt, Prof. Dr. Christian Betzel Dr. Lars Redecke	Mikrokristalle und Strukturaufklärung TbATG8	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg
Dr. York Stierhof	Immunelektronenmikroskopie	Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen
Karl-Heinz Hellmer	Rasterelektronenmikroskopie	Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten, Universität Tübingen
Dr. Clemens Schulze-Briese	Mikrokristalle	Paul Scherrer Institut, Synchrotron Lichtquelle Schweiz
Dr. Wolfgang Schütz	Massenspektrometrie	Proteom Zentrum Tübingen

Hochschullehrer

Prof. Dr. P. Bohley	Biochemie
Prof. Dr. M. Duszenko	Biochemie
Prof. Dr. G. Gauglitz	Physikalische Chemie
Prof. Dr. F. Götz	Mikrobiologie
Prof. Dr. U. Güntzer	Datenbanken
Prof. Dr. K. P. Hadeler	Mathematik
Prof. Dr. P. Hauck	Kryptologie
Prof. Dr. D. Huson	Bioinformatik
Prof. Dr. G. Jürgens	Genetik
Prof. Dr. H. Klaeren	Praktische Informatik
Prof. Dr. W. Knapp	Mathematik
Prof. Dr. K.-J. Lange	Theoretische Informatik
Dr. K. Nieselt	Bioinformatik
Prof. Dr. H. Probst	Biochemie
Prof. Dr. H.-U. Schnitzler	Tierphysiologie
Prof. Dr. F. Schöffl	Genetik
Prof. Dr. E. Schweda	Anorganische Chemie
Prof. Dr. B. Speiser	Organische Chemie
Dr. M. Sperber	Praktische Informatik
Prof. Dr. W. Straßer	Technische Informatik
Prof. Dr. M. Wolff	Mathematik
Prof. Dr. A. Zell	Robotik