

Untersuchungen zum Apoptosemechanismus bei *Trypanosoma brucei*:
Effekte von Staurosporin im Vergleich zu Prostaglandin D₂
und die Rolle der Endonuklease G

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Torsten Barth
aus Hechingen

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Prüfung:

02.07.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Rapaport

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich besonders für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie für die intensive und kollegiale Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Rapaport danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Institutsangehörigen Arbeitsgruppen und Kooperationspartnern danke ich für die Bereitstellung von Geräten und Messungen, die diese Arbeit erst möglich machte.

Der gesamten Arbeitsgruppe Duszenko bin ich dankbar für das tolle und freundschaftliche Arbeitsklima und den regen Ideenaustausch.

Bedanken möchte ich mich bei Derya Demirsal, Agnes Grey, Caroline Schönfeld, Andrea Wegner und Matthias Huber für die Unterstützung bei den alltäglichen Laborarbeiten.

Meinen Doktorandenkollegen Jasmin Stein, Björn Bassarak, Gustavo Bruges, Björn Buchholz, Rudolf Koopmann, Andreas Meiwes, Stefan Mogk und Khalid Muhammad danke ich für die Hilfsbereitschaft in experimentellen Fragen und der Motivation und vielen wertvollen Diskussionen.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Verena für die großartige Unterstützung und Motivation in schwierigen Phasen und den vielen schönen Momenten abseits der Arbeit.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Schlafkrankheit	1
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Infektionsverlauf und Krankheitsbild.....	4
1.1.3	Therapie.....	5
1.2	Trypanosomen	8
1.2.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	9
1.2.2	Taxonomie.....	10
1.2.3	Morphologie	12
1.2.4	Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	14
1.2.5	<i>Variant Surface Glycoprotein</i> (VSG).....	17
1.2.6	Trypanothion	18
1.2.7	Glykosomen	19
1.3	Nekrose und programmierter Zelltod	20
1.3.1	Apoptose bei höheren Eukaryonten	22
1.3.2	Apoptose bei Einzellern	24
1.4	Auslöser des induzierten Zelltodes bei <i>T. brucei</i>	25
1.4.1	ROS	25
1.4.2	Prostaglandine	26
1.4.3	Staurosporin	27
1.5	Cyclooxygenase (COX)	28
1.6	Endonuklease G (EndoG)	30
1.7	EndoG bei Trypanosomen	31
1.8	Zielsetzung	34

2	MATERIAL & METHODEN	35
2.1	Verwendete Organismen	35
2.1.1	Trypanosomen	35
2.1.2	Versuchstiere	36
2.1.3	Bakterien	36
2.2	Materialien	37
2.2.1	Chemikalien	37
2.2.1.1	Laborchemikalien.....	37
2.2.1.2	Radiochemikalien.....	39
2.2.2	Verwendete Antikörper	40
2.2.3	Oligonukleotide	40
2.2.4	Restriktionsenzyme	41
2.2.5	Sonstige Enzyme	41
2.2.6	Plasmide	42
2.2.7	Kits	42
2.2.8	Verbrauchsmaterialien	42
2.2.8.1	Geräte	43
2.2.8.2	Software und Datenbanken	45
2.3	Medien, Puffer und Lösungen	45
2.3.1	Gelelektrophorese.....	45
2.3.2	Medien für Bakterienkulturen	46
2.3.3	Puffer für die <i>inclusion bodies</i> (IB) Isolierung	47
2.3.4	Puffer für die FPLC.....	47
2.3.4.1	Ni-NTA Affinitätschromatographie	47
2.3.4.2	Ionenaustauschchromatographie	48
2.3.4.3	Gelfiltration	48
2.3.5	Kulturmedien für Trypanosomen	48
2.3.6	Puffer zur Isolierung von Trypanosomen aus Blut	52
2.3.7	Puffer zur Herstellung von Trypanosomenlysat.....	52
2.3.8	Lösungen für die Dünnschichtchromatographie	53
2.3.9	Sonstige Puffer	53

2.3.10 Puffer für die Trypanosomen-Elektroporation	54
2.3.11 Puffer für die SDS-PAGE	55
2.3.12 Western Blot mit alkalischer Phosphatase (AP)	55
2.3.13 Zytotoxizitätstest (nach Bodley <i>et al.</i> , 1995)	57
2.3.14 Lösungen für die Elektronenmikroskopie	57
2.3.15 Lösungen für die Durchflusszytometrie	58
2.3.16 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie	60
2.4 Methoden.....	61
2.4.1 Anzucht und Isolierung von Trypanosomen aus Rattenblut	61
2.4.2 Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten	61
2.4.3 Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen.....	62
2.4.4 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen	62
2.4.5 Herstellung von <i>E.coli</i> -Kulturstabilaten.....	63
2.4.6 DNA-Sequenzierung	63
2.4.7 Molekularbiologische Methoden.....	63
2.4.7.1 Isolierung von genomischer DNA.....	63
2.4.7.2 Polymerasekettenreaktion	63
2.4.7.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	64
2.4.7.4 Gelextraktion	65
2.4.7.5 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	65
2.4.7.6 Restriktionsverdau.....	65
2.4.7.7 Minipräparation von Plasmid-DNA	66
2.4.7.8 Ligation	66
2.4.7.9 Transformation	66
2.4.8 Extraktion und Dünnschichtchromatographie von Prostaglandinen.....	67
2.4.9 Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC ₅₀)	67
2.4.10 Untersuchung der Wirkung von Prostaglandin D ₂ und Staurosporin auf das Wachstum von <i>T. brucei</i> unter <i>in vitro</i> Kultivierung	68
2.4.11 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵ S]-Methionin	68
2.4.12 Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie	69
2.4.13 Rasterelektronenmikroskopie.....	70
2.4.14 Durchflusszytometrie	70

2.4.14.1	Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H ₂ DCFDA)	71
2.4.14.2	Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit 3'-(<i>p</i> -Aminophenyl)-fluorescein (APF)	71
2.4.14.3	Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit Dihydroethidium (DHE)	71
2.4.14.4	Färbung des Mitochondriums mittels Tetramethylrhodaminester (TMRE)	72
2.4.14.5	Annexin-V-Färbung von Phosphatidylserin-externalisierenden Trypanosomen	72
2.4.14.6	Messung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid.....	73
2.4.14.7	TUNEL-Test.....	73
2.4.15	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	73
2.4.15.1	Färbung des Mitochondriums mit Mitotracker Red CMXRos.....	73
2.4.15.2	Färbung des Zellkern und des Kinetoplasten mit DAPI	74
2.4.16	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	74
2.4.16.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	74
2.4.16.2	SDS-PAGE.....	75
2.4.16.3	Silberfärbung.....	75
2.4.16.4	Western Blot.....	76
2.4.17	Isolierung eines Cyclooxygenase-ähnlichen Enzyms (TbCOX) aus <i>T. brucei</i>	76
2.4.17.1	Lyse von Trypanosomen	76
2.4.17.2	Ammoniumsulfatfällung	77
2.4.17.3	Amplex Red assay	77
2.4.17.4	Ionenaustausch-Chromatographie (IEX).....	77
2.4.17.5	Gelfiltration	78
2.4.17.6	Immunpräzipitation mittels MagBeads	78
2.4.17.7	Identifizierung mittels Massenspektrometrie (MS).....	78
2.4.18	rTbCOX in <i>E. coli</i>	79
2.4.18.1	Expression von rTbCOX.....	79
2.4.18.2	Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	79
2.4.18.3	Affinitätschromatographie	79
2.4.18.4	Abspaltung des His-Tags	80
2.4.18.5	rTbCOX Aktivitätstest	80
2.4.19	rTbEndoG in <i>E. coli</i>	80

2.4.19.1	Expression von rTbEndoG	80
2.4.19.2	Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	81
2.4.19.3	Affinitätschromatographie	81
2.4.19.4	Abspaltung des His-Tags	81
2.4.19.5	rTbEndoG Nukleaseaktivitätstest.....	82
2.4.20	TbEndoG in <i>T. brucei</i>	82
2.4.20.1	Herstellung von Trypanosomen mit EndoG- <i>knock down</i> , EndoG- Überexpression und EndoG-eGFP	82
2.4.20.2	Transfektion und Selektion	83
2.4.20.3	Induzierung.....	84
2.4.20.4	RNA-Isolierung und RT-qPCR.....	84
3	ERGEBNISSE	85
3.1	Isolierung eines COX-ähnlichen Enzyms aus <i>T. brucei</i>	85
3.1.1	Zellyse	87
3.1.2	Ammoniumsulfat-Fällung	88
3.1.3	Amplex Red assay	90
3.1.4	Chromatographie	91
3.1.5	Immunpräzipitation mit Protein A gekoppelten MagBeads.....	93
3.1.6	Massenspektrometrische Analyse	94
3.2	Expression von rTbCOX in <i>E. coli</i>	95
3.2.1	Klonierung von rTbCOX	95
3.2.2	Expression von rTbCOX in <i>E. coli</i>	98
3.2.3	Aktivitätstest von rTbCOX mittels Dünnschicht-Chromatographie.....	99
3.3	Rekombinante Endonuklease G.....	100
3.3.1	Klonierung von rTbEndoG in <i>E. coli</i>	100
3.3.2	Expression und Aufreinigung von rTbEndoG in <i>E. coli</i>	101
3.3.3	Nukleaseaktivität von rTbEndoG.....	103
3.4	Endonuklease G in <i>T. brucei</i>.....	104
3.4.1	Klonierung von TbEndoG in <i>T. brucei</i>	104
3.4.2	Herstellung von TbEndoG-Überexpressions-Trypanosomen	107

3.4.3	Verifizierung der Expression von TbEndoG mittels Western Blot.....	107
3.4.4	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	108
3.4.5	Wachstumskurven von TbEndoG-over, TbEndoG <i>knock down</i> und TbEndoG-eGFP Trypanosomen.....	109
3.4.6	Verifizierung der Überexpression von TbEndoG mittels esiRNA.....	111
3.4.7	Induktion von Apoptose mit PGD ₂ und Staurosporin in <i>T. brucei</i>	112
3.4.7.1	Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC ₅₀) von Staurosporin.....	112
3.4.7.2	Proteinbiosyntheserate von STS-behandelten Trypanosomen.....	113
3.4.8	Expression von TbEndoG nach Behandlung mit Prostaglandin D ₂	114
3.4.9	Wachstumskurve von SMB-Trypanosomen nach Behandlung mit Prostaglandin D ₂ und Staurosporin	115
3.4.10	Morphologische Untersuchungen nach Behandlung mit Prostaglandin D ₂ und Staurosporin	116
3.4.10.1	Morphologie von PGD ₂ -behandelten Trypanosomen	117
3.4.10.2	Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels Lichtmikroskopie	118
3.4.10.3	Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels REM.....	119
3.4.10.4	Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels TEM.....	120
3.4.10.5	Morphologie von TbEndoG-over Trypanosomen mittels TEM	122
3.4.11	Durchflusszytometrie	123
3.4.11.1	Untersuchung des Zelltodes nach Behandlung mit PGD ₂ und Staurosporin mittels Durchflusszytometrie	123
3.4.11.2	Nachweis des Zelltodes nach PGD ₂ - bzw. STS-Behandlung	124
3.4.11.3	Nachweis von Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid (PI).....	124
3.4.11.4	Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	125
3.4.11.5	Bestimmung intrazellulärer ROS mittels 2',7'-dichlorodihydrofluorescein- diacetat (H ₂ DCFDA).....	126
3.4.11.6	Bestimmung intrazellulärer ROS mittels 3'-(<i>p</i> -Aminophenyl)-fluorescein (APF)	128
3.4.11.7	Bestimmung intrazellulärer ROS mittels Dihydroethidium (DHE).....	128
3.4.11.8	Nachweis der Exposition von Phosphatidylserin (PS) mittels Annexin-V	129
3.4.11.9	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mittels TMRE130	
3.4.11.10	Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid (PI)	131
3.4.12	Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Test.....	135

3.4.13	Fluoreszenz-Mikroskopie nach PGD ₂ bzw. STS Behandlung	136
4	DISKUSSION	138
4.1	Isolierung eines Cyclooxygenase-ähnlichen Enzyms aus <i>T. brucei</i>.....	138
4.1.1	Expression von rTbCOX in <i>E. coli</i>	140
4.2	Einfluss von PGD₂ und Staurosporin auf <i>T. brucei</i>	140
4.2.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Zelltod von PGD ₂ bzw. STS behandelten Trypanosomen.....	142
4.3	Einfluss von Endonuklease G auf <i>T. brucei</i>	144
4.3.1	Überexpression von EndoG in <i>T. brucei</i>	145
4.3.2	Expression von rTbEndoG in <i>E. coli</i>	146
5	ZUSAMMENFASSUNG	147
6	LITERATURVERZEICHNIS	149

Abkürzungen

AIF	<i>apoptosis inductor factor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Ammoniumsulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonat
BF	Blutform der Trypanosomen
BSA	bovines Serumalbumin
CDKs	<i>cyclin-dependent kinases</i>
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethly-
DFMO	Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HAT	humane afrikanische Trypanosomiasis
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kDNA	Kinetoplasten-DNA
LS	<i>long slender</i> Form der Trypanosomen
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MITat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigenic type</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Prozyklische Fliegenform der Trypanosomen
PCD	<i>programmed cell death</i> (Programmierter Zelltod)
PG	Prostaglandin

PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SMB	<i>single marker</i> Blutform der Trypanosomen
SS	<i>short stumpy</i> Form der Trypanosomen
STS	Staurosporin
TAO	trypanosomale Alternative Oxidase
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TMRE	Tetramethylrodaminester
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Schlafkrankheit

Die humane afrikanische Trypanosomiasis, auch Schlafkrankheit genannt, ist eine der wichtigsten Erkrankungen in der Gruppe der vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*). Der Erreger, *Trypanosoma brucei*, wird von der Tsetsefliege, die im tropischen Afrika beheimatet ist, übertragen. Somit sind über 60 Millionen Menschen südlich der Sahara direkt von der Krankheit bedroht. Die WHO schätzt die Zahl an neuen Infektionen auf 50.000 bis 70.000 pro Jahr [WHO, 2010].

Es gibt zwei Formen der afrikanischen Schlafkrankheit. Die durch *T. brucei gambiense* verursachte chronisch verlaufende Infektion, die v. a. in Zentral- und Westafrika verbreitet ist und die durch *T. brucei rhodesiense* verursachte akute Infektion, die fast nur in Ostafrika vorkommt [Hide, 1999]. Die Parasiten treten während der Infektion vom Blut in das Zentrale Nervensystem (ZNS) über und lösen dort den typischen Dämmerzustand der betroffenen Patienten aus. Aufgrund der mangelhaften Wirksamkeit von veralteten Medikamenten mit hoher Toxizität gegen Parasiten, die ins ZNS gelangt sind, ist eine effektive Therapie nach heutigem Stand nicht umzusetzen. Um eine Verbesserung der sozialen und wirtschaftlichen Bedingungen in den Entwicklungsländern zu erlangen ist die Entwicklung neuer und bezahlbarer Medikamente dringend erforderlich. Zudem wird aus Angst vor einer Infektion mit den Schlafkrankheitserregern oft auch fruchtbares Land gemieden, was einen Bevölkerungsschwund in großen Teilen Afrikas zur Folge hat. Dadurch entsteht wiederum eine Hemmung der landwirtschaftlichen Entwicklung und Produktion in diesen Gebieten [Kuzoe, 1991; 1993].

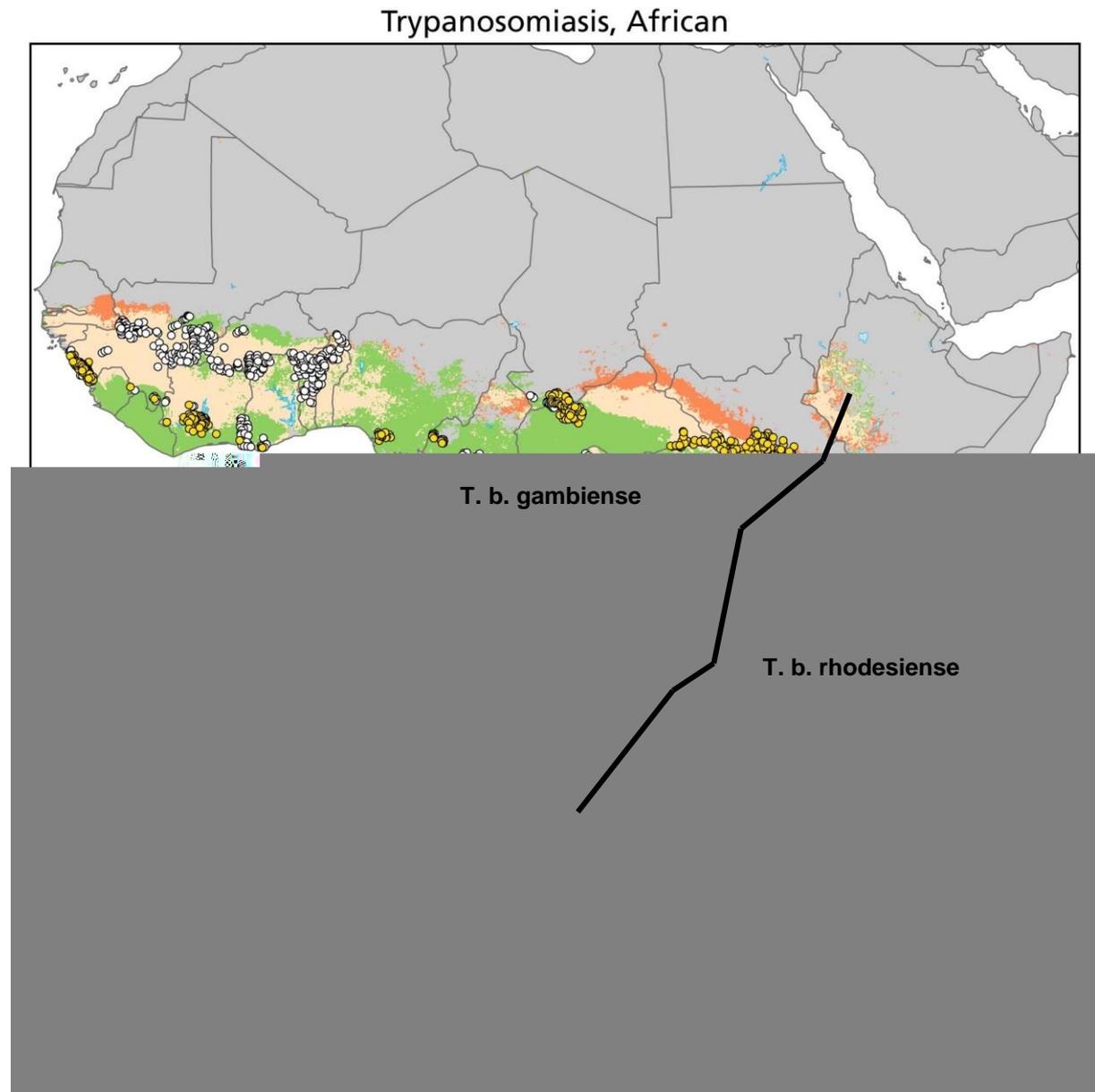


Abbildung 1-1: Fälle und Verbreitungsgebiet der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis

[Wellcome Trust, 2011]

Quelle: <http://wellcometrust.wordpress.com/2012/03/01/developing-the-atlas-of-human-infectious-diseases/african-trypanosomiasis/>

Nach etwa vier bis sechs Monaten dringen die *T. b. gambiense* Parasiten über die Blut-Hirn-Schranke in das Zentrale Nervensystem (ZNS) ein. Bei *T. b. rhodesiense* kann diese meningoenzephalitische, zweite Phase oft schon nach wenigen Wochen eintreten. Hier leiden die Patienten unter den charakteristischen Meningoenzephalitis-Symptomen, wie dem Auftreten von Verwirrungszuständen, Kopfschmerzen, Apathie und Somnolenz sowie schweren Schlafstörungen, die der Krankheit ihren Namen gaben [Beers *et al.*, 1999; Witzel *et al.*, 2007]. Diese beruhen auf einer Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus und einer Fragmentierung der Schlafphasen [Buguet *et al.*, 2001]. Desweiteren treten neurologische Symptome wie Lähmungen von Gliedmaßen, Zittern, Muskelzuckungen sowie Koordinations- und Sprachstörungen auf, die mit anhaltendem Krankheitsverlauf stetig zunehmen. Die fortschreitende Beeinträchtigung des ZNS führt im Endstadium zum Koma und in 100% der unbehandelten Fälle zum Tod. Aufgrund von Mangelernährung oder Sekundärinfektionen tritt dieser jedoch oft schon früher ein.

1.1.3 Therapie

Je nach Stadium der Krankheit erfolgt die Behandlung mit Medikamenten, die starke bzw. letale Nebenwirkungen aufweisen. In der ersten Phase können noch Medikamente mit relativ geringen Nebenwirkungen eingesetzt werden. In der zweiten Phase der Krankheit muss jedoch mit Wirkstoffen, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, therapiert werden. Diese sind allerdings stark toxisch und schwierig zu applizieren.

Bereits 1904 wurde die arsenhaltige Verbindung Atoxyl als trypanozoider Wirkstoff identifiziert. Die Toxizität des Stoffes machte jedoch eine Weiterentwicklung unerlässlich. 1916 gelang es dem Bayer-Konzern schließlich mit Bayer 205 (Suramin) das erste effektive Mittel gegen *T. b. rhodesiense*-Infektionen in der ersten Phase zu entwickeln [Winkle, 2005]. Das nicht ZNS-gängige Suramin, welches später unter dem Handelsnamen Germanin vertrieben wurde, wird heute noch verwendet.

Pentamidin, das 1937 von Arthur James Ewins entwickelt wurde, ist heute noch das einzige Medikament, das in der ersten Phase von *T. b. gambiense*-Infektionen eingesetzt wird. [Bray *et al.*, 2003].

Mit der Entwicklung des ZNS-gängigen Melarsoprols 1949 (Arsobal[®]) wurde erstmals ein wirkungsvolles Medikament gegen die zweite Phase, sowohl von *T. b. gambiense*- als auch von *T. b. rhodesiense*-Infektionen, vorgestellt. Jedoch starben damals noch bis zu 20% der

Patienten an den Folgen der arsenhaltigen Therapie [Friedheim, 1949]. In einer Studie von 2003 wurden Schlafkrankheitspatienten der zweiten Phase mit Melarsoprol und Eflornithin behandelt. Hier lag die Sterblichkeitsrate bei Melarsoprol-behandelten Patienten bei 3,5% und bei Eflornithin-behandelten Patienten bei 0,8% [Chappuis *et al.*, 2005].

Mit dem Ende der 1980er Jahre entwickelten, α -Difluormethylornithin (DFMO, Eflornithin) wurde ein ZNS-gängiges Mittel entdeckt, welches eine deutlich verminderte Sterblichkeitsrate gegenüber Melarsoprol aufwies. Allerdings ist es nur gegen die westafrikanischen *T. b. gambiense* Erreger wirksam und zudem sehr teuer in der Produktion, weshalb es Mitte der 1990er Jahre wieder vom Markt genommen wurde.

Erst durch die Einigung Sanofi-Aventis und der DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) 2001 wurde das Mittel wieder hergestellt und umsonst der afrikanischen Bevölkerung zur Verfügung gestellt. Ein effizienter Therapieansatz stellt auch die Kombination bereits bekannter Medikamente wie Eflornithin und dem eigentlich gegen die Chagas-Krankheit (durch *T. cruzi* verursacht) eingesetzten Nifurtimox, dar. Diese Kombinationstherapie gilt als die wirksamste und wurde im April 2009 in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel (*List of Essential Medicine*) der WHO aufgenommen [WHO, 2010]. Die NECT-Therapie (*nifurtimox-eflornithine combination therapy*) ist einfacher und günstiger als eine Therapie mit Eflornithin alleine. Zudem bedarf sie kürzerer Behandlungsdauer und ruft in nur etwa halb so vielen Fällen schwere Nebenwirkungen hervor [Priotto *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2010].

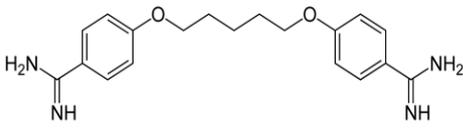
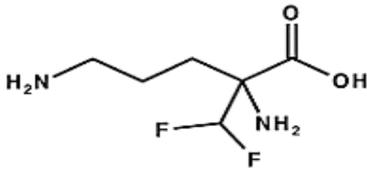
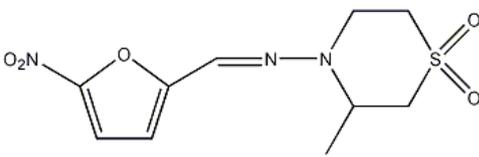
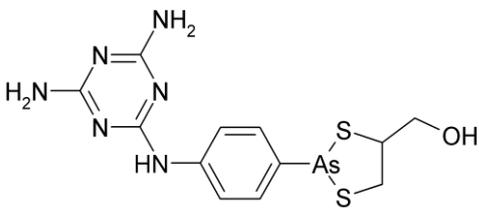
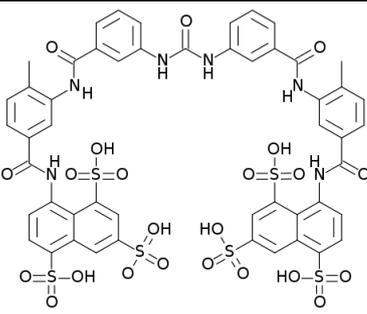
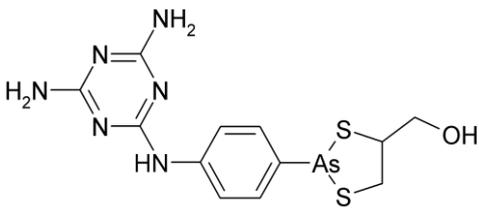
Substanz	Stadium	App.	Struktur	Nebenwirkungen
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>				
Pentamidin	erstes	i. m.		Hypoglykämie, Schmerzen an der Einstichstelle, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen
Eflornithin (DFMO)	zweites	i. v.		Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe, Anämie, Leuko- und Thrombozytopenie
Nifurtimox	zweites	i. v.		in Kombination mit Eflornithin deutlich verminderte Nebenwirkungen
Melarsoprol	zweites	i. v.		Enzephalopathie, Hautreaktionen, periphere motorische und sensorische Neuropathien, Thrombophlebitis
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>				
Suramin	erstes	i. v.		Überempfindlichkeit, Albuminurie, Hämaturie, periphere Neuropathien
Melarsoprol	zweites	i. v.		Enzephalopathie, Hautreaktionen, periphere motorische und sensorische Neuropathien, Thrombophlebitis

Tabelle 1-1: Medikamente gegen die Schlafkrankheit

Modifiziert nach [Brun *et al.*, 2010].

1.2 Trypanosomen

Die einzelligen, parasitär lebenden Eukaryonten verdanken ihren Namen ihrer länglichen und gewundenen Zellform sowie ihren „bohrenden“ Drehungen bei der Fortbewegung. „*Trypanon*“ und „*soma*“ ist griechisch und steht für Bohrer und Körper.

Erstmals wurden Trypanosomen 1843 von dem Forscher David Gruby im Blut von Fröschen nachgewiesen [Gruby, 1843].

Die afrikanischen Trypanosomen der Art *Trypanosoma brucei* wurden zum ersten Mal im Jahre 1895 von Sir David Bruce näher beschrieben und als Krankheitserreger der Tierseuche Nagana identifiziert [Bruce, 1895]. Später wurde durch ihn auch die Tsetsefliege als Überträger beschrieben [Bruce *et al.*, 1903]. Wie wir heute wissen sind die Erreger nicht nur für die Nagana (*T. b. brucei*, *T. congolense*) sondern auch für die humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT) oder auch afrikanische Schlafkrankheit beim Menschen (*T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*) verantwortlich.

Humanpathogene Trypanosomen wurden zum einen 1902 von Joseph Everett Dutton identifiziert, der den Parasiten den Namen nach ihrem Entdeckungsort durch Robert Michael Forde, dem Fluss Gambia, *Trypanosoma gambiense* gab [Dutton, 1902; Forde, 1902]. Zum anderen, 1910 von Stephens und Fantham, die *Trypanosoma rhodesiense* aus einem Patienten isolieren konnten [Stephens und Fantham, 1910]. Zu dieser Zeit wurde auch die zyklische Übertragung in der Fliege durch Friedrich Karl Kleine erstmals beschrieben [Kleine, 1909]. 1972 wurden diese drei ursprünglich identifizierten Arten zur Art *Trypanosoma brucei* mit den Unterarten *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* zusammengefasst.

Die geißeltragenden Protozoen (Flagellaten) kommen weltweit in Arthropoden, Vertebraten, und Pflanzen vor und gehören der Ordnung Kinetoplastida an. Alle Trypanosomen sind heteroxene Parasiten, die sich mehr als einen Wirt pro Lebenszyklus zu Eigen machen. Sie treten sowohl im hämolymphatischen System der Vertebraten als auch im Verdauungssystem von Arthropoden (den Überträgern) auf.

Zur Gattung *Trypanosoma* zählen weltweit mehrere hundert Arten [BioLib, 2010], wobei den beiden humanpathogenen Arten *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi* mit den jeweiligen Unterarten eine besondere Bedeutung zukommt. Die intrazellulären Parasiten der Art *T. cruzi* sind die Auslöser der Chagas-Krankheit in Mittel- und Südamerika und werden durch blutsaugende Raubwanzen übertragen. Jährlich gibt es dort ca. 50.000 Neuinfektionen mit etwa 15.000 Todesfällen.

1.2.1 *Trypanosoma brucei*

Die Parasiten der drei *Trypanosoma brucei*-Artengruppe werden durch unterschiedliche Fliegen der Gattung *Glossina*, oder auch Tsetsefliege genannt, übertragen. Das Verbreitungsgebiet der Erkrankungen ist daher auf das Lebensgebiet der Tsetsefliegen beschränkt [Frey *et al.*, 2001].

Der sogenannte „Tsetse-Gürtel“ ist über ein ca. 10 Millionen km² großes Gebiet verbreitet und erstreckt sich vom 14° nördlicher bis zum 29° südlicher Breite, also südlich der Sahara im Norden bis an den Nordrand der Kalahari im Süden Afrikas [Dönges, 1988; Pepin und Meda, 2001; Barrett *et al.*, 2003]. In 36 Ländern sind so mehr als 60 Millionen Menschen dem ständigen Risiko einer Erkrankung durch Trypanosomen ausgesetzt [WHO, 2010].

Der ostafrikanische Grabenbruch stellt dabei ziemlich genau die Grenze zwischen den Verbreitungsgebieten der westafrikanischen *T. b. gambiense* und der ostafrikanischen *T. b. rhodesiense* dar. Lediglich in Uganda treten beide Unterarten auf. *T. b. brucei*, kommt über den gesamten Tsetse-Gürtel verteilt vor.

Der humanpathogene Erreger *T. b. gambiense* wird vorwiegend von Fliegen der *Glossina palpalis*-Gruppe übertragen. Sie leben in West- und Zentralafrika und sind in wasserreichen Gegenden und in Flussnähe anzutreffen.

Das Hauptreservoir für *T. b. rhodesiense* stellt das Rind dar. Es können bis zu 20% der Rinder in Epidemieregionen akut oder auch chronisch mit humanpathogenen Parasiten infiziert sein. Haustiere wie Schweine oder Ziegen sowie Wildtiere wie Buschböcke und Antilopen stellen weitere Reservoirs dar. Die Übertragung erfolgt durch Fliegen der *Glossina morsitans*-Gruppe, die vorwiegend in der Savanne leben.

Die nicht-humanpathogene Unterart, *T. b. brucei* befällt zahlreiche Haus- und Wildtiere, bei denen sie die Tierseuche Nagana auslöst. Hier verläuft die Infektion sehr unterschiedlich. Bei westafrikanischen Hausrindern z.B. treten kaum Krankheitszeichen auf. Bei Hunde, Katzen oder Pferden verläuft die Infektion meist tödlich. Menschen zeigen aufgrund des im humanen Serum vorkommenden Apolipoproteins L-1 (apoL-1) eine Resistenz gegenüber *T. b. brucei* [Pays und Vanhollebeke, 2008]. *T. b. rhodesiense* besitzt mit dem *serum resistance associated* (SRA)-Faktor ein Protein, das an das Apolipoprotein bindet und dessen trypanolytische Wirkung neutralisiert. Der Mechanismus der Serumresistenz bei *T. b. gambiense* ist bislang noch unbekannt [Berberof *et al.*, 2001]. Durch Mutation und *knock down* des Hp/Hb Rezeptors in diesen Parasiten konnte ein apoL-1 vermittelter Zelltod

umgangen werden [Kieft *et al.*, 2010]. Somit spielt dieser Rezeptor nachweislich eine zentrale Rolle bei der *T. b. gambiense* Serumresistenz.

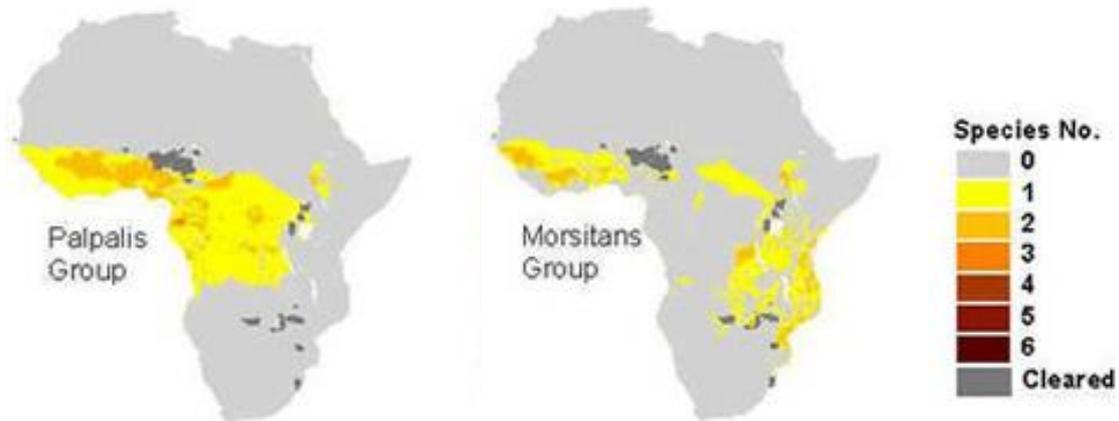


Abb. 1-3: Verbreitungsgebiet der Tsetsefliegen der Palpalis- und Morsitans-Gruppe

Quelle: http://www.medicalecology.org/diseases/print_d_african_trypano.htm

1.2.2 Taxonomie

Trypanosomen gehören der Ordnung Kinetoplastida an. Die taxonomische Klassifizierung richtet sich nach morphologischen, biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika. Der Ordnungsname ist auf die Präsenz des Kinetoplasts, einem elektronenmikroskopisch sichtbaren Selbstteilungskörper, der die mitochondriale DNA enthält, zurückzuführen. Alle Angehörigen dieser Ordnung tragen in mindestens einem der Stadien ihres Lebenszyklus ein oder mehrere Flagellen. Je nach Anzahl der Flagellen leiten sich die Unterordnungen Trypanosomatina (ein Flagellum) und Bodonina (zwei Flagellen) ab.

Die Gattung *Trypanosoma* gehört der Familie Trypanosomatidae an und zählt zu den Trypanosomatina.

Diese gliedert sich in die beiden Gruppen Salivaria und Stercoraria. Die Klassifizierung richtet sich nach dem Vermehrungsort im Vektor und der Übertragungsart. Die Vervielfachung der Salivaria-Trypanosomen, die durch den Speichel übertragen werden, findet im vorderen Teil des Verdauungstraktes des Vektors statt. Zu ihnen gehören neben der Art *T. brucei* auch *T. congolense*, *T. vivax* (Erreger der Rinderseuche in Afrika), *T. evansi* (Erreger der Surra) und *T. equiperdum* (verursacht die Kreuzlähme bei Pferden).

Die Parasiten der Stercoraria-Gruppe vermehren sich im Hinterdarm des Vektors und werden durch die *Faeces* übertragen. Zu den Stercoraria gehört *T. cruzi* (Erreger der Chagas Krankheit in Mittel- und Südamerika), der durch die Raubwanze übertragen wird.

Einige Kinetoplastiden, wie beispielsweise Crithidien, leben ausschließlich im Darmsystem von Arthropoden und vollziehen keinen Wirtswechsel. Es wird angenommen, dass diese Formen in der Evolution zuerst auftraten bevor sich Parasiten mit komplexeren Lebenszyklen entwickelten.

Nach Levine stehen die Trypanosomen in folgendem taxonomischen Gesamtzusammenhang [Levine, *et al.*, 1980]:

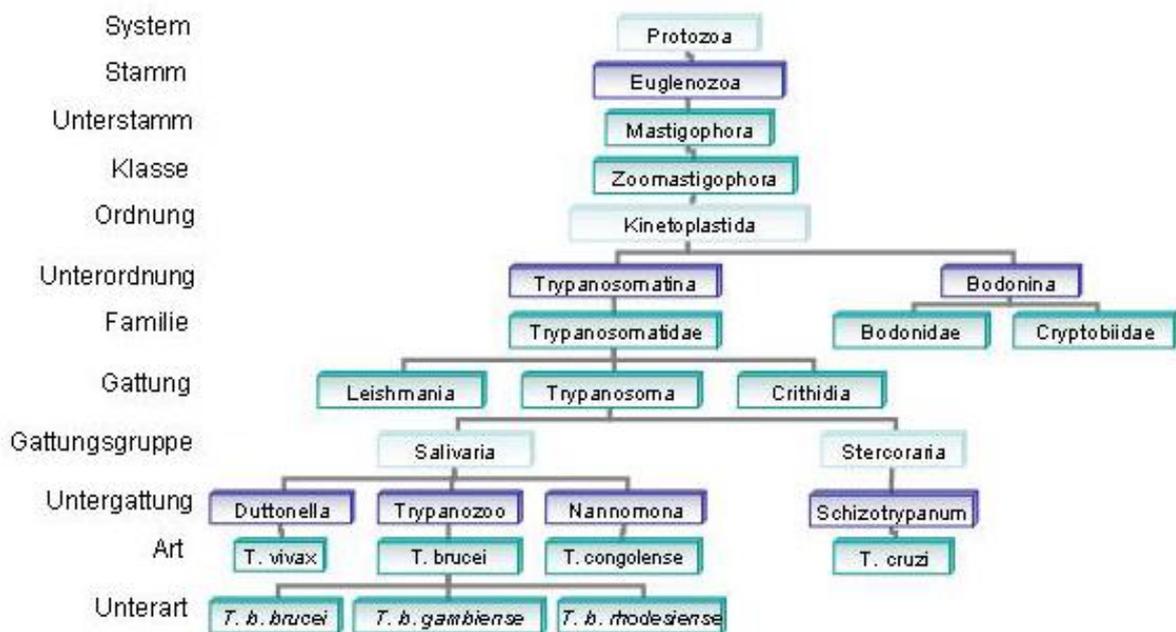


Abb. 1-4: Taxonomische Einordnung von *Trypanosoma brucei*

1.2.3 Morphologie

Trypanosomen sind 15-40µm lange und im Durchmesser etwa 0,5-2µm große Einzeller, deren äußere Gestalt stark vom jeweiligen Stadium ihres Lebenszyklus abhängig ist. Intrazellulär bleibt der Aufbau der Zelle aber im Wesentlichen konstant. So besitzt jede Zelle das charakteristische Flagellum, welches aus einer Flagellumtasche am hinteren Ende der Zelle entspringt. Die Flagellumtasche ist der zentrale Ort von zellulären Aufnahme- und Abgabeprozessen, um die sich ein stark ausgebildetes vesikuläres System befindet [Landfear und Ignatushchenko, 2001]. Dies und die Beobachtung, dass die Geißel der Trypanosomen kaum zur Fortbewegung der Parasiten beiträgt, legt die Vermutung nahe, dass das Flagellum eher ein Transportmedium extrazellulärer Stoffe zur Flagellumtasche hin darstellt, damit sie dort über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden können [Engstler *et al.*, 2007]. Außerdem ist das Flagellum der Trypanosomen lediglich in einem kleinen Bereich am Vorderende des Parasiten frei beweglich und fast über die gesamte Länge durch *maculae adhaerentes* (desmosomen-artige Strukturen) mit der Zelle verbunden. Allerdings hat sich die Motilität der Geißel als essentiell für die Überlebensfähigkeit der Parasiten herausgestellt [Broadhead *et al.*, 2006].

Je nach Stadium des Lebenszyklus ist der Ursprung des Flagellums ein anderer. In der trypomastigoten Form liegt er hinter dem Nukleus. In der epimastigoten Form, im Insekt, liegt er vor dem Nukleus.

Trypanosomen besitzen parallel angeordnete Mikrotubuli, die unterhalb der Plasmamembran als dicht gepacktes, flexibles Netzwerk aus gegeneinander verschiebbaren Strängen verlaufen und der Zelle ihre charakteristische Form und Stabilität verleihen [Hemphill *et al.*, 1991]. Vorgänge wie Exo- oder Endozytose erfolgen nur an der Flagellumtasche.

An der Zelloberfläche befinden sich Proteine wie VSG oder Procyclin, die einen Oberflächenmantel bilden. Diese schützen die Blutformen bzw. die Fliegenformen gegen das Immunsystem des jeweiligen Säugerwirts (VSG) bzw. gegen die Verdauungsenzyme im Darm der Fliege (Procyclin).

In Abb. 1-5 ist der Aufbau eines *long slender* Trypanosomen dargestellt. Neben den gewohnten Organellen wie Nukleus, Golgi-Apparat, Lysosomen und Endosomen gibt es auch trypanosomenspezifische Organellen wie die Glykosomen (peroxisomen-artige Organellen), welche die meisten Enzyme der Glycolyse enthalten, sowie ein einziges Mitochondrium, das sich je nach Stadium verändert. In dem schlauchartig durch die Zelle angelegten Mitochondrium enthalten ist auch der Kinetoplast, der die gesamte mitochondriale DNA

(kDNA) repräsentiert. Er ist auf der Höhe der Flagellumtasche lokalisiert und besteht aus etwa 50 *maxicircles* (20-38 Kilobasen) und mehreren Tausend *minicircles* (ca. 1kb), die catenat-artig miteinander verknüpft sind [Chen *et al.*, 1995; Lukes *et al.*, 2002]. Die DNA der *maxicircles* codiert für die ribosomale RNA (rRNA) sowie für einige der mitochondrialen Proteine der oxidativen Phosphorylierung und der Elektronentransportkette [Simpson, 1987]. Auf den *minicircles* ist ein Teil der *guideRNAs* lokalisiert, die für das *RNA-editing* der *maxicircle*-Transkripte benötigt werden.

Das *RNA-editing* stellt eine umfangreiche posttranslationale Modifikation der prä-mRNA in Trypanosomen dar, die zu einer Erhöhung der Diversität des Transkriptom führt und somit in einer größeren Proteinviefalt mündet. Dazu werden von der 3'-terminalen Uridyl-Transferase Uridylreste in die mRNA-Sequenzen entgegen der Transkriptionsrichtung eingebaut. Aus Mitochondrien konnte ein Protein/DNA-Komplex mit *RNA-editing*-Aktivität, das sogenannte „Editosom“, isoliert werden [Stuart, 1998].

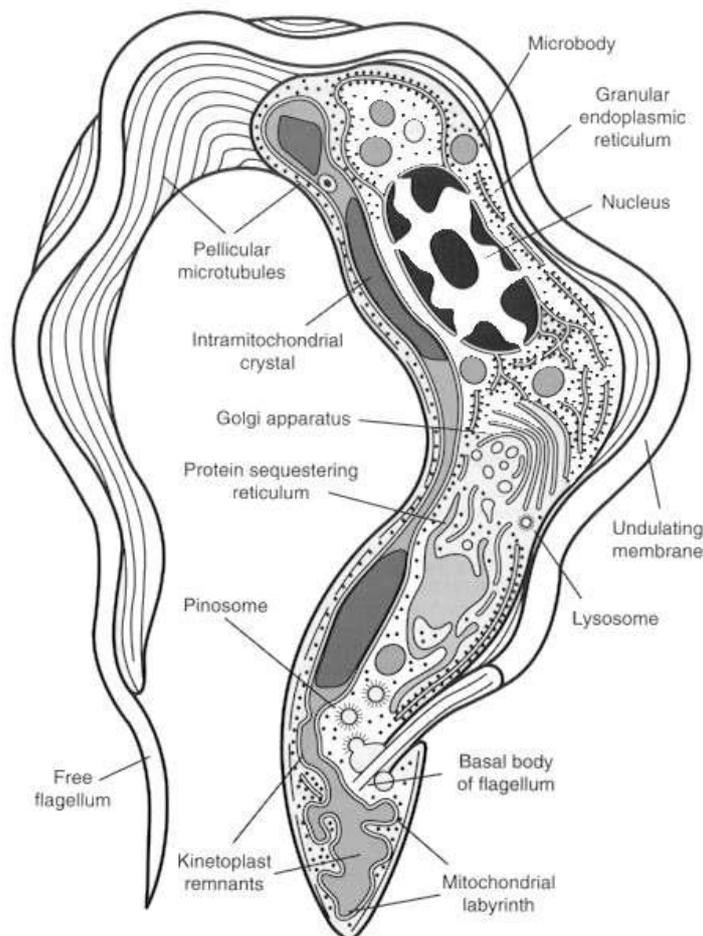


Abb. 1-5: Schematischer Aufbau von *Trypanosoma brucei* [Vickerman, 1977]

1.2.4 Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen unterliegen einem sehr komplexen Lebenszyklus, der verschiedene Stadien beinhaltet. Um den Wirtswechsel von Fliege auf Säuger und umgekehrt zu bewerkstelligen, müssen sie sich an vier verschiedene Umgebungen anpassen:

Den Blutkreislauf und das Gehirn des Säugers [Wolburg *et al.*, 2012], den Verdauungstrakt der Fliege und schließlich deren Speicheldrüse.

Dabei erfahren das Mitochondrium und die Plasmamembran die größte Veränderung. Aber auch insgesamt unterscheiden sich die verschiedenen Stadien in ihren zellbiologischen und biochemischen Eigenschaften sowie ihrer Morphologie. Während der Blutmahlzeit einer infizierten Tsetsefliege gelangen etwa 20.000 metazyklische, trypomastigote Trypanosomen, über den Speichel der Fliege, in den Körper des gebissenen Säugers [Stich und Steverding, 2002]. Im dermalen Bindegewebe der Einstichstelle kommt es zu einer lokalen Entzündung, dem sogenannten Schanker, dem ersten Symptom der Schlafkrankheit [Barry und Emery, 1984]. Die Parasiten gelangen während des Bisses direkt in das gesamte Lymph- und Blutkreislaufsystem. Dort wandeln sich die metazyklischen Parasiten in die proliferierende *long slender* (LS) Blutform um, die sich durch binäre Zellteilung, bei der eine geschlossene Mitose durchgeführt wird [Duszenko, 1998], vermehren. Im Gegensatz zur pro- bzw. metazyklischen Insektenform, welche eine voll funktionsfähige Atmungskette aufweist und hauptsächlich Prolin metabolisiert, besitzt die LS-Blutform ein stark zurückgebildetes Mitochondrium, das keines der für den Citratzyklus oder Atmungskette erforderlichen Enzyme enthält. Sie gewinnt ihre Energie ausschließlich aus der im Blut vorhandenen Glucose [Oppendoes und Borst, 1977] und ist das, für die wellenförmig verlaufende Parasitämie, verantwortliche Stadium der Trypanosomen. Ist eine gewisse Zelldichte erreicht, differenziert die LS-Form über eine Intermediat-Form zu der im Zellzyklus arretierten und daher nicht mehr teilungsfähigen *short stumpy* (SS) Form.

Im Gegensatz zur LS-Form besitzt die SS-Form ein Mitochondrium mit tubulären Cristae, in dem Enzyme wie Pyruvat-Dehydrogenase, Prolinoxidase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase exprimiert werden [Flynn und Bowman, 1973]. Insofern stellt die SS-Form ein Stadium dar, das für das Leben im Darmsystem der Tsetsefliege präadaptiert ist, in dem Prolin die einzige Energiequelle darstellt.

Im Blut sind immer beide Formen (LS und SS) enthalten, da nicht alle Trypanosomen differenzieren. Um dem Immunsystem des Wirts zu entkommen, exprimieren die Zellen stets eine neue VSG-Variante, welche die alte auf der Zelloberfläche ersetzt. In der letzten Phase

der Infektion dringen die Trypanosomen über die Blut-Liquor-Schranke in das zentrale Nervensystem ein und lösen eine Meningoenzephalitis aus [Chimelli und Scaravilli, 1997].

Die SS-Form produziert PGD_2 , welches, wie seine Metabolite, einen apoptose-ähnlichen programmierten Zelltod (PCD) induziert [Figarella *et al.*, 2005, 2006].

Werden diese Parasiten also nicht innerhalb der nächsten 3-4 Tage, durch eine Blutmahlzeit einer Tsetsefliege, aufgenommen, sterben sie ab [Tyler, 2003]. Geschieht dies aber, gelangen die Trypanosomen in das Verdauungssystem des Insekts. Im Mitteldarm entwickelt sich die nicht teilungsfähige, gedrungene SS-Form, innerhalb von 48-72h, zur prozyklischen (PC) Insektenform, die eine hohe Teilungsrate aufweist und statt VSG, Procyclin als Hauptoberflächenprotein exprimiert [Roditi *et al.*, 1989].

Nach einigen Tagen im Darm wandeln sich die Parasiten zur epimastigoten Form um und wandern anschließend durch das Proventrikulum in die Speicheldrüse [Glättli, 1988]. Die epimastigote Form heftet sich an die Mikrovilli der Speicheldrüsen an und wandelt sich in die gedrungene, nicht proliferierende, metazyklische (MC) Form um, die für den Säugerwirt infektiös ist. Ihr Oberflächenmantel besteht erneut aus VSG, und bei einer Übertragung lösen sie sich wieder vom Speicheldrüsenepithel ab.

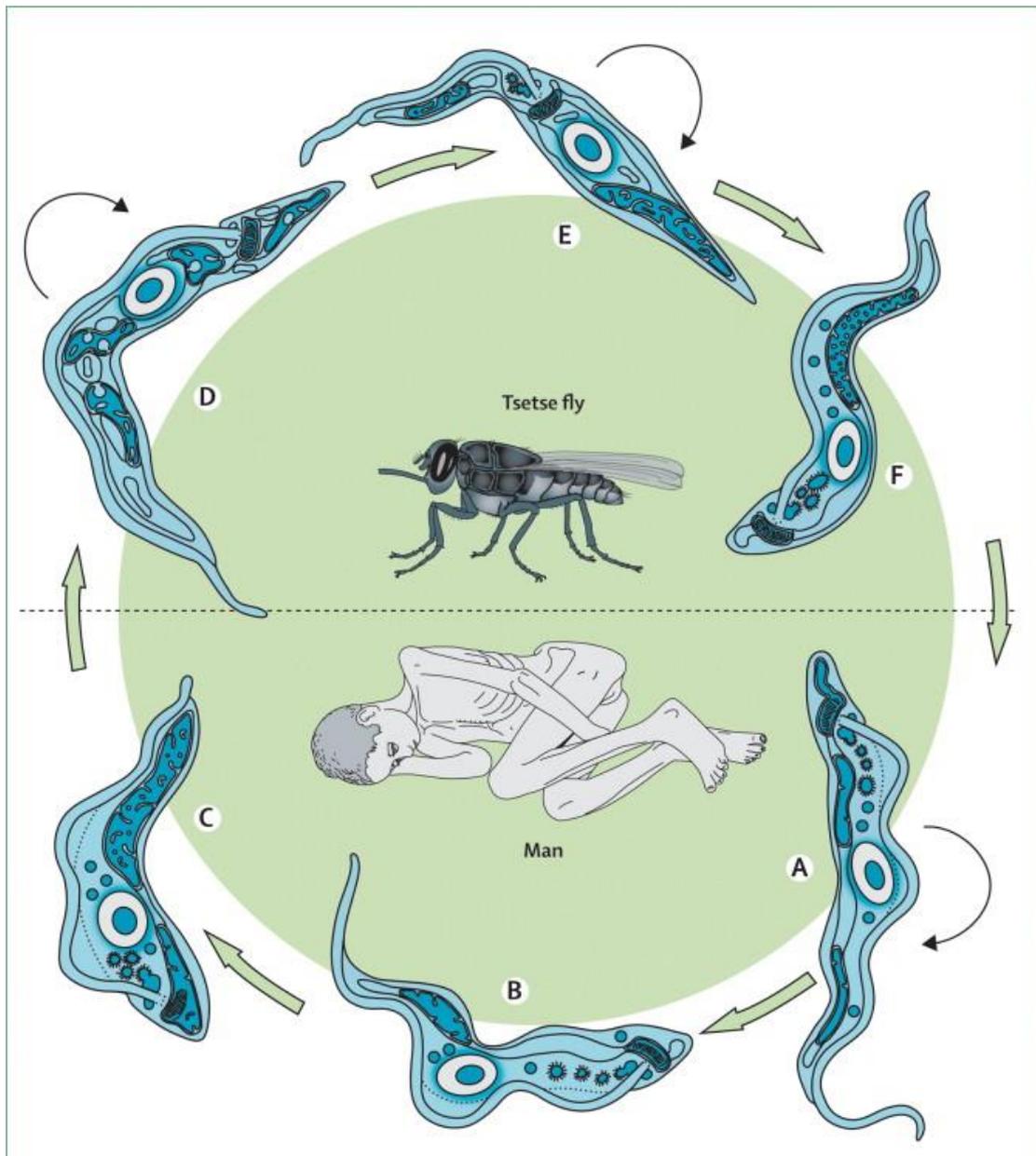


Abb. 1-6: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

Säuger-Formen: A) teilungsfähige *long slender* Form, B) Intermediat-Form, C) *short stumpy* Form. Insekten-Formen: D) teilungsfähige Mitteldarm-Form, E) epimastigote Form und F) metazyklische Form.

[Brun *et al.*, 2010, Modifiziert nach Vickerman K., "Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes" *Br Med Bull* 1985; **41**: 105–14]

1.2.5 *Variant Surface Glycoprotein (VSG)*

Bereits Ende der 60er Jahre wurde der erste experimentelle Hinweis auf eine protektive Proteinhülle bei Trypanosomen gefunden [Vickerman, 1969]. Um sich vor dem Immunsystem des Säugerwirts zu schützen, besitzen die Blutformen der Trypanosomen einen dichten Oberflächenmantel aus ca. 10^7 Molekülen eines knapp 60kDa großen Proteins, dem *variant surface glycoprotein (VSG)*. Das VSG bildet eine einheitliche, ca. 12-15nm dicke Schicht, die elektronenmikroskopisch sichtbar ist und das einzige von außen zugängliche Antigen des Parasiten darstellt [Cross, 1975; Turner, 1999].

Gegen VSG oder antigene Determinanten werden vom Wirt Antikörper gebildet, was zur Abtötung des größten Teils der Parasitenpopulation führt. Einige Trypanosomen exprimieren zu dieser Zeit aber bereits eine andere VSG-Variante, die vom Immunsystem noch nicht erkannt wurde und können so die Population wieder regenerieren. Auf diese Weise kommt es, wie in Abb. 1-7 gezeigt, zum typischen wellenförmigen Verlauf der Parasitämie [Ross und Thomson, 1910]. Außerdem wird das VSG-Repertoire der Trypanosomen durch fehlerhafte genetische Rekombination ständig erweitert. Der Mechanismus des sogenannten *antigenic switching* besteht in der Aktivierung eines stillen VSG-Gens, wobei das zu diesem Zeitpunkt aktive Gen gleichzeitig inaktiviert wird. Dies kann z.B. durch Rekombinationsprozesse erfolgen, bei denen ein bis zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiertes Gen in eine telomerständige *VSG expression site* transloziert und in der Folge transkribiert wird [Borst *et al.*, 1998].

Das *antigenic switching* tritt spontan, d.h. unabhängig von der Immunantwort des Wirts auf, und zwar in Intervallen von etwa 10^{-6} pro Generation bei monomorphen und bis zu 10^{-2} pro Generation bei pleomorphen Stämmen [Lamont *et al.*, 1986]. Dies führt dazu, dass die Parasitämie einen oszillierenden Verlauf annimmt. Nach dem Absterben des größten Teils der Trypanosomen vermehren sich diejenigen mit einem veränderten Oberflächenmantel wieder ungestört bis das Immunsystem auf das neue Antigen reagieren kann. Dann wird wieder eine andere VSG-Variante benötigt. Die jeweiligen antigenen Determinanten werden von dem nach außen gerichteten Amino-Terminus bestimmt, der den variablen Teil der unterschiedlichen VSG-Moleküle darstellt. Dagegen bildet der Carboxy-Terminus, der etwa ein Drittel des Gesamtmoleküls ausmacht, den in allen VSG-Varianten relativ konservierten Anteil des Proteins. Über diesen ist das VSG-Molekül als Homodimer über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Plasmamembran befestigt. Strukturanalysen von verschiedenen VSG-Varianten wiesen die Gemeinsamkeit auf, dass die

Oberfläche der Trypanosomen durch das Protein jeweils dicht bedeckt ist. Eine weitere Gemeinsamkeit der untersuchten VSG-Varianten ist die Anwesenheit von N-Glykanen [Freyman *et al.*, 1984]. Bei den prozyklischen Insektenformen von *Trypanosoma brucei* findet man keinen Oberflächenmantel aus VSG-Molekülen, sondern eine Expression des plasmamembranständigen *Procyclic Acidic Repetitive Protein* (PARP) oder Procyclin [Roditi und Clayton, 1999], welches den nötigen Schutz vor dem Verdauungssystem der Tsetsefliege bietet.

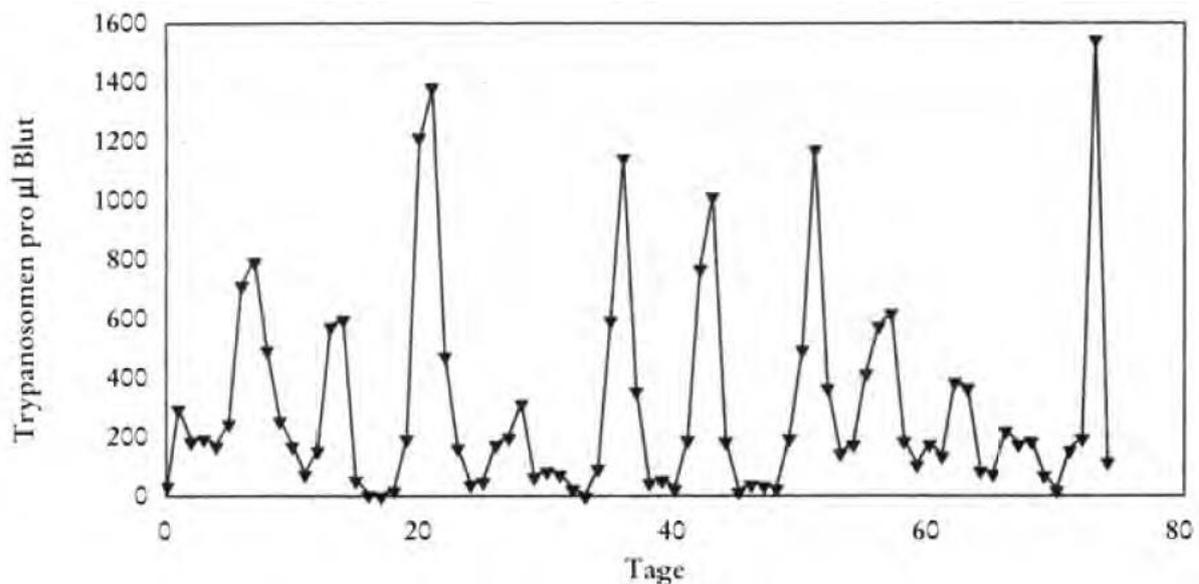


Abb. 1-7: Parasitämie eines Schlafkrankheit-Patienten

Gezeigt ist der Verlauf der Trypanosomenkonzentration im Blut eines männlichen Patienten, modifiziert nach [Ross und Thomson, 1910].

1.2.6 Trypanothion

Die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts ist für jede Zelle von großer Bedeutung. Höhere Eukaryonten besitzen dafür das Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin), das vor allem zur Beseitigung freier Radikale (über die Glutathion-Peroxidase), zum antioxidativen Schutz von Cysteinresten in Proteinen, als Konjugatbildner in der Phase II der Biotransformation und für verschiedene biosynthetische Reaktionen (z.B. Peptidoleukotriene) verwendet wird. Trypanosomen besitzen keine Katalase und keine selenhaltige Glutathion-Peroxidase [Bosch-Morell *et al.*, 1999].

Etwa 70% ihres Glutathions wird in Trypanothion umgewandelt, welches den essentiellen Redox-Mediator in den Trypanosomatiden *Crithidia*, *Leishmania* und *Trypanosoma* darstellt

[Fairlamb und Cerami, 1985; 1992]. Es besteht aus zwei Molekülen Glutathion, die über das Polyamin Spermidin miteinander verknüpft sind (N1, N8-bis(L-glutamyl-L-hemicystinylglycyl)spermidin). Darüber hinaus spielt es eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Redoxverhältnisse und trägt über die Trypanothion-Peroxidase direkt zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei [Keiser *et al.*, 2001]. Trypanothion wird *de novo* aus Spermidin, Glutathion und ATP synthetisiert [Koenig *et al.*, 1997; Comini *et al.*, 2003]. Außerdem ist der charakteristische Polyaminstoffwechsel der Kinetoplastiden für die Biosynthese von Trypanothion essentiell. Die Enzyme Ornithin-Decarboxylase und S-Adenosylmethionin-Decarboxylase, welche als *Targets* für chemotherapeutische Maßnahmen dienen sowie die Trypanothion-Reduktase (Äquivalent der Glutathion-Reduktase im Säuger), die die Regeneration des Trypanothions katalysiert, sind hier von Bedeutung [Fairlamb und Cerami, 1992].

Tryparedoxin (TXN), ein Molekül der Thioredoxin-Familie, dient als Akzeptor für das Reduktions-Äquivalent des Trypanothions. Gleichzeitig ist TXN das Substrat für die Tryparedoxin-Peroxidase, welche Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und andere Hydroperoxide reduziert [Gommel *et al.*, 1997; Nogoceke *et al.*, 1997]. Herunterregulation der Trypanothion-Reduktase in *Trypanosoma brucei* führt zu einer Zunahme der Wasserstoffperoxidempfindlichkeit, Verlust der Virulenz und zum Arrest der Proliferation [Dumas *et al.*, 1997; Krieger *et al.*, 2000].

1.2.7 Glykosomen

Bei den Kinetoplastiden läuft, im Gegensatz zu allen anderen Zellen, die Glycolyse nicht im Zytosol, sondern in einem speziellen Organell, dem Glykosom ab. Die Glucose wird dort bis zum 3-Phosphoglycerat umgesetzt. Dieses wird aus dem Glykosom ins Zytosol überführt, wo die letzten beiden Schritte der Glycolyse ablaufen, also auch die unter Substratkettenphosphorylierung ablaufende Pyruvatkinasereaktion. Somit ist die Energiebilanz innerhalb des Glykosoms ausgeglichen, und das in der letzten Glycolysereaktion anfallende ATP steht für Reaktionen in der Zelle bereit. Das Endprodukt Pyruvat wird über einen Transporter aus der Zelle ins Medium abgegeben und stellt somit ein direktes Maß für die glycolytische Aktivität von Blutform-Trypanosomen dar.

Um das in der GAPDH-Reaktion im Glykosom entstehende NADH zu reoxidieren, benutzen die Parasiten ein besonderes Shuttle-System:

Das in der Aldolasereaktion entstehende Dihydroxyacetonphosphat wird zunächst im Glykosom durch die Glycerinphosphat-Dehydrogenase unter NAD-Bildung zu Glycerin-3-Phosphat reduziert. Das G-3-P wird aus dem Glykosom zum Mitochondrium (Intermembranraum) transportiert, wo es durch die trypanosomale Alternative Oxidase (TAO) zu Dihydroxyacetonphosphat reoxidiert wird. Als Elektronenakzeptor fungiert molekularer Sauerstoff, wodurch auch in Blutform-Trypanosomen, trotz der nicht vorhandenen Atmungskette, ein erheblicher Sauerstoffverbrauch nachweisbar und essentiell ist [Clarkson *et al.*, 1989].

Das Glykosom ist ein hochspezialisiertes Organell. Da die Parasiten ihre Energie ausschließlich aus der Blut-Glucose des Wirtes beziehen, stellt die Glycolyse die einzige energieliefernde Reaktionskette dar. In dem zurückgebildeten Mitochondrium der BF-Trypanosomen wird weder der Citratzyklus noch die Atmungskette durchgeführt. Daher ist auch die Expression mitochondrialer Cytochrome ausgesetzt und ein sehr hoher Glucosedurchsatz notwendig, den die Trypanosomen mithilfe dieses Kompartiment vollziehen [Priest und Hajduk, 1994]. Glykosomen können wie Peroxisomen und Glyoxisomen zu den *microbodies* gezählt werden, da sie neben der praktisch identischen Erscheinungsform auch einen ähnlichen Satz an Enzymen besitzen (z.B. Katalase in Crithidien, Enzyme für die β -Oxidation von Fettsäuren in *Trypanosoma brucei*). Desweiteren weisen sie im Saccharosegradienten die gleiche Dichte wie Peroxisomen und Glyoxisomen auf [Borst, 1986].

1.3 Nekrose und programmierter Zelltod

Der programmierte Zelltod (*programmed cell death*; PCD) ist der absichtlich herbeigeführte Tod von Zellen in einem mehrzelligen Organismus. Dieser dient in der Regel dazu, für die Entwicklung oder den Fortbestand des Organismus unnötige oder hinderliche Zellen gezielt zu entfernen.

Aber auch in einzelligen Organismen wurde PCD nachgewiesen.

Der Tod von Zellen ist, wie die Proliferation, für die Homöostase eines Organismus unabdingbar [Nagata und Golstein, 1995]. Der programmierte Zelltod wurde zum ersten Mal bei der Beobachtung der Ontogenese von Wirbeltieren beschrieben [Vogt, 1842].

Vogt beobachtete, dass während der Entwicklung von Amphibien unerwünschte Gewebe (Schwanz, Schwimmhäute) durch Zelltod gezielt abgebaut wurden. Der Zelltod wurde von

Toxikologen und Pathologen aber erst als ein passives, degeneratives Ereignis angenommen, was im Jahre 1871 von Virchow als „Nekrose“ und „Nekrobiose“ bezeichnet wurde [Virchow, 1871]. Mit der Entwicklung der Biologie wurde erkannt, dass es sich hierbei um eine gesteuerte Reaktion handelt [Saunders, 1966].

1971 wurde eine Art Suizid vorgeschlagen, nachdem klar wurde, dass eine *de novo* Proteinbiosynthese notwendig ist, um morphologische Veränderungen herbeizuführen [Farber *et al.*, 1971]. Im Jahre 1972 wurde von Kerr, Wyllie und Currie erstmals eine Klassifizierung in zwei Arten vorgenommen, die den oben beschriebenen Zelltod (Apoptose) vom Unfalltod einer Zelle (Nekrose) abgrenzt.

Dabei beschreibt die Nekrose den pathologischen Untergang von Zellen, die durch verschiedene Stimuli wie Verletzungen, Verbrennungen, Detergentien, Strahlung, Oxidantien, Ischämien, Traumata oder Pathogene absterben. Diese Form des Zelltodes tritt unerwartet und plötzlich auf und kann nur durch die Entfernung des auslösenden Stimulus verhindert werden, nicht wie bei der Apoptose durch Blockierung eines Signals [Leist *et al.*, 2001]. Im Verlauf des nekrotischen Zelltodes kommt es durch einen Ausfall der zellulären Ionenpumpen zu einem Einstrom von Kalzium- und Natriumionen. Der daraus resultierende osmotische Einstrom von Wasser führt zur Schwellung der Zelle und der Organellen und schließlich zum Platzen der gesamten Zelle. Durch die Einwirkung von Detergenzien führt der Verlust der Membrintegrität zu diesem Effekt. Hierbei tritt der Inhalt der Zelle aus und löst in Metazoen eine charakteristische Entzündung aus [Kerr *et al.*, 1972].

Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei der Apoptose nicht zum Auflösen der Zelle. Vielmehr treten hier morphologische Charakteristika auf, die einen genetisch gesteuerten Prozess erkennen lassen, der eine Reaktion auf physiologische oder pathologische Umgebungsveränderungen darstellt und somit induzierbar ist [Kerr *et al.*, 1972]. Es kommt zum Schrumpfen von Zytosol und Zellkern, wobei die Zelle aktiv Ionen, vor allem Kaliumionen, nach außen pumpt. Das Chromatin kondensiert und zerfällt in Fragmente. Es kommt zu keiner Schwellung der Organellen, die erst spät ihre Integrität verlieren. Des Weiteren bilden sich Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembran, die sich als „apoptotische Körper“ abschnüren. Durch dieses sogenannte *blebbing* werden die Zellen gerichtet degradiert. Es kommt, im Gegensatz zur Nekrose, nicht zur Freisetzung des Zellinhalts, so dass in mehrzelligen Organismen keine entzündlichen Reaktionen induziert werden.

Zur Charakterisierung aller Arten des programmierten Zelltodes (außer Nekrose) führte Clarke 1990 eine neue Klassifizierung des PCD ein:

- PCD I, die typische Apoptose,
- PCD II, Autophagie, die durch die Bildung von autophagischen Vakuolen charakterisiert ist,
- PCD III, bei dem sich die Zelle ohne die Beteiligung des Lysosomensystems in Fragmente auflöst [Clarke, 1990].

Zudem wurde von Leist und Jäätelä ein Modell erstellt, das den Zelltod nach der Chromatinkondensation in vier Klassen einteilt [Leist und Jäätelä, 2001]. Apoptose zeigt eine Chromatinkondensation in kompakter und geometrisch einfacher Form. *Apoptosis-like* PCD zeigt eine weniger kompakte Chromatinkondensation mit geometrisch komplexeren Formen als bei Apoptose. Die meisten caspase-unabhängige Apoptose-Formen fallen in diese Klasse. Beim *necrosis-like* PCD ist dagegen keine Chromatinkondensation zu beobachten. Nekrose als Gegenstück zum PCD kann nur durch die Entfernung des auslösenden Stimulus verhindert werden.

1.3.1 Apoptose bei höheren Eukaryonten

Für die Existenz eines mehrzelligen Organismus ist die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau einzelner Zellen essentiell. Bei der Embryonalentwicklung werden z.B. die Häute des Interdigitalraumes apoptotisch entfernt [Mori *et al.*, 1995]. Auch überflüssig gebildete Nervenzellen, die keine Synapsen ausgebildet haben werden durch Apoptose degradiert [Yuan *et al.*, 2000]. Aber auch für die Homöostase des adulten Körpers ist die Apoptose von großer Bedeutung. So werden genotoxische Zellen oder autoreaktive Zellen des Immunsystems genauso apoptotisch entfernt wie in der Regel viral infizierte Zellen [Shub, 1994]. Eine Fehlregulation der Apoptose wird in einer Reihe von akuten (Infarkte) und chronischen Krankheitsbildern (neurodegenerative Erkrankungen, AIDS) beobachtet [Ameisen, 1991]. Die Apoptose ist ein aktiver und somit energieabhängiger Prozess. Sie lässt sich in drei Phasen einteilen [Martin und Green, 1995].

In der Induktionsphase können exogene oder endogene Stimuli den PCD auf verschiedenen Wegen induzieren. Exogen werden spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z.B. Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren-Familie (TNFR), wie der CD95-Rezeptor durch ihre Liganden aktiviert [Van Parijs und Abbas, 1998]. Reaktive Sauerstoffradikale oder Schädigung der DNA führen dagegen als endogene Stimuli zum intrinsischen Weg der Apoptose. Die Todesrezeptoren des extrinsischen Weges besitzen in ihrem zytoplasmatischen

Teil eine Todesdomäne (DD, „*death domain*“). Liganden sind z.B. der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und andere Zytokine, die beispielsweise von T-Lymphozyten sezerniert werden. Durch die induzierte Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an die Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne binden können. Als erstes wird das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ (TRADD) rekrutiert. Anschließend bindet an die DD des TRADD das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). FADD besitzt neben der DD auch eine Todeseffektordomäne (DED, „*death effector domain*“), über die Procaspase 8 mit ihrer DED an den Komplex bindet. Diese kann sich nun durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktivieren. Die aktive Caspase 8 löst ihrerseits die sogenannte Caspase-Kaskade aus, wodurch weitere Caspasen aktiviert werden.

Beim intrinsischen Weg kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren, wie Smac/DIABLO, aus dem Mitochondrium ins Zytosol. Dieser Weg wird beispielsweise durch p53, einem Tumor-Suppressor ausgelöst, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird. p53 stimuliert die Expression pro-apoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bax, Bad). Diese führen dann zur Freisetzung der proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c, aus dem mitochondrialen Intermembranraum.

Die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) macht die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD der Procaspase 9 binden kann. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung von Caspase 9. Dieses Apoptosom stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Wie Caspase 8 initiiert aktive Caspase 9 die Caspase-Kaskade. Eine Signalverstärkung dieses Weges wird innerhalb der Caspase-Kaskade durch Caspase 7 vermittelt, die nicht nur Substrate spaltet die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase 9 aktiviert.

Zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg kommt es aber auch zum *cross-talk*. So kann die Caspase 8 das cytosolische Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) spalten und das entstehende C-terminale Spaltprodukt tBid (*truncated Bid*) vermittelt nach der Translokation an das Mitochondrium die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren und führt zur Aktivierung der Caspase 9 [Igney und Krammer, 2002].

Im letzten Schritt führen Effektorcaspasen, vor allem Caspasen 3, 6 und 7 zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie aktivieren einerseits sekundäre Zielproteine (z.B. Caspase aktivierte DNase (CAD), oder andere Caspasen) durch limitierte Proteolyse. Andererseits sind sie selbst aktiv am Abbau von Lamin und Actin beteiligt. Ein weiterer Aspekt ist die caspasen-vermittelte Unterdrückung der DNA-Reparatur [Elmore, 2007].

Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleine Vesikel ab, bei denen, im Gegensatz zur Nekrose, die Zellmembran intakt bleibt [Schulze-Osthoff *et al.*, 1998].

Der Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol, tritt beim extrinsischen Weg erst spät, d.h. während der Apoptose auf und ist eher ein Resultat der Apoptose als ihr Auslöser. Beim extrinsischen Weg unterscheidet man ferner zwischen aktiver (Aktivierung von Rezeptoren) und passiver (Entzug von Wachstumsfaktoren) Apoptose.

Es wurden bereits auch caspasen-unabhängige Formen des Zelltodes beschrieben [Borner und Monney, 1999; Leist und Jäätelä, 2001]. Eines dieser Modelle ist die Paraptose. Starke Vakuolisierung des Zytosols und Dilatierung des Mitochondriums und des endoplasmatischen Retikulums sind hierfür charakteristisch. Paraptose wird durch MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ohne Beteiligung von Caspasen vermittelt und kann durch Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie TAJ/TROY induziert werden [Sperandio *et al.*, 2004].

1.3.2 Apoptose bei Einzellern

Während das Auftreten eines apoptotischen Zelltodes bei mehrzelligen Organismen als Homöostase gut nachvollziehbar ist, war ein solcher Prozess bei Einzellern lange Zeit kaum vorstellbar.

Dennoch sind unizelluläre Organismen fähig, sich selbst in Zellpopulationen zu organisieren und interzelluläre Kommunikationsmuster zu errichten [Shapiro, 1995; Palkova *et al.*, 1997]. Zur Akzeptanz dieses Phänomens haben auch die vielen Veröffentlichungen zum apoptotischen Zelltod bei den folgenden Spezies beigetragen: *Dictyostelium discoideum* [Arnoult *et al.*, 2001], *Leishmania donovani* [Lee *et al.*, 2002], *Leishmania infantum* [Serenio *et al.*, 2001], *Leishmania mexicana* [Zangger *et al.*, 2002], *Plasmodium bergeri* [Al Olayan *et al.*, 2002], *Plasmodium falciparum* [Picot *et al.*, 1997], *Saccharomyces cerevisiae* [Madeo *et al.*, 1999; 2002], *Tetrahymena thermophila* [Christensen *et al.*, 1996], *Trypanosoma brucei* [Ridgley *et al.*, 1999; Figarella *et al.*, 2005; 2006], *Trypanosoma cruzi* [Piacenza *et al.*, 2001]. Die Apoptose in niederen Eukaryonten unterstützt die Theorie, dass der programmierte Zelltod (PCD) aus einem ursprünglichen Zelltodmechanismus entstanden ist [Fraser und James, 1998]. Eine Hypothese für die Entstehung des PCD ist, dass eukaryontische Zellen eine Fusion einer aeroben Bakterienspezies mit anaeroben Zellen ist, woraus die Mitochondrien entstanden sind. Kinetoplastiden sind die ersten Einzeller, die ein Mitochondrium besitzen. Dieses scheint von großer Bedeutung für die Kontrolle von Leben

und Tod in der Eukaryontenevolution zu sein [Nguewa *et al.*, 2004]. Um Konflikte zwischen den unterschiedlichen Genomen lösen zu können und somit eine Symbiose zu erreichen, könnten Killer-Gene selektiert worden sein [Ameisen, 1996]. Obwohl sich viele phänotypische Merkmale des Zelltodes bei den Trypanosomatidae, mit denen der verschiedenen Typen von Apoptose in höheren Eukaryonten gleichen, sind die molekularen Mechanismen noch unklar. Es wurde bereits beschrieben, dass einige Gene unterschiedlich exprimiert werden, wenn PCD in diesen Parasiten stattfindet. Bei *Trypanosoma brucei* wurde eine Stimulierung von Prohibitin (ein Proto-Oncogen), TRACK (Mitglied der RACK Gen-Familie) und ein Homolog des QM Proteins (Regulator von c-Jun) während des Ablaufs des Zelltodes festgestellt [Welburn und Murphy, 1998; Lillico *et al.*, 2002]. Jedoch sind die genauen Signalwege des PCD bei den Trypanosomatidae noch längst nicht entschlüsselt.

1.4 Auslöser des induzierten Zelltodes bei *T. brucei*

1.4.1 ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind metabolische Nebenprodukte vieler physiologischer Prozesse. Zu den ROS gehören neben Singulett-Sauerstoff auch die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte: Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale (OH^{\bullet}). Häufig werden auch Hypochlorid ($HOCl$), Peroxyl-Radikale (ROO^{\bullet}), Alkoxyl-Radikale (RO^{\bullet}) und Stickstoffmonoxid (NO) dazu gerechnet. Diese ROS können durch Oxidations- und Destruktionsprozesse mit biologischen Makromolekülen, wie z.B. Lipiden (insbesondere in den Zellmembranen), Proteinen und DNA wechselwirken und so zu letalen Zellschädigungen führen. Eine besondere Bedeutung für zytotoxische Effekte wird dem Hydroxyl-Radikal beigemessen, das neben Ozon zu den reaktivsten Sauerstoff-Derivaten zählt [Farr und Kogoma, 1991; Kwan und Voelker, 2003]. Wasserstoffperoxid kann durch Ein-Elektronen-Transfer in das stark oxidierende Hydroxyl-Radikal überführt werden. Dieses ist in biologischen Systemen sehr kurzlebig, da es mit fast jeder Art von Molekülen reagiert.

Aerob lebende Organismen haben effektive Schutz- und Reparaturmechanismen aufgebaut, um ROS abzubauen und entstandene Schäden reparieren zu können. Enzymatische Entgiftungsreaktionen werden von der Superoxid-Dismutase, Katalase, Peroxidase sowie von

Glutathion-Peroxidase übernommen. Aufgrund des Fehlens von Enzymen wie Katalase und Peroxidase in Trypanosomen, werden die Entgiftungsprozesse hauptsächlich vom Trypanothion übernommen [Duszenko, 1998].

Im Mitochondrium der Blutform (auch in der PC-Form) ist ein Enzym lokalisiert, das die Reduktionsäquivalente des NADH der Glycolyse auf den Sauerstoff transferiert, die trypanosomale Alternative Oxidase (TAO). Sie wurde in der prozyklischen Form als *scavenger* für das Superoxid-Anion beschrieben [Fang und Beattie, 2003]. In der Blutform von *T. brucei rhodesiense* führt die Inhibierung der TAO mit Ascofuranon zum Zelltod, die Überexpression dieses Enzyms übt jedoch einen schützenden Effekt aus [Tsuda *et al.*, 2005]. ROS und der damit verbundene oxidative Stress sind maßgeblich an der Entstehung verschiedener Krankheiten wie z.B. Alzheimer, Parkinson, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und an Entzündungsprozessen beteiligt, wo sie den apoptotischen Zelltod einzelner Zellen einleiten.

1.4.2 Prostaglandine

Prostaglandine sind Eicosanoide, die aus C-20 Fettsäuren durch oxidativen Metabolismus im tierischen und menschlichen Organismus entstehen. Eicosanoide werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus dem Fettstoffwechsel produziert. Aus drei dieser Fettsäuren, Dihomo- γ -Linolensäure, Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure werden durch die Prostaglandinsynthese drei unterschiedliche Prostaglandin-Serien gebildet. Hier werden die Prostaglandine der Serie-2 aus Arachidonsäure beschrieben. Nach Abspaltung von Arachidonsäure aus Phosphoglycerolipiden (in der Regel durch die Phospholipase A₂) beginnt die Prostaglandinsynthese mit der Bildung von Prostaglandin H₂ (PGH₂). Dies ist die Ausgangsverbindung für Prostaglandine und Tromboxane. Zwei Reaktionen führen zur Bildung von PGH₂, die beide durch das bifunktionelle Enzym Cyclooxygenase (COX) ausgeführt werden [Chandrasekharan und Simmons, 2004]. Durch Addition von Sauerstoff an C-9, C-11 und C-15 wird das Endoperoxid Prostaglandin G₂ (PGG₂) gebildet. Daraufhin wird durch die Peroxidaseaktivität der COX, das PGG₂ zu PGH₂ umgewandelt. Das instabile PGH₂ wird dann durch spezifische Prostaglandin Synthesen oder nicht-enzymatisch z.B. durch Liponsäure in die Prostaglandine D₂ (PGD₂), F_{2 α} (PGF_{2 α}) und E₂ (PGE₂) umgewandelt. PGF_{2 α} kann auch durch die 11-Ketoreduktase aus PGD₂ gebildet werden. 1983 wurde PGJ₂

als Metabolit von PGD₂ entdeckt [Fitzpatrick und Wynalda, 1983]. Mit ihm werden antikarzinogene und antivirale Eigenschaften verbunden [Nakahata *et al.*, 1990].

Das in dieser Arbeit verwendete Prostaglandin D₂ ist das Hauptprodukt des Cyclooxygenaseweges des Arachidonsäuremetabolismus in Mastozyten, Makrophagen und Knochenmarkszellen [Lewis *et al.*, 1982; Urade, 1989; Ujihara, 1988]. Es aktiviert den seltensten Prostaglandin-Rezeptor, den membranständigen DP-Rezeptor und führt zu einer gesteigerten cAMP-Produktion [Narumiya *et al.*, 1999]. DP-Rezeptoren werden in den Leptomeningen (*Dura mater*, *Arachnoidea* und *Pia mater*) exprimiert und sind für die Schlafinduktion verantwortlich [Oida *et al.*, 1997; Scammell *et al.*, 1998]. Die gehirnspezifische PGD₂-Synthase ist wie der DP-Rezeptor, in den Leptomeningen lokalisiert [Urade *et al.*, 1993]. Interessanterweise ist eine Dysregulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und erhöhte PGD₂ Konzentrationen im Liquor für das späte Stadium der Schlafkrankheit charakteristisch [Pentreath *et al.*, 1990].

1.4.3 Staurosporin

Staurosporin (STS) wurde erstmals 1977 aus *Saccharothrix aerocolonigenis ssp. staurospore* isoliert und anfangs als spezifischer Proteinkinase C-Inhibitor beschrieben [Omura *et al.*, 1977; Tamaoki *et al.*, 1986]. Später aber konnte gezeigt werden, dass Staurosporin ein zellmembranpermeables Alkaloid ist, welches verschiedene Kinasen in sehr niedrigen Konzentrationen hemmt. Aufgrund seiner hohen Affinität zur ATP Bindungsstelle von Kinasen ist Staurosporin ein effizienter Proteinkinaseinhibitor. Staurosporin wird heute als Breitbandkinaseinhibitor eingesetzt, dessen breite biologische Aktivität aufgrund seiner geringen Selektivität von anti-fungal bis hin zu anti-hypertensiv reicht. Es wirkt jedoch nicht anti-bakteriell. Die inhibitorische Wirkung von STS wurde bei verschiedenen Kinasen beschrieben ist aber noch nicht geklärt [Meyer *et al.*, 1989; Nakano *et al.*, 1987; Secrist *et al.*, 1990; Yanagihara *et al.*, 2006]. Einerseits induziert STS die Apoptose durch die Verwendung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges unabhängig vom Todesrezeptorsignalweg und kann durch Bcl-2 inhibiert werden [Bertrand *et al.*, 1994; Engels *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1997], andererseits kann STS die Apoptose auch über den caspase-unabhängigen Mechanismus auslösen [Belmokhtar *et al.*, 2001]. Die STS-induzierte Apoptose in unterschiedlichen Zelllinien konnte nicht durch Cycloheximid gehemmt werden, was bedeutet, dass keine *de novo* Proteinbiosynthese dafür benötigt wird [Bertrand *et al.*, 1994; Ishizaki *et*

al., 1995; Jacobson *et al.*, 1994]. Daraus wurde geschlossen, dass die benötigten Proteine für die Ausführung des Zelltodprogrammes konstitutiv vorhanden sind [Jacobson *et al.*, 1996]. Die Auslösung der Apoptose bei Kinetoplastiden wie Leishmanien, die keine Caspasen besitzen wurde bereits intensiv erforscht. In Caspase-3 defizienten Mäusen wurde Apoptose durch STS ausgelöst, der jedoch Merkmale wie das typische *blebbing* der Zellen und DNA-Fragmentierung fehlten [Jänicke *et al.*, 1998].

1.5 Cyclooxygenase (COX)

Cyclooxygenasen, auch bekannt als Prostaglandin H-Synthasen oder Prostaglandin Endoperoxid-Synthasen (E.C. 1.14.99.1), gehören der Klasse der Oxidoreduktasen an. Erstmals wurde die 67kDa große COX-1 1976 aus Schaf- und Rindersamenblasen isoliert [Hemler und Lands, 1976; Miyamoto *et al.*, 1976]. Sie katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂, und bilden bei der Prostaglandinbiosynthese den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Die Synthese von PGH₂ geschieht in zwei Schritten in zwei unterschiedlichen Reaktionszentren des Enzyms. Im ersten Schritt fügt die Cyclooxygenaseaktivität des bifunktionellen Enzyms zwei Sauerstoffatome an C-9 und C-11 ein, die anschließend eine kovalente Bindung miteinander eingehen, und bildet so das Prostaglandin G₂. Im zweiten Reaktionsschritt wird durch die Peroxidaseaktivität Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ reduziert. Das entstandene PGH₂ dient als Substrat für die PGD₂, PGE₂ und PGF_{2 α} -Synthasen, der Prostacyclinsynthase (PGI₂) sowie der Thromboxan-Synthase (TXA). Die primären Prostaglandine werden dann weiter zu verschiedenen Derivaten und Abbauprodukten metabolisiert.

Bei den Cyclooxygenasen gibt es zwei Isoenzyme. COX-1, das für homöostatische Funktionen der Prostaglandine zuständig ist [Engelhardt *et al.*, 1995], und die induzierbare COX-2, die vor allem durch Entzündungsprozesse und Zytokine aktiviert wird [Raz *et al.*, 1988].

Die Cyclooxygenasen höherer Organismen sind integrale Membranproteine und luminal an den Innenseiten des endoplasmatischen Retikulums, der Kernhülle und im Golgi-Apparat in einer unüblichen Art lokalisiert. Die COX-Isoenzyme besitzen eine Tandem-Serie von vier amphipatischen Helices, welche eine hydrophobe Oberfläche bilden. Diese dringen in den oberen Teil der luminalen Seite des hydrophoben Lipiddoppelmembrankerns ein, wodurch sie in der Membran „fließen“ können [Simmons *et al.*, 2004]. Die Helices bilden auch den

Eingang des Kanals, der für die Cyclooxygenase-Aktivität des Enzyms verantwortlich ist und durch NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug*) gehemmt werden kann.

Nach heutigem Stand kommen COX nicht in einzelligen Organismen, Pflanzen oder Insekten vor. Die Inkubation von Trypanosomen mit verschiedenen NSAIDs zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum der Parasiten. Allerdings führte der Einsatz von ETYA (5,8,11,14-*Eicosatetratraynoic acid*), einem Arachidonsäurederivat das von der COX erkannt aber nicht umgesetzt werden kann zur Hemmung des Wachstums [Rawer, 2004]. Die nachgewiesene Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen in Trypanosomen wird also durch ein Enzym katalysiert, das strukturell kaum Ähnlichkeit zu den COX höherer Organismen aufweist. In Protozoen wurde bisher auch nur ein COX-ähnliches Enzym aus *Endamoeba histolytica*, welches aus Arachidonsäure PGE₂ synthetisiert, identifiziert [Dey, 2003]. Dieses Enzym weist eine Sequenzhomlogie zu COX-1 von 10% auf. In Trypanosomen ist kein Protein mit einer höheren Sequenzhomologie als 10% zu COX-1 bzw. COX-2 bekannt.

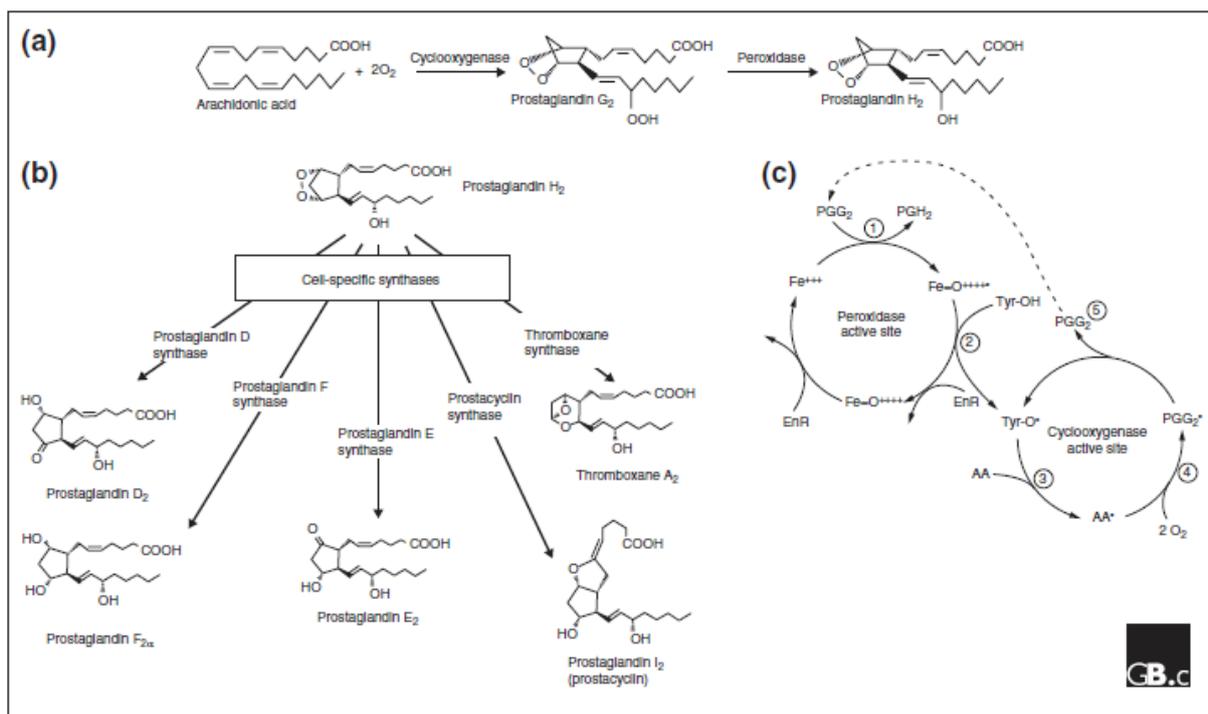


Abb. 1-8: Arachidonsäure-Kaskade

(a) Cyclooxygenase: Die Reaktion der Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂ wird durch die Cyclooxygenaseaktivität des Enzyms katalysiert, die Reaktion von Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ durch die Peroxidaseaktivität. **(b)** Zellspezifische Synthesen katalysieren die Umwandlung von PGH₂ zu den fünf Prostaglandinen D₂, F_{2α}, E₂, I₂ und Thromboxan A₂. **(c)** Reaktionsmechanismus von COX-1. (1). AA, Arachidonsäure; EnR, endogener Reduktant; Fe⁺⁺⁺, Häm-Eisen; Fe=O⁺⁺⁺⁺, Ferryl-oxo FeIV Porphyrinradikal; Tyr-OH, Tyrosin; Tyr-O•, Tyrosylradikal. [Chandrasekharan und Simmons, 2004].

1.6 Endonuklease G (EndoG)

Die Endonuklease G ist eine Nuklease, die zur $\beta\beta\alpha$ -Me-finger Superfamilie gehört. Diese Enzyme gehören der Klasse der Hydrolasen an und binden zweiwertige Metallionen. Das aktive Zentrum bildet ein hoch konserviertes DRGH-Motiv mit dem katalytisch wichtigen Histin-Rest, der ein OH- generiert, und somit Phosphodiesterbindungen in RNA sowie DNA unspezifisch spaltet. Bei dieser Spaltung führt EndoG im Gegensatz zu CAD (Caspase-aktivierte DNase) viele Einzelstrangbrüche durch, die zur Fragmentierung der chromosomalen DNA führen. Sie ist im Zellkern kodiert und ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Hier ist sie über eine Transmembrandomäne an die innere Mitochondrienmembran assoziiert. Die, erstmals 1987 aus den Zellkernen von unreifen Hühnererythrozyten isolierte, Endonuklease spaltete gezielt (dG)_n · (dC)_n Abschnitte der DNA wobei die Spaltungsrate beim G-Strang 4-10 mal höher als beim C-Strang lag. Daher der Name Endonuklease G [Ruiz-Carrillo und Renaud, 1987]. Über die Funktion der EndoG in höheren Organismen gibt es mehrere widersprüchliche Studien. Anfänglich wurde angenommen, dass EndoG an der DNA-Replikation im Mitochondrium beteiligt sei [Cote und Ruiz-Carrillo, 1993], dies wurde allerdings aufgrund der unterschiedlichen Kompartimente (EndoG im Intermembranraum und mtDNA in der mitochondrialen Matrix) verworfen [Ohsato *et al.*, 2002]. Auch über die Bedeutsamkeit von EndoG in Säugern gab es widersprüchliche Studien mit EndoG-*knock out*-Mäusen. Während in einer Studie EndoG-defiziente Mäuse schon in der frühen Phase der Embryogenese starben [Zhang *et al.*, 2003], wurde in einer anderen Studie das Überleben EndoG-defizienter Mäuse berichtet mit der Annahme EndoG spiele keine Rolle bei der Apoptose. Hier wurde auch gezeigt, dass in der ersten Studie ein Teil eines konserviertes Gen, unbekannter Funktion, welches mit dem EndoG-Gen überlappt ebenfalls "ausgeknocked" wurde [Irvine *et al.*, 2005]. Vielmehr ist wohl die Annahme richtig, dass EndoG während der Apoptose an einem DNA-Degradations-Komplex beteiligt ist und zumindest teilweise für die DNA-Fragmentierung im Zellkern verantwortlich ist. Dafür sprechen funktionelle Genomanalysen in *C. elegans* die zeigten, dass mindestens sieben Nukleasen an dem DNA-Degradationsprozess beteiligt sind darunter, CPS-6 (EndoG-Homolog), NUC-1 und TatD [Parrish und Xue, 2003]. In *L. donovani* wurde ein DNA-„Degradasom“ bestehend aus LdEndoG, LdFEN-1 und LdTatD beschrieben, das beim caspase-unabhängigen PCD eine zentrale Rolle spielt [BoseDasgupta *et al.*, 2008].

1.7 EndoG bei Trypanosomen

Die im Genom von *Trypanosoma brucei* codierte Endonuklease G besteht aus 506 Aminosäuren. Sie ist somit 70% größer als die entsprechenden orthologen Proteine in höheren Organismen wie *Bos taurus* oder *Homo sapiens* [Schäfer *et al.*, 2004]. Sequenzanalysen ergaben, dass sie N-terminal eine mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS) mit einer Länge von 63 Aminosäuren besitzt. In dieser MLS liegt ein 4 Aminosäuren langes nukleäres Signalpeptid (NSP) an Position 30 mit der Sequenz RKKH sowie ein 6 Aminosäuren langes mitochondriales Signalpeptid mit der Sequenz GRAFAF, wobei bevorzugt an Position 47 gespalten werden soll (PSORT). Aufgrund sehr unterschiedlicher Vorhersagen sind allerdings weitere Untersuchungen nötig. Je nach Programm wird die MLS auf 55 bis 60 Aminosäuren geschätzt (MitoProtII und PrediSi). Auch die NSP wird nur von dem Programm PSORT vorhergesagt. In anderen Programmen wird in TbEndoG keine NLS vorhergesagt. Im Gegensatz zu den Endonukleasen der höheren Organismen ist eine Spaltung der MLS in Trypanosomen nicht beobachtet worden [Gannavaram *et al.*, 2008].

Weiterhin ist im aktiven Zentrum, welches bei den Endonukleasen in höheren Organismen aus DRGH besteht das Aspartat (D) durch Serin (S) ersetzt. Bei der trypanosomalen EndoG liegt das aktive Zentrum zwischen Position 218 und 253 welches sich von S216 bis zum Mg²⁺-bindenden N253 erstreckt. Dieser Austausch von D zu S liegt auch in der EndoG-Sequenz von Leishmanien vor. Er beeinträchtigt die Nukleaseaktivität des Enzyms jedoch nicht. In Abb.1-10 ist das mit ClustalW erstellte Alignment von TbEndoG mit orthologen EndoG aus *H. sapiens*, *B. taurus* und *L. infantum* dargestellt. Abb. 1-9 zeigt die MLS sowie den $\beta\beta\alpha$ -Struktur-ausmachenden Sequenzbereich mit dem aktiven Zentrum und der Kofaktor-bindenden Aminosäure Asparagin (N).

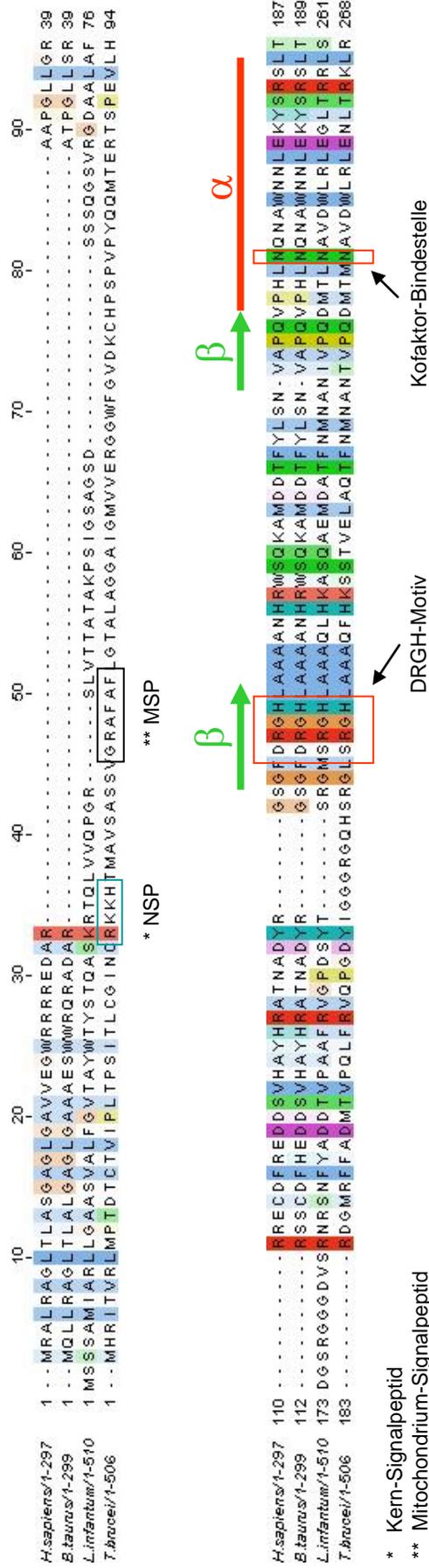


Abb.1-9: Alignment von EndoG mit konservierten Motiven

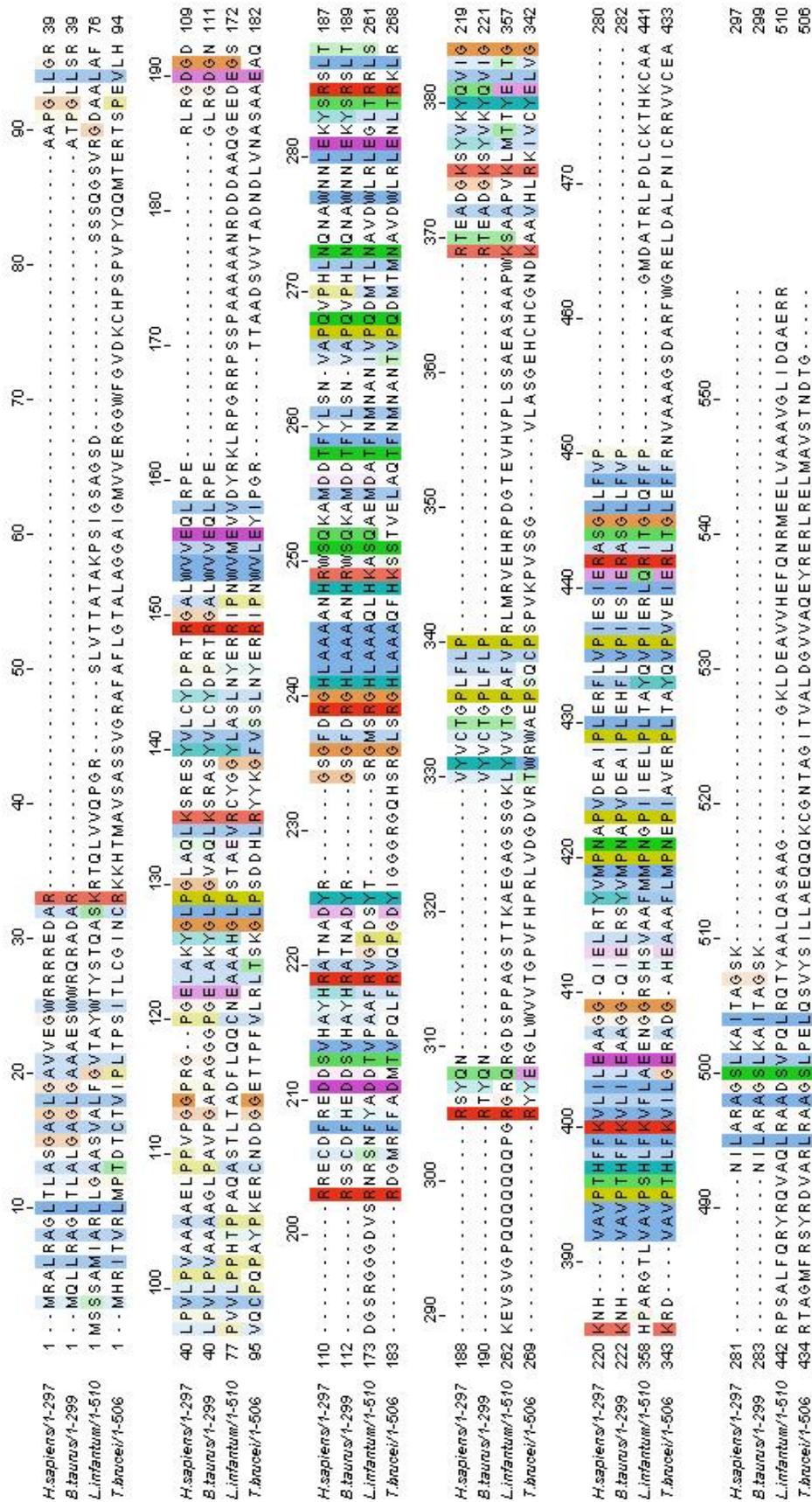


Abb. 1-10: Multiples Sequenzalignment von EndoG Homologen

1.8 Zielsetzung

Diese Arbeit soll zur Aufklärung des Apoptose-Mechanismus bei Trypanosomen beitragen und setzt sich aus zwei Projekten zusammen. Ziel des ersten Projektes war es, ein Cyclooxygenase-ähnliches Enzym aus trypanosomalen Zelllysaten zu isolieren. Noch immer ist über den Mechanismus der Apoptose bei Parasiten sehr wenig bekannt. Bei *T. brucei* wurde in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe entdeckt, dass PGD_2 , welches von der SS-Form selbst produziert wird, ein effektiver Apoptose-Induktor darstellt. Prostaglandine werden auch in Trypanosomen aus Arachidonsäure synthetisiert [Kubata *et al.*, 2000]. Daher ist die Anwesenheit eines Enzyms, welches die Arachidonsäure zu PGG_2 und PGH_2 konvertiert, essentiell. Aufgrund der Detektion einer positiven Reaktion von cytosolischem trypanosomalen Zelllysaten mit radioaktiv markierter [^{14}C]-Arachidonsäure, sowie der Detektion einer Bande mit einem konventionell erwerbbaaren COX-1 Antikörper sollte dieses Protein mittels klassischer Reinigungsschritte und chromatographischer Trennmethode isoliert und charakterisiert werden.

Das Ziel des zweiten Projektes war es, aktive Endonuklease G zu strukturanalytischen Zwecken herzustellen. Dazu sollte das Enzym in *E.coli* überexprimiert und ein adäquates Reinigungsprotokoll etabliert werden, da EndoG in Bakterien bekanntermaßen als *inclusion bodies* exprimiert wird. Zusätzlich sollte durch Überexpression und *knock down* der Nuklease in *Trypanosoma brucei* deren Rolle während der Apoptose untersucht werden.

Aus Untersuchungen zu EndoG aus höheren Organismen ist bekannt, dass sie bei der caspase-abhängigen Apoptose aus dem Mitochondrium in den Zellkern transloziert wird um dort DNA zu fragmentieren. Da Trypanosomen wie auch andere Protozoen keine Caspasen besitzen, läuft der apoptotische Zelltod hier anders ab als in Metazoen. Auch die Größe der protozoischen EndoG, die um ca. 20kDa von der in höherer Eukaryonten abweicht, hält immer noch Fragen offen.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendete Organismen

2.1.1 Trypanosomen

Bei der Untersuchung zum apoptotischen Zelltod bei Trypanosomen fanden zwei Zelllinien des monomorphen Stamm MITat1.2 (**M**olteno **I**nstitute **T**rypanozoon **a**ntigenic **t**ype, Cambridge) Verwendung. Zum einen, der aus dem monomorphen *Trypanosoma brucei brucei* Stamm Lister 427 herangezogene Blutform (BF) Stamm mit der VSG-Antigenvariante 221 (BF221) [Cross, 1975], zum anderen, eine von einer BF221 klonalen Zelllinie abgeleitete *single marker bloodform* Linie (SMB), die konstitutiv T7 RNA-Polymerase (Plasmid pHD328) und *Tn10 Tet* Repressor (Plasmid pLEW114hyg5') mittels NEO-Resistenz exprimiert [Wirtz *et al.*, 1999].

BF SMB

Nomenklaturname: MITat1.2 T7RNAP TETR NEO

Selektionsmarker: G418 [2µg/ml]

Zusätzlich wurden transgene Zelllinien in dieser Arbeit hergestellt. Diese wurden entsprechend den *Trypanosoma brucei*-Nomenklatur nach Clayton benannt [Clayton *et al.*, 1998]. Nachfolgend sind alle transgenen Zelllinien, die während dieser Arbeit produziert wurden aufgelistet.

SMB EndoG

Nomenklaturname: MITat1.2 T7RNAP NEO TETR HYG RDNA:: $PGPEET^{Ti}$ EndoG
T7RNAP BLE

Alternativer Name: TbEndoG-over

Plasmidname: pLew100v5-Hyg

Selektionsmarker: G418 (2µg/ml), Hygromycin B (2,5µg/ml)

SMB eGFP

Nomenklaturname: MITat1.2 T7RNAP NEO TETR HYG RDNA:: $\text{PGPEET}^{\text{Ti}}$ eGFP
T7RNAP BLE
Alternativer Name: eGFP
Plasmidname: pCO57
Selektionsmarker: G418 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Phleomycin (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

SMB EndoG-eGFP

Nomenklaturname: MITat1.2 T7RNAP NEO TETR HYG RDNA:: $\text{PGPEET}^{\text{Ti}}$ EndoG-eGFP
T7RNAP BLE
Alternativer Name: TbEndoG-eGFP
Plasmidname: pCO57
Selektionsmarker: G418 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Phleomycin (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2.1.2 Versuchstiere

Für Experimente die eine große Anzahl von Trypanosomen erforderten wurden die Parasiten *in vivo* herangezogen. Dazu wurden Ratten der Rasse Wistar verwendet (Charles River).

2.1.3 Bakterien

Zur Klonierung von Plasmiden wurden „One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli*“ Zellen der Firma Invitrogen und „NEB Turbo competent *E. coli* (High Efficiency)“ Zellen der Firma New England BioLabs verwendet.

Für die Expression kamen *BL21(DE3)* (Invitrogen) und *RosettaTM2(DE3)pLysS* (Novagen) competent *E. coli* Zellen zum Einsatz.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad *pro Analysis* (p. A.) oder *für die Molekularbiologie*.

2.2.1.1 Laborchemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
cis-Aconitsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar 100	Plano, Wetzlar
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3'-(<i>p</i> -Aminophenyl)-fluorescein (APF)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Annexin-V-Fluos	Roche, Mannheim
Arachidonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bleicitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenol Blau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid x H ₂ O	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Complete [®] Protease-Inhibitormix	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blau G-25	Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, Steinheim
Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dihydroethidium (DHE)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim

Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DNA-Leiter (1 kb)	Fermentas, St. Leon-Rot
DodecenyI-succinic-anhydrid (DDSA) Agar	Scientific Ltd., Essex, UK
Eisessig (100%)	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Epon 812	Serva, Heidelberg
Epon-Beschleuniger DMP-30	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylacetat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Pan Systems, Aidenbach
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat (H ₂ DCFDA)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
HCl	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Kaliumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Kodak Lx24 Entwickler	Kodak, Frankreich
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
MEM Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim
MES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
<i>Midori Green DNA stain</i>	Nippon Genetics, Dueren
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim

Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nitroblautetrazolium	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
p-Nitrophenyl-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propylenoxid	Plano, Marburg
Prostaglandin D ₂	Biomol, Hamburg
<i>ProLong[®] Gold Antifade Reagent</i>	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Protein-Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tental SUPERFIX	Tental Photowerk GmbH, Norderstedt
Tetramethylrodaminester (TMRE)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Plano, Marburg

2.2.1.2 Radiochemikalien

[¹⁴ C]-Arachidonsäure	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³⁵ S]-Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig
Ultima Gold	Packard, Frankfurt

2.2.2 Verwendete Antikörper

Anti-Kaninchen IgG, AP-Konjugat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Maus IgG, AP-Konjugat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-His-Tag (6-Histidine)	Kaninchen	Bethyl, Montgomery, USA
Anti-GFP	Maus	Boehringer-Ingelheim, Biberach
Anti-COX-1 (ovine)	Kaninchen	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

2.2.3 Oligonukleotide

Primer (Oligonukleotide) wurden von der Firma Invitrogen bezogen und als 100µM Stammlösung bei -20°C gelagert. Für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurde die Stammlösung in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

1. Primer für die Expression von TbCOX in pProEx HTa in *E.coli*

fw-*BamHI*-TbCOX: 5`- GGATCCACCACGTTCTTTGGCATTACTGA-3`
 rev-*HindIII*- TbCOX: 5`- AAGCTTTGGCATCAATTTTACCTACCC-3`

2. Primer für die Expression von TbEndoG in pProEx HTa in *E.coli*

fw-*EcoRI*-TbEndoG: 5`-GAATTCAGTGGACGGAAGGACCTCATAG-3`
 rev-*NotI*- TbEndoG: 5`-GCGGCCGCCCCTGGAAAGTTACAAATAAGG-3`

3. Primer für die Expression von TbEndoG in pLew100v5-Hyg in *T. brucei*

fw-*HindIII*-TbEndoG: 5`- ACGGAAGCTTATGCATCGCATCACCGTAC-3`
 rev-*BamHI*- TbEndoG: 5`- ACTTGGATCCTTAACCGGTGTCGTTGGTC-3`

4. Primer für die Expression von TbEndoG-eGFP in pCO57 in *T. brucei*

fw-*HindIII*-TbEndoG: 5`-AAGCTTATGCATCGCATCACCGTA-3`
 rev-*PvuII*- TbEndoG: 5`-CAGCTGACCGGTGTCGTTGGTCG-3`

5. Primer für die Sequenzierung

M13-Forward: 5`-GTTTTCCCAGTCACGAC-3`
 M13-Reverse: 5`-CAGGAAACAGCTATGAC-3`
 pQE-Forward: 5`-CGGATAACAATTCACACAG-3`
 pProEx HTa-Reverse: 5`-CGCTTCTGCGTTCTGATTTA-3`

2.2.4 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATC C-3' 3'-C CTAC↑C-5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATT C-3' 3'-C TTAA↑G-5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EheI</i>	5'-GGC↓GCC-3' 3'-CCG↑CGG-5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	5'-A↓AGCTT C-3' 3'-C TTCGA↑A-5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NotI</i>	5'-GC↓GGCC GC-3' 3'-CG CCGG↑CG-5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PvuI</i>	5'-CAG↓CTG-3' 3'-GTC↑GAC-5'	Fermentas, St. Leon-Rot

2.2.5 Sonstige Enzyme

T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Benzonase	Novagen, Darmstadt
AcTEV Protease	Invitrogen, Karlsruhe
AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.6 Plasmide

pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pProEx HTa	Invitrogen, Karlsruhe
pLew100v5-Hyg	George Cross, New York, USA
pCO57	George Cross, New York, USA
p2T7	George Cross, New York, USA

2.2.7 Kits

AccuPrime Taq DNA Polymerase HF Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Fragmentation Imaging Kit	Roche, Mannheim
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Power SYBR [®] Green RNA-to-CT [™] 1-Step Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.8 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- 48- & 96- <i>well</i> Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem [®] -Cups	Plano, Marburg
BioMax MR Film (13x18cm)	Kodak, Stuttgart
Centricon [®] YM-10, 30	Millipore Cosp, Bedford, USA
Elektroporationsküvetten 2mm	Bio-Rad, München
Film Kodak Plus-X-Plan 120	Kodak, Stuttgart
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen

Glasfaserfilter GF/C	Whatman, Maidstone, USA
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Hybond-ECL (Nitrozellulosemembran)	GE Healthcare, Freiburg
Immunfluoreszenz-Objektträger	bioMerieux, Nürtingen
Kieselgel 60F DC-Platten	Merck, Mannheim
Kupfernetzchen, 400 mesh	Plano, Marburg
Küvetten 10 x 10 x 45mm	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen (94 x 16mm)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Greiner, Frickenhausen
Schott Glasflaschen, autoklavierbar (50ml bis 1l)	Fischer Scientific, Steinheim
Sterilfilter, SFCA-Membran	Nalge, Hereford (UK)
Szintillationsgefäße	PerkinElmer, MA, USA
Whatman Papier 3mm	Whatman, Maidstone, USA
Zellkulturflaschen (T-12,5; T-25; T-75; T-175)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturröhrchen, runder Boden (14ml)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, steril (15ml, 50ml)	Greiner, Frickenhausen

2.2.8.1 Geräte

ÄKTA FPLC	GE Healthcare, München
Autoklav Dampfsterilisator	Münchner Mechanik, Stadlern
Beckmann Mikrofuge B	Beckmann, München
Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Brutschrank 2770 (27°C)	Köttermann, Uetze
Brutschrank HeraCell mit CO ₂ Begasung (37°C)	Heraeus, Osterode
<i>Elisa Reader</i> MRX-II Revelation	Dynex, Chantilli, USA
FACSCantoII [®] Durchflusszytometer	Becton Dickinson & Co, USA
Filtrationssystem 1225	Millipore, Bedford, USA
Flüssigszintillationszähler Tri-Carb1600 TR	Packard, Frankfurt
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg

Fluoreszenzmikroskop CellObserver	Zeiss, Oberkochen
Gelkammer Blue Marine 100	Serva, Heidelberg
GenePulser XCell	Bio-Rad, München
GeneQuant 1300 Spektrophotometer	GE Healthcare, München
Heizblock neoBlock I	NeoLab, Heidelberg
Heraeus Sepatech Biofuge A	Heraeus, Hanau
Heraeus Sepatech Suprafuge 22	Heraeus, Hanau
Inkubator (37°C) ITE	Infors AG, Bottmingen, Ch
Invertmikroskop ID 02	Zeiss, Oberkochen
LKB 11800 Pyramitone®	LKB, Stockholm, Schweden
Microfuge E	Beckmann, München
Mikrozentrifuge MC-13	Heraeus, Osterode
Mikropipetten	Gilson, Frankreich
8-Kanal-Mikropipette	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Zeiss AxioStar plus	Zeiss, Oberkochen
Minigel-Elektrophorese System (<i>Mighty Small II</i> , SE 250)	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,02mm)	Brand, Wertheim
pH-Meter pH 539	WTW, Weilheim
<i>Power Supply</i> EPS 301	Amersham, Freiburg
<i>Semi-dry</i> Blotting Apparatur	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Sigma Laborzentrifuge 3K12	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Sonifier</i> Cell Disruptor B-30	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
<i>SpeedVac Vacuum Concentrator</i>	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank, LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus, Hanau
Sterilpumpe ACPU-221	Microgon, NJ, USA
Thermocycler UnoCycler	VWR, Leuven
Transmissionselektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultramikrotom OM U3 C	Reichert, Wien, Austria
Vortex-Genie2	Bender&Hobein, Zürich, CH

2.2.8.2 Software und Datenbanken

AxioVision 4.8.2	Zeiss, Oberkochen
Chromas 2.01	GATC, Konstanz
Cyflogic 1.1	CyFlo Ltd.
DNAMAN 6.0.3.99	Lynnon Corporation, Quebec, Canada
Endnote 9	Thomson Reuters, New York, USA
FACSDiva	Becton Dickinson & Co, USA
Microsoft Office XP	Microsoft, Unterschleißheim
Origin 8.0	OriginLab, Northampton, USA
Photoshop 6.0	Adobe Systems, München
Unicorn 5.1	GE Healthcare, München
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
TriTrypDB	http://www.tritrypdb.org
UniProtKB	http://www.uniprot.org

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 Gelelektrophorese

TAE-Puffer 50x, pH 8,0

Tris	242g/l
Essigsäure	57,1ml/l
EDTA	37,2g/l

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure eingestellt.

1% DNA Agarosegel

Agarose	0,5g
Ethidiumbromid (5mg/ml)	2,5µl oder
<i>Midori Green Advanced</i>	2µl
TAE-Puffer	50ml

2.3.2 Medien für Bakterienkulturen

Luria-Bertani (LB) Medium 2x, pH 7,5

Bacto-Trypton	20g/l
Hefeextrakt	10g/l
NaCl	20g/l

LB-Amp Medium

LB-Medium 2x	0,5ml
H ₂ O _{dd}	0,5ml
Ampicillin 50mg/ml in 70% Ethanol	1µl/ml

Agar-Agar 2x

Agar-Agar	40g/l
-----------	-------

LB-Amp Agar Platten

Agar-Agar 2x	0,5ml/ml
LB-Medium 2x	0,5ml/ml
X-Gal 25mg/ml in Dimethylformamid	2µl/ml
Ampicillin 50mg/ml in 70% Ethanol	1µl/ml

SOB Medium

Bacto-Trypton	20g/l
Hefeextrakt	10g/l
NaCl	20g/l
MgCl ₂ 1M	10ml/l
MgSO ₄ 1M	10ml/l

SOC Medium, pH 7,0

Glucose 2M	0,01ml/ml
SOB Medium ad	1ml/ml

2.3.3 Puffer für die *inclusion bodies* (IB) Isolierung

IB-Waschpuffer, pH 7,5

Tris-HCl	20mM
EDTA	10mM
Triton X-100	1%

IB-Solubilisierungspuffer, pH 11.0

Tris-HCl	50mM
N-Lauroylsarkosin	1%

2.3.4 Puffer für die FPLC

2.3.4.1 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Bindepuffer, pH 7,5

Tris-HCl	20mM
NaCl	300mM
Triton X-100	0,1%
N-Lauroylsarkosin	1%

Waschpuffer, pH 7,5

Tris-HCl	20mM
NaCl	300mM
Triton X-100	0,1%
Imidazol	10mM

Elutionspuffer, pH 7,5

Tris-HCl	20mM
NaCl	300mM
Triton X-100	0,1%
Imidazol	300mM

2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Bindepuffer, pH 6,0

MES	50mM
-----	------

Elutionspuffer, pH 6,0

MES	50mM
-----	------

NaCl	1M
------	----

2.3.4.3 Gelfiltration

Gelfiltrationspuffer, pH 7,5

Tris-HCl	20mM
----------	------

NaCl	300mM
------	-------

2.3.5 Kulturmedien für Trypanosomen

Grundmedium, pH 7,4

Das Minimum Essential Medium (MEM) wurde nach einem Standardprotokoll [Eagle, 1959] mit Modifikationen nach Hamm [Hamm *et al.*, 1990] hergestellt.

CaCl ₂	265mg/l	1,8mM
KCl	400mg/l	5,4mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200mg/l	0,8mM
NaCl	6800mg/l	116mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140mg/l	1mM
HEPES	7140mg/l	30mM

Die Substanzen wurden in H₂O_{dd} gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 7,4 einstellen.

Anschließend wurden folgende Substanzen zugegeben:

L-Arginin/HCl	126mg/l	0,6mM
L-Histidin/HCl x H ₂ O	42mg/l	0,2mM
L-Isoleucin	52mg/l	0,4mM
L-Leucin	52mg/l	0,4mM
L-Lysin	73mg/l	0,5mM
L-Methionin	60mg/l	0,4mM
L-Phenylalanin	100mg/l	0,6mM
L-Threonin	48mg/l	0,4mM
L-Tryptophan	100mg/l	0,5mM
L-Tyrosin	100mg/l	0,55mM
L-Valin	46mg/l	0,4mM
L-Ornithin/HCl	10mg/l	0,3mM
L-Adenosin	12mg/l	0,045mM

Nachfolgende kommerzielle Stammlösungen wurden danach zugegeben:

MEM nicht essentielle AS-Lösung	10mg/l	
MEM Vitamin-Lösung	10mg/l	
Phenolrot	10mg/l	0,03mM

Das Grundmedium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert, wo es bis zu 3 Monaten haltbar ist.

Blutform-Kulturmedium, pH 7,4

Zur Herstellung von Kulturmedium für Blutform-Trypanosomen wurde das Grundmedium mit folgenden Reagenzien ergänzt:

Glucose x H ₂ O	4990mg/l	25mM
NaHCO ₃ 33,3x	75mg/ml	26,2mM
L-Glutamin 100x	29,2mg/ml	2mM
L-Cystein 100x	3,03mg/ml	0,25mM

Thymidin 100x	0,39mg/ml	0,016mM
Hypoxanthin 100x ¹	1,36mg/ml	0,1mM
Bathocuproindisulfonat; 1000x ²	5,65mg/ml	0,016mM
Myristinsäure, gekoppelt an BSA 50x ³	24mg/ml	0,1mM
Penicillin/Streptomycin Mix ⁴		5ml/l
Grundmedium		ad 850ml/l

¹Hypoxanthin 100x wurde in 0,1M NaOH gelöst.

²Bathocuproindisulfonat 1000x wurde in H₂O_{dd} suspendiert und durch Zugabe von wenigen Tropfen 0,5M HCl gelöst.

³Die Herstellung der Myristinsäurelösung erfolgte nach Cross und Ferguson [Cross *et al.*, 1973; Ferguson *et al.*, 1984]: 24mg Myristinsäure wurden in 100µl Ethanol p.a. gelöst und schrittweise zu einer BSA-Lösung zugegeben (1g fettsäurefreies BSA pro 20ml H₂O_{dd}).

⁴Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10.000 Units Penicillin, 10mg Streptomycin und 25µg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:200 eingesetzt.

Nach pH-Wert Kontrolle wurde das Medium steril filtriert zu 150ml/l fötalem Kälberserum (FCS) gegeben. FCS wurde zuvor bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert.

Das Blutform Kulturmedium ist bei 4°C für 2 Monate haltbar.

HMI-9 Kulturmedium für Blutformtrypanosomen, pH 7,4

Trypanosomenkulturen in Blutform-Kulturmedium benötigen eine Dichte von mindestens 2×10^5 Zellen/ml um heranzuwachsen. Daher wurde zur Anzucht von klonalen SMB-Trypanosomen ein spezielles Medium eingesetzt, welches das Wachstum durch seinen Zusatz von Serum PlusTM begünstigt. Dazu wurde der *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) Mix und Natriumhydrogencarbonat in H₂O_{dd} gelöst und anschließend mit verschiedenen Stammlösungen versetzt.

Material & Methoden

IMDM Mix	17,7g/l	
NaHCO ₃	3,02g/l	
H ₂ O _{dd}	ad 775ml/l	
Hypoxanthin 1000x ¹	13,6mg/ml	1mM
L-Cystein 100x	18,2mg/ml	1,5mM
Na-Pyruvat 1000x	110mg/ml	1mM
Thymidin 1000x	39mg/ml	0,16mM
Bathocuproindisulfonat 1000x ²	28,2mg/ml	0,087mM
β-Mercaptoethanol		14μl/l
Penicillin/Streptomycin Mix ³		10ml/l

¹Hypoxanthin 100x wurde in 0,1M NaOH gelöst.

²Bathocuproindisulfonat 1000x wurde in H₂O_{dd} suspendiert und durch Zugabe von wenigen Tropfen 0,5M HCl gelöst.

³Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10.000 Units Penicillin, 10mg Streptomycin und 25μg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:100 eingesetzt.

Nach pH-Wert Kontrolle des Mediums wurde es steril filtriert zu fötalem Kälberserum (FCS) und Serum PlusTM zugegeben. FCS wurde zuvor bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert.

Fötale Kälberserum (30min @ 56°C hitzeinaktiviert)	96ml/l
Serum Plus TM (nicht erhitzt)	96ml/l

Das HMI-9 Kulturmedium für Blutform-Trypanosomen ist bei 4°C für 2 Monate haltbar.

2.3.6 Puffer zur Isolierung von Trypanosomen aus Blut

Trypanosome dilution buffer (TDB), pH 7,7

Na ₂ HPO ₄	18mM
NaH ₂ PO ₄	2mM
KCl	5mM
NaCl	80mM
MgSO ₄	1mM
Glucose	20mM

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

Na-Citrat	100mM
Glucose	40mM

Separationspuffer, pH 8,0

Na ₂ HPO ₄	57mM
KH ₂ PO ₄	3mM
NaCl	44mM
Glucose	55mM

Einfriermedium für Stabilate (EFM)

TDB	77ml
Glycerin 87%	23ml

2.3.7 Puffer zur Herstellung von Trypanosomenlysat

Proteaseinhibitor Mix (PI, 1000x)

Chymostatin	1mM
Leupeptin	1mM
Pepstatin A	1mM

Die drei Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

10mM PBS, pH 7,4

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

Lysepuffer

PBS	10mM
Protease-Inhibitor-Mix	1x
Triton X-100	0,1%

2.3.8 Lösungen für die Dünnschichtchromatographie

Laufmittel

Diethylether	98,5ml
Methanol	1ml
Eisessig	0,5ml

2.3.9 Sonstige Puffer

AcTEV-Protease-Puffer, pH 7,5

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

MagBeads-Bindepuffer

PBS	
Tween 20	0,05 %

MagBeads-Waschpuffer

PBS	
Tween 20	0,05 %

MagBeads-Elutionspuffer, pH 2,6

Glycin	0,1M
--------	------

COX-Aktivitätspuffer, pH 7,5

Phenol	5mM
Hematin	2 μ M
[¹⁴ C] Arachidonsäure	2,5 μ M
Tris-HCl	100mM

EndoG-Aktivitätspuffer, pH 7,5

HEPES	20mM
MgCl ₂	3mM
Triton X-100	0,1%

2.3.10 Puffer für die Trypanosomen-Elektroporation

Cytomix, pH 7,6 steril filtriert

EGTA	2mM
KCl	120mM
CaCl ₂	0,15mM
K ₂ HPO ₄	86,6mM
KH ₂ PO ₄	13,4mM
HEPES	25mM
MgCl ₂	5mM
Glucose	0,5%
BSA (fettsäurefrei)	1,5 μ M
Hypoxanthin*	0,1mM

*100x Hypoxanthin Stammlösung (1,36mg/ml) wurde mit 1M KOH eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.3.11 Puffer für die SDS-PAGE

Laufpuffer, pH 8,3

Tris-HCl	25mM
Glycin	250mM
SDS	0,1%

Gelherstellung (für vier 10% Gele):

Lösung	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
H ₂ O _{dd}	8,4 ml	6,6 ml
30% Acrylamid	2,0 ml	7,6 ml
1M Tris-HCl, pH 8,8		8,6 ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	1,5 ml	
10% SDS	120µl	120µl
10% APS	60µl	60µl
TEMED	12µl	12µl

2.3.12 Western Blot mit alkalischer Phosphatase (AP)

Transferpuffer, pH 9,2

Tris-HCl	48mM
Glycerin	39mM
SDS	0,00375%
Methanol	20%

Blockierpuffer

Milchpulver in 2x PBS 10%

PBS-Tween

Tween 20 in PBS 0,1%

TBS (*Tris buffered saline*), pH 7,4

Tris-HCl 25mM

NaCl 120mM

KCl 8,7mM

Waschpuffer, pH 7,4

Tris-HCl 10mM

NaCl 120mM

KCl 8,7mM

Tween 20 0,1%

AP-Puffer, pH 8,9

Tris-HCl 20mM

NaCl 150mM

MgCl₂ 10mM

Färbelösung für die alkalische Phosphatase (AP)

BCIP (Bromo-chloro-indolyl-phosphat) 0,38mM

NBT (Nitro-tetrazoliumblau) 0,4mM

AP-Puffer 100ml

2.3.13 Zytotoxizitätstest (nach Bodley et al., 1995)

Lysepuffer, pH 5,5

Natriumacetat	1M
Triton X-100	1%
p-Nitrophenyl-Phosphat	20mg/ml

Das p-Nitrophenyl-Phosphat wird frisch zugegeben.

2.3.14 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

0,2M Na-Cacodylatpuffer (2x), pH 7,4

Na-Cacodylat x 3H ₂ O	2,14g
Sucrose	4g
H ₂ O _{dd} ad	50ml

Fixierlösung (2% Glutaraldehyd)

0,2M Cacodylatpuffer (2x)	1,5ml
Glutaraldehyd (8%)	0,75ml
H ₂ O _{dd}	0,75ml

3% Osmiumtetroxid-Stammlösung (OsO₄)

Glasampulle Osmiumtetroxid (0,25g) in 8,14ml H₂O_{dd}.

Die Lösung muss im Dunkeln gelagert werden. Bei RT ist sie mehrere Monate haltbar.

1,5% OsO₄-Lösung

1:1 Verdünnung der 3%igen OsO₄-Stammlösung mit 0,2M Na-Cacodylatpuffer (2x; pH 7,4).

Diese Lösung muss frisch angesetzt werden.

Uranylacetat-Lösung

0,5% Uranylacetat in H₂O_{dd}.

Die Lösung muss 2 Tage vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert werden. Sie ist im Dunkeln bei RT etwa drei Wochen verwendbar.

EPON-Einbettungs-Lösung (für eine Einbettung)

Agar 100 Resin (EPON 128)	2,00g
DDSA (Dodecenylnsuccinimid)	1,00g
MNA (Methyl-nadic-anhydrid)	1,08g
BBMA (Benzoldimethylamin)	0,04g

Bleicitrat-Lösung

Blei-Citrat	10mg
H ₂ O _{dd} ad	10ml
NaOH	10M (20-50µl)

Uranylacetat-Lösung für Grids

5% Uranylacetat in H₂O_{dd}

2.3.15 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Ringer-Lösung, pH 7,4

NaCl	147mM
KCl	4mM
CaCl ₂	2,3mM
NaHCO ₃	1M

Tetramethylrhodaminester (TMRE) Stammlösung

TMRE	25µM in H ₂ O _{dest}
------	--

Dihydroethidium (DHE) Stammlösung

DHE 10mM in DMSO

3'-(p-Aminophenyl)-fluorescein (APF) Stammlösung

APF 10mM in DMSO

Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) Stammlösung

H₂DCFDA 10mM in DMSO

Lysepuffer zur Analyse des DNA-Gehaltes

Na₂HPO₄ 7,7mM

NaH₂PO₄ 2,3mM

Digitonin Stammlösung

Digitonin 6,4mM in H₂O_{dest}

Färbelösung zur Analyse des DNA-Gehaltes

PBS 2ml

Propidiumiodid (10mg/ml) 4µl

Annexin-V-Puffer, pH 7,4

HEPES 10mM

NaCl 140mM

CaCl₂ 5mM

Färbelösung zur Detektion von Phosphatidylserin

Annexin-V-Puffer 48µl

Annexin-Lösung 1µl

Propidiumiodid (50µg/ml) 1µl

2.3.16 Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Fixierlösung

Paraformaldehyd in PBS	3,5%
------------------------	------

Das Paraformaldehyd wird in PBS unter leichtem Erwärmen gelöst. Es kann bis zu einer Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Neutralisierungspuffer, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	100mM
Glycin	100mM

Permeabilisierung-Lösung

Triton X-100 in PBS	0,2%
---------------------	------

BSA-Lösung

BSA (Albumin Fraktion V) in PBS	1%
---------------------------------	----

DAPI Stammlösung

4',6-Diamidin-2-phenylindol in H ₂ O _{dest}	1mg/ml
---	--------

Die DAPI Stammlösung kann im Dunkeln bei 4°C einen Monat gelagert werden. Als Färbelösung dient eine 1:1.000 Verdünnung.

2.4 Methoden

2.4.1 Anzucht und Isolierung von Trypanosomen aus Rattenblut

Um Parasiten in großer Menge zu gewinnen wurden Ratten mit 5×10^7 Trypanosomen aus Stabilaten intraperitoneal infiziert. Die Parasitämie erreicht dann nach etwa 72h eine Konzentration von ca. 1×10^9 Zellen/ml. Dies wurde durch Blutabnahme aus der Schwanzvene kontrolliert. Nachfolgend wurden die Tiere mit CO₂ getötet, der Thorax geöffnet und nach Vorlegen von 2ml kaltem CGA (s. 2.3.6) in den Brustraum die *Vena cava inferior* durchtrennt. Das Blut (etwa 10ml) wurde in 15ml Falconröhrchen gesammelt. Um das Gefäßsystem anschließend zu spülen wurde der linke Ventrikel punktiert und mit ca. 5ml kaltem CGA gespült.

Die gesammelte Blutsuspension wurde zentrifugiert (1.500g, 10min, 4°C) um Blutplasma und zelluläre Bestandteile zu trennen. Der sich zwischen den beiden Phasen befindende *buffy coat* der die Trypanosomen enthält wurde in 2ml Separationspuffer resuspendiert und durch Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephacel) aufgereinigt. Da die Trypanosomen auf Grund des VSG-Mantels bei pH 8,0 ungeladen vorliegen, können sie dabei von den negativ geladenen Blutzellen getrennt werden. Nach Äquilibrierung der DEAE-Cellulose mit 150ml kaltem Separationspuffer wurde der *buffy coat* auf die Säule aufgetragen. Die Elution fand mit kaltem Separationspuffer unter Wasserstrahlvakuum statt. Die so erhaltene Trypanosomen-Suspension wurde wieder zentrifugiert (1.500g, 5min, 4°C) und in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen entweder lysiert oder für weitere Experimente in Medium aufgenommen.

2.4.2 Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten

Um Ratten-Stabilate zur Infektion neuer Tiere herzustellen wurde das CGA-Blut-Gemisch aus einer Ratte deren Parasitämie bei ca. 5×10^8 Zellen/ml lag im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt und in 0,5ml-Aliquots in Kryoröhrchen verteilt.

Zur Herstellung von Blutform-Kulturstabilaten wurde der *buffy coat* in 4ml CGA, 6ml Blutformmedium und 2ml Vetren[®]200 aufgenommen und die Zelldichte der Trypanosomen-Suspension mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,02mm) bestimmt und mit

Blutformmedium auf 2×10^8 Zellen/ml eingestellt. Unter ständiger Kühlung wurde die Suspension 1:1 mit Einfriermedium (s. 2.3.6) gemischt und auf 0,5ml-Aliquots in Kryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Stabilate für 1h bei -20°C und über Nacht bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte dann der Transport in flüssigen Stickstoff zur endgültigen Lagerung.

2.4.3 Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen

Die Kultivierung von Blutform-Trypanosomen fand in Blutform-Kulturmedium (s. 2.3.5) statt. Dazu wurden BF221-Kulturstabilate unter fließendem warmen Wasser aufgetaut und in ein 15ml Falconröhrchen mit ca. 9ml kaltem Blutform-Kulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation bei 1.500g, 5min, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in ca. 1ml Kulturmedium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zelldichte mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Vorkultur auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in vorgewärmtem Kulturmedium angesetzt.

Die Inkubation der Vorkultur erfolgte in einem CO_2 -Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 bis sie eine Zelldichte von ca. 8×10^5 Zellen/ml erreichte. Zum Ansetzen der jeweiligen Experimente wurde die Vorkultur erneut auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml mit Kulturmedium verdünnt. Zur Aufnahme von Wachstumskurven wurden die Zellen täglich zweimal gezählt. In Blutform-Kulturmedium erreichten die BF221-Zellen eine Zelldichte von bis zu $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml innerhalb von 30-36h, bevor sie in die stationäre Phase eintraten und dann zu Grunde gingen. In HMI-9 Kulturmedium (s. 2.3.5) erreichten die SMB-Zellen eine Zelldichte von bis zu 5×10^6 Zellen/ml innerhalb von 30-36h, bevor sie in die stationäre Phase eintraten und zu Grunde gingen.

2.4.4 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli* Stämmen

Die Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme (s. 2.1.3) fand in Luria-Bertani Medium (LB-Medium) (s. 2.3.2) statt. Als Flüssig-Selektivmedium wurden dem LB-Medium kurz vor Gebrauch die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Als Festmedium in Petrischalen wurde 2xLB-Medium mit 2xBacto-Agar (s. 2.3.2) gemischt. Um das Wachstum unerwünschter Bakterien zu verhindern, wurden daraus sogenannte Selektivplatten hergestellt. Dazu wurde das Festmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit Antibiotika sowie X-Gal versetzt.

2.4.5 Herstellung von *E.coli*-Kulturstabilaten

Eine *E.coli* Kultur wurde 16h über Nacht bei 37°C inkubiert um in die stationäre Phase einzutreten. Danach wurde 1ml der jeweiligen Kultur zentrifugiert (10.000 g, 24°C, 1 min) mit LB-Medium gewaschen und in 1ml frischem LB-Medium mit 15% Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.6 DNA-Sequenzierung

Nach der Gelextraktion und DNA-Konzentrationsbestimmung wurden die gereinigten DNA Proben bei der Firma GATC Biotech sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend per Sequenzalignment mit der jeweiligen Gen- bzw. Vektorsequenz verglichen.

2.4.7 Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen in einer Heraeus LaminAir Sterilbank durchgeführt.

2.4.7.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *T. brucei* wurde das „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Eine BF221-Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert bis sie eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml erreichte. Die Trypanosomen wurden dann bei 1.500g für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet für die Isolierung der gDNA nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.7.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Klonierung der gewünschten trypanosomalen Gene wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt. Die Amplifizierung der gewünschten Genabschnitte wurde mit dem „AccuPrime Taq DNA

Polymerase High Fidelity Kit“ (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Accu-Prime PCR-Programm 30 Zyklen:

	Temperatur	Dauer
Aktivierung	95°C	5 min
Denaturieren	94°C	45 sec
Annealing	60°C	30 sec
Extension	68°C	2 min
Finale Extension	68°C	3 min

Kolonie-PCR und Kontroll-PCR wurden mit dem „HotStarTaq DNA Polymerase Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

HS-PCR-Programm 30 Zyklen:

	Temperatur	Dauer
Aktivierung	95°C	15 min
Denaturieren	94°C	1 min
Annealing	56°C	1 min
Extension	72°C	2 min
Final Extension	72°C	10 min

2.4.7.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Die Detektion und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde mittels 1%igen Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurden 0,5g *low melting* Agarose mit 50ml TAE-Puffer (s. 2.3.1) versetzt und in einem Mikrowellenherd unter Erhitzung zur Lösung gebracht. Die Lösung wurde mit 1µl „*Midori Green DNA stain*“ (Nippon) versetzt und in eine Flachbettkammer gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde die DNA Probe mit 6x Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Als DNA-Marker wurde „*1 kb GeneRuler*“ (Fermentas) verwendet. Die anschließende Elektrophorese fand bei einer Spannung von 80V für 60min

statt. Die DNA-Fragmente wurden mittels Fluoreszenz-Anregung mit langwelligem UV-Licht (312nm) detektiert.

2.4.7.4 Gelextraktion

Nach der Detektion und Isolierung des gewünschten DNA-Fragments aus dem Agarosegel erfolgte die weitere Reinigung der DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.4.7.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der vorliegenden DNA-Konzentration wurde die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm mit einem GeneQuant 1300 Spektrophotometer durchgeführt. Für doppelsträngige DNA entspricht ein Absorptionswert von 1AU einer Konzentration von 50ng/μl für einzelsträngige DNA einer Konzentration von 20ng/μl. Liegt der Wert der Absorption beim Quotienten 260/280nm über einem Wert von 1,8 liegt eine Verunreinigung durch Proteine vor und die Reinigung der DNA sollte wiederholt werden.

2.4.7.6 Restriktionsverdau

Zur Restriktion von DNA wurden Enzyme und Puffer der Firma Fermentas verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Beispielhaft ist der Restriktionsverdau von 1μg TbEndoG-PCR-Produkt für den Vektor pProEx HTa (Invitrogen) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* als 20μl Ansatz dargestellt:

10x Puffer O	2μl
PCR-Produkt (1μg TbEndoG)	10μl
EcoRI (10U)	1μl
NotI (10U)	1μl
H ₂ O _{dd}	6μl

Der Verdau wurde bei 37°C für 1h durchgeführt.

2.4.7.7 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem „Qiaprep Spin Mini Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Je 3ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und bei 13.000g für 1min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien-Sedimente in je 250µl P1-Puffer resuspendiert. Danach folgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von je 250µl P2-Puffer. Die Lösung wurde 4-6 mal invertiert und für 5min stehen gelassen. Nach Zugabe von je 350µl N3-Puffer zur Neutralisation wurden die Gefäße wieder 4-6 mal invertiert und für 10min bei 13.000g zentrifugiert, um die ausgefällten Zellbestandteile abzutrennen. Die Überstände wurden in Qiaprep-Säulen überführt und zur DNA-Fällung mit je 700µl PE-Puffer versetzt und zweimal bei 13.000g für 1min zentrifugiert. Die Säulen wurden auf 1,5ml Eppendorfgefäße gesetzt und die Plasmid-DNA mit 50µl EB-Puffer eluiert.

2.4.7.8 Ligation

Die Ligation der DNA Fragmente und der verdauten Plasmide erfolgte mit dem „Rapid DNA Ligation & Transformation Kit“ der Firma Fermentas. Dabei wurde die Vektor-DNA mit der Fragment-DNA in verschiedenen Verhältnissen (1:1 bis 1:3) von *pmol ends* zueinander eingesetzt. Dazu wurde folgende Formel zur Berechnung verwendet (1:3 Verhältnis):

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = 3 * (\text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]) * \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}]$$

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden 2µl T4 DNA Ligase eingesetzt und der Ligationsansatz für 1h bei 22°C, 1h bei 16°C und 1h bei 4°C alterierend über Nacht inkubiert.

2.4.7.9 Transformation

Es wurden *TOP10 One Shot*[®], *NEB Turbo*, *BL21(DE3)* und *Rosetta2(DE3)pLysS E. coli* Zellen (Invitrogen, NEB und Novagen) verwendet. Die Transformation wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Dazu wurden die kompetenten Zellen 10min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5µl des Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitze-Schock bei 42°C für 45sek. Der Ansatz wurde sofort wieder für 2min auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wurde der Transformationsansatz bei 37°C und 225rpm für 1h geschüttelt. Zuletzt wurden 50µl und 200µl des Ansatzes auf LB-Platten (mit Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.8 Extraktion und Dünnschichtchromatographie von Prostaglandinen

Zur Aktivitätsbestimmung der Cyclooxygenase (COX) wurde die Dünnschicht-Chromatographie (DC) angewendet. Dazu wurde das Laufmittel (s. 2.3.8) ca. 2h vor der DC angesetzt und in einer geschlossenen Chromatographiekammer bei -20°C stehen gelassen um eine Laufmittelatmosphäre herzustellen. Danach wurden 100µl Trypanosomenlysate mit 2,5µCi [¹⁴C]-Arachidonsäure in 400µl COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) bei 37°C für 1h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl 1M HCl gestoppt. Für die Prostaglandin-Extraktion wurden die angesäuerten Proben mit Ethylacetat im Verhältnis 3:1 gemischt und in einen Scheidetrichter überführt und geschüttelt. Danach wurde gewartet bis die wässrige Phase und die Ethylacetat-Phase deutlich voneinander getrennt waren. Die Ethylacetat-Phase wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und die wässrige Phase noch einmal mit Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten extrahierten Proben wurden anschließend in einer SpeedVac-Zentrifuge getrocknet. Die Pellets wurden dann in 50µl eiskaltem Ethanol aufgenommen und für 30min auf Eis gestellt. Unter einem Luftstrom wurden 10µl Probe auf die DC-Platte (Kieselgel 60F Platten; 20 x 20cm) aufgetragen und direkt in die Chromatographie-Kammer bei -20°C gestellt. Nach 45min wurde die Platte getrocknet und mit einem Kodak MR Film fünf Tage lang entwickelt.

2.4.9 Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC₅₀)

Die IC₅₀ von Staurosporin (STS) wurde mittels eines Zytotoxizitäts-Test durchgeführt [Bodley *et al.*, 1995]. Dazu wurde eine Standardreihe mit einer Konzentrationsspanne des STS, bei der zwischen 0 und 100% der Zellen überleben, angesetzt. Eine Hauptkultur wurde auf 2,5 x 10⁵ Zellen/ml mit frischem Blutformmedium ohne Phenolrot angesetzt und 199ml/well dieser Suspension in eine 96-well-Platte pipettiert. Dazu wurde 1ml/well der

entsprechenden Konzentration zugegeben und 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu jedem *well* 20ml Lysepuffer (s. 2.3.13) mit p-Nitrophenyl-Phosphat gegeben, um die Phosphatase-Aktivität der überlebenden Zellen zu messen. Anschließend wurden die Zellen weitere 6h bei 37°C inkubiert, und die Extinktion des Nitrophenols bei 405nm im Elisa-Reader gemessen. Neben den acht inkubierten Zellkulturen wurden ein Medium-Leerwert sowie Medium + STS ohne Zellen in jeweils acht *wells* gemessen. Die Extinktionswerte sind direkt proportional zur Zelldichte.

2.4.10 Untersuchung der Wirkung von Prostaglandin D₂ und Staurosporin auf das Wachstum von *T. brucei* unter *in vitro* Kultivierung

Trypanosomen-Vorkulturen wurden auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt und die zu untersuchenden Substanzen zum Zeitpunkt $t = 0$ zugegeben. Zur Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel in gleichen Volumina zu den Kontrollkulturen gegeben. Die Kulturen wurden zweimal täglich ausgezählt bis alle Zellen abgestorben waren.

Zusätzlich wurden Experimente mit Zellen aus der stationären Phase durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert, die Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und dann mit den jeweiligen Substanzen behandelt.

2.4.11 Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵S]-Methionin

Eine Vorkultur aus BF221-Trypanosomen wurde in BF-Kulturmedium auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gezählt und auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml verdünnt und für 2h bei 37°C und 5% CO₂ mit 10nM STS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und zu jeweils 1,5ml Zellsuspension 7,5µl (entsprechend 7,5µCi) [³⁵S]-Methionin (Hartmann Analytic) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 und 30min bei 37°C erfolgte die Messung als Triplikate. Zur Probenentnahme wurden 20µl BSA-Lösung in einem Eppendorfgefäß vorgelegt, 200µl Zellsuspension zum jeweiligen Zeitpunkt entnommen und die Proteine mit 600µl Aceton gefällt. Die präparierten Proben wurden für mindestens 20min bei -20°C aufbewahrt. Die Proben wurden dann 15min bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert und der

Überstand abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden in 1ml 5% TCA mit 2mM Methionin resuspendiert und auf vorbereitete Filtereinheiten gegeben. Das auf dem Filterpapier verbliebene Präzipitat wurde dreimal mit je 5ml TCA/Methionin und einmal mit eiskühler 1% Essigsäure gewaschen. Danach wurden die Filterpapiere getrocknet und in Szintillatorgefäße mit 5ml Ultima Gold überführt. Die Proben wurden über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.4.12 Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Zellmorphologie durch Transmissions- (TEM) und Raster- (REM) Elektronenmikroskopie wurden die Trypanosomen bis zur Entwässerung mit 50% Ethanol nach demselben Protokoll präpariert. Die Zellen für die REM wurden in 70% Ethanol an Herr Karl-Heinz Hellmer bzw. Frau Meinert im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Betz (Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten, Universität Tübingen) weitergegeben. Für die TEM wurden die Zellen in Eponharz eingebettet.

Für die Einbettung wurden 1×10^8 Trypanosomen bei 1.500g und 4°C für 5min zentrifugiert und zweimal in TDB (s. 2.3.6) gewaschen. Die Zellen wurden in 2% (vol/vol) Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert und viermal in Cacodylatpuffer (jeweils 10min) gewaschen. Danach wurden die Zellen 1h bei 4°C in 1,5% (wt/vol) Osmiumtetroxid inkubiert und erneut für jeweils 10min einmal in Cacodylatpuffer und dreimal mit H_2O_{dd} gewaschen. Anschließend erfolgte die Kontrastierung mit 0,5% Uranylacetat für 1h bei RT.

Nach einem Waschschrift mit H_2O_{dd} wurden die Zellen zur Entwässerung einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol-Lösungen ausgesetzt.

Die Zellen wurden jeweils 5min in jeder Lösung (50%, 70%, 95% Ethanol) gewaschen. Die Entwässerungsschritte in 100% Ethanol sowie die darauf folgende Inkubation in Propylenoxid wurde dreimal wiederholt.

Danach folgte die Einbettung in Eponharz (s. 2.3.14). Zuerst 1h in 50% Eponharz in Propylenoxid danach eine weitere Stunde in reinem Eponharz in Beem-Cups. Die Proben wurden dann über Nacht bei 45°C und dann noch einmal 24h bei 60°C polymerisiert. Alle Schritte wurden mit 1ml Flüssigkeit in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Zellen jeweils 30sek in einer Beckman Microfuge B zentrifugiert (13.000g, RT).

Die eingebetteten Zellen wurden mit einem LKB 11800 Pyramitone[®] zu Trapezen (ca. 0,5mm Basislänge) getrimmt und mit einem Ultramikrotom OM U3 (Reichert) geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit Kupfernetzchen gefischt. Zum Kontrastieren der Schnitte wurden die Netzchen (Schnitte nach unten) auf einen Tropfen 5% Uranylacetat 1h bei RT gegeben und mit H₂O_{dd} gewaschen [Lewis und Knight, 1977]. Anschließend wurden sie 45sek in eine Bleicitratlösung gedipt, mit H₂O_{dd} gewaschen und getrocknet.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen fanden an einem Zeiss EM 109 Transmissionselektronenmikroskop mit TFP-Großbildkamera statt. Für die Aufnahmen wurde der Negativfilm Kodak Plus-X-Plan 120 (125 ASA, 60 x 70mm) verwendet.

2.4.13 Rasterelektronenmikroskopie

Nach dem Aufbringen der Probe auf einen mit poly-L-Lysin beschichteten Träger, folgte eine jeweils 8h-Inkubation in 96% und 100% Ethanol. Nach einer Kritische-Punkt-Trocknung, wurde die Probe mit einer Palladium-Gold-Mischung (Schichtdicke 20nm) metallisiert. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde mit einem Cambridge Stereo Scan 250 Mk2 durchgeführt und Bilder digital aufgenommen.

2.4.14 Durchflusszytometrie

Zur quantitativen Analyse von intrazellulären Veränderungen in den Trypanosomen während der Apoptose wurde die Durchflusszytometrie, wenn nach Fluoreszenz sortiert wird auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, eingesetzt. Hierbei werden die Zellen unter hohem Druck in einer Trägerflüssigkeit an verschiedenen Lasern vorbeigeführt. Der Strahl ist so fein, dass er in Tröpfchen aufgetrennt, die jeweils nur eine Zelle enthalten nacheinander die Laser passieren kann. Das von den Zellen emittierte Streulicht wird dann von verschiedenen Detektoren ausgewertet. Somit können in kürzester Zeit verschiedene Parameter einer Zelle wie Größe, Granularität und mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. In dieser Arbeit wurde ein FACSCantoII Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der FACSDiva Software von BD Biosciences und der Cyflogic Software.

2.4.14.1 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA)

Die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wurde mit dem relativ unspezifischen Farbstoff, 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) nachgewiesen. H₂DCFDA ist zellmembranpermeabel und besitzt zwei Acetat-Gruppen. Werden die Acetat-Gruppen intrazellulär durch Esterasen gespalten wird das Molekül unpermeabel (H₂DCF). Durch Oxidation intrazellulär vorhandener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wird das nicht-fluoreszierende H₂DCF zum fluoreszierenden Farbstoff DCF. Dazu wurde je 1ml Zellkultur (~ 2 x 10⁶ Zellen/ml) 1h bei 37°C mit 10µM H₂DCFDA inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit Ringerlösung gewaschen und in FACS-Röhrchen zur Messung überführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im grünen Kanal des Durchflusszytometers bestimmt.

2.4.14.2 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit 3'-(p-Aminophenyl)-fluorescein (APF)

Das unter 2.4.14.1 beschriebene H₂DCFDA wird durch ein breites Spektrum an ROS oxidiert, darunter auch die ROS Peroxyl- (ROO•), Hydroxylradikale (•OH) und Peroxynitritanionen (ONOO⁻). APF besitzt eine höher Spezifität und Stabilität als H₂DCFDA und wird ausschließlich durch diese drei ROS oxidiert. Zusätzlich besitzt APF eine weit höhere Resistenz gegenüber lichtinduzierter Oxidation als H₂DCFDA. APF ist wie H₂DCFDA nicht fluoreszierend bis es durch Hydroxylradikale, Peroxynitritanionen oder Hypochloritanionen (–OCI) zu fluoreszierendem APF oxidiert wird. Wie bei der Bestimmung mit H₂DCFDA wurde je 1ml Zellkultur (~ 2 x 10⁶ Zellen/ml) für 30min bei 37°C mit 10µM APF inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit Ringerlösung gewaschen und in FACS-Röhrchen zur Messung überführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im grünen Kanal bestimmt.

2.4.14.3 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit Dihydroethidium (DHE)

DHE ist ein zellpermeabler Farbstoff der in den Mitochondrien lebender Zellen durch Superoxid-Anionen (O₂^{•-}) zu Ethidium oxidiert wird. Das Ethidium kann dann zwischen die Basen der DNA interkalieren. Im Zytosol erscheint die Fluoreszenz von DHE blau,

interkaliert in DNA fluoresziert Ethidium rot. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie bei den oben genannten ROS-Markern mit 10 μ M DHE für 30min bei 37°C. Die Zellen wurden dann im roten Kanal des Durchflusszytometers gemessen.

2.4.14.4 Färbung des Mitochondriums mittels Tetramethylrhodaminester (TMRE)

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (Ψ_m) wurde der Farbstoff Tetramethylrhodaminester (TMRE) verwendet. TMRE ist ein kationischer, rot fluoreszierender Farbstoff, der in die Mitochondrien vitaler Zellen gelangt. Durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nimmt auch die messbare Fluoreszenz in den Zellen ab. Dazu wurde 1 μ l der TMRE-Stammlösung (s. 2.3.15) zu 1ml Kultur ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml) zugegeben und für 15min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis gelagert und im Durchflusszytometer im roten Kanal gemessen.

2.4.14.5 Annexin-V-Färbung von Phosphatidylserin-externalisierenden Trypanosomen

Zur Detektion der Phosphatidylserin (PS)-Exposition im äußeren *leaflet* der Zellmembran wurde Annexin-V-Fluos verwendet. Annexin-V bindet Ca²⁺-abhängig an negativ geladene Phospholipide und sehr spezifisch an PS. Dazu wurde 1ml Zellkultur ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml) einmal mit PBS gewaschen und in 1ml Ringerlösung aufgenommen. Zu der Zellsuspension wurden 50 μ l Färbelösung (s. 2.3.15) gegeben und 15min auf Eis inkubiert. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen noch einmal mit Ringerlösung gewaschen.

Um eindeutig nekrotische von apoptotischen Zellen zu trennen wurde eine Doppelfärbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt, da PI nur Zellen mit permeabilisierten Zellmembranen durchdringen kann. Die Annexin-V/PI Fluoreszenz wurde im grünen Kanal (Annexin-V) und im roten Kanal (PI) des Durchflusszytometers gemessen. Um die Überlappung der roten PI-Fluoreszenz in den grünen Bereich zu vermeiden musste eine elektronische Kompensation des Gerätes erfolgen.

2.4.14.6 Messung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid

Degradationsprozesse und Veränderungen des Zellzyklus wurden mit Propidiumiodid (PI) gemessen. Dazu wurde je 1ml Zellkultur ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml) einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 μ l Lysepuffer und 1 μ l Digitonin-Stammlösung (s. 2.3.15) aufgenommen und 30min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 100 μ l Färbelösung (20 μ g/ml Propidiumiodid, in PBS) zugegeben. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und im roten Kanal des Durchflusszytometers gemessen.

2.4.14.7 TUNEL-Test

Die Detektion von DNA-Strangbrüchen wurde mit dem „DNA Fragmentation Imaging Kit“ der Firma Roche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 3,5% Paraformaldehyd und 0,1% Triton X-100 für 10min bei RT fixiert und mit PBS gewaschen. Danach wurden 5×10^5 Zellen pro Feld auf einen Immunobjektträger aufgetragen und mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine 60minütige Inkubation mit *reaction solution* bei 37°C. Nach Zugabe der *nuclei dye solution* und weiteren 5min bei RT wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen.

2.4.15 Fluoreszenz-Mikroskopie

2.4.15.1 Färbung des Mitochondriums mit Mitotracker Red CMXRos

Zur Färbung der Mitochondrien von Trypanosomen wurde Mitotracker Red CMXRos der Firma Invitrogen verwendet. Mitotracker enthält einen leicht thiol-reaktiven Chloromethyl-Rest und verbleibt auch nach Fixierung noch im Mitochondrium. Dazu wurden Trypanosomen-Kulturen vor der Fixierung mit 3,5% Paraformaldehyd mit 50nM Mitotracker Red CMXRos für 20min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Fixierung und weiteren Färbungen, z.B. mit DAPI, wurden die Zellen auf einen poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger gegeben und mit „ProLong[®] Gold Antifade“ eingebettet. Anschließend erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop.

2.4.15.2 Färbung des Zellkern und des Kinetoplasten mit DAPI

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein fluoreszierender Farbstoff mit hoher Bindungsaffinität zu AT-reichen DNA Regionen. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie auf einem Objektträger mit eiskaltem Methanol fixiert und getrocknet. Danach wurde die DAPI-Färbelösung (1µg/ml in H₂O_{dest}) aufgetropft und 5min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit H₂O_{dest} gewaschen und getrocknet, bevor am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss CellObserver Mikroskop und der AxioVision Software.

2.4.16 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.4.16.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen wurde der Assay nach Bradford verwendet [Bradford, 1976]. Mit Hilfe einer 0,2µg/ml BSA-Stammlösung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe für die Standard-Kurve erstellt.

Proteinmenge (µg)	Stammlösung (µl)	H ₂ O _{dest} (µl)
2	10	790
4	20	780
6	30	770
8	40	760
10	50	750

Tab. 2-1: Zusammensetzung der BSA-Standards

Die Standardproben wurden als Duplikate angesetzt, mit 200µl Bradford-Reagenz versetzt, gemischt und 5min bei RT stehen gelassen. Als Referenz wurden 800µl H₂O_{dest} und 200µl Bradford-Reagenz gemischt. Anschließend wurden die Proben in einem GeneQuant 1300 Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen und eine Standardkurve erstellt.

Folgend wurde nun immer zur Bestimmung der Proteinkonzentration ein definiertes Volumen der zu bestimmenden Probe zu 800µl H₂O_{dest} und 200µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5min wurde die Absorption bei 595nm gemessen und anhand der entsprechenden Standard-Kurve die Protein-Konzentration bestimmt.

2.4.16.2 SDS-PAGE

Zur Analyse von Proteinproben wurde die Methode nach Laemmli (1970) verwendet. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurden die Proben mit reduziertem Probenpuffer (*RotiLoad 1*, Roth) für 5min bei 100°C erhitzt. Das gewünschte Probenvolumen wurde in die Taschen des Gels gegeben als Standard wurden je 2,5µl Proteinmarker der Firma Fermentas verwendet. Die Gele wurden in einer „*mighty small*“ Gelapparatur der Firma Hoefer unter Wasserkühlung bei einer maximalen Spannung von 160V und einer konstanten Stromstärke von 10mA pro Gel etwa 2h laufen gelassen. Die Zusammensetzung der Gele ist am Beispiel eines 5% Sammelgels und eines 10% Trenngels unter 2.3.11 aufgeführt. Anschließend erfolgte entweder eine Silberfärbung zur Detektion der Proteinbanden oder die Gele wurden für einen Western Blot vorbereitet.

2.4.16.3 Silberfärbung

Zur Detektion geringerer Proteinmengen wurde die Silberfärbung nach folgendem Schema durchgeführt:

Fixieren:	10min in Fixierlösung
Waschen:	3 x 10min in 50% Ethanol
Imprägnieren:	1min mit Imprägnierlösung
Waschen:	2 x 2min in H ₂ O _{dest}
Silberinkubation:	20min mit AgNO ₃ -Lösung
Waschen:	2min in H ₂ O _{dest}
Entwickeln:	unter Sichtkontrolle mit Entwicklungslösung
Waschen:	2 x 2min in H ₂ O _{dest}
Stoppen:	10min in Stopplösung
Waschen:	20min in 50% Ethanol

Alle Schritte wurden in einem Plastikbehälter auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4.16.4 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel in Transferpuffer (s. 2.3.12) gegeben. Das Blotten des Gels wurde mit einer *Semi-Dry* Apparatur durchgeführt. Dazu wurde auf der Anodenplatte der Apparatur ein sogenanntes Sandwich aus 3 Lagen feuchtem Whatman Blotting Papier, einer Nitrozellulose-Membran (Hybond-ECL), dem zu blottenden Gel und erneut 3 Lagen feuchtem Whatman Blotting Papier gebildet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Zum Schluss wurde die Kathodenplatte aufgelegt und eine Spannung von maximal 20V und ein konstanter Strom von 400mA für 40min angelegt. Danach wurde die Nitrozellulose-Membran 2h in Blockierlösung (s. 2.3.12) blockiert und 5 x 5min in Waschpuffer (s. 2.3.12) unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in TBS (s. 2.3.12) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder 5 x 5min gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem verdünnten Sekundärantikörper unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem 5 x 5min Waschen wurde der Blot schließlich mit Entwicklungslösung (s. 2.3.12) unter visueller Kontrolle inkubiert bis gefärbte Banden erschienen. Sofort nach Erscheinen der Banden wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und der Blot zur weiteren Analyse eingescannt und auf Whatman Blotting Papier luftgetrocknet.

2.4.17 Isolierung eines Cyclooxygenase-ähnlichen Enzyms (TbCOX) aus *T. brucei*

2.4.17.1 Lyse von Trypanosomen

Eine Ratte wurde mit BF221-Trypanosomen infiziert und die Parasitämie regelmäßig über Blutentnahme aus der Schwanzvene bestimmt. Bei einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml wurde die Ratte mittels CO₂ getötet und die Trypanosomen wie unter 2.4.1 isoliert. Die Lyse der Trypanosomen erfolgte mit Lysepuffer (s. 2.3.7). Nach der hypotonen Lyse wurden die

Zellen 10min bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand für die anschließende Ammoniumsulfatfällung verwendet.

2.4.17.2 Ammoniumsulfatfällung

Zur Reinigung und Konzentrierung von Proteinlösungen wurde die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (AS-Fällung) eingesetzt. Alle Schritte der AS-Fällung wurden auf Eis durchgeführt. Dazu wurde unter ständigem Rühren zu dem trypanosomalen Zelllysat tropfenweise eiskalte, gesättigte AS-Lösung gegeben. Die Lösung wurde dann 30min gerührt und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation bei 10.000g und 4°C pelletiert. Die Fällung erfolgte in 20%-Schritten. Nach jeder Zugabe von Ammoniumsulfat wurde die Lösung gerührt, zentrifugiert und die Pellets in 20mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen und für weitere Experimente bei 4°C gelagert.

2.4.17.3 Amplex Red assay

Zur Detektion der Cyclooxygenaseaktivität wurde der Peroxid-sensitive Farbstoff Amplex[®] Red (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) verwendet. Durch Oxidation von Arachidonsäure mittels COX-1 oder COX-2 reagiert das nicht-fluoreszierende Amplex Red zu stark fluoreszierendem Resorufin (7-Hydroxyphenoxazon). Die COX-Proben wurden zu COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) mit 100µM Arachidonsäure und 50µM Amplex Red gegeben und 15min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben bei 565nm im Spektrophotometer gemessen. Die Reaktion von Amplex Red zu Resorufin findet im Verhältnis 1:1 zu der Oxidation von Arachidonsäure statt.

2.4.17.4 Ionenaustausch-Chromatographie (IEX)

Zur Trennung der mit Ammoniumsulfat präzipitierten Proteine wurde die Ionenaustausch-Chromatographie an einer Äkta FPLC der Firma GE Healthcare verwendet. Hierfür wurden die Proteinlösungen gegen MES-Puffer (s. 2.3.4.2) dialysiert und auf eine 1ml HiTrap SP Säule der Firma GE Healthcare gegeben und nach Herstellerangaben eluiert. Die Elution

erfolgte gegen MES-Puffer mit 1M NaCl. Die eluierten Fraktionen wurden gesammelt und mittels *Amplex Red assay* oder Western Blot analysiert.

2.4.17.5 Gelfiltration

Nach der IEX-Chromatographie folgte eine Gelfiltration um das Proteingemisch nach Größe aufzutrennen. Dazu wurde die IEX-Fraktion auf eine Superdex G-200 HR 10/30 Säule der Firma GE Healthcare mit einem Bett-Volumen von 24ml gegeben und mit einer Flussrate von 0,2ml/min mit Gelfiltrationspuffer (s. 2.3.4.3) eluiert. Die erhaltenen Peakfraktionen wurden gesammelt und mittels *Amplex Red assay* oder Western Blot analysiert.

2.4.17.6 Immunpräzipitation mittels MagBeads

Zur Immunpräzipitation des COX-ähnlichen Enzyms aus *T. brucei* wurden Roti[®]-MagBeads mit Protein A beladen der Firma Roth verwendet. Dazu wurden 250µg MagBeads dreimal mit Waschpuffer (s. 2.3.9) und anschließend dreimal mit Bindepuffer (s. 2.3.9) gewaschen. Zu 25µl MagBeads wurde dann 2µg anti-COX-1 Antikörper gegeben und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Beads wurden wieder dreimal mit Bindepuffer gewaschen und zu 500µl Proteinlösung gegeben. Nach Inkubation von 1h bei RT wurden die Beads wieder dreimal mit Bindepuffer gewaschen und anschließend das gebundene Protein eluiert. Dazu wurden 50µl Elutionspuffer (s. 2.3.9) zu den Beads gegeben und 5min bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2,5µl/50µl 1M NaOH neutralisiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE mit dem eluierten Protein durchgeführt.

2.4.17.7 Identifizierung mittels Massenspektrometrie (MS)

Das immunpräzipitierte Protein wurde zur weiteren Analyse an das Proteomcenter der Universität Tübingen gegeben. Hier wurde es verdaut und eine massenspektrometrische Analyse der ausgeschnittenen Gelbande mit einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer durchgeführt.

2.4.18 rTbCOX in *E. coli*

2.4.18.1 Expression von rTbCOX

Mit Zellen eines *BL21(DE3)*-TbCOX Klons aus Kulturstabilaten wurden 50ml einer *E. coli*-Flüssigkultur (mit Ampicillin) angeimpft und über Nacht als Vorkultur bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10ml Vorkultur zu 500ml LB-Medium gegeben und bei 37°C angezogen, bis die logarithmische Wachstumsphase erreicht war. Dazu wurde die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) gemessen. Bei einer OD_{600} von 0,8 wurden 0,5mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) zur Induktion der Expression zugegeben und für 5h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 3.000g für 10min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bei -20°C gelagert.

2.4.18.2 Isolierung von *inclusion bodies*

Das wie oben beschrieben hergestellte Zellpellet wurde in 20ml IB-Waschpuffer (s. 2.3.3) resuspendiert und mit 100µg/ml Lysozym für 15min bei 30°C lysiert. Danach erfolgten 3 Ultraschallaufschlüsse mit einem Cell Disruptor B-30 der Firma Heinemann (10min, *duty cycle* 50%, *output level* 5) mit anschließender Zentrifugation zur Fraktionierung der löslichen und unlöslichen Komponenten bei 10.000g für 10min bei 4°C. Nach diesen Waschschritten wurde das Pellet in 10ml IB-Solubilisierungspuffer (s. 2.3.3) aufgenommen und 1h bei RT und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln gelöst. Am nächsten Tag wurde das Lysat bei 10.000g für 10min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten *inclusion bodies* für die Affinitätschromatographie verwendet.

2.4.18.3 Affinitätschromatographie

Der vorab beschriebene IB-Überstand wurde auf eine 1ml Ni-NTA Säule (Qiagen) gegeben, welche zuvor mit 20ml Bindepuffer (s. 2.3.4.1) equilibriert worden war. Das fehlgefaltete Protein wurde nun über einen Gradienten gegen Bindepuffer mit einer Flussrate von 0,2ml/min über Nacht auf der Säule zurückgefaltet. Das nun korrekt gefaltete Protein wurde dann mit Waschpuffer (s. 2.3.4.1) gewaschen und mittels eines 10ml Gradienten mit

Elutionspuffer (s. 2.3.4.1) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde zu 1ml Fraktionen gesammelt. Die eluierten Peakfraktionen wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.18.4 Abspaltung des His-Tags

Die Proteinproben wurden in einen Dialyseschlauch mit einem MWCO von 14kDa überführt und über Nacht gegen ein 1.000faches Volumen AcTEV-Protease-Puffer (s. 2.3.9) dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Puffer ausgetauscht und für weitere 2h dialysiert. Anschließend wurde der His-Tag durch Inkubation von 200U AcTEV-Protease für 4h bei RT und dann bei 4°C über Nacht abgespalten. Der Ansatz wurde dann 1:1 mit Waschpuffer versetzt und wieder auf eine 1ml Ni-NTA Säule, welche mit Waschpuffer equilibriert worden war, gegeben. Dabei blieben His-Tag, Reste von His-rTbCOX und die ebenfalls His-getaggte Protease auf der Säule zurück, während sich das ungetaggte Protein in der Durchflussfraktion befand. Die rTbCOX-Fraktion wurde gesammelt und über Zentrifugation mit einem Größenausschluss (NMWL) von 30kDa gegen COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) getauscht.

2.4.18.5 rTbCOX Aktivitätstest

Die Cyclooxygenaseaktivität von rTbCOX wurde mit [¹⁴C]-Arachidonsäure als Substrat und Aliquots der entsprechenden TbCOX Proben getestet. Dazu wurde je [¹⁴C]-Arachidonsäure und 200ng rekombinantes TbCOX zu COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) gegeben. Die Ansätze wurden für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Ethylacetat entsprechend 2.4.15 extrahiert und analysiert.

2.4.19 rTbEndoG in *E. coli*

2.4.19.1 Expression von rTbEndoG

Mit Zellen eines *BL21(DE3)*-TbEndoG Klon aus Kulturstabilaten wurden 50ml einer *E. coli*-Flüssigkultur angeimpft und über Nacht als Vorkultur bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10ml Vorkultur zu 500ml LB-Medium gegeben und bei 37°C herangezogen, bis die

logarithmische Wachstumsphase erreicht war. Dazu wurde die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) gemessen. Bei einer OD_{600} von 0,8 wurden 0,5mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) zur Induktion der Expression zugegeben und für 5h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 3.000g für 10min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bei -20°C gelagert.

2.4.19.2 Isolierung von *inclusion bodies*

Das nach der Expression gelagerte Zellpellet wurde in 20ml IB-Waschpuffer (s. 2.3.3) resuspendiert und die Zellen mit 100µg/ml Lysozym für 15min bei 30°C lysiert. Danach erfolgten 3 Ultraschallaufschlüsse mit einem Cell Disruptor B-30 der Firma Heinemann (10min, *duty cycle* 50%, *output level* 5) mit anschließender Zentrifugation zur Fraktionierung der löslichen und unlöslichen Komponenten bei 10.000g für 10min bei 4°C. Nach diesen Waschschritten wurde das Pellet in 10ml IB-Solubilisierungspuffer (s. 2.3.3) aufgenommen und 1h bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln gelöst. Am nächsten Tag wurde das Lysat bei 10.000g für 10min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten *inclusion bodies* für die Affinitätschromatographie verwendet.

2.4.19.3 Affinitätschromatographie

Der vorab beschriebene IB-Überstand wurde auf eine 1ml Ni-NTA Säule (Qiagen) gegeben, welche zuvor mit 20ml Bindepuffer (s. 2.3.4.1) equilibriert worden war. Das fehlgefaltete Protein wurde nun über einen Gradienten gegen Bindepuffer mit einer Flussrate von 0,2ml/min langsam auf der Säule zurückgefaltet. Das nun korrekt gefaltete Protein wurde dann mit Waschpuffer (s. 2.3.4.1) gewaschen und mittels eines 10ml Gradienten auf den Elutionspuffer (s. 2.3.4.1) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde zu 1ml-Fractionen gesammelt. Die eluierten Peakfraktionen wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.4.19.4 Abspaltung des His-Tags

Die Proteinproben wurden in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen AcTEV-Protease-Puffer (s. 2.3.9) dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Puffer ausgetauscht und für

weitere 2h dialysiert. Anschließend wurde der His-Tag durch Inkubation von 200U AcTEV-Protease für 4h bei RT und dann bei 4°C über Nacht abgespalten. Der Ansatz wurde dann 1:1 mit Waschpuffer versetzt und wieder auf eine 1ml Ni-NTA Säule, welche mit Waschpuffer equilibriert worden war, gegeben. Dabei blieben His-Tag, Reste von His-rTbEndoG und die ebenfalls His-getaggte Protease auf der Säule zurück, während sich das ungetaggte Protein in der Durchflussfraktion befand. Die rTbEndoG-Fraktion wurde gesammelt und über 30kDa NMWL Zentrifugens gegen EndoG-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) getauscht.

2.4.19.5 rTbEndoG Nukleaseaktivitätstest

Die Nukleaseaktivität von rTbEndoG wurde mit Plasmid-DNA als Substrat und Aliquots der entsprechenden TbEndoG Proben getestet. Dazu wurde je 1µg Plasmid-DNA und 200ng rekombinantes TbEndoG zu EndoG-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) gegeben. Die Ansätze wurden für 1h und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wurde ein Puffer (EndoG-Aktivitätspuffer) verwendet, der für die *in vitro* Spaltung von DNA durch EndoG schon beschrieben wurde [Gannavaram *et al.*, 2007].

Die Ansätze wurden anschließend gelelektrophoretisch mittels 1% Agarosegele (s. 2.3.1) analysiert.

2.4.20 TbEndoG in *T. brucei*

2.4.20.1 Herstellung von Trypanosomen mit EndoG-*knock down*, EndoG-Überexpression und EndoG-eGFP

T. brucei besitzt zwei Kopien von EndoG (Tb427.9.4040 und Tb427.9.4080) mit 99%iger Identität auf DNA- und Proteinebene.

Zur Transfektion von TbEndoG in SMB-Trypanosomen wurde jeweils das Tb427.9.4040 in verschiedenen Vektoren für den TbEndoG-*knock down*, die Überexpression von TbEndoG und die Expression von TbEndoG-eGFP verwendet. Für den TbEndoG-*knock down* wurde der RNAi Vektor p2T7, für die Überexpression von TbEndoG der Vektor pLew100v5Hyg und für die Expression von TbEndoG-eGFP der Vektor pCO57 verwendet. Alle drei Vektoren

konnten mit Tetracyclin induziert werden. In dieser Arbeit wurde Doxycyclin, ein Tetracyclin-Derivat, anstelle von Tetracyclin verwendet. Nach der Plasmidherstellung wurden die Plasmide mittels Minipräparation (s. 2.4.7.7) gereinigt und mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert.

2.4.20.2 Transfektion und Selektion

Zur Transfektion von *T. brucei* wurden SMB-Zellen verwendet um einen Selektionsdruck durch Zugabe von Geneticin (G418) ausüben zu können. HMI-9 Medium wurde verwendet da hier die klonale Vermehrung einzelner Zellen ermöglicht wird. Die Generationszeit von SMB-Zellen in HMI-9 Medium liegt bei ca. 6h im Vergleich zu 8h in BF-Kulturmedium.

Alle Schritte der Transfektion mittels Elektroporation erfolgten auf Eis.

$2,5 \times 10^7$ Zellen einer SMB-Hauptkultur wurden bei 1.000g, 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25ml Cytomix (s. 2.3.10) aufgenommen und bei 1.000g für 10min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in ca. 200µl Cytomix resuspendiert, um auf ein Endvolumen von 440µl zu kommen. Zur Überprüfung der Zellzahl wurde 1µl der Zellsuspension in ein vorbereitetes Eppendorfgesäß überführt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Zu den SMB-Zellen wurden 10µl DNA (10µg *NotI* linearisierter Vektor) zugegeben und die nun 450µl Zellsuspension in eine kalte Elektroporationsküvette (2mm) überführt.

Darauf folgte ein Puls von 1,4kV, 25µF und $\infty\Omega$ mit einem GenePulser XCell der Firma Bio-Rad. Die Küvette wurde anschließend wieder auf Eis gelagert und die Zellzahl bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt sind 10-50% überlebende Zellen vorhanden. Der elektroporierte Ansatz wurde dann in 36ml HMI-9 Medium überführt und 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Zugabe von 2µg/ml G418 und 2,5µg/ml Hygromycin B wurden jeweils 1ml der Kultur auf 24-well Platten verteilt und für 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Unter täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die klonal wachsenden Zellen für weitere Experimente geerntet.

2.4.20.3 Induzierung

Die Kulturen wurden mit 10µg/ml Doxycyclin für 3 Tage (*knock down*) und 24h (TbEndoG-over bzw. TbEndoG-eGFP) induziert bevor sie für weitere Experimente eingesetzt wurden. Die Halbwertszeit von Doxycyclin beträgt in Kulturmedium nur 48h, deshalb wurde den Kulturen alle 24h 5µg/ml Doxycyclin zugegeben.

2.4.20.4 RNA-Isolierung und RT-qPCR

Kulturen von SMB- und TbEndoG-over-Zellen wurden in HMI-9 Medium herangezogen und mit 10µg/ml Doxycyclin die TbEndoG Expression induziert. Nach 24h wurden 10µM Prostaglandin D₂ (PGD₂) den Kulturen zugegeben und weitere 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen bei 1.500g für 5min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet gewaschen. Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Herstellerangaben des „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen. Die RNA-Konzentration der gereinigten RNA wurde photometrisch bestimmt und jeweils 100ng zu den RT-qPCR Ansätzen zugegeben.

Die Quantifizierung der *in vivo* synthetisierten mRNA erfolgte mit dem „Power SYBR[®] Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit“ (Invitrogen).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung eines COX-ähnlichen Enzyms aus *T. brucei*

Die Inkubation von [¹⁴C]-markierter Arachidonsäure mit Zelllysat aus BF221-Trypanosomen ließ bei der Dünnschicht-Chromatographie ein ähnliches Muster erkennen, wie die Inkubation mit Schaf-COX-1 (s. Abb. 3-1). Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass es in Trypanosomen ein Enzym geben muss, das dieselben oder ähnliche Eigenschaften wie die Cyclooxygenasen höherer Organismen besitzt.

Zur Identifizierung dieses COX-ähnlichen Enzyms in *T. brucei* wurden zwei Nachweismethoden verwendet. Zum einen wurde nach jedem Aufreinigungsschritt ein Western Blot mit Antikörper gegen COX-1 aus dem Schaf (ovin) durchgeführt. Zum anderen wurden die Proteinproben mit Amplex Red, wie unter 2.4.17.3 beschrieben, inkubiert. Amplex Red ist ein farbloses Substrat, welches mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Arachidonsäure zu stark fluoreszierendem Resorufin reagiert. Mit dieser Eigenschaft sollte die Peroxidaseaktivität der COX nachgewiesen werden. Fraktionen, die mit beiden Methoden positiv getestet wurden, sind für weitere Aufreinigungsschritte verwendet worden.

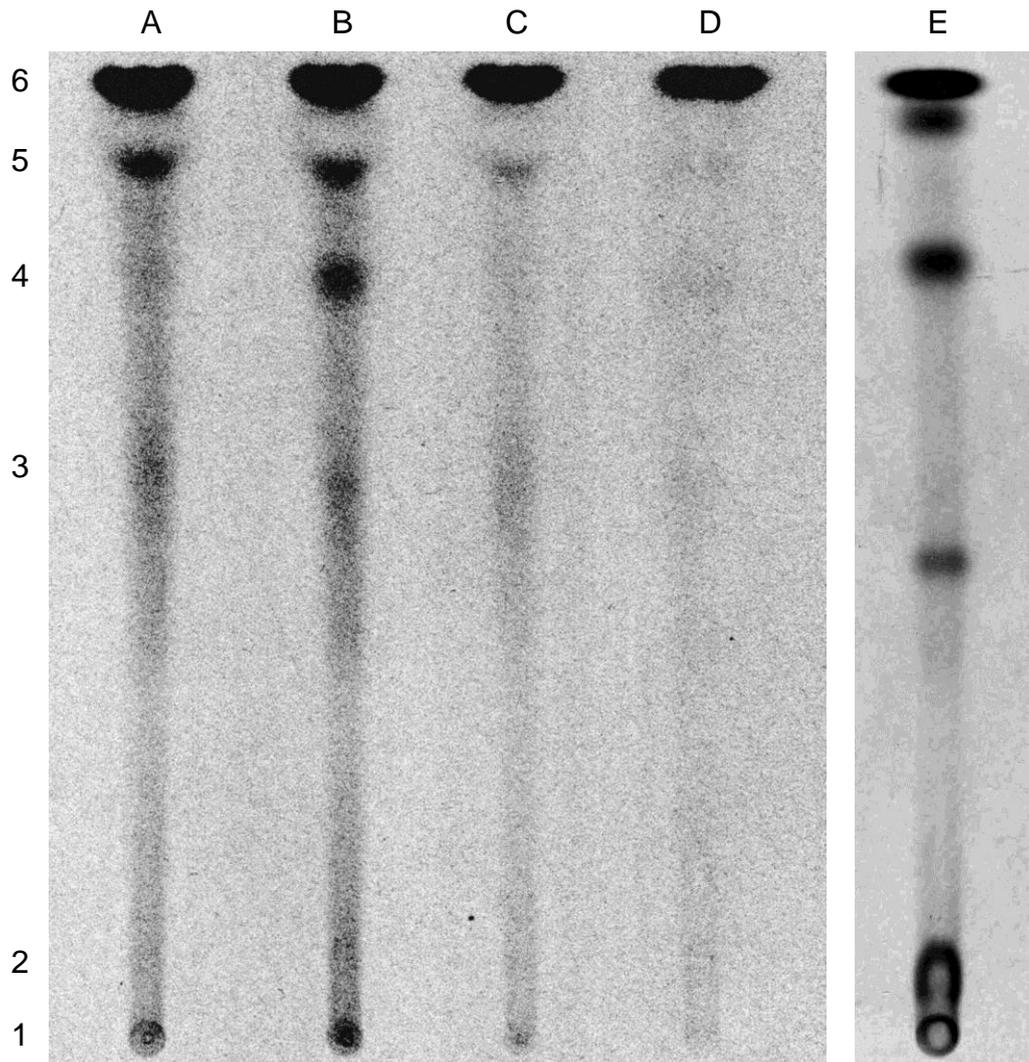


Abb. 3-1: Dünnschichtchromatographie von [¹⁴C]-markierter Arachidonsäure

Trypanosomenlysate wurden mit [¹⁴C]-Arachidonsäure in COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) bei 37°C für 1h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M HCl gestoppt. Die angesäuerten Proben wurden mit Ethylacetat im Verhältnis 3:1 gemischt und die wässrige Phase und die Ethylacetat-Phase in einem Scheidetrichter voneinander getrennt. Die Ethylacetat-Phase wurde in einer SpeedVac-Zentrifuge getrocknet und die Pellets in 50µl eiskaltem Ethanol aufgenommen und für 30min auf Eis gestellt. 10µl der Proben wurden auf die DC-Platte (Kieselgel 60F Platten; 20 x 20cm) aufgetragen und direkt in die Chromatographie-Kammer bei -20°C gestellt. Nach 45min wurde die Platte getrocknet und mit einem Kodak MR Film fünf Tage lang entwickelt.

1) Startpunkt; 2) PGE₂ und PGF_{2α}; 3) PGD₂ und andere PG Metabolite; 4) PGH₂;

5) HETE (Hydroxyeikosatetraenoat); 6) Arachidonsäure;

A) hitzeinaktivierter Überstand; B) Überstand; C) hitzeinaktiviertes Pellet; D) Pellet; E) COX-1.

3.1.1 Zellyse

Wie unter 2.4.1 beschrieben, wurden 1×10^9 BF221-Trypanosomen aus Rattenblut isoliert und hypoton lysiert. Nach Zentrifugation bei 10.000g für 10min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen, auf Eis gelagert und für die AS-Fällung verwendet. Zur Kontrolle wurde ein Western Blot mit oviner COX-1 und trypanosomalen Zellysat durchgeführt. Dazu wurden 1µg COX-1 und 20µg Proteinlösung über ein 10% SDS-Gel getrennt und anschließend geblottet. Die Nitrozellulosemembran wurde dann mit anti-COX-1 Antikörper der Firma Cayman Chemical und anti-Kaninchen IgG AP-konjugierten Antikörper wie unter 2.4.16.4 beschrieben inkubiert.

Die zur Kontrolle aufgetragene COX-1 ist in Abb. 3-2 als intensive Bande bei 72kDa zu erkennen. In der Lysatfraktion von *T. brucei* ist eine Bande mit etwas größerem Molekulargewicht als die ovine COX-1 zu erkennen. Das gesuchte trypanosomale Enzym ist daher entweder etwas größer als seine orthologe Enzyme in höheren Organismen oder das Laufverhalten im SDS-Gel ist wie bei der EndoG verändert.

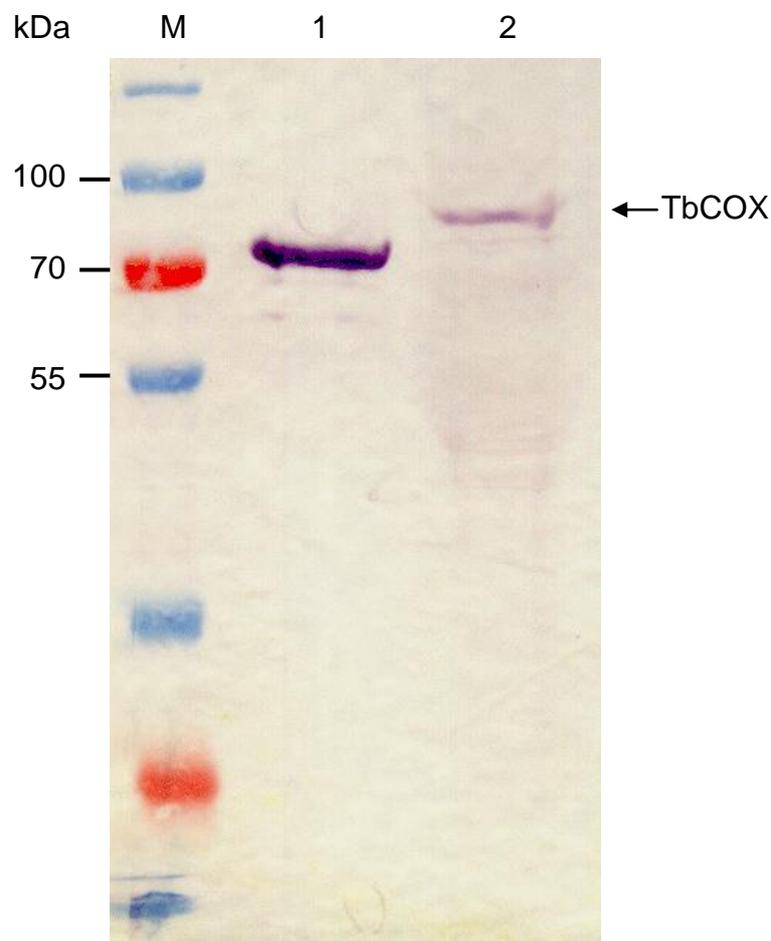


Abb. 3-2: Western Blot mit anti-COX-1 (ovine) Antikörper

BF221-Trypanosomen wurden aus Rattenblut isoliert und hypoton lysiert. Nach Zentrifugation bei 10.000g für 10min bei 4°C wurde der Überstand auf Eis gelagert und über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde ovine COX-1 verwendet. Anschließend wurde das Gel geblottet. Der Blot wurde mit anti-COX-1 Primärantikörper (1:1.000) und anti-Kaninchen IgG AP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:15.000) inkubiert. Der Blot wurde anschließend mit BCIP/NBT gefärbt.

M) Fermentas PageRuler #SM1811; 1) ovine COX-1; 2) Trypanosomen-Lysat

3.1.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Das Trypanosomenlysate wurde zur Ammoniumsulfat (AS)-Fällung unter Eiskühlung gerührt und AS in 20%-Schritten tropfenweise zur Proteinlösung gegeben. Nach jeder AS-Zugabe wurde die Lösung wie unter 2.4.17.2 beschrieben 30min gerührt und anschließend zentrifugiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden dann über Zentrifugationsröhrchen mit einer Ausschlussgröße von 30kDa mit einem 20mM Tris-HCl Puffer, pH 7,5 entsalzt und für die SDS-PAGE und Western Blot Analyse verwendet (s. Abb. 3-3). Nach einer Proteinbestimmung nach Bradford wurden jeweils 20µg Protein in die Taschen eines 10% SDS-Gels gegeben und wie unter 2.4.16.2 elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend folgte die Silberfärbung des SDS-Gels wie unter 2.4.16.3 beschrieben. Zur Detektion der Proteinbanden mittels Western Blot wurde ein identisches SDS-Gel wie unter 2.4.16.4 beschrieben geblottet und mit anti-COX-1 Primärantikörper (1:1.000) und anti-Kaninchen IgG-AP Sekundärantikörper (1:15.000) inkubiert und die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Entwicklungslösung (s. 2.3.12) detektiert. In den Fraktionen, die mit 80% bzw. 100% AS versetzt wurden war eine starke Bande bei ca. 50kDa zu erkennen, die dem VSG zuzuordnen war. In diesen beiden Fraktionen wurde allerdings auch die gesuchte TbCOX präzipitiert. VSG, welches ca. 50% des gesamten Proteinanteils in Trypanosomen ausmacht störte durch Überlagerung der Peaks bei den folgenden Aufreinigungsschritten. Daher wurde zur weiteren Isolierung der TbCOX eine 70% AS-Fällung verwendet, bei der das VSG noch nicht präzipitierte und noch ausreichend TbCOX in der Probe vorhanden war.

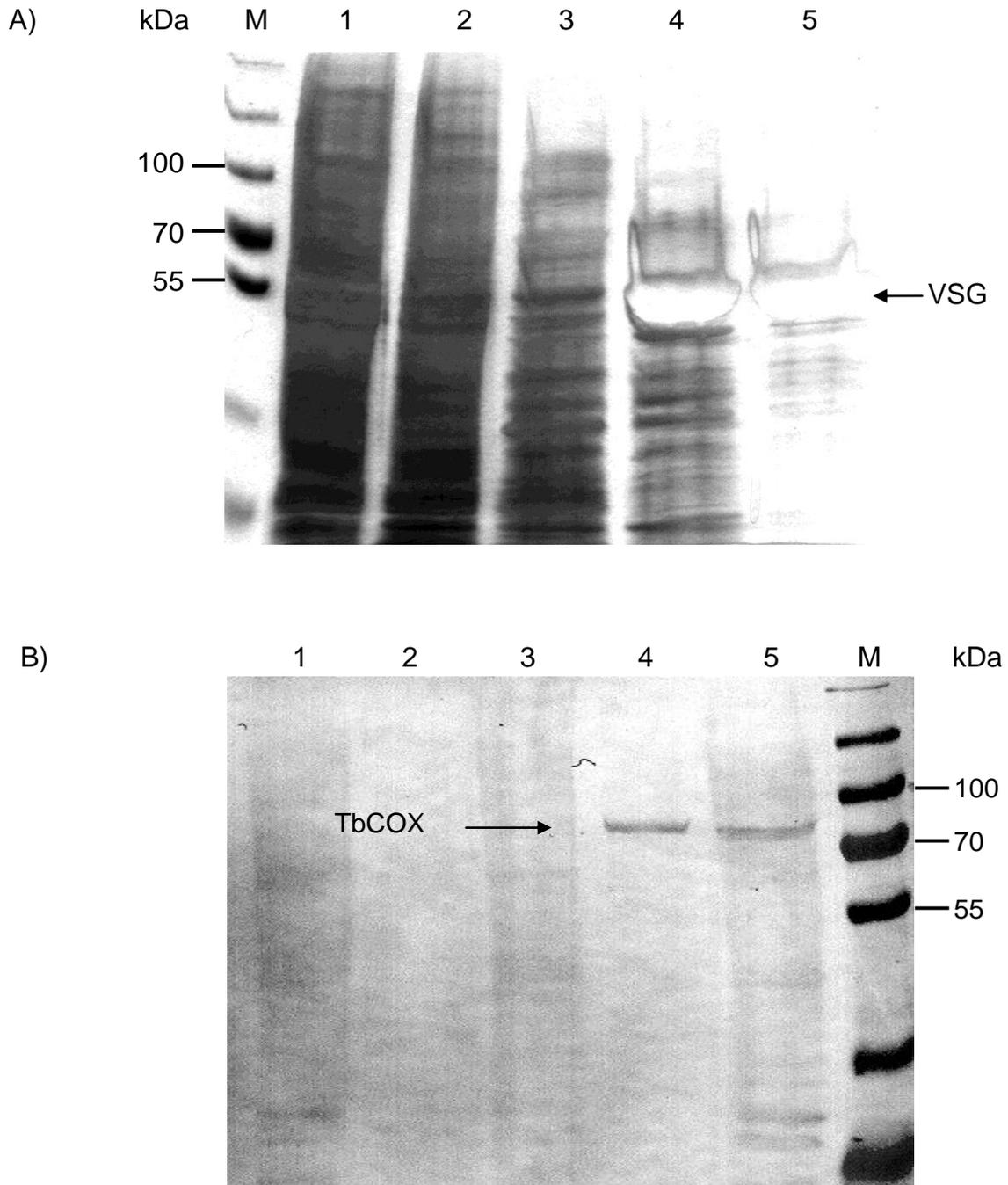


Abb. 3-3: SDS-Gel und Western Blot von AS-Fraktionen

Zur Fällung der Proteine wurde in 20% Schritten AS tropfenweise zu trypanosomalen Zelllysate gegeben und 30min auf Eis gerührt. Danach wurden die gefällten Proteine 10min bei 10.000g zentrifugiert und das Pellet in 20mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Anschließend wurden die Proteinlösungen durch SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) analysiert.

A) SDS Gel: M) PageRuler #SM1811 (Fermentas); 1) 20% AS-Fraktion; 2) 40% AS-Fraktion; 3) 60% AS-Fraktion; 4) 80% AS-Fraktion; 5) 100% AS-Fraktion

B) Western Blot: M) PageRuler #SM1811 (Fermentas); 1) 20% AS-Fraktion; 2) 40% AS-Fraktion; 3) 60% AS-Fraktion; 4) 80% AS-Fraktion; 5) 100% AS-Fraktion.

3.1.3 Amplex Red assay

Die Peroxidaseaktivität der Cyclooxygenase wurde mit Amplex Red (s. 2.4.17.3) gemessen. Dazu wurden die Fraktionen der AS-Fällung wie im letzten Abschnitt beschrieben entsalzt, mit 100 μ M Arachidonsäure und 50 μ M Amplex Red versetzt und 15min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Spektrophotometer bei 565nm gemessen. Wie in Abb. 3-4 zu sehen ist, sind die Absorptionswerte in den Fraktionen mit 80% und 100% AS, in denen die TbCOX auch mit anti-COX-1 Antikörper detektiert wurde, stark erhöht.

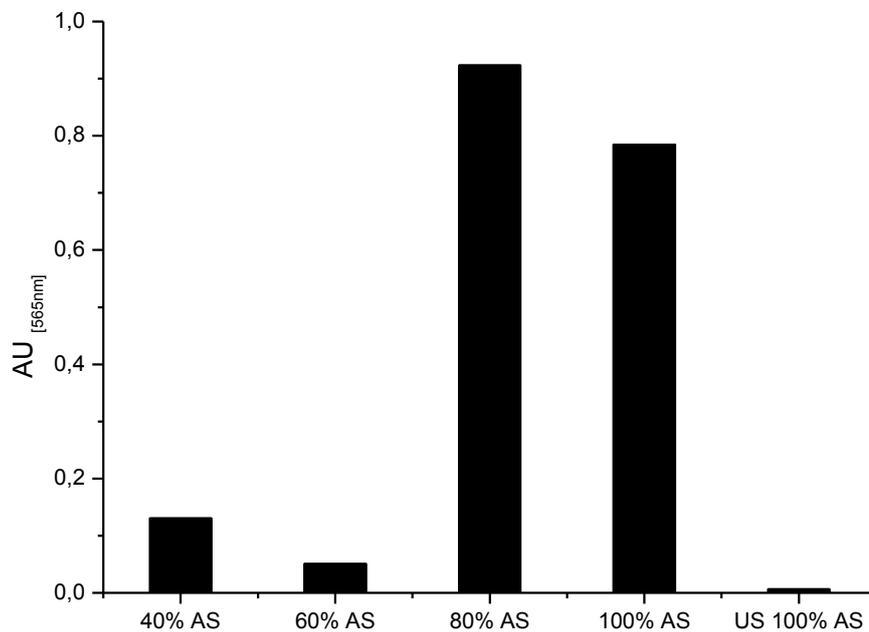


Abb. 3-4: Peroxidaseaktivität der AS-Fractionen gemessen mit Amplex Red

Je 500 μ g Protein wurden zu COX-Aktivitätspuffer mit 100 μ M Arachidonsäure und 50 μ M Amplex Red gegeben und 15min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben bei 565nm im Spektrophotometer gemessen.

Die 40%-AS-Fraktion; 60%-AS-Fraktion; 80%-AS-Fraktion; 100%-AS-Fraktion und der Überstand der 100%-AS-Fraktion wurden gemessen.

3.1.4 Chromatographie

Ionenaustausch-Chromatographie

Für die Ionenaustausch-Chromatographie (IEX) über eine ÄKTA FPLC wurde eine HiTrap SP Kationenaustauschersäule der Firma GE Healthcare verwendet. Dazu wurde die 70% AS-Fraktion gegen MES-Bindepuffer (s. 2.3.4.2) dialysiert und auf die HiTrap SP Säule gegeben. Anschließend wurde die Probe mit Elutionspuffer (s. 2.3.4.2) eluiert und gegen Tris-Puffer (s. 2.3.4.3) dialysiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mit Amplex Red gemessen und die Fraktionen mit Peroxidaseaktivität für die darauf folgende Gelfiltration vorbereitet. Die Peroxidaseaktivität wurde im Durchlauf der HiTrap SP Säule gemessen.

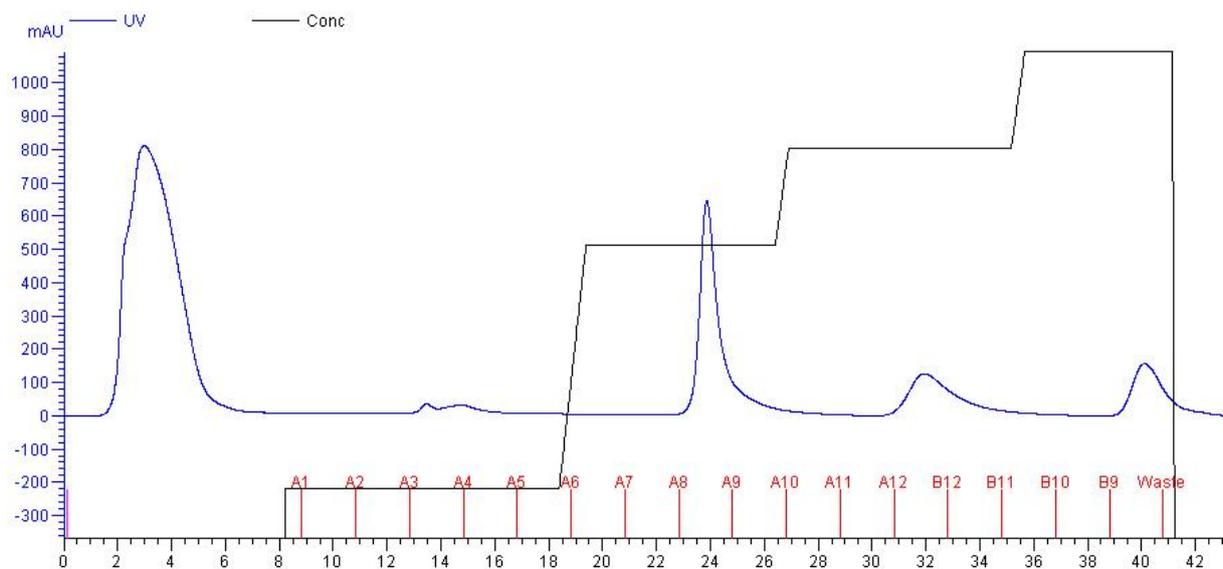


Abb. 3-5: Chromatogramm der Ionenaustausch-Chromatographie mit HiTrap SP

Lysat einer BF221-Kultur wurde mit 70% AS gefällt und gegen MES-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde in einer ÄKTA FPLC auf eine HiTrap SP Säule gegeben und mit einem Step-Gradient mit 50mM MES, 1M NaCl, pH 6,0 eluiert.

Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex G-200 HR 10/30 Säule der Firma GE Healthcare mit einem Bett-Volumen von 24ml. Nach der Equilibrierung der Säule mit Tris-Puffer (s. 2.3.4.3) wurde der Durchlauf der IEX-Chromatographie auf die Gelfiltrationssäule gegeben. Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen wieder mit Amplex Red gemessen. Die mit Amplex Red nachweisbare Peroxidaseaktivität der TbCOX fand sich in der ersten Peakfraktion wieder. Diese wurde für die darauffolgende Immunpräzipitation verwendet.

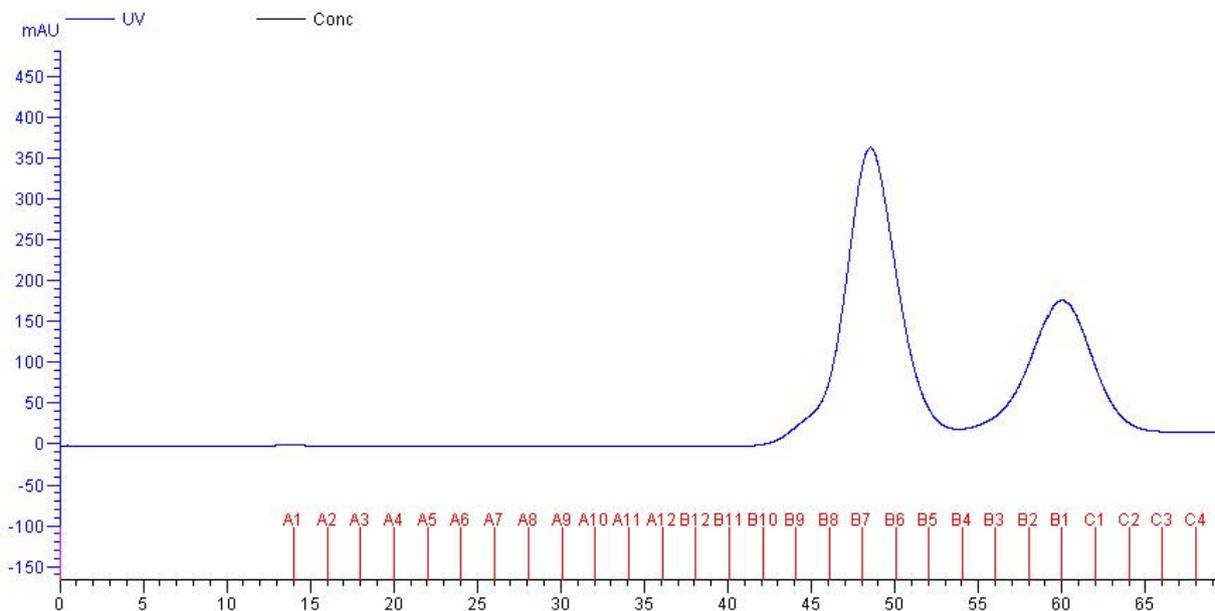


Abb. 3-6: Chromatogramm der Gelfiltration mit Superdex G-200 HR

Der Durchlauf der IEX-Fraktion wurde auf eine Superdex G-200 HR 10/30 Säule der Firma GE Healthcare gegeben und mit einer Flussrate von 0,2ml/min mit Gelfiltrationspuffer (s. 2.3.4.3) eluiert.

3.1.5 Immunpräzipitation mit Protein A gekoppelten MagBeads

Die Immunpräzipitation (IP) wurde wie unter 2.4.17.6 beschrieben durchgeführt. Dafür wurde die Peakfraktion der Gelfiltration über Nacht mit den an anti-COX-1 Antikörper gekoppelten MagBeads inkubiert und anschließend eluiert. Abb. 3-7 zeigt das eluierte Protein nach Bindung an anti-COX-1 Antikörper an MagBeads (1) und den Überstand nach der Bindung an die MagBeads (2).

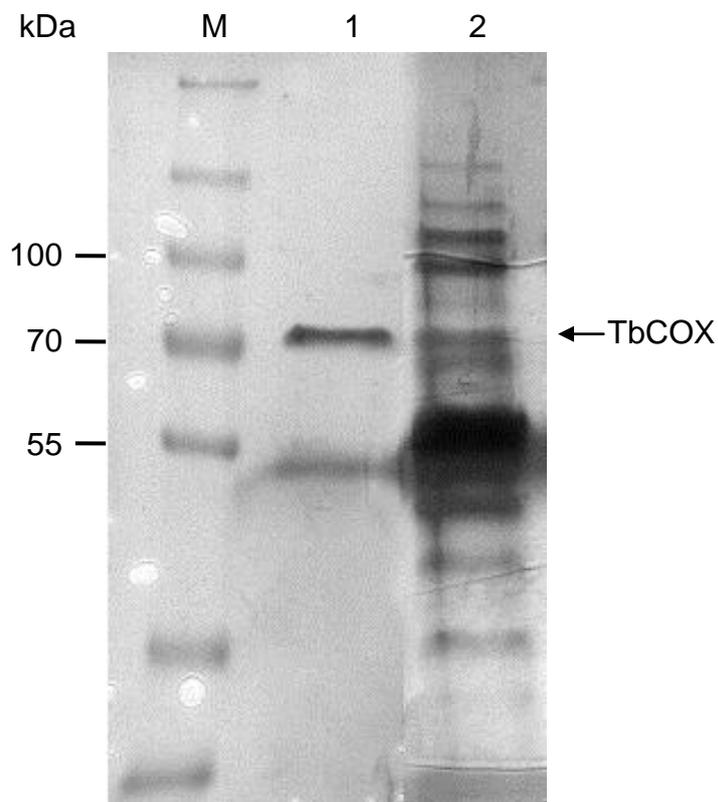


Abb. 3-7: SDS-Gel von TbCOX nach anti-COX-1 MagBeads-Protein A Immunpräzipitation

250µg MagBeads wurden mit Wasch- und Bindepuffer (s. 2.3.9) gewaschen. Zu den MagBeads wurden 2µg anti-COX-1 Antikörper gegeben und über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads wieder mit Bindepuffer gewaschen und zu 500µl Proteinlösung gegeben. Nach Inkubation von 1h bei RT wurden die Beads wieder mit Bindepuffer gewaschen und das gebundene Protein mit 50µl Elutionspuffer (s. 2.3.9) eluiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2,5µl 1M NaOH neutralisiert. Anschließend wurde eine SDS-PAGE mit dem eluierten Protein und dem Überstand nach der Bindung durchgeführt.

M) PageRuler #SM1811 (Fermentas); 1) Eluiertes Protein aus der 70% AS-Fraktion; 2) Überstand nach der Bindung an anti-COX-1 MagBeads-Protein A.

3.1.6 Massenspektrometrische Analyse

Die Proteinbande der eluierten Proteine aus der Immunpräzipitation wurde aus einem 10% SDS-Gel ausgeschnitten und an das Proteomcenter Tübingen gegeben. Hier wurde es verdaut und durch massenspektrometrische Verfahren durch ein LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer die Proteinbande analysiert. Tabelle 3-1 zeigt, dass acht der zehn intensivsten Peptide aus dem hypothetischen Protein Tb.427.10.13790 (TriTrypDB ID) hier als TbCOX beschrieben, stammen. Zusätzlich wurden Peptide des heat shock protein 83 (TriTrypDB ID: Tb427.10.10980) detektiert, das hier nicht weiter verfolgt wurde, da es kaum als *COX-like* Enzym in Frage kommt.

In Abb. 3-8 ist die Sequenz der TbCOX angegeben. Die durch die Massenspektrometrie detektierten Peptide sind rot eingefärbt.

id	MS/MS IDs	Sequence	Length	Mass	Proteins	PEP	Mascot Score	Intensity
614	878	TTDVVISR	9	988,55531	trD0A034	9,26E-08	63,25	3007500
581	827;828	TGVIDHLASPR	11	1164,6251	trD0A034	5,86E-09	60,03	1221800
377	534;535	LPSSLR	6	671,39662	trD0A034	0,17064	30,43	1134100
23	27;28	AILFLPK	7	800,51601	trD0A4N5	6,16E-05	39,57	981920
61	87	AVDALVR	7	742,43374	trD0A034	6,16E-05	53,73	934060
546	774;775	SLSLCFR	7	881,44292	trD0A034	0,4952	19,83	822990
242	335;336;337	IGACAPVVDIPR	12	1266,6754	trD0A034	4,78E-15	87,98	783610
520	738	SAFNIAK	7	749,40719	trD0A034	0,0076257	40,84	625090
4	5;6	ADLVNNLGTIAR	12	1255,6884	trD0A4N5	0,0020344	43,74	580570
121	170	EGEDAVNVVLER	12	1328,6572	trD0A034	0,00014838	71,94	426980

Tabelle 3-1: Identifizierung der Proteine in der IP-Bande

Die Proteinbande bei ca. 75kDa wurde aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und in 50% Ethanol dem Proteomcenter der Universität Tübingen übergeben. Dort wurden die Proteine verdaut und durch ein LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer analysiert. Nach Intensität geordnet konnten acht der zehn häufigsten Peptide der TbCOX zugeordnet werden.

trD0A034: Tb.427.10.13790 (TbCOX); trD0A4N5: Tb427.10.10980 (Heat shock protein 83)

```

MATIAELQQA IRDEKEKHEQ AMEELRSQRE SLASVVAEQQ
QYTQDIIMRV SELRGRKSQQ MLAGNAAPNF AEIDTGCKAV
DDILYSIEEG LETSTGKSSV VLGKILAAAV QAVVPGGDKK
PSTLSSSSSA TRTTDVVVIS RNEIRGTHEW VKKHCKKCTA
CGELNGRPRP WEPKKTDKG KSIKGNASAP NLRICIPGKNF
RSLSLCFRRE PCSGTVLELM RISAVVNVQG QSGEQITNPR
EVA AKITALV VEWVRKEMEN AREA AKKAPW CEDGEDGQKF
AVAVEMLLHN IDTRVEVFVI PPKNGGNVGG SNHVPMKINV
FVVSPLFLST LQPFVELWGN ERDREYMLQG LIKPAIKRIA
KLF GVDGVVD HGITVGLKAV DALVRMTKGK HFFEPTSPVK
SKSGRPSASQ PEQLIGFMHS VILAMSLLGT RIELECAVPD
LGDLDLEDA KRSAFNIAKA FLQRLLPPRQ DVAVSLTDPA
AADAVLWLRM MPTRMLEVLN NAFSSNSRLP SSLRTGVIDH
LASPRLKINY ALKNFSEIVI DIFRPYAPNS GMMTVEEKHK
GEKARIGACA PVVDIPRDIV RASAEAAAWA KDMQQELLKR
EAAGVNTKEG EDVNVVLER TKGDEIMANF LKEMQDLRLE
VVELLEFGCD VCLPFGVAMQ NGTTQPSEII YARVEGVRNA

```

Abb. 3-8: Sequenz-Coverage der Peptide für Tb.427.10.13790 (TbCOX)

3.2 Expression von rTbCOX in *E. coli*

3.2.1 Klonierung von rTbCOX

Die massenspektrometrische Analyse des Proteomcenters Tübingen ergab, dass Tb427.10.13790, im weiteren TbCOX genannt, das prominenteste Protein in der eluierten Fraktion ist. Daher wurde dieses Protein in *Rosetta2(DE3)pLysS E.coli* Zellen rekombinant exprimiert.

Dazu wurden eine PCR mit den unter 2.2.3 genannten Primern und gDNA aus BF221-Trypanosomen mit dem „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ der Firma Invitrogen durchgeführt. Die PCR wurde nach dem Herstellerprotokoll mit einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt und das PCR-Produkt mit einer Länge von 2125bp über ein 1% Agarosegel analysiert (Abb. 3-9). Nach Subklonierung in den, im „TOPO TA Cloning

Kit“ enthaltenen, pCR2.1 Vektor der Firma Invitrogen, wurde das TbCOX-Fragment mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten und über ein 1% Agarosegel gereinigt. Derselbe Verdau wurde mit dem Expressionsvektor pProEx HTa durchgeführt. Dieser enthält am 5'-Ende der *multiple cloning site* (MCS) (s. Abb. 3-10) die Sequenz für einen, dem exprimierten Protein N-terminal vorgeschalteten, His-Tag und eine Erkennungssequenz für die *tobacco etch virus*-Protease (TEV-Protease), um den His-Tag vom exprimierten Protein zu spalten. Anschließend wurden die beiden DNA-Fragmente mittels T4 DNA Ligase (Fermentas) ligiert und 5µl des Ligationsansatzes zur Transformation in *TOP10 E. coli* Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde von den gepickten Kolonien eine Restriktionsanalyse durchgeführt und korrekt ligierte Plasmide zur Expression in *Rosetta2(DE3)pLysS E. coli* Zellen verwendet.

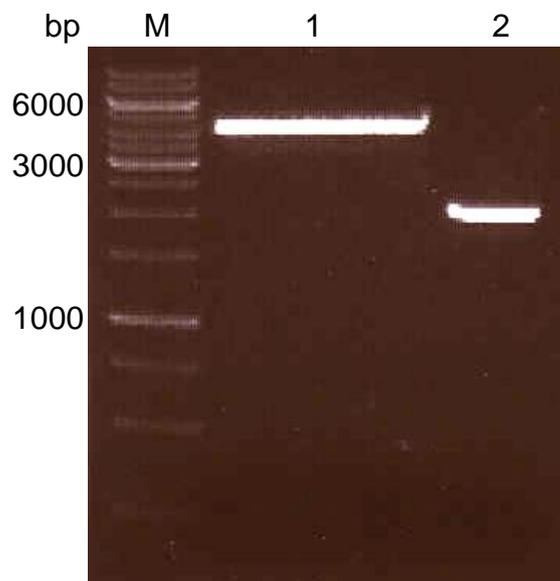


Abb. 3-9: 1% Agarosegel von pProEx HTa und TbCOX

Die PCR wurde mit dem „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ der Firma Invitrogen nach dem Herstellerprotokoll mit einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt. Nach Subklonierung in den, im „TOPO TA Cloning Kit“ enthaltenen, pCR2.1 Vektor der Firma Invitrogen, wurde das TbCOX-Fragment mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten und über ein 1% Agarosegel gereinigt. Derselbe Verdau wurde mit dem Expressionsvektor pProEx HTa durchgeführt.

M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1) pProEx HTa (4,8kb) nach *Bam*HI und *Hind*III-Verdau; 2) TbCOX (2,1kb) nach *Bam*HI und *Hind*III-Verdau

3.2.2 Expression von rTbCOX in *E. coli*

Die Expression von His-rTbCOX fand in *Rosetta2(DE3)pLysS E.coli* Zellen wie unter 2.4.18.1 beschrieben statt. Die Expression des Proteins führte, wie die Expression von rTbEndoG zum Einschluss in *inclusion bodies*. Nach Reinigung der *inclusion bodies* (s. 2.4.18.2) wurde die Proteinsuspension auf eine Ni-NTA-Säule zur Rückfaltung und anschließender Affinitätschromatographie gegeben. Die Peak-Fractionen der Elution wurden vereinigt und über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3-11). Das isolierte His-rTbCOX ist bei ca. 78 kDa als singuläre Bande zu erkennen.

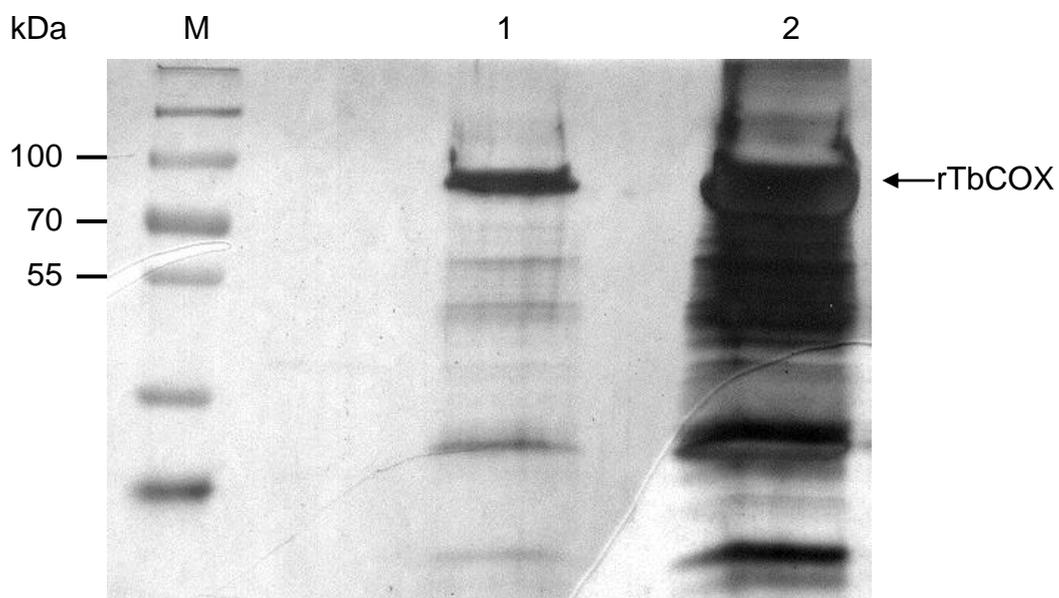


Abb. 3-11: SDS-Gel von His-rTbCOX

Bei einer OD_{600} von 0,8 wurden 0,5mM IPTG zur Induktion der Expression zu *BL21(DE3) E. coli* Zellen gegeben und für 5h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.000g für 10min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet bei -20°C gelagert. Nach der Isolierung der *inclusion bodies* wurde die Proteinsuspension über eine Ni-NTA Säule gegeben um reines His-rTbCOX zu erhalten.

M) PageRuler #SM1811 (Fermentas); 1) Ni-NTA Elution; 2) Zellysate nach *inclusion bodies* Isolierung

3.2.3 Aktivitätstest von rTbCOX mittels Dünnschicht-Chromatographie

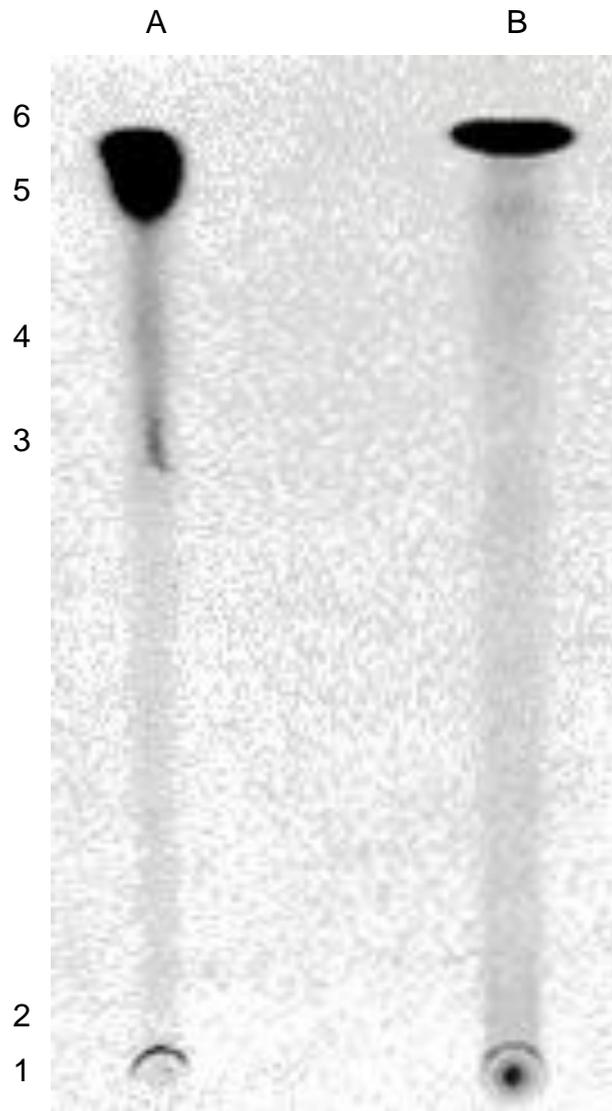


Abb. 3-12: Dünnschicht-Chromatographie von [¹⁴C]-markierter Arachidonsäure

2,5 μ Ci [¹⁴C]-Arachidonsäure und 200ng rekombinantes rTbCOX wurden zu COX-Aktivitätspuffer (s. 2.3.9) gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M HCl gestoppt. Anschließend wurden die Arachidonsäure-Metabolite mit Ethylacetat entsprechend 2.4.8 extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie analysiert.

1) Startpunkt, 2) PGE₂ und PGF_{2 α} , 3) PGD₂ und andere PG Metabolite; 4) PGH₂,
5) HETE (Hydroxyeikosatetraenoat), 6) Arachidonsäure;

A) Zelllysate nach *inclusion bodies* Isolierung; B) Ni-NTA Elution

3.3 Rekombinante Endonuklease G

3.3.1 Klonierung von rTbEndoG in *E. coli*

Zur Klonierung von rTbEndoG wurde Tb427.8.4040 als DNA-Template verwendet. Für die PCR wurde gDNA, die zuvor aus BF221 isoliert worden war und die unter (s. 2.2.3) aufgelisteten Primer mit dem „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Die PCR wurde nach dem Herstellerprotokoll mit einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt und das PCR-Produkt mit einer Länge von 1551bp über ein 1% Agarosegel analysiert (Abb. 3-13). Nach Subklonierung in den im „TOPO TA Cloning Kit“ enthaltenen pCR2.1 Vektor der Firma Invitrogen, wurde das TbEndoG-Fragment mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* ausgeschnitten und über ein 1% Agarosegel gereinigt. Derselbe Verdau wurde mit dem Expressionsvektor pProEx HTa durchgeführt. Anschließend wurden die beiden DNA-Fragmente mittels T4 DNA Ligase (Fermentas) ligiert (s. 2.4.7.8) und 5µl des Ligationsansatzes zur Transformation in „TOP10 competent *E. coli*“ Zellen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde von den gepickten Kolonien eine Restriktionsanalyse durchgeführt und korrekt ligierte Plasmide zur Expression in *BL21(DE3)*-Zellen verwendet.

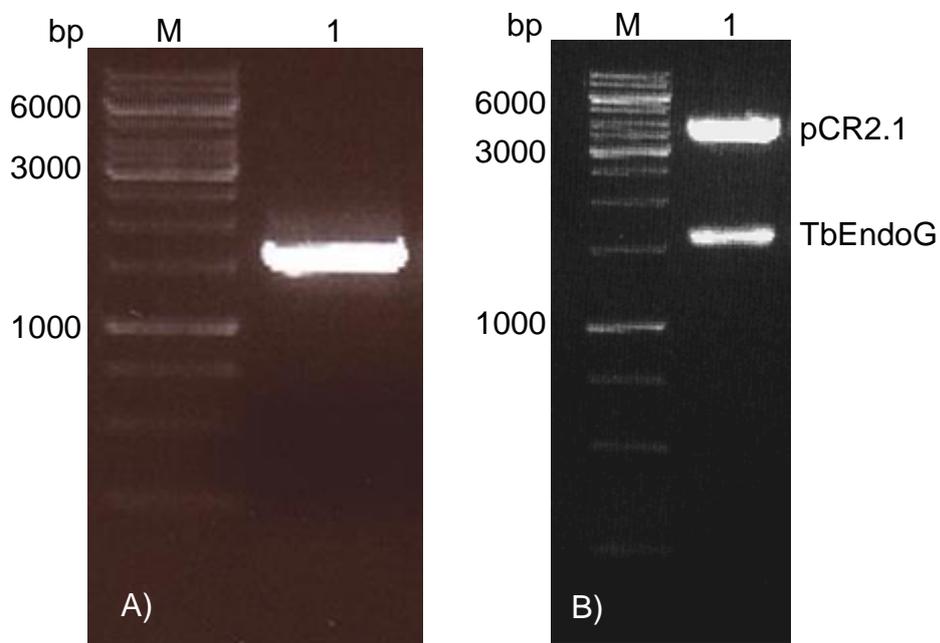


Abb. 3-13: 1% Agarosegele gefärbt mit *Midori Green DNA stain*

A) PCR von TbEndoG: M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1) PCR-Produkt von TbEndoG.
 B) Restriktionsverdau von pCR2.1-TbEndoG mit *EcoRI* und *NotI*: M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1) erhaltene Fragmente: pCR2.1 (3,9kb) und TbEndoG (1,6kb)

3.3.2 Expression und Aufreinigung von rTbEndoG in *E. coli*

His-rTbEndoG wurde wie unter (s. 2.4.19.1) beschrieben exprimiert. Die Expression des Proteins führte stets, auch mit unterschiedlichen Expressionsstrategien, wie dem Wechsel der Temperatur oder der IPTG-Konzentration sowie der Expression in anderen Vektoren (z.B. pET43 unter Fusion mit NusA (*N utilization substance A*)) zum Einschluss in *inclusion bodies*. Abb. 3-14 zeigt den Verlauf der Expression in *BL21(DE3) E.coli* Zellen nach Zugabe von 0,5mM IPTG. Nach Reinigung der *inclusion bodies* (s. 2.4.19.2) wurde die Proteinsuspension auf eine Ni-NTA-Säule zur Rückfaltung und Affinitätschromatographie gegeben. Die Peak-Fractionen der Elution wurden vereinigt und über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3-15). Das isolierte His-rTbEndoG ist bei ca. 66 kDa als singuläre Bande zu erkennen.

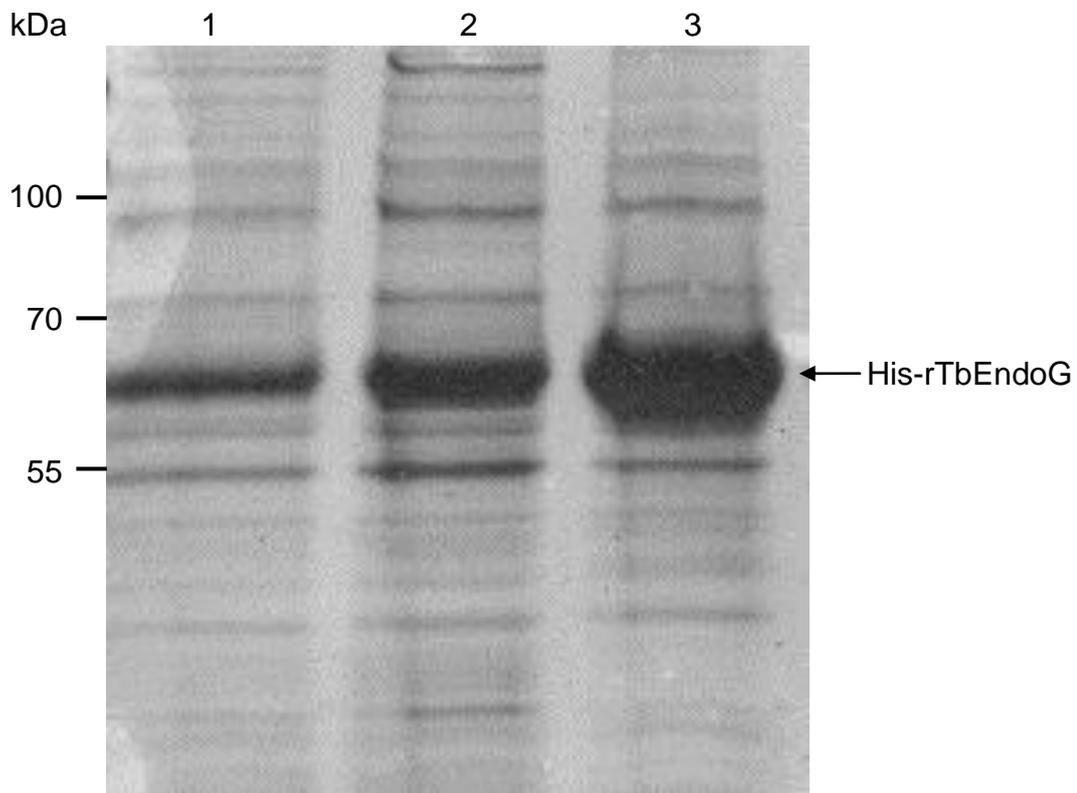
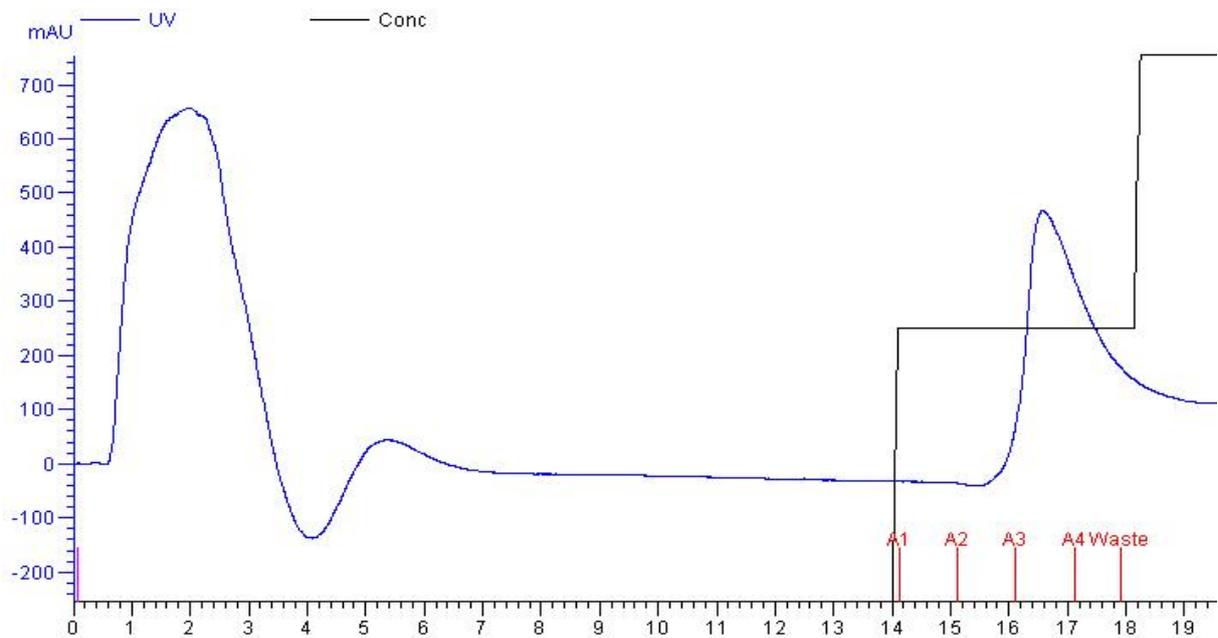


Abb.3-14: Überexpression von His-rTbEndoG in *E. coli*

Gezeigt ist ein 10% SDS-Trenngel, nach elektrophoretischer Trennung und Silberfärbung. *BL21(DE3) E.coli* Zellen mit dem Expressionsvektor pProEx HTa-rTbEndoG wurden bei 37°C in LB-Medium inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,5mM IPTG induziert und die Kultur weitere 5h inkubiert. Nach 2h (1), 3h (2) und 4h (3) wurden Aliquots für die SDS-PAGE entnommen. Die His-rTbEndoG Bande ist bei ca. 66 kDa zu erkennen.

A)



B)

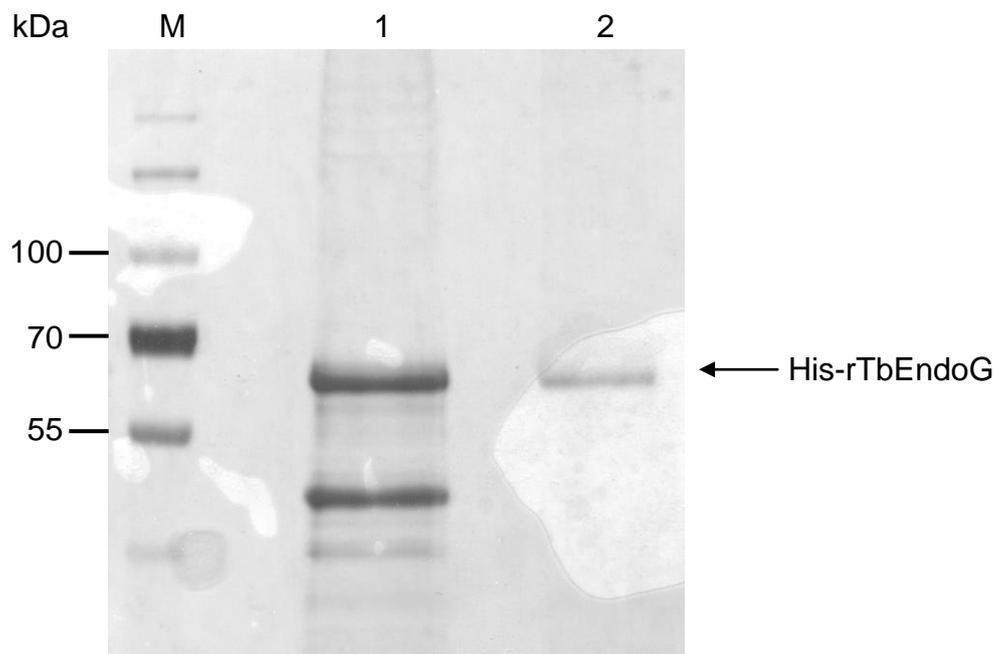


Abb. 3-15: Affinitätschromatographie und SDS-PAGE von rTbEndoG

A) Isolierung von His-rTbEndoG durch Ni-NTA. Die in IB-Solubilisierungspuffer gelöste Proteinsuspension wurde mit IB-Waschpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen. Nach der Elution gegen Elutionspuffer wurden die Peakfraktionen gesammelt. B) SDS-PAGE der His-rTbEndoG Fraktionen: M) PageRuler #SM0671 (Fermentas); 1) nach *inclusion bodies* Isolierung; 2) vereinte Peakfraktionen der Ni-NTA Elution.

3.3.3 Nukleaseaktivität von rTbEndoG

Das isolierte His-rTbEndoG wurde zur Aktivitätsbestimmung mit Plasmid-DNA wie unter (s. 2.4.19.5) beschrieben eingesetzt. Die Spaltprodukte wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert (Abb. 3-16). Nach der Affinitätschromatographie lag das Protein wieder in seiner nativen Konformation vor. Der Nukleaseaktivitätstest konnte zeigen, dass die verwendete Plasmid-DNA nach Inkubation mit His-rTbEndoG über Nacht komplett fragmentiert wurde.

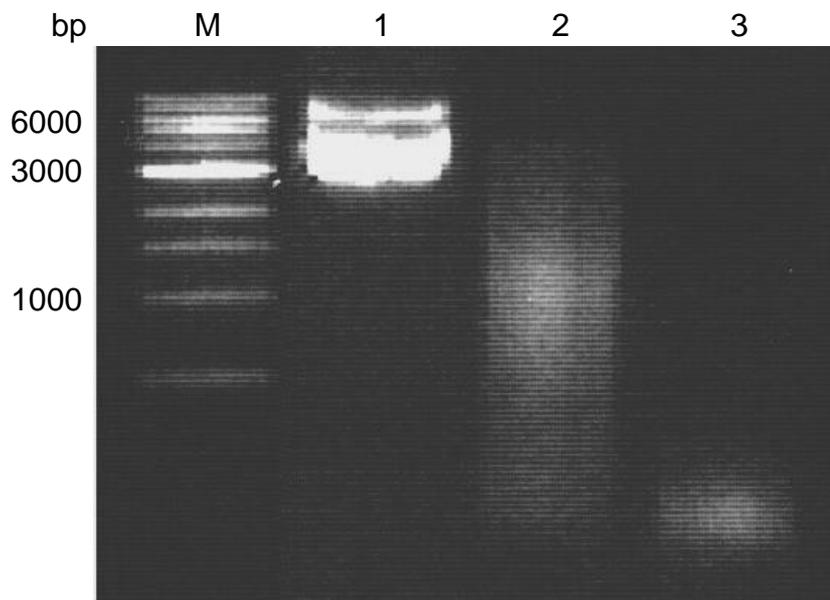


Abb 3-16: Nukleaseaktivität von rTbEndoG

1µg Plasmid-DNA wurde mit 200ng rTbEndoG bei 37°C in HEPES-Puffer inkubiert. Aliquots wurden nach 4h und 16h abgenommen und über ein 1% Agarosegel detektiert. M) 1 kb DNA Ladder (NEB); 1) Plasmid-DNA ohne rTbEndoG; 2) Fragmentierte Plasmid-DNA nach 4h; 3) Fragmentierte Plasmid-DNA nach 16h.

3.4 Endonuklease G in *T. brucei*

Um die Rolle der Endonuklease G bei der Apoptose in *T. brucei* zu untersuchen wurde Tb427.8.4040 in SMB-Zellen überexprimiert.

Es wurde auch ein polyklonaler Antikörper gegen rTbEndoG aus Ratte produziert. Dieser detektierte jedoch keine Proteinbande in trypanosomalen Lysaten. Auch ein Antikörper gegen LiEndoG aus *Leishmania infantum* (Arbeitsgruppe Jimenez-Ruiz, Madrid) konnte aufgrund zu niedriger Homologie (40%) nicht verwendet werden. Daher wurde zusätzlich ein eGFP exprimierendes Fusionsprotein in SMB-Zellen exprimiert. Dies sollte die Lokalisation sowie die Translokation von TbEndoG während der Apoptose in *T. brucei* mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigen.

3.4.1 Klonierung von TbEndoG in *T. brucei*

Zur Klonierung von TbEndoG und TbEndoG-eGFP wurde wie bei der Klonierung des rekombinanten TbEndoG, Tb427.8.4040 verwendet.

Mit der aus BF221-Trypanosomen isolierten gDNA wurde unter Verwendung der in 2.2.3 aufgelisteten Primern eine PCR mit dem „AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ (Invitrogen) durchgeführt. Auch hier wurde die PCR nach dem Herstellerprotokoll mit einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt und das PCR-Produkt über ein 1% Agarosegel analysiert (Abb. 3-17). Das PCR-Produkt wurde zur Subklonierung mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* (TbEndoG-over) bzw. *HindIII* und *PvuII* (TbEndoG-eGFP) wurde ein Restriktionsverdau der pCR2.1 Plasmide sowie der jeweiligen Vektoren pLew100v5-Hyg (TbEndoG-over) und pCO57 (TbEndoG-eGFP) durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden über ein 1% Agarosegel gereinigt, ausgeschnitten und ligiert. Danach wurden die beiden Vektoren mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert und für die Transformation in SMB-Zellen bei -20°C gelagert. Die beiden verwendeten Vektoren sind unter Abb. 3-18 dargestellt. Der Expressionsvektor pLew100v5-Hyg basiert auf der pLew100-Vektor-Reihe aus dem Labor von C. Clayton und liefert eine hohe Expressionsrate des gewünschten Proteins. Der Expressionsvektor pCO57 basiert auf dem Vektor pLew82 und exprimiert ein C-terminales eGFP-Fusionsprotein.

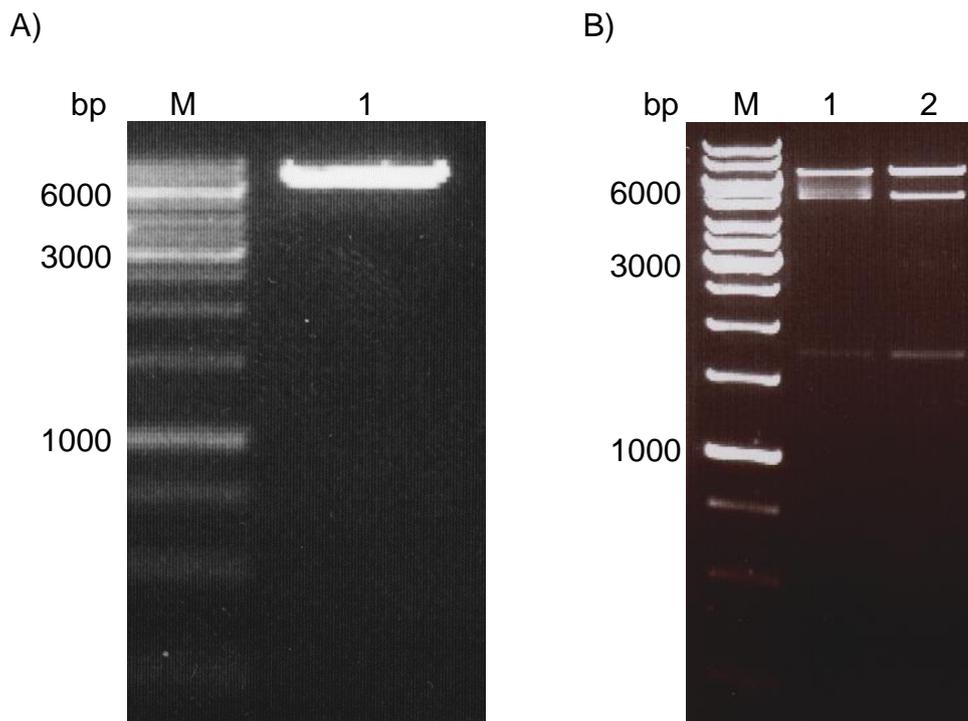


Abb. 3-17: 1% Agarosegele gefärbt mit *Midori Green DNA stain*

Restriktionsverdau von pLew100v5-Hyg mit *HindIII* und *BamHI* (A) und Testverdau von TbEndoG-eGFP in pCO57 (B). A: M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1) erhaltenes Fragment: pLew100v5-Hyg (8,3kb); B: M) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1) Testverdau von TbEndoG-eGFP Klon 1 in pCO57; 2) Testverdau von TbEndoG-eGFP Klon 2 in pCO57.

3.4.2 Herstellung von TbEndoG-Überexpressions-Trypanosomen

Die *NotI*-linearisierten Plasmide, pLEW100v5-Hyg-TbEndoG und pCO57-TbEndoG-eGFP, wurden zur Transformation mittels Elektroporation in SMB-Zellen eingesetzt. Dazu wurden $2,5 \times 10^7$ Zellen 10min bei 1.500g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10ml eisgekühltem Cytomix gewaschen, in 440µl Cytomix resuspendiert und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (2mm) überführt. Daraufhin wurden 10µl (10µg) *NotI*-linearisierter Vektor steril zugegeben, durchmischt und mit einem GenePulser XCell der Firma Bio-Rad ein Puls von 1,4kV mit 25µF und $\infty\Omega$ gesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden in 36ml vorgewärmtes HMI-9 Kulturmedium überführt, die Zellzahl bestimmt und dann 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden die Selektionsantibiotika zugegeben, die Kultur auf 24-well-Platten verteilt (1ml/well) und für mehrere Tage ungestört inkubiert.

Nachdem in einigen *wells* eine klonale Zelllinie gewachsen war, wurden 3 *wells* ausgewählt, die durch schrittweise Verdünnung mit HMI-9 Kulturmedium inklusive der Selektionantibiotika in größere Volumina überführt wurden. Die Generationszeit der TbEndoG-over- und TbEndoG-eGFP-Zellen wurde über drei Tage hinweg bestimmt. Sie betrug 24h (TbEndoG-over) bzw. 10h (TbEndoG-eGFP). Zusätzlich wurden Stablate für weitere Experimente angelegt.

3.4.3 Verifizierung der Expression von TbEndoG mittels Western Blot

Der Nachweis der Expression des TbEndoG-eGFP Fusionsproteins und des eGFP wurden anhand einer SDS-PAGE (s. 2.4.16.2) und anschließender Western Blot Analyse (s. 2.4.16.4) durchgeführt. Zur Detektion der eGFP-Proteine wurden ein Maus-Anti-GFP Antikörper der Firma Boehringer in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit Anti-Maus IgG HC+LC AP konjugierten Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1:15.000 in TBS. Durch die Umsetzung des BCIP durch die AP wurden die eGFP-Proteine auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht. Wie in Abb. 3-19 gezeigt werden sowohl die TbEndoG-eGFP Bande bei ca. 80kDa als auch die eGFP Bande bei 26,9kDa detektiert. Zusätzlich zu der erwarteten Bande bei ca. 80kDa trat eine weitere Bande bei ca. 27kDa in der TbEndoG-eGFP Probe auf.

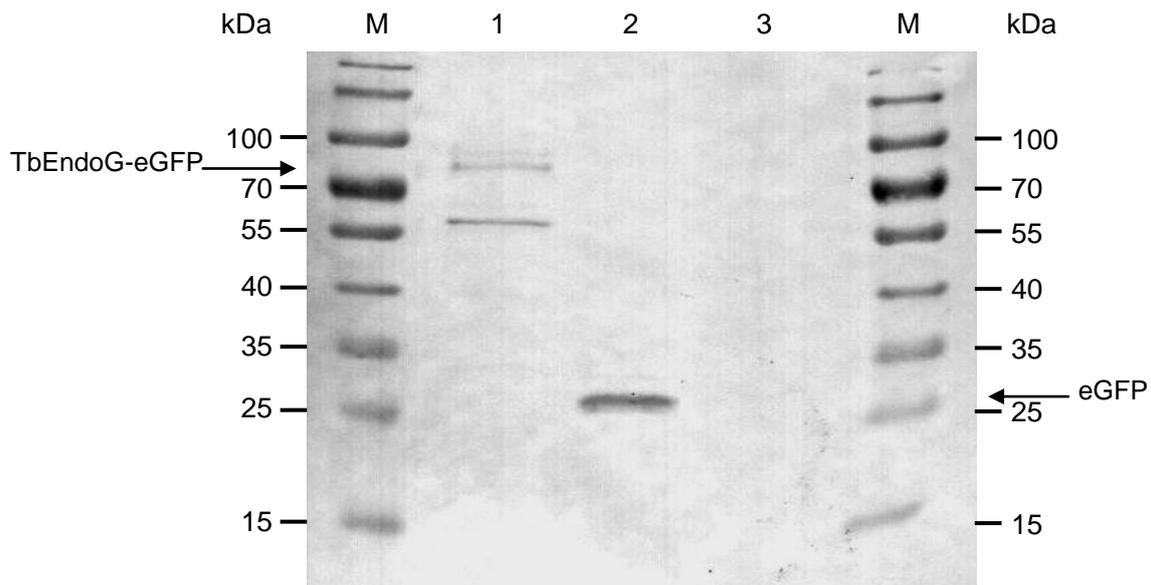


Abb. 3-19: Western Blot von *E. coli* Lysat mit anti-GFP- und anti-Maus IgG-Antikörpern

Rosetta2(DE3)pLysS E.coli Zellen mit den Expressionsvektoren pCO57-TbEndoG und pCO57 wurden bei 37°C in LB-Medium inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,5mM IPTG induziert und die Kulturen weitere 5h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und für die SDS-PAGE vorbereitet. Das TbEndoG-eGFP und das eGFP sind bei ca. 80 kDa und 27kDa zu erkennen.

M) PageRuler #SM0671 (Fermentas); 1) TbEndoG-eGFP; 2) eGFP; 3) *Rosetta2(DE3)pLysS E.coli* Kontrolle.

3.4.4 Fluoreszenz-Mikroskopie

TbEndoG-eGFP sowie eGFP exprimierende Trypanosomen wurden in HMI-9 Kulturmedium mit Hygromycin B und Phleomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und durch Zugabe von 10µg/ml Doxycyclin für 24h induziert. Die Fluoreszenz des eGFP konnte dann bei lebenden als auch bei fixierten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop mit grünem Filter beobachtet werden. Abb. 3-20 zeigt eGFP- und TbEndoG-eGFP-exprimierende Trypanosomen. Das eGFP ist über das gesamte Zytosol verteilt während TbEndoG-eGFP nur im Mitochondrium lokalisiert vorliegt.

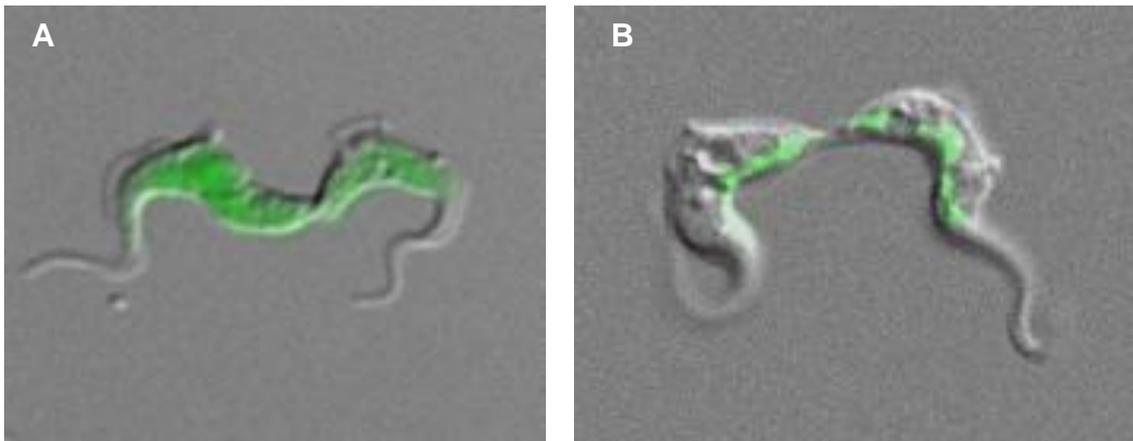


Abb. 3-20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFP exprimierenden Trypanosomen.

A) SMB-Zellen wurden in HMI-9 Medium 24h mit 10µg/ml Doxycyclin induziert und mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert. Das eGFP liegt im gesamten Zytosol vor. B) TbEndoG-eGFP exprimierende SMB-Zellen wurden in HMI-9 Medium 24h mit 10µg/ml Doxycyclin induziert und mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert. TbEndoG-eGFP liegt nur im Mitochondrium vor.

3.4.5 Wachstumskurven von TbEndoG-over, TbEndoG *knock down* und TbEndoG-eGFP Trypanosomen

Die Überexpression von TbEndoG in Trypanosomen führte zu keinem lichtmikroskopisch sichtbaren Phänotyp. Um die Generationszeit und Effekte der Überexpression zu untersuchen wurden Wachstumskurven der transfizierten Zellen aufgenommen. Dazu wurden die Zellen in HMI-9 Kulturmedium mit den jeweiligen Selektionsantibiotika gegeben und mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml angesetzt. Durch Zugabe von 10µg/ml Doxycyclin wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ die Expression des TbEndoG induziert. Die Zellen wurden dann zweimal täglich gezählt. Nach je 24h wurde den Zellkulturen 5µg/ml Doxycyclin zugegeben um eine Hemmung der Induktion zu vermeiden. Als Kontrolle wurden SMB-Trypanosomen verwendet. Auch hier wurde der Zellkultur 10µg/ml Doxycyclin zum Zeitpunkt $t = 0$ und alle weiteren 24h 5µg/ml Doxycyclin zugegeben. Für die Wachstumskurven mit TbEndoG-eGFP-Zellen wurde ebenso verfahren. Die Überexpression von TbEndoG führte in SMB-Zellen zu einer signifikanten Hemmung des Wachstums. Nach der Induktion der Expression mit Doxycyclin fand praktisch kein Wachstum der Zellkultur mehr statt. Da jedoch schon die nicht-induzierte Expression von TbEndoG mit dem Vektor pLew100v5Hyg „leaky“ war, wurden auch Wachstumskurven mit nicht-induzierten TbEndoG-over-Zellen aufgenommen. Abb. 3-21 zeigt die nicht-induzierten und induzierten TbEndoG-over-Zellen im Vergleich zu

TbEndoG *knock down*- und SMB-Zellen als Kontrolle. Die Generationszeit der SMB-Zellen beträgt 6-7h, die der nicht-induzierten TbEndoG-over-Zellen 22-24h. Bei induzierten TbEndoG-over-Zellen konnte keine Generationszeit mehr bestimmt werden, da sie innerhalb der ersten 48h starben. Auch die Expression des TbEndoG-eGFP führte zu einem gehemmten Wachstum gegenüber SMB-Zellen. Hier beträgt die Generationszeit 10-11h. Der *knock down* von TbEndoG führte zu keiner nennenswerten Veränderung des SMB-Zellen Wachstums.

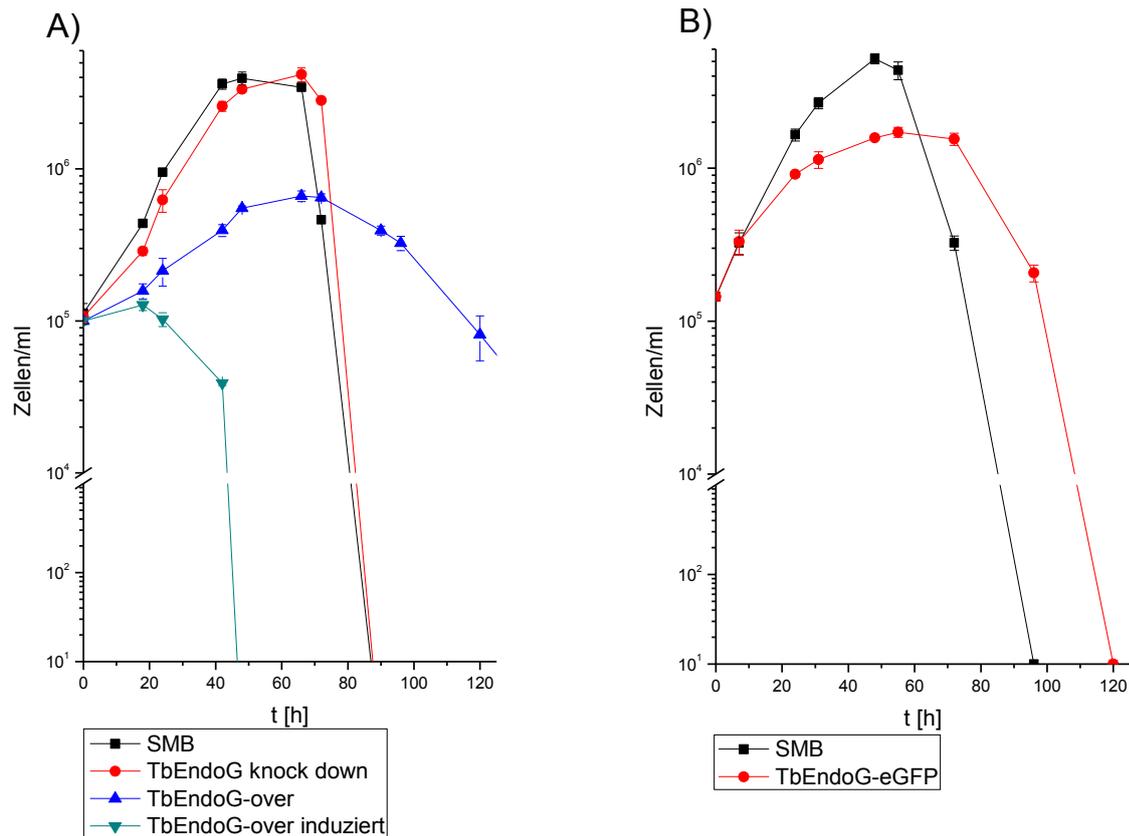


Abb. 3-21: Wachstumskurven von TbEndoG exprimierenden Trypanosomen

A) Trypanosomenkulturen wurden bei einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml mit $10 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert und zweimal täglich gezählt. TbEndoG *knock down*-Zellen (●) zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten wie SMB-Zellen (■). TbEndoG-over-Zellen (▲) sind auch ohne Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin stark im Wachstum gehemmt. Nach Induktion mit $10 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin starben die TbEndoG-over-Zellen innerhalb von 48h ab (▼).

B) TbEndoG-eGFP-Zellen (●) zeigen nach Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin eine Hemmung des Wachstum, die aber nicht so stark ausgeprägt ist, wie die Hemmung der TbEndoG-over-Zellen.

3.4.6 Verifizierung der Überexpression von TbEndoG mittels esiRNA

Ein weiterer *knock down* Ansatz für TbEndoG wurde mittels esiRNA durchgeführt. Hierbei werden durch den Einsatz von Endoribonuklease-behandelter siRNAs die mRNA von TbEndoG abgebaut. Auch diese Methode der RNA-Interferenz führte zu keiner nennenswerten Veränderung des Wachstums. Durch den Einsatz der Mission[®] esiRNA der Firma Sigma-Aldrich konnte jedoch der wachstumshemmende Effekt der TbEndoG-over-Zellen rückgängig gemacht werden. Dazu wurden 5µl (1µg) esiRNA mit der Targetsequenz CTCATGCCCACTGATACGTGCACTGTCATCCCACTTACTCCTTCTATTACACTTTG TGG der Zellkultur zugegeben, unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert und einmal täglich gezählt. Abb. 3-22 zeigt deutlich wie der Effekt der Überexpression durch den Einsatz von esiRNA gegen TbEndoG aufgehoben werden konnte.

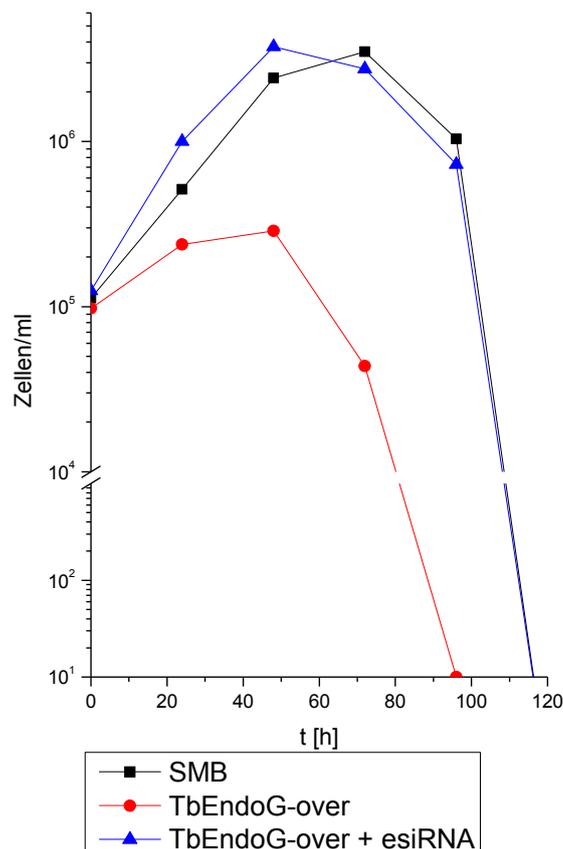


Abb. 3-22: Wachstumskurve von SMB-Zellen und TbEndoG-over-Zellen

Zu TbEndoG-over-Zellen wurden 5µl esiRNA gegeben und einmal täglich gezählt. Der Effekt der Wachstumshemmung in nicht-induzierten TbEndoG-over-Zellen (●) konnte durch die Zugabe von 5µl (1µg) esiRNA komplett aufgehoben werden (▲). Die Zellen zeigten dasselbe Wachstumsverhalten wie SMB-Zellen (■).

3.4.7 Induktion von Apoptose mit PGD₂ und Staurosporin in *T. brucei*

Auf der Suche nach weiteren Apoptose-Auslösern neben PGD₂ wurden Wirkstoffe, die in Leishmanien Apoptose auslösen getestet. Es wurden Camptothecin, Miltefosin und Staurosporin in unterschiedlichen Konzentrationen mit BF-221 Trypanosomen aus der logarithmischen und stationären Wachstumsphase inkubiert. Von den drei Wirkstoffen konnte nur Staurosporin (STS) einen frühzeitigen Zelltod der Trypanosomenkulturen induzieren. Auch morphologische Veränderungen traten nur in den STS-behandelten Zellen auf.

3.4.7.1 Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Staurosporin

Die IC₅₀ von STS wurde anhand des Zytotoxizitäts-Tests nach Bodley durchgeführt [Bodley *et al.*, 1995]. Dieser Test ist eine etablierte Methode zur Erfassung der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Konzentration toxischer Verbindungen. Nach 24h Inkubation von $2,5 \times 10^5$ Trypanosomen/*well* in einer STS-Konzentrationsreihe wurde die Saure-Phosphatase-Aktivität spektrometrisch bei 405nm bestimmt. Abb. 3-23 zeigt, dass durch den zytotoxischen Effekt von STS bei einer Konzentration von 7,6nM nach 24h 50% der maximalen Trypanosomendichte erhalten bleibt.

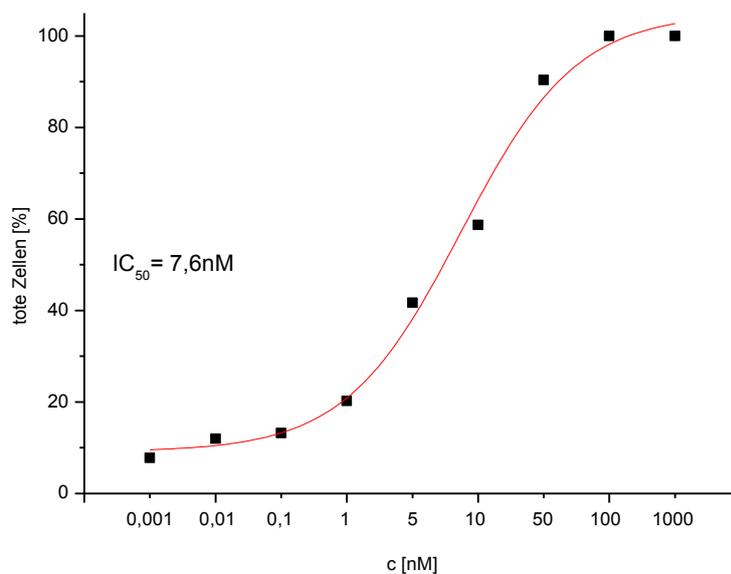


Abb. 3-23: IC₅₀ von Staurosporin

Die IC₅₀ wurde nach 24 h Inkubation mit STS durch die Saure-Phosphatase-Aktivität bei 405nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Konzentration bei der 50% der Zellen tot waren lag bei 7,6nM.

3.4.7.2 Proteinbiosyntheserate von STS-behandelten Trypanosomen

Um die *in vivo* Synthese von Proteinen zu untersuchen wurden SMB-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase für 2h mit 20nM STS inkubiert. Danach wurde die Zelldichte kontrolliert und die Zellen 15 und 30min mit [³⁵S]-Methionin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Proteine mit Aceton gefällt. Danach wurde die Radioaktivität der markierten Proteine im Flüssigszintillationszähler bestimmt (s. 2.4.11). In Abb. 3-24 ist der Gehalt an eingebautem [³⁵S]-Methionin gezeigt. Wie eindeutig zu erkennen ist verläuft die Proteinbiosynthese bei SMB-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase linear. Nach 15min wurden hier 898cpm nach 30min 2007cpm gemessen. In Zellen, die mit STS behandelt wurden kommt die Synthese bereits in dieser frühen Phase des Zelltods fast komplett zum Erliegen. Nach 15min wurden 298cpm und nach 30min 207cpm gemessen.

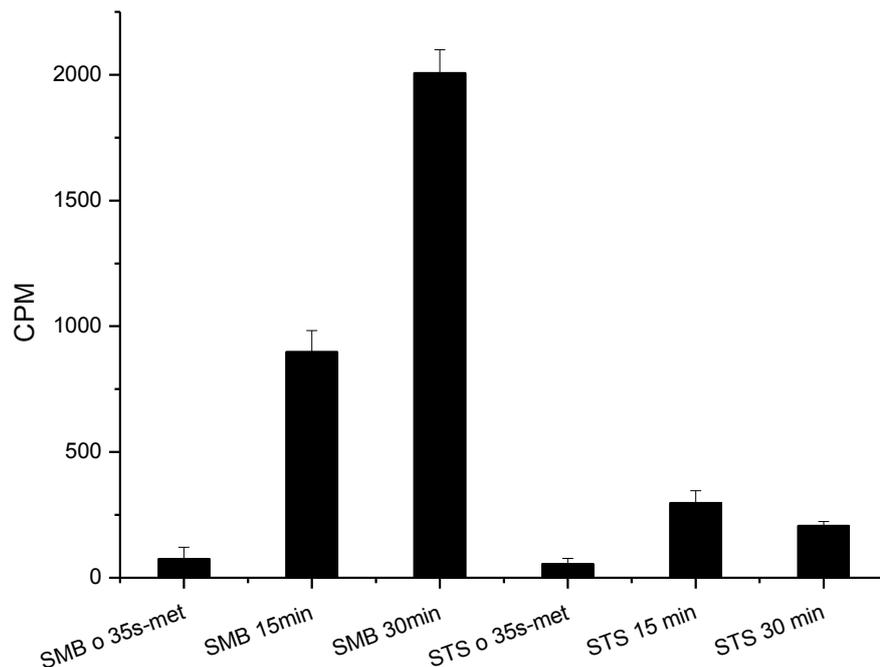


Abb. 3-24: Bestimmung der Proteinbiosyntheserate mit [³⁵S]-Methionin

Nach 2h Inkubation mit 20nM STS wurden die Trypanosomen mit [³⁵S]-Methionin für 15 und 30min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden SMB-Zellen in gleicher Weise behandelt.

3.4.8 Expression von TbEndoG nach Behandlung mit Prostaglandin D₂

Durch seine Translokation vom Mitochondrium in den Zellkern spielt EndoG eine entscheidende Rolle beim apoptotischen Zelltod höherer Eukaryonten, da es zur Fragmentierung von Chromatin-DNA führt. In *T. brucei* kann der Zelltod durch Prostaglandin D₂ als auch mit Staurosporin induziert werden. Die *in vivo* Synthese von TbEndoG unter PGD₂ Einwirkung wurde wie unter 2.4.20.4 mittels RT-qPCR analysiert. Der mRNA-Gehalt der EndoG in SMB-Zellen wurde entsprechend dem Gehalt an Tubulin auf 100% gesetzt. Nach Inkubation mit 10 µM PGD₂ für 24h lag der Gehalt an EndoG-mRNA in SMB-Zellen bei 298%. Im Vergleich dazu wurden TbEndoG-over-Zellen mit 10µg/ml Doxycyclin und 10 µM PGD₂ inkubiert. Der Gehalt an EndoG-mRNA fiel hier von 896% ohne PGD₂ auf 717% mit PGD₂ da vermutlich bei einer Überexpression keine weitere Steigerung mehr möglich ist.

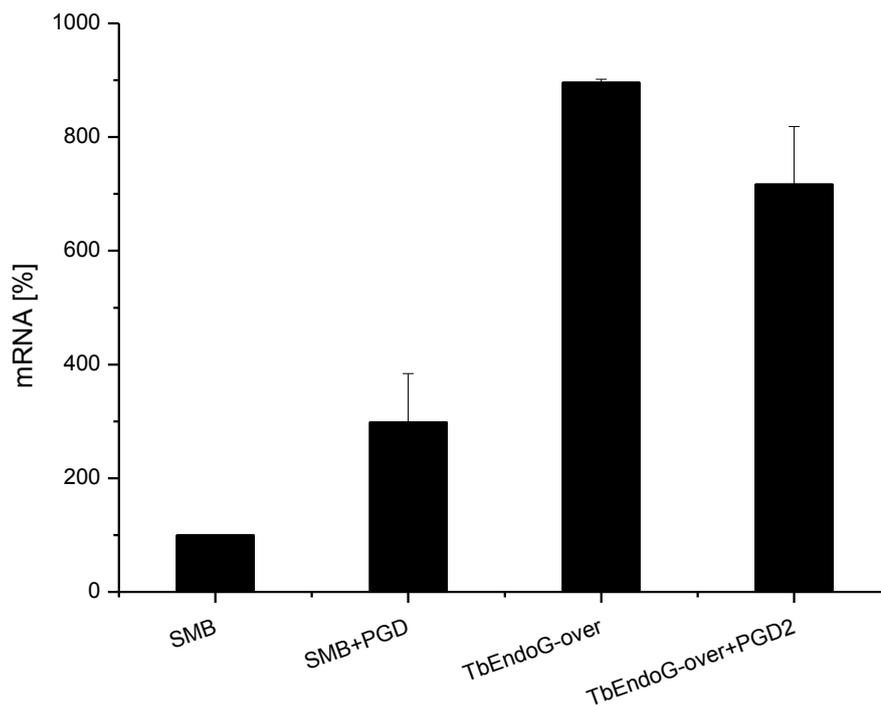


Abb. 3-25: RT-qPCR von EndoG in SMB und TbEndoG-over-Zellen

SMB- und TbEndoG-over-Zellen wurden in HMI-9 Medium kultiviert und mit 10µg/ml Doxycyclin induziert. Zusätzlich wurden die Zellen für 24h mit 10µM PGD₂ inkubiert. Nach der RNA-Isolierung wurden jeweils 100ng RNA zu den RT-qPCR Ansätzen gegeben und in einem Lightcycler 480 der Firma Roche analysiert.

3.4.9 Wachstumskurve von SMB-Trypanosomen nach Behandlung mit Prostaglandin D₂ und Staurosporin

Nicht nur die Überexpression von TbEndoG, sondern auch die Induktion des Zelltodes mit PGD₂ bzw. STS führen zur Hemmung des Wachstums bei *T. brucei*. Abb. 3-26 zeigt die Wachstumskurven von SMB-Zellen, die mit PGD₂ und STS behandelt wurden. Dazu wurde eine SMB-Vorkultur auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt und auf drei Kulturflaschen aufgeteilt. Zu einer Kultur wurden dann 10µM PGD₂ zur anderen Kultur 10nM STS zugegeben. Anschließend wurden die Zellkulturen zweimal täglich gezählt.

Unter normalen Kulivierungsbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ wachsen SMB-Zellen ca. 40h logarithmisch bis auf eine Zelldichte von ca. 3×10^6 Zellen/ml. In dieser stationären Phase verweilen sie weitere 24h bis sie rasch absterben. Nach ca. 96h sind keine lebenden Zellen mehr in der Kultur zu beobachten. Bei Zugabe von 10µM PGD₂ zum Startpunkt einer SMB-Kultur war eine leichte Hemmung des Wachstums zu beobachten. Die Zellen wuchsen innerhalb 24h nur auf eine Zelldichte von $6-7 \times 10^5$ Zellen/ml und starben danach schnell ab. Nach 48h enthielt die Kultur kaum noch lebende Zellen. Die Zugabe von 10nM STS führte bei SMB-Zellen zu einem frühzeitiger einsetzenden Tod als mit PGD₂. Die Zellpopulation durchlief höchstens eine Zellteilung bevor sie sehr schnell starb. Nach 24h waren hier noch 50% der Zellen am Leben. Nach 40h waren keine lebenden Zellen mehr zu beobachten.

PGD₂ hatte auf die Zellen der logarithmischen Wachstumsphase einen geringeren wachstumshemmenden Effekt als STS. In STS-induzierten Kulturen waren bereits nach 32h keine lebenden Zellen mehr zu finden, in PGD₂-induzierten Kulturen waren nach 56h keine lebenden Zellen mehr enthalten. Die Kontrollkulturen überlebten hingegen ca. 90-100h.

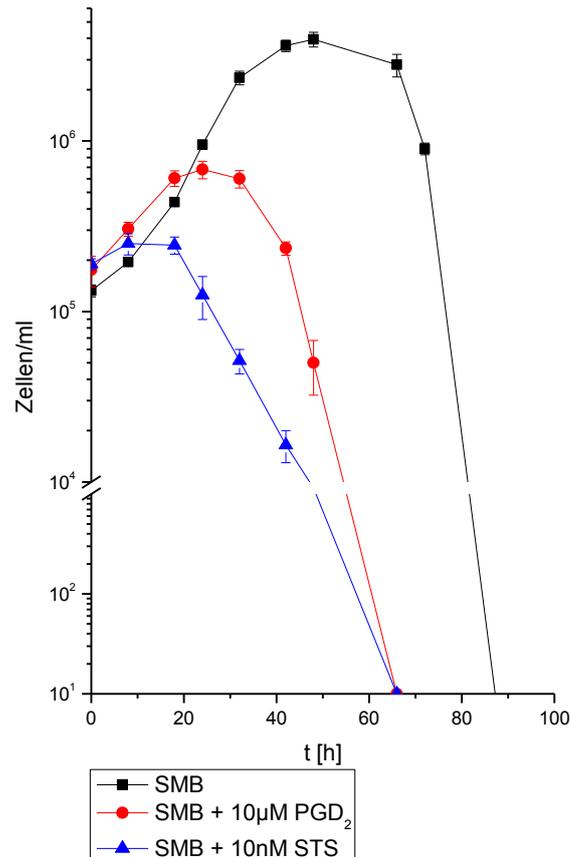


Abb. 3-26: Wachstumskurve von SMB-Zellen nach Zugabe von PGD₂ und STS

2 x 10⁵ Zellen/ml wurden mit 10µM PGD₂ und 10nM STS induziert. Die Kulturen wurden zweimal täglich gezählt. Der hemmende Effekt von PGD₂ auf das Wachstum der Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase ist geringer als der Effekt von STS. In STS-induzierten Kulturen (▲) sind nach 32h keine lebenden Zellen mehr zu finden, in PGD₂-induzierten Kulturen (●) sind nach 56h keine lebenden Zellen mehr enthalten. SMB-Kontrollzellen (■) überleben ca. 90-100h.

3.4.10 Morphologische Untersuchungen nach Behandlung mit Prostaglandin D₂ und Staurosporin

Zellen die sich einem apoptotischen Zelltod unterziehen weisen typische morphologische Veränderungen auf [Figarella *et al.*, 2005]. Um zu untersuchen, ob die Einwirkung von PGD₂ oder STS diese Art von Veränderungen auch in Trypanosomen induzieren kann, wurden die Zellen nach 24h Inkubation mit den jeweiligen Wirkstoffen für die Lichtmikroskopie, Transmissions- (TEM) und Raster- Elektronenmikroskopie (REM) präpariert.

3.4.10.1 Morphologie von PGD₂-behandelten Trypanosomen

Wie bei Figarella *et al.* bereits gezeigt wurde, treten nach der Induktion der Apoptose mit PGD₂ unterschiedliche morphologische Veränderungen in Trypanosomen auf. Darunter ist eine erhöhte Anzahl an Zellen mit zwei oder mehreren Flagellen bei nur einem Nukleus zu beobachten oder auch Zellen mit mehr als einem Flagellum pro Flagellumtasche. Es treten aber auch typische Apoptose-Merkmale wie DNA-Fragmentierung, Dilatation des Mitochondriums, Vergrößerung der Flagellumtasche und eine Zunahme von vakuolären Strukturen auf.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass in Trypanosomen unter PGD₂-Einwirkung ein Auflaufen im Zellzyklus stattfindet, bei dem die Bildung eines neuen Flagellums ohne Teilung des Zellkerns erfolgt [Ploubidou *et al.*, 1999].

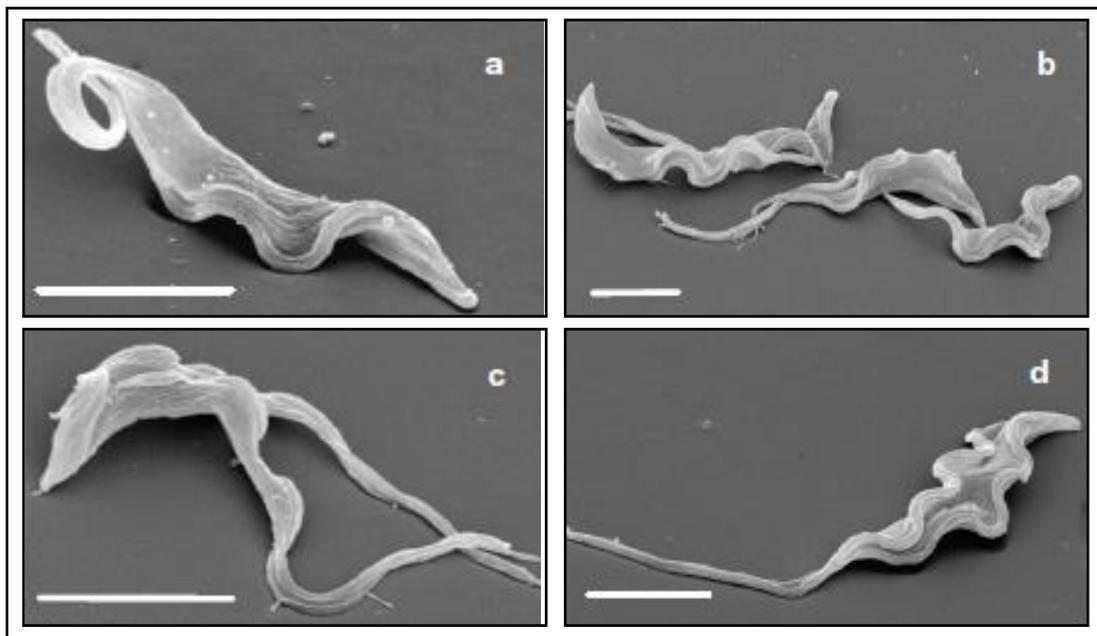


Abb. 3-27: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit PGD₂ behandelten Blutformen
REM-Aufnahmen der PGD₂-behandelten BF221-Trypanosomen zeigen einen ungewöhnlich hohen Anteil an Zellen, die sich in einem Stadium der Zellteilung mit zwei oder mehrere Flagellen befinden (b-d). Zum Vergleich eine unbehandelte Zelle (a). Maßstab: 5µm.

Quelle: [Figarella *et al.*, 2005].

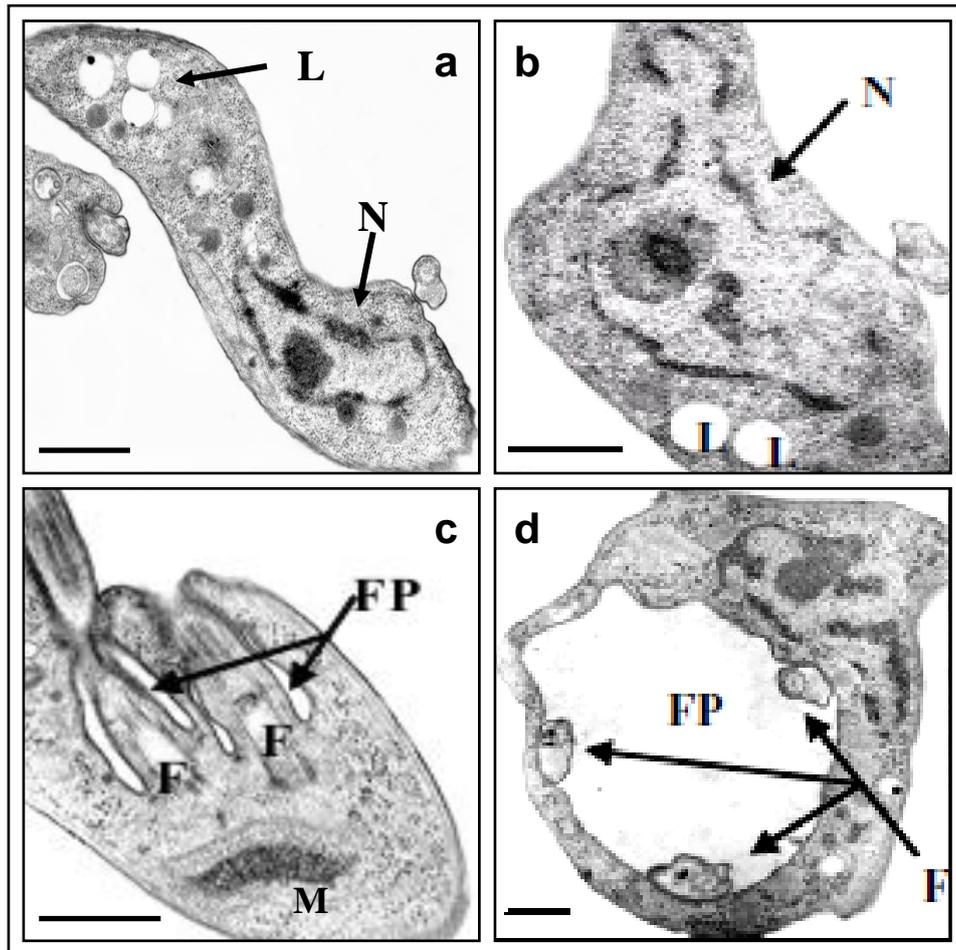


Abb. 3-28: Transmissions-EM Aufnahmen von mit PGD₂ behandelten Trypanosomen

Kulturen von BF221-Trypanosomen wurden nach Inkubation mit 10µM PGD₂ (24 h) für die TEM fixiert. In den TEM-Aufnahmen ist eine Erhöhung der Lysosomenzahl (a), welche häufig elektronendichtes Material enthalten und fragmentierte DNA der Zellkerne (b) zu erkennen. Auch die erhöhte Anzahl (zwei oder mehr) an Flagellen pro Flagellumtasche (c und d) ist in diesen Zellen auffällig.

AC: Acidocalcisom; F: Flagellum; FP: Flagellumtasche; G: Glykosom; L: Lysosom; M: Mitochondrium; N: Nukleus. Maßstab: 0,5µm.

Quelle: [Figarella *et al.*, 2005]

3.4.10.2 Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels Lichtmikroskopie

BF221-Trypanosomen wurden in BF-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und nach Zugabe von 10nM STS einige Stunden inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde je ein Tropfen der Zellsuspension ohne Fixierung auf einen Objektträger aufgetragen und im Lichtmikroskop betrachtet.

Abb. 3-29 zeigt die morphologische Veränderung einer Zelle unter STS-Einwirkung. Hauptmerkmal der STS-Wirkung ist die Vergrößerung der Flagellumtasche und der damit einhergehenden Abrundung des Zellkörpers.

Im Endstadium besteht die gesamte Zelle praktisch nur noch aus einer Flagellumtasche mit einer dünnen Hülle, dem Zytoplasma. Diese morphologischen Veränderungen waren mit einem signifikanten Verlust der Motilität der Zellen verbunden. Zudem verlor das Flagellum im Laufe dieses Prozesses seine Verbindung zur Plasmamembran.

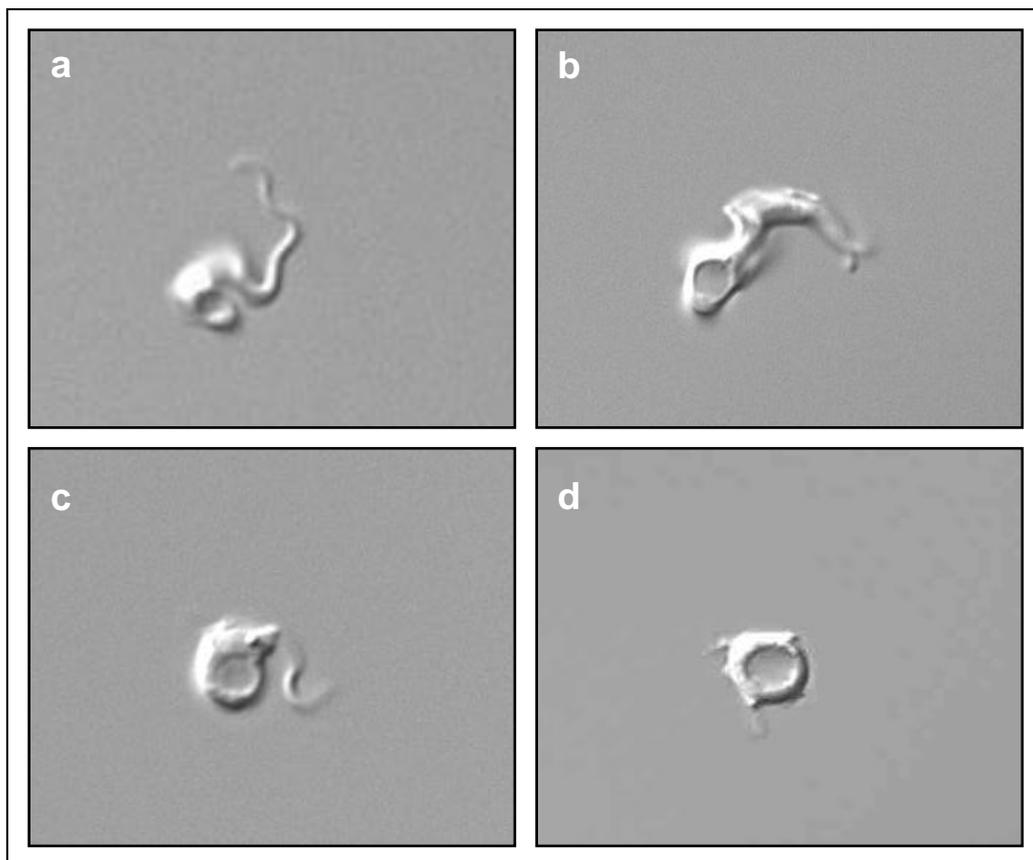


Abb. 3-29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit Staurosporin behandelten Trypanosomen

Im zeitlichen Verlauf des zytotoxischen Effekts von STS auf Trypanosomen ist die Vergrößerung der Flagellumtasche am besten zu erkennen. Weiterhin sind das Abrunden des Zellkörpers und eine Verminderung der Motilität zu beobachten. Vergrößerung: 400x

3.4.10.3 Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels REM

Die lichtmikroskopischen Beobachtungen wurden durch die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bestätigt. Abb. 3-30 zeigt Trypanosomen, die 24h mit 10nM STS inkubiert worden waren. Nach anschließender Fixierung wurden die Zellen für die REM eingebettet (s. 2.4.12).

Der abgerundete Zellkörper ist gut zu erkennen. Durch die Prozesse der Einbettung konnte jedoch die plastische Form der Zellen, die unter dem Lichtmikroskop sehr gut zu erkennen war, in der REM leider nicht so stark beibehalten werden.

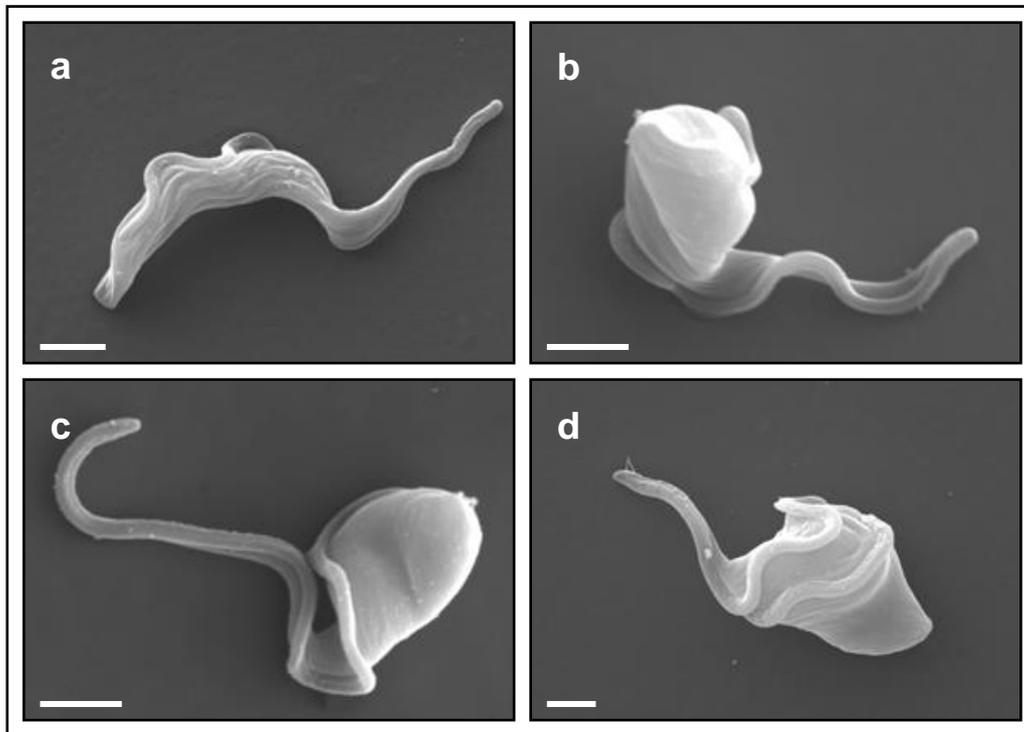


Abb. 3-30: Raster-EM Aufnahmen von mit Staurosporin behandelten Trypanosomen

Im Vergleich zu unbehandelten SMB-Zellen (a) ist bei Zellen, die mit STS behandelt wurden ein stark abgerundeter Zellkörper zu erkennen (b-d). Dies ist auf die massive Erweiterung der Flagellumtasche zurückzuführen. Maßstab: 2µm

3.4.10.4 Morphologie von STS-behandelten Trypanosomen mittels TEM

Um Veränderungen der Organellen in den Parasitenzellen zu erkennen, wurden mit STS behandelte Zellen für die TEM eingebettet und die Ultradünnschnitte unter dem Elektronenmikroskop betrachtet (s. 2.4.12). Bei der Induktion des Zelltodes mittels STS konnten ähnliche morphologische Veränderungen in Trypanosomen beobachtet werden wie bei der Induktion mit PGD₂. Auch hier trat ein dilatiertes Mitochondrium auf, der Zellkern wurde segmentiert und eine Zunahme von vakuolären Strukturen wurde beobachtet. Bei STS-Induktion war zusätzlich die Erweiterung der Flagellumtasche signifikant gesteigert. Bereits nach 2-3h rundeten die Zellkörper der Trypanosomen lichtmikroskopisch erkennbar ab. TEM-Untersuchungen konnten belegen, dass der Zellkörper in diesem Stadium von der gesamten

Flagellumtasche ausgefüllt ist und sich die Organellen im Zytosol in einer nur noch dünnen „Hülle“ um die Flagellumtasche, in der sich auch kleine Vesikel sowie weiteres Zellmaterial ansammelte, befanden. Das Auftreten von Zellen mit mehreren Flagellen, wie nach PGD₂-Behandlung, konnte unter der Einwirkung von STS nicht beobachtet werden.

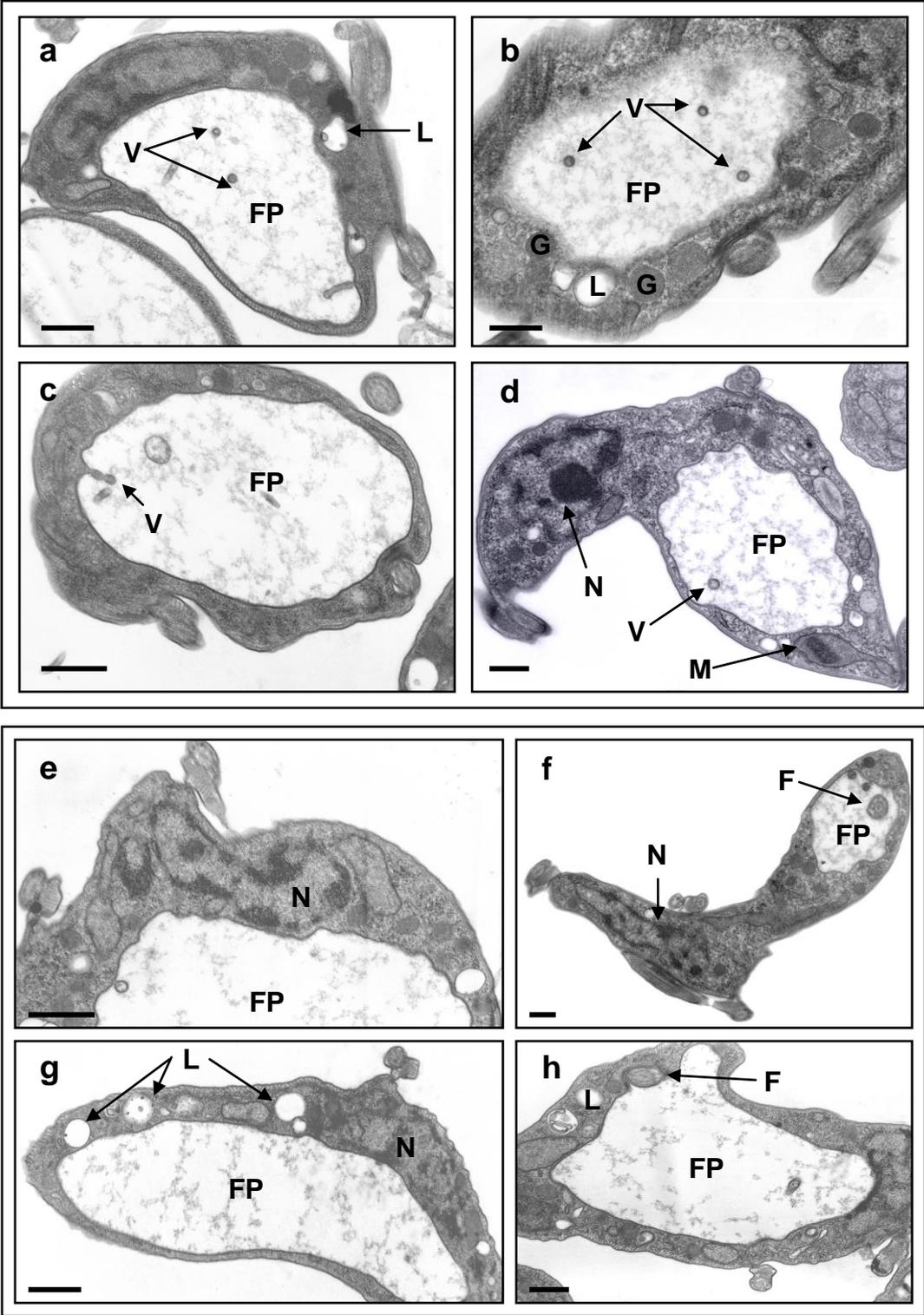


Abb. 3-31: Transmissions-EM-Aufnahmen von mit Staurosporin behandelten Trypanosomen

(a-h) TEM-Aufnahmen von STS-induzierten Trypanosomen. Nach der Induktion des Zelltodes mit 10nM STS konnten stark vergrößerte Flagellartaschen beobachtet werden (a-h), welche z. T. mit Vesikeln angereichert sind (a-f). Es kommt auch zu ungewöhnlichen Abschnürungen ins Innere der Flagellumtasche (a, c, e) und einer erhöhten Anzahl an Lysosomen.

AC: Acidocalcisom; F: Flagellum; FP: Flagellumtasche; G: Glykosom; L: Lysosom; M: Mitochondrium; N: Nukleus; V: Vesikel. Maßstab: 0,5µm

3.4.10.5 Morphologie von TbEndoG-over Trypanosomen mittels TEM

Da die Überexpression von TbEndoG in Trypanosomen zu einer starken Hemmung des Wachstums führte, wurden auch diese Zellen für die TEM eingebettet. Dazu wurden TbEndoG-over Kulturen mit 10µg/ml Doxycyclin für 24h inkubiert um die Expression der TbEndoG zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen für die TEM-Einbettung wie unter 2.4.12 beschrieben vorbereitet. Abb. 3-32 zeigt, dass die Überexpression der trypanosomalen Endonuklease G zu einer signifikanten Zunahme von Glykosomen und Lysosomen in den Zellen führte. Zudem konnten auch vergrößerte Acidocalcisomen, die einen stark erhöhten Anteil an Ca²⁺-Phosphaten enthielten sowie DNA-Fragmentierung im Zellkern beobachtet werden.

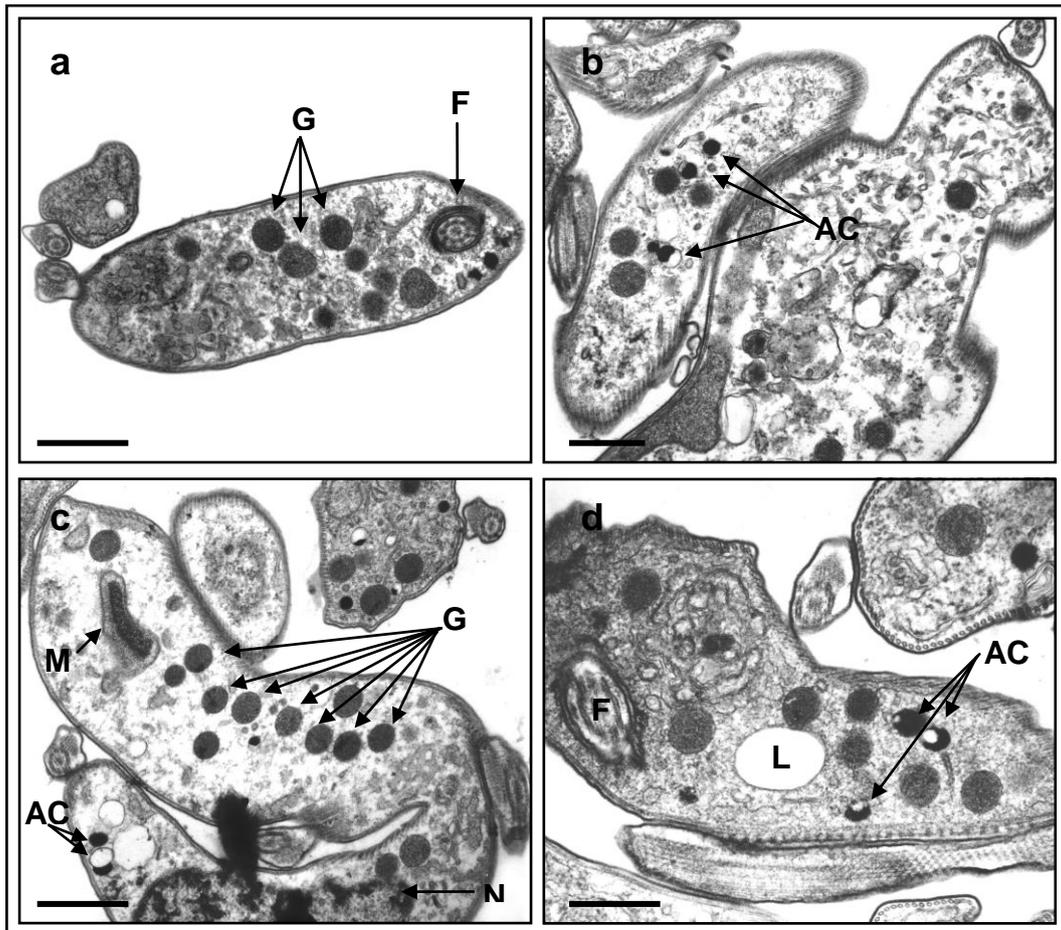


Abb. 3-32: TEM-Aufnahmen von TbEndoG-over Trypanosomen

(a-d) Transmissions-EM-Aufnahmen von TbEndoG überexprimierenden SMB-Zellen. Es kann eine stark erhöhte Anzahl an Glykosomen und eine starke Erhöhung an, mit Phosphaten angereicherten Acidocalcisomen, erkannt werde. Auch fragmentierte Zellkerne sind in den TbEndoG-over-Zellen vermehrt zu beobachten.

AC: Acidocalcisom; F: Flagellum; G: Glykosom; M: Mitochondrium; N: Nukleus. Maßstab: 0,5 μ m

3.4.11 Durchflusszytometrie

3.4.11.1 Untersuchung des Zelltodes nach Behandlung mit PGD₂ und Staurosporin mittels Durchflusszytometrie

Apoptose bei höheren Eukaryonten kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Der typische intrinsische Apoptoseweg oder auch Apoptose Typ II genannt, läuft über die Induktion von Caspasen ab, einer Familie von Proteasen, die der Gruppe der Kinetoplastidae, bis auf Caspase-ähnliche Enzyme, den sogenannten Metacaspasen, fehlen [Szallies *et al.*, 2002]. Die

Metacaspasen spielen jedoch keine Rolle bei der Apoptose. Bei *T. brucei* konnte dies durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren gezeigt werden. Sie konnten die PGD₂-induzierte Apoptose nicht hemmen [Helms *et al.*, 2006].

Ein frühes Merkmal dieses induzierten Apoptose-Mechanismus` ist der flip-flop von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran. Zeitgleich erfolgt im Inneren der Zelle die Schädigung des Mitochondriums, z.B. durch ROS. Darauf folgt typischerweise die Freisetzung mitochondrialer pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, Smac/DIABLO, AIF oder EndoG aus dem Intermembranraum. Der Aktivierung der Caspasen und der darauf folgenden Caspase-Kaskade folgt auch die Aktivierung Caspase-aktivierender DNasen (CAD), die den Abbau genomischer DNA zur Folge hat.

Diese Parameter werden meist durch Fluoreszenz-messende Methoden analysiert. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, die am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von Apoptose. Zur Analyse der Veränderungen von Apoptose-Merkmalen in den Trypanosomen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die Quantifizierung wurde mit einem BD FACSCantoII Durchflusszytometer durchgeführt. Zur anschließenden Auswertung wurde die FACSDiva- bzw. Cyflogic-Software verwendet.

3.4.11.2 Nachweis des Zelltodes nach PGD₂- bzw. STS-Behandlung

Um die zeitliche Abfolge der intrazellulären Prozesse während des induzierten Zelltodes in Trypanosomen beobachten zu können wurde eine Kinetik durchgeführt. Dazu wurden SMB-Zellkulturen mit 10µM PGD₂ bzw. 10nM STS für 6 oder 24h inkubiert. Zusätzlich wurden TbEndoG-over-Zellen mit PGD₂ und STS inkubiert um den Effekt von EndoG auf den Verlauf des induzierten Zelltodes zu untersuchen. Nach der Inkubation mit den beiden Wirkstoffen wurden die Zellen gewaschen und wie unter 2.4.14 beschrieben mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Anschließend folgte die Analyse im Durchflusszytometer.

3.4.11.3 Nachweis von Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid (PI)

Um die Nekrose als Art des Zelltodes auszuschließen wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein interkalierendes Agens, das sich in doppelsträngige DNA einlagert und aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft detektiert

werden kann. Da Propidiumiodid nicht membrangängig ist, wird es nur von Zellen aufgenommen, deren Plasmamembran geschädigt ist. Dieses Phänomen kann mit Nekrose gleichgesetzt werden. Die angefärbten nekrotischen Zellen können dann im roten Kanal des Durchflusszytometers detektiert und quantifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit PGD₂ und STS behandelte Zellen selbst nach 24h Inkubation keine signifikante Nekrose aufweisen.

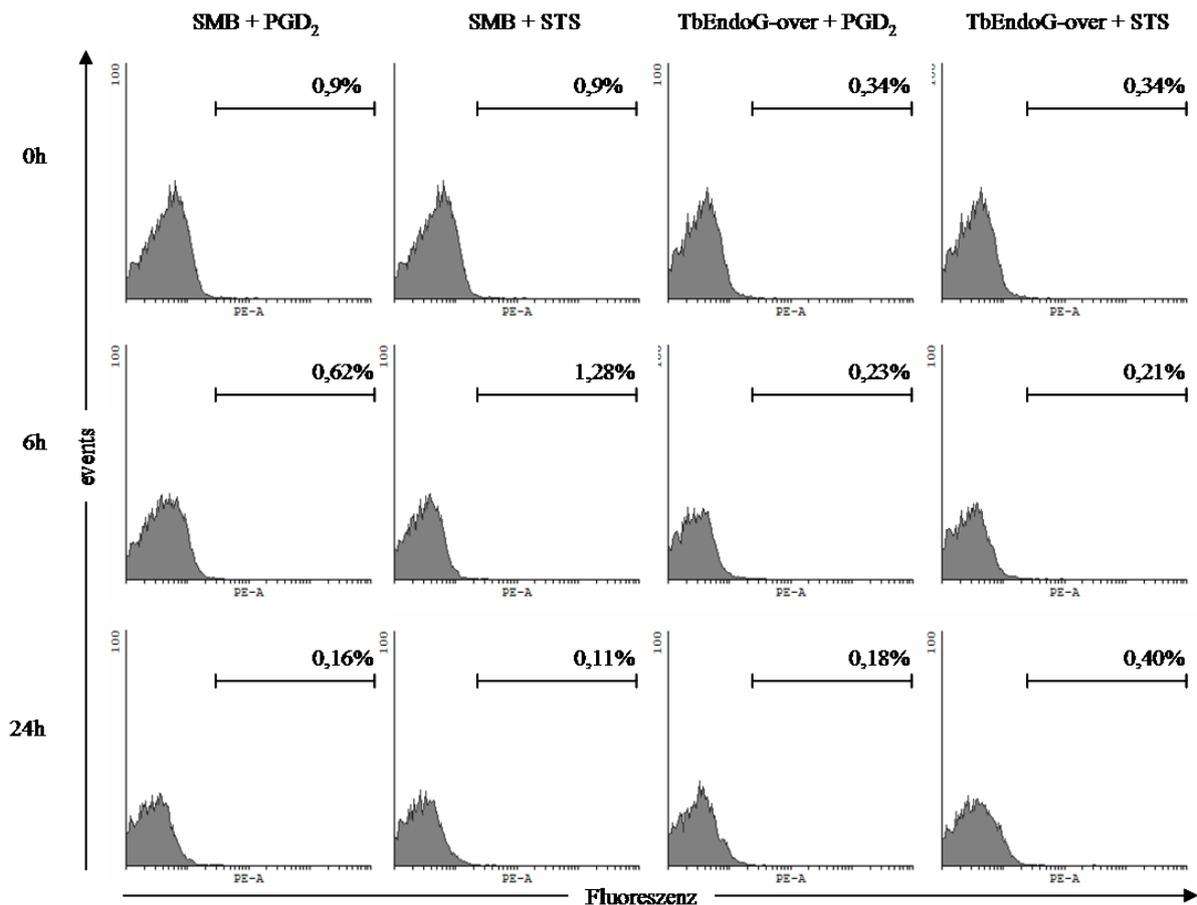


Abb. 3-33: Nekrosenachweis durch Färbung mit Propidiumiodid

Verteilung der Fluoreszenz von SMB- und TbEndoG-over-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h. Zellen mit einer stärkeren Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Zellen zum Zeitpunkt 0 wurden als PI-positive Zellen mit permeabilisierten Membranen markiert.

3.4.11.4 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

In der Literatur wurden Prostaglandine als starke Induktoren von intrazellulärem oxidativen Stress durch die Erhöhung der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben [Kondo *et al.*, 2001, Pignatelli *et al.*, 2005]. Um zu untersuchen, ob dieses

Phänomen auch bei dem durch STS induzierten Zelltod auftritt wurden Trypanosomen in Kultur mit PGD₂ und STS inkubiert und mit unterschiedlichen kommerziell erwerbbaaren ROS-Markern versetzt.

3.4.11.5 Bestimmung intrazellulärer ROS mittels 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H₂DCFDA)

Zunächst wurde das Auftreten von intrazellulären ROS mit dem wenig spezifischen H₂DCFDA untersucht. Das zellmembrangängige nicht-fluoreszierende H₂DCFDA wird durch intrazelluläre Esterasen zu DCFH gespalten und durch die Anwesenheit von einem breiten Spektrum an ROS zu dem stark fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Zur Bestimmung dieser ROS wurden Zellen jeweils nach 6 und 24h Induktion mit PGD₂ und STS im Durchflusszytometer gemessen. Die Behandlung mit den beiden Zelltod-Auslösern führte nach 6h zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären ROS. Bei PGD₂-behandelten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt 77,88% der SMB-Zellen und 82,56% der TbEndoG-over-Zellen DCF-positiv. Nach 24h nahm der Wert in der Gesamtpopulation ab. Er lag bei den SMB-Zellen bei 33,93% und bei TbEndoG-over-Zellen bei 32,79%. Dies zeigt, dass im Verlauf der Apoptose die Produktion der intrazellulären ROS zu Beginn auftritt. Die Zahl der gemessenen ROS-positiven Zellen nimmt aufgrund weiterer zellschädigender Prozesse dann wieder ab. Dies ist auch sehr gut innerhalb einer Population zu beobachten. Selektiert man im *FSC vs. SSC Dot plot* (Größe vs. Granularität) die intakten Zellen einer Population, so ist im dazugehörigen *FITC vs. PE Dot plot* (grüner vs. roter Kanal) zu erkennen, dass diese Zellen eine sehr hohe Fluoreszenz emittieren. Granuläre und absterbende Zellen dagegen weisen kaum noch Fluoreszenz auf (Abb. 3-35). Bei STS-behandelten Zellen verläuft die Produktion der ROS ähnlich und auch die Anzahl DCF-positiver Zellen ist mit PGD₂-behandelten Zellen gleichzusetzen. Nach 6h wurden bei den SMB-Zellen 79,54% DCF-positive Zellen gemessen, bei TbEndoG-over-Zellen 84,11%. Nach 24h waren 41,44% der SMB-Zellen und 37,26% der TbEndoG-over-Zellen DCF-positiv gefärbt. Der Anfangswert der DCF-positiven Zellen zeigt deutlich, dass die Überexpression von TbEndoG in SMB-Trypanosomen auch ohne Zugabe von einem der beiden Wirkstoffe zu einer gesteigerten Produktion intrazellulärer ROS führt. Hier lag der Wert mit 16,66% DCF-positiver Zellen fast doppelt so hoch wie in Kontroll-SMB-Zellen.

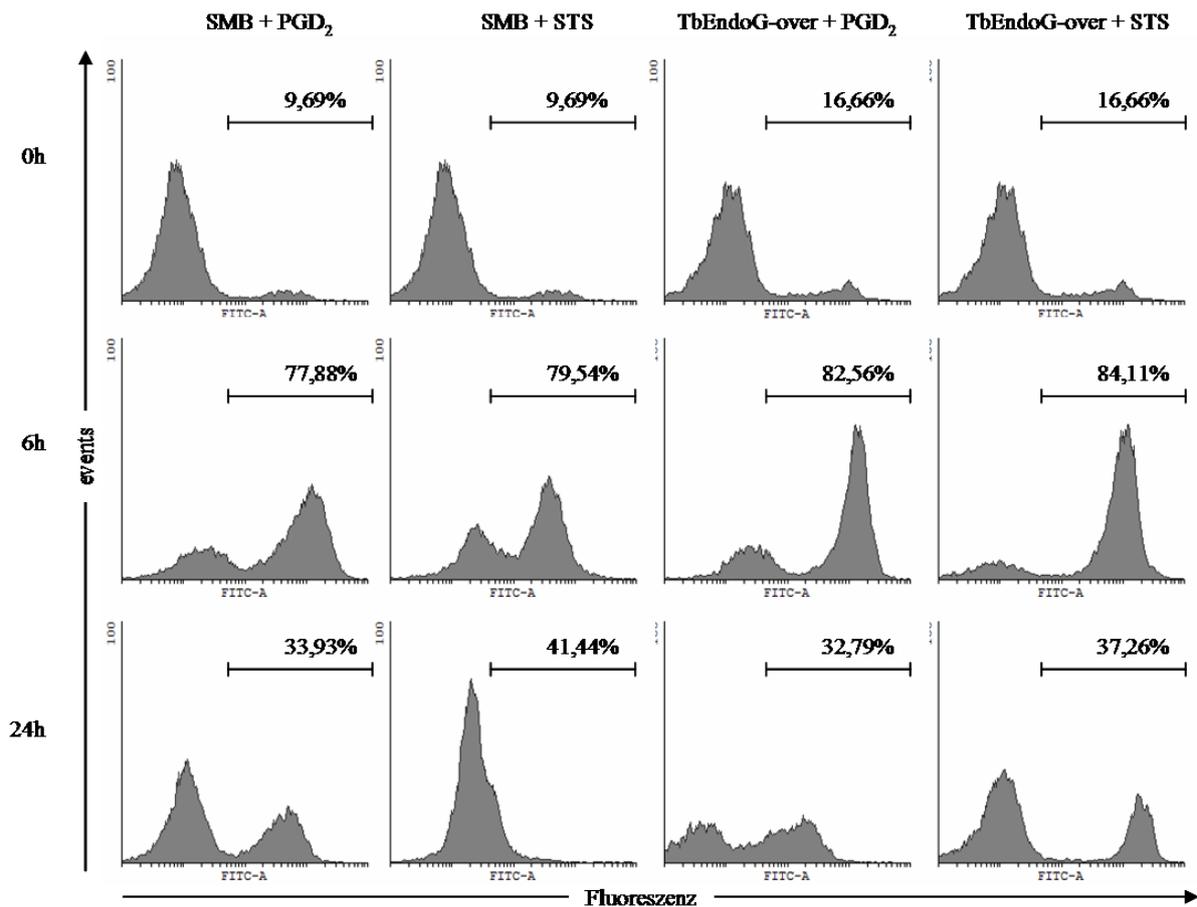


Abb. 3-34: ROS-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB- und TbEndoG-over-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h. Zellen mit einer stärkeren Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Zellen zum Zeitpunkt 0 wurden als DCF-positive Zellen mit gesteigerter ROS-Produktion markiert.

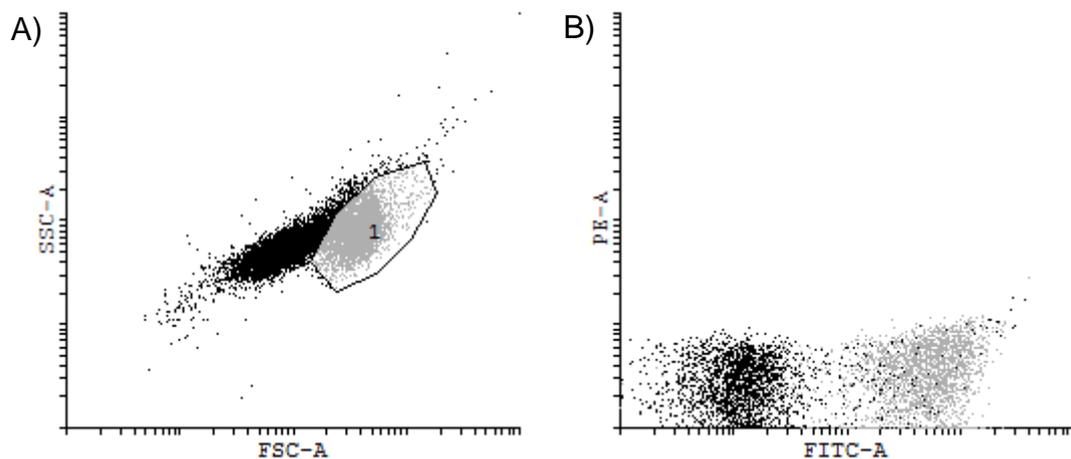


Abb. 3-35: ROS-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB-Zellen nach PGD₂-Behandlung zum Zeitpunkten 6h. Im FSC-SSC-Dot plot (A) sind die intakten Zellen grau selektiert (Gate 1). Dadurch ist die Verteilung der Fluoreszenz im FITC-PE Dot plot (grüner vs. roter Kanal) (B) zu erkennen.

3.4.11.6 Bestimmung intrazellulärer ROS mittels 3'-(*p*-Aminophenyl)-fluorescein (APF)

Um nun die ROS zu identifizieren, die den Zelltod einleitet, wurden ROS-Marker eingesetzt, die spezifischer mit einzelnen ROS reagieren als H₂DCFDA. Dazu wurde APF verwendet, welches durch Hydroxylradikale, Peroxynitritanionen oder Hypochloritanionen oxidiert wird und eine weit höhere Resistenz gegenüber lichtinduzierter Oxidation als H₂DCFDA besitzt. Sowohl Zellen, die mit PGD₂ behandelt wurden, als auch die mit STS-induzierten Zellen zeigten keine gesteigerte Fluoreszenz nach APF-Färbung. Die Anzahl APF-positiver Zellen lag bei PGD₂ behandelten Zellen bei 5,01% und bei STS behandelten Zellen bei 5,09%. Der Marker wurde bei 2,59% der Kontrollzellen angelegt. Somit konnten die oben genannten ROS bei der Einleitung der Apoptose in *T. brucei* ausgeschlossen werden.

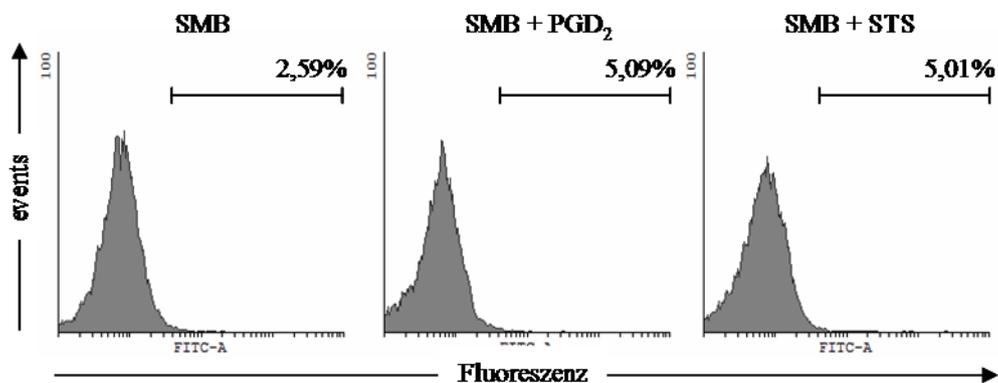


Abb. 3-36: ROS-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung nach 24h. Zellen mit einer stärkeren Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Kontroll-Zellen wurden als APF-positive Zellen mit gesteigerter ROS-Produktion markiert.

3.4.11.7 Bestimmung intrazellulärer ROS mittels Dihydroethidium (DHE)

Als weiterer spezifischer ROS-Marker wurde das DHE eingesetzt. DHE gilt als relativ spezifischer Marker für Superoxid-Anionen und wird in vielen Studien verwendet. Nach Oxidation zu Ethidium kann es als rot-fluoreszierendes Agens detektiert werden. Die Inkubation von PGD₂ und STS behandelten Zellen mit DHE führte zu einer Detektion von signifikant gesteigerten DHE-positiven Zellen gegenüber Kontroll-SMB-Zellen. Bei PGD₂ behandelten Zellen konnten 41,26%, bei STS 54,49% Superoxid-positive Zellen gemessen werden.

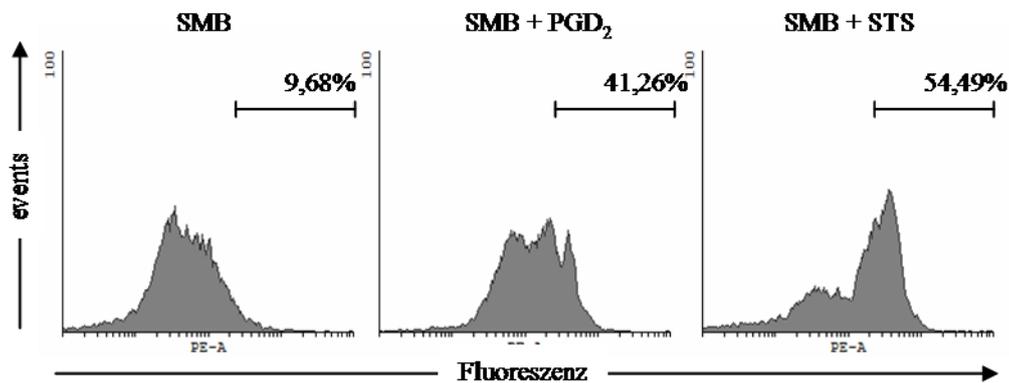


Abb. 3-37: Superoxid-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung nach 24h. Zellen mit einer stärkeren Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Kontroll-Zellen wurden als DHE-positive Zellen mit gesteigerten Superoxid-Anionen markiert.

3.4.11.8 Nachweis der Exposition von Phosphatidylserin (PS) mittels Annexin-V

Die Messung von Phosphatidylserin (PS), das auf dem äußeren *leaflet* der Zellmembran während der Apoptose präsentiert wird, wurde mit FITC-gekoppeltem Annexin-V durchgeführt. Dabei bindet das Annexin Ca²⁺-abhängig an PS und die grüne Fluoreszenz des FITC kann im Durchflusszytometer detektiert werden. Aufgrund des sehr dicht gepackten VSG-Mantels auf der Oberfläche der Trypanosomen wird wahrscheinlich nur ein Teil der PS-Moleküle an Annexin-V gebunden und die tatsächlichen Werte der Annexin-positiven Zellen liegt höher als der gemessene. Nach 6h Inkubation mit PGD₂ waren bereits 28,05% der SMB-Zellen und 30,44% der TbEndoG-over-Zellen gefärbt. Bei STS-behandelten Zellen waren 28,62% der SMB-Zellen und 63,04% der TbEndoG-over-Zellen Annexin-positiv.

Die Anzahl erhöhte sich nach 24h nur noch wenig. Bei den PGD₂-behandelten Zellen waren 34,09% und 26,12% positiv gemessen worden. Bei STS-behandelten Zellen waren es 34,64% und 78,86%.

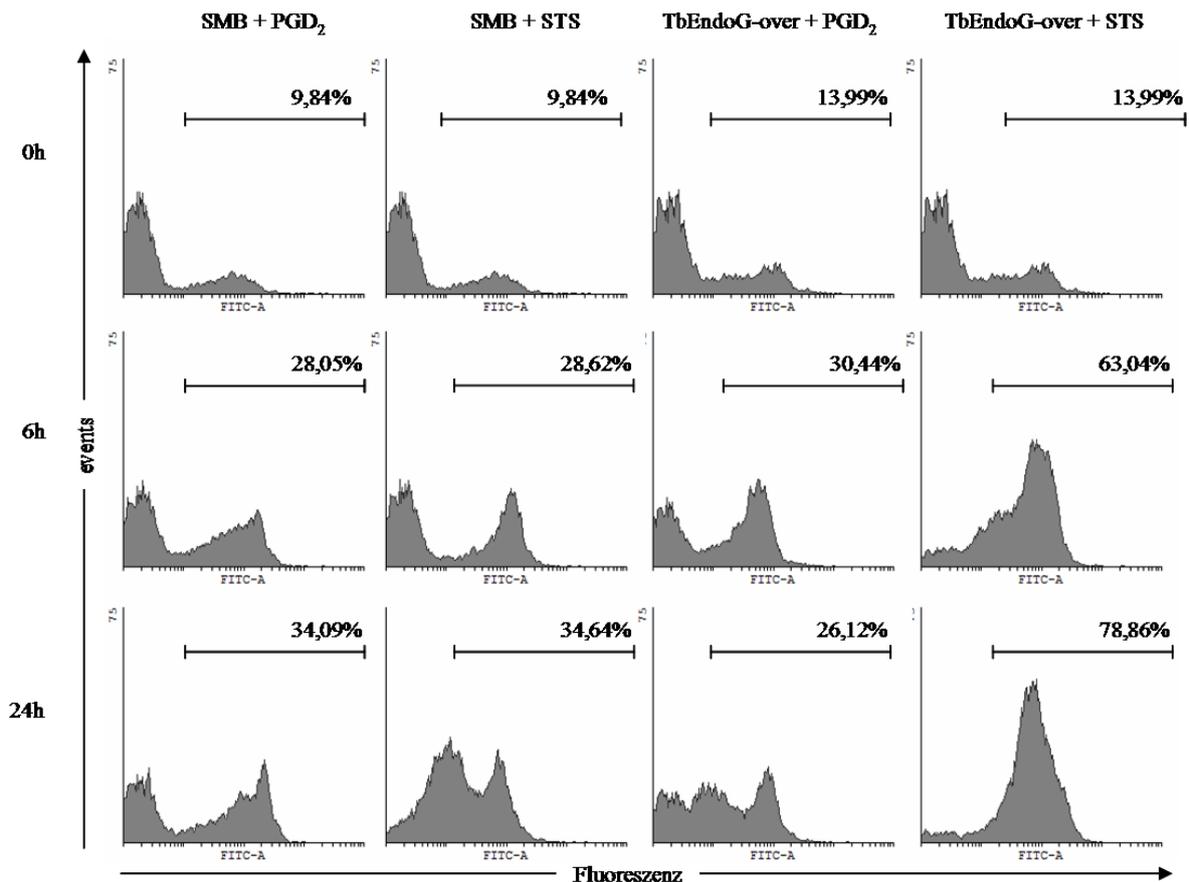


Abb. 3-38: Annexin-V-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB- und TbEndoG-over-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h. Eine stärkere Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Zellen zum Zeitpunkt 0 wurde als Annexin-V-positive Zellen mit PS-Exposition markiert.

3.4.11.9 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) mittels TMRE

Vor der Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) wurden die Zellen 30min mit Tetramethylrhodaminester (TMRE) bei 37°C inkubiert. Der Verlust des MMP konnte in beiden Fällen bereits nach 6h gemessen werden. Dieser lag bei PGD₂-induzierten SMB-Zellen bei 20,44% und bei TbEndoG-over-Zellen bei 21,88%. Nach 24h war die Anzahl an Zellen mit MMP-Verlust bei PGD₂-induzierten SMB-Zellen auf 65,11% und bei TbEndoG-over-Zellen auf 89,35% angestiegen. Mit STS induzierte SMB-Zellen waren nach 24h 84,63% TMRE-positiv und TbEndoG-over-Zellen 94,91%.

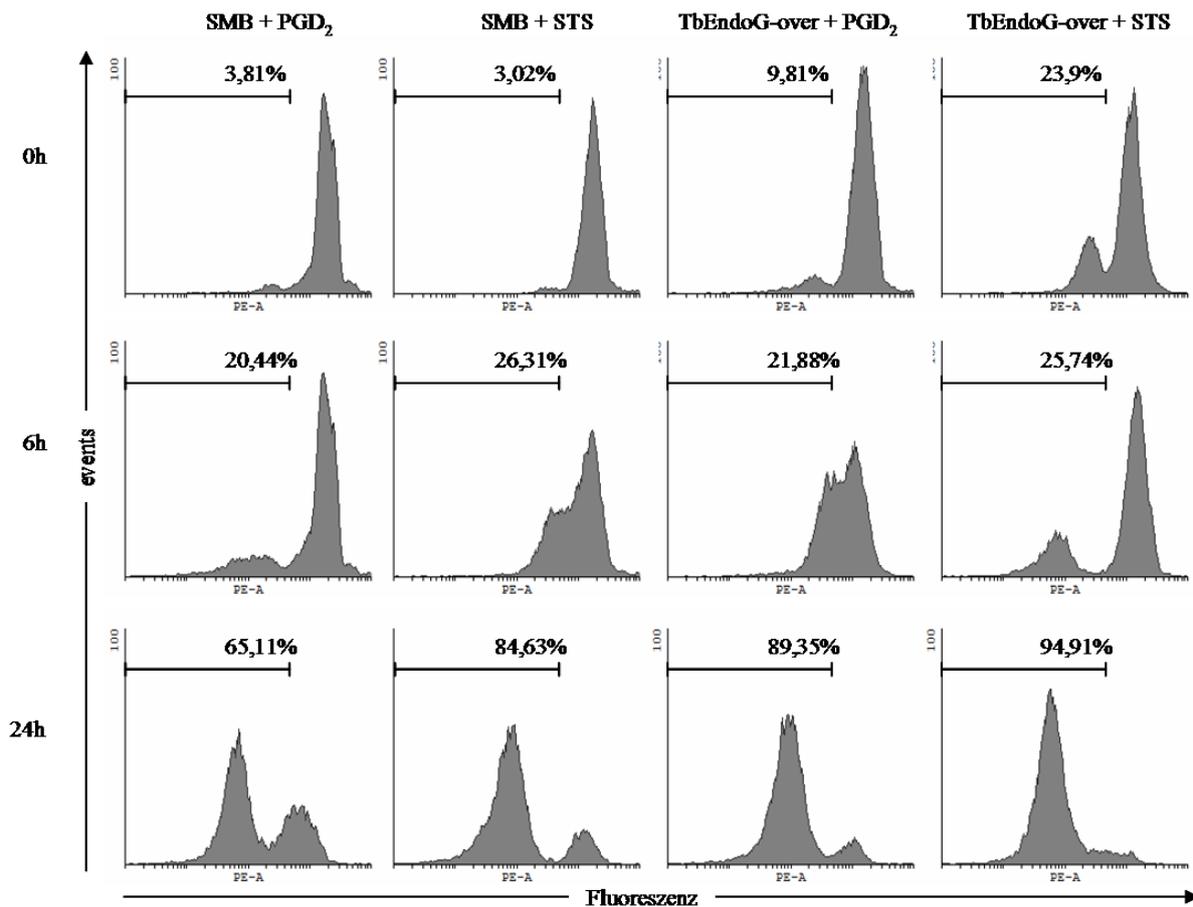


Abb. 3-39: TMRE-Detektion in Apoptose-induzierten Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB- und TbEndoG-over-Zellen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h. Eine geringere Fluoreszenz, als der Peak von SMB-Zellen zum Zeitpunkt 0 wurde als Zellen mit mitochondrialem Membranpotentialverlust markiert.

3.4.11.10 Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid (PI)

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Zellen durch Zugabe von Digitonin lysiert. Die freigesetzten Nuklei konnten anschließend mit Propidiumiodid gefärbt werden und so die Verteilung der DNA und somit die Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen befinden, bestimmt werden. Bei intakten Zellen sind ca. 60% der Zellen in der G1-Phase und 30% in der G2-Phase. Die restlichen 10% verteilen sich auf Zellen, die in der S-Phase sind sowie Zellen mit degradiertem DNA und polynukleare Zellen. Auf die Fragmentierung der DNA der Zellkerne bei TbEndoG-over-Zellen wurde besonders geachtet. Schon in unbehandelten Zellen wurde in TbEndoG-over-Zellen eine erhöhte DNA-Fragmentierung gemessen. Bei SMB-Zellen lag eine Fragmentierung der Zellkerne bei 2-6% der Zellen vor, bei TbEndoG-over-Zellen wurden 7-9% der Zellen mit fragmentierter DNA gemessen. Offenbar führt die

EndoG Überexpression also nicht selbst schon zu einem massiven Eintransport in den Kern, wenn nicht ein zusätzliches Signal vorliegt.

Wie erwartet nahm die DNA-Fragmentierung der Zellkerne bei Behandlung der jeweiligen Zellen mit PGD₂ oder STS im Laufe des Zelltodes zu. Nach 6h war dieser Anteil jeweils nur leicht erhöht. Bei SMB-Zellen, die mit PGD₂ behandelt wurden stieg der Anteil auf 7,59% bei STS-behandelten Zellen auf 9,68%. In TbEndoG-over-Zellen waren nach 6h bereits in 13,02% der Zellen, die mit PGD₂ behandelt wurden, DNA-Fragmentation zu messen, in TbEndoG-over-Zellen, die mit STS induziert wurden sogar 19,22%.

Nach 24h war der Effekt von PGD₂ in SMB-Zellen deutlich zu messen. Die DNA-Fragmentierung der Zellkerne war zu diesem Zeitpunkt in 21,28% der Zellen zu messen, in STS behandelten Zellen wurden 26,98% der Zellen positiv gemessen. In TbEndoG-over-Zellen waren 30,52% der PGD₂ behandelten Zellen und 63,87% der STS behandelten Zellen DNA-fragmentiert. Die Messungen sind in Abb. 3-40 zusammengefasst.

Desweiteren konnte mit der PI-Färbung gemessen werden, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befinden. Dass die Behandlung mit PGD₂ zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt wurde schon von Figarella *et al.* beschrieben. Die Messungen der Trypanosomen, die mit STS behandelt wurden, zeigten allerdings verstärkt Zellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befanden. Hier ist also ein deutlicher Unterschied der Wirkung von PGD₂ und STS bei dem Zelltod in Trypanosomen zu erkennen. Während sich wie o. g. ca. 60% der Kontroll-Zellen in der G1-Phase und 30% in der G2-Phase befindet, waren nach 24h 38% der PGD₂-behandelten Zellen in der G1-Phase und 27% in der G2-Phase. Bei SMB-Zellen, die mit STS behandelt wurden befanden sich hingegen nur noch 27% der Zellen in der G1-Phase und 44% in der G2-Phase.

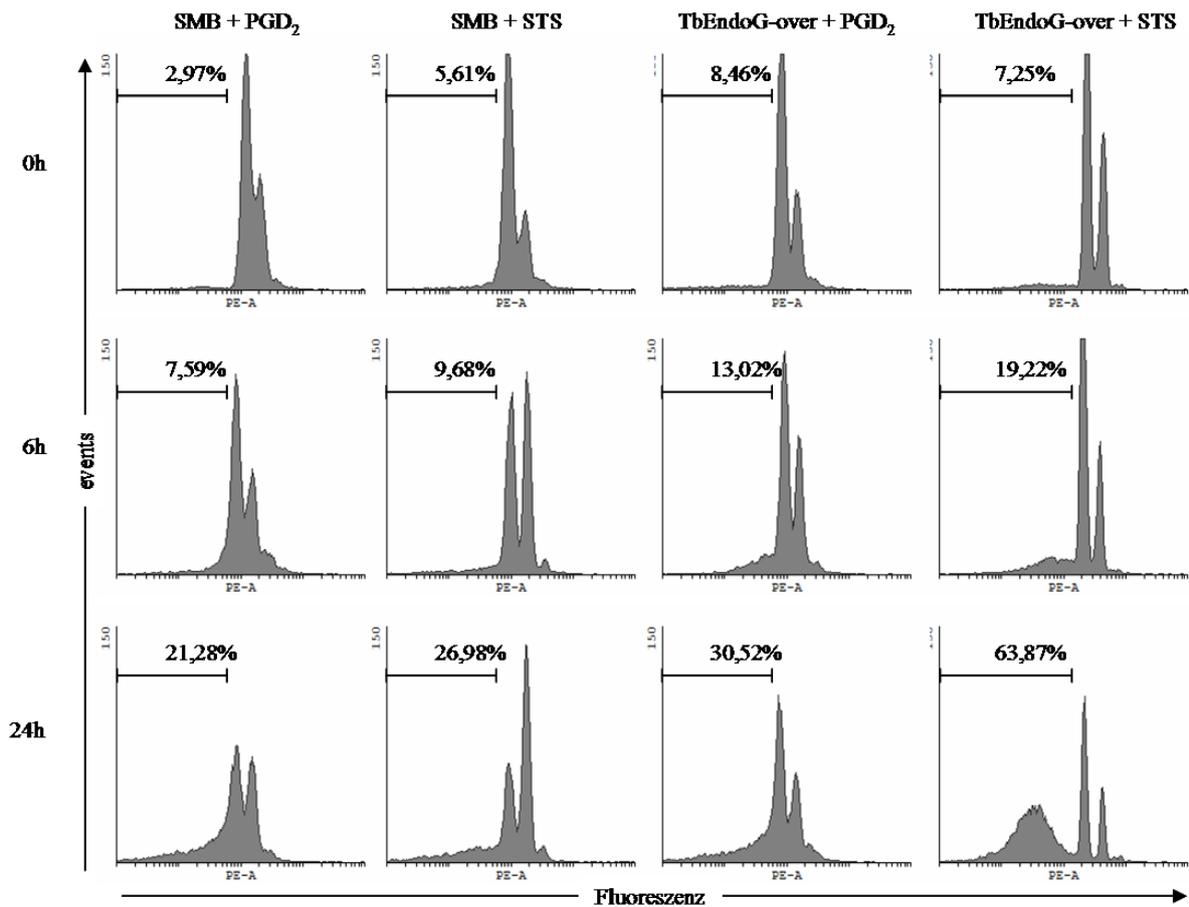


Abb. 3-40: DNA-Gehalt in den Zellkernen apoptose-induzierter Trypanosomen

Verteilung der Fluoreszenz von SMB- und TbEndoG-over-Zellkernen mit PGD₂- bzw. STS-Behandlung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24h. Kerne, die eine geringere Fluoreszenz als die des G1-Peaks aufweisen, wurden als fragmentiert definiert. Der G2-Peak besitzt eine doppelte Fluoreszenz (log. Maßstab). Von sogenannten *giants* hervorgerufene Fluoreszenz ist hinter dem G2-Peak zu erkennen.

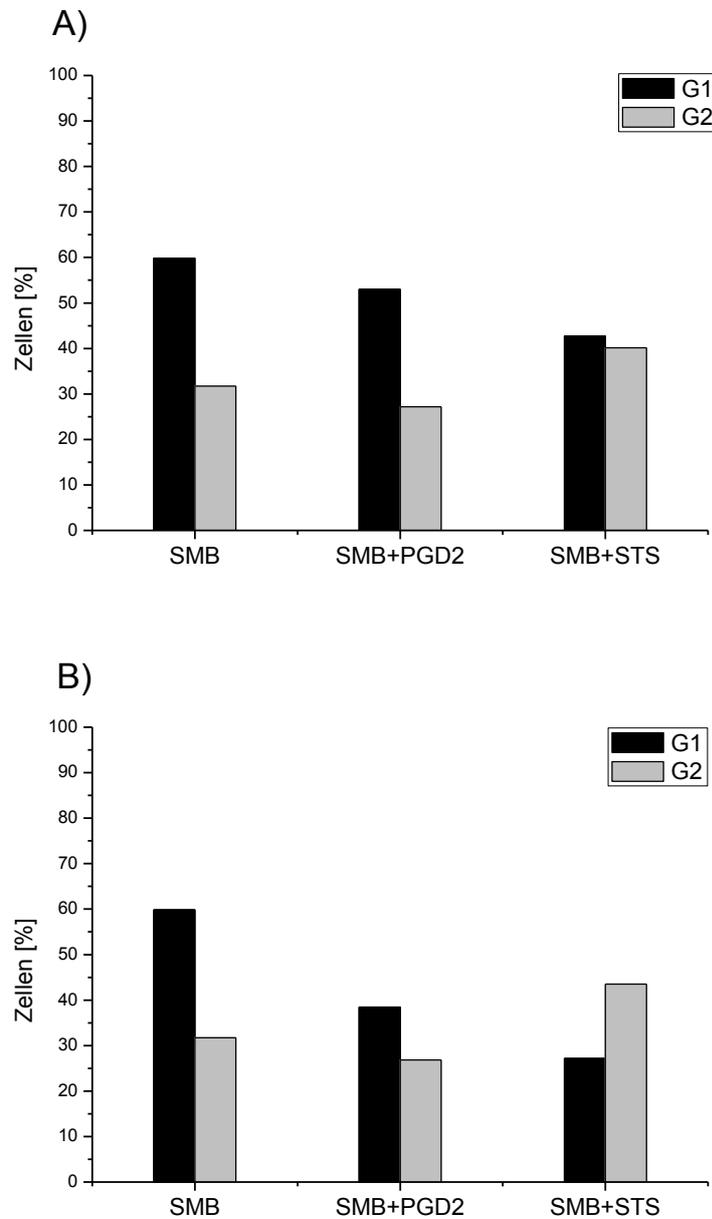


Abb. 3-41: Zellzyklus-Verteilung von mit PGD₂ bzw. STS behandelten Trypanosomen

Verteilung des DNA-Gehaltes in SMB-Zellkernen nach Behandlung mit 10µM PGD₂ bzw. 10nM STS nach 6 (A) und 24h (B). Die normale Verteilung von ca. 60% der Zellen, die sich in der G1-Phase und ca. 30%, die sich in der G2-Phase befinden, verschiebt sich durch die Behandlung mit STS nach 24h zu 27% der Zellen, die sich in der G1-Phase und 44%, die sich in der G2-Phase befinden.

3.4.12 Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Test

Ein weiterer Nachweis der DNA-Fragmentierung wurde durch die Detektion von DNA Strangbrüchen mit dem „DNA Fragmentation Imaging Kit“ der Firma Roche durchgeführt. Während der Apoptose entstehen Doppel- und Einzelstrangbrüche, die durch Markierung der freien 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden durch den enzymatischen TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*)-Test nachgewiesen werden. Hierzu wird die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) verwendet, welche die Reaktion von Fluorescein-gekoppelten dUTPs an die freien 3'-OH Enden katalysiert.

SMB-Zellen wurden 24h mit 10 μ M PGD₂ bzw. 10nM STS inkubiert und anschließend gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem „DNA Fragmentation Imaging Kit“ (s. 2.4.14.7) gefärbt. Zur Quantifizierung wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten jeweils 100 Zellen gezählt. Wie in Abb. 3-42 gezeigt ist, waren nach 24h 52,15% der mit PGD₂ behandelten Zellen und 61,1% der mit STS behandelten Zellen TUNEL-positiv. Der Anteil der positiven SMB-Zellen lag bei 2,75%.

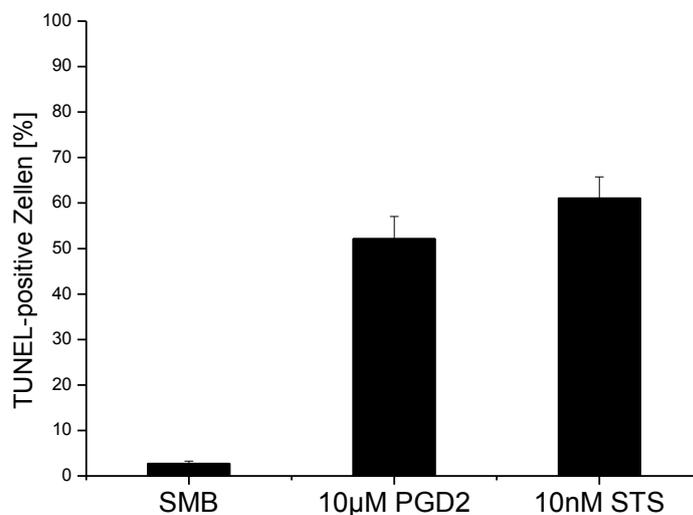


Abb. 3-42: TUNEL-Test von mit PGD₂ und STS behandelten Trypanosomen

SMB-Trypanosomen wurden für 24h mit 10 μ M PGD₂ bzw. 10nM STS inkubiert. Danach wurden Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA mit dem „DNA Fragmentation Imaging Kit“ nachgewiesen. TUNEL-Färbung bei SMB-Kontroll-Zellen: 2,75 \pm 0,49497; bei PGD₂ behandelten Zellen: 52,15 \pm 4,87904; bei STS behandelten Zellen: 61,1 \pm 3,9598.

3.4.13 Fluoreszenz-Mikroskopie nach PGD₂ bzw. STS Behandlung

Zur Lokalisation von TbEndoG-eGFP während des Zelltodes wurden die TbEndoG-eGFP-Zellen mit 10µM PGD₂ bzw. 10nM STS induziert. Nach 24h wurden 50nM Mitotracker Red CMXRos zu den Kulturen gegeben und für weitere 20min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Die Inkubation der Zellen mit Mitotracker Red CMXRos diente zur Lokalisation des Mitochondriums (s. Abb. 3-43). Bei nicht-induzierten SMB-Zellen war ein intaktes rot-fluoreszierendes Mitochondrium zu erkennen, das sich durch die ganze Zelle zieht und durch die grüne Fluoreszenz des TbEndoG-eGFP überlagert wird. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das TbEndoG-eGFP nach der Expression vollständig in das Mitochondrium der Trypanosomen transloziert wurde.

Bei Zellen, die mit PGD₂ bzw. STS induziert wurden, war nach 24h kein Mitotracker mehr zu erkennen, was auf einen Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien schließen lässt. Das TbEndoG-eGFP war in diesen Zellen über das gesamte Zytosol verteilt und auch im Zellkern zu erkennen. Die vorhergesagte Kernlokalisationssequenz der TbEndoG befindet sich innerhalb der mitochondrialen Lokalisationssequenz (MLS). Eine Abspaltung der MLS während oder nach der Translokation ins Mitochondrium, wie es bei den Endonukleasen höherer Organismen der Fall ist, konnte in *T. brucei* nicht beobachtet werden [Gannavaram *et al.*, 2002]. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die TbEndoG aktiv in den Zellkern transloziert wird. Nach 24h befand sich in PGD₂-behandelten Zellen allerdings nur ein Teil der exprimierten TbEndoG-eGFP im Kern. Der Hauptanteil befand sich im Zytosol, was entweder damit zu erklären ist, dass nur eine geringe Menge an EndoG in den Kern aufgenommen werden konnte, bevor die Kernmembran selbst durch die Apoptoseprozesse in der Zelle ihre Integrität verlor (und somit zu einer Verteilung über das gesamte Zytosol führt), oder dass die Expression von TbEndoG-eGFP die physiologischen Werte von TbEndoG so weit überstieg, dass nicht mehr davon in den Zellkern aufgenommen werden konnte. Dafür sprechen die Ergebnisse der aufgenommenen Wachstumskurven mit TbEndoG-eGFP bei denen eine Wachstumshemmung und ein frühzeitiges Absterben der Kulturen zu beobachten war. Bei Zellen die mit STS behandelt wurden, war ein weitaus größerer Anteil des TbEndoG-eGFP im Kern zu beobachten. Das kann aber auch an der morphologischen Veränderung der Zellen liegen, da hier das geringe Volumen des Zytosols einfach kein Platz mehr bietet. In Abb. 3-44 sind die mit PGD₂ bzw. STS behandelten Zellen dargestellt.

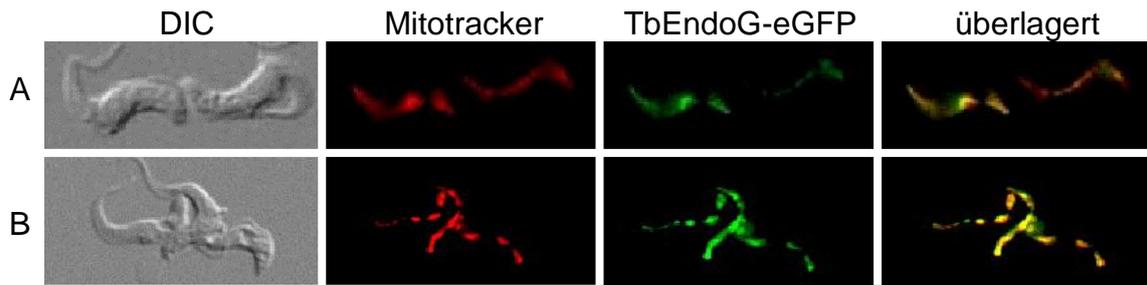


Abb. 3-43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von TbEndoG-eGFP-Zellen

Trypanosomen-Kulturen wurden vor der Fixierung mit 3,5% Paraformaldehyd mit 50nM Mitotracker Red CMXRos für 20min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert um die Mitochondrien der Zellen sichtbar zu machen. Nach der Fixierung wurden die Zellen auf einen poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger gegeben und mit „ProLong® Gold Antifade“ eingebettet. Anschließend erfolgte die Auswertung an einem Zeiss CellObserver Fluoreszenzmikroskop. Gezeigt sind TbEndoG-eGFP-Zellen, gefärbt mit Mitotracker Red CMXRos (A und B).

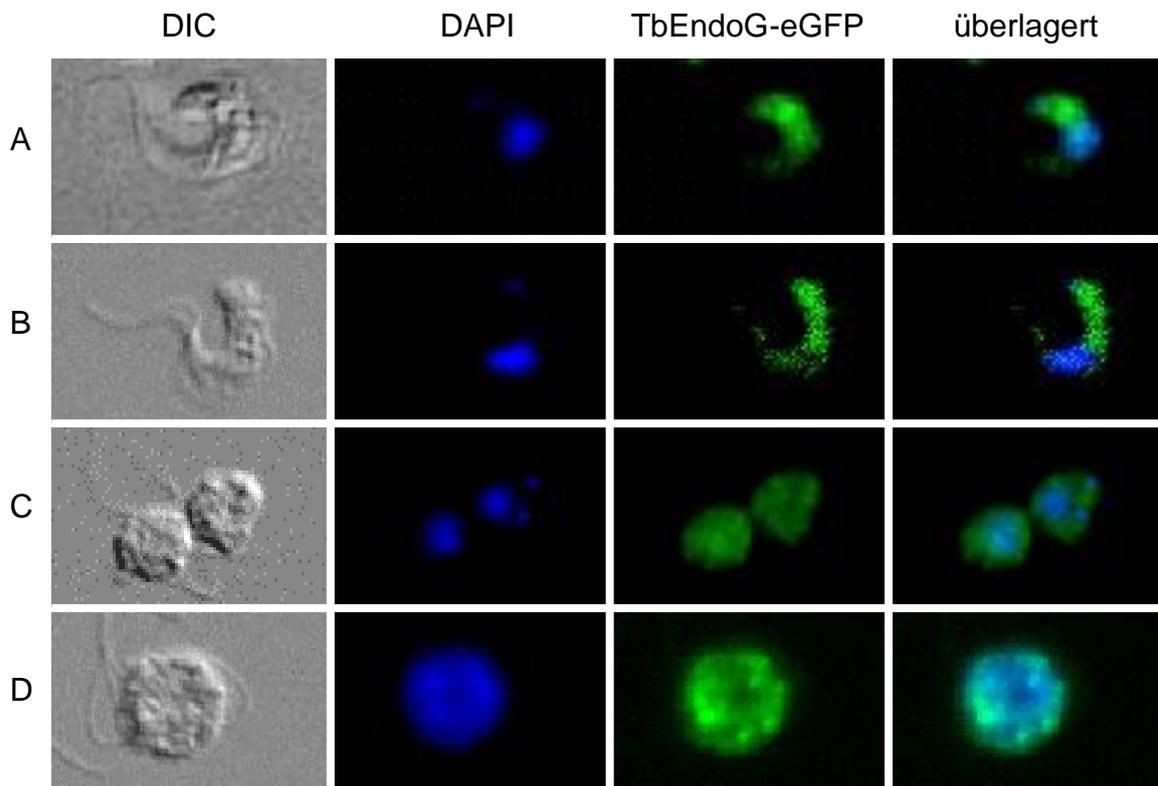


Abb. 3-44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von TbEndoG-eGFP-Zellen

Trypanosomen-Kulturen wurden vor der Fixierung mit 3,5% Paraformaldehyd mit 50nM Mitotracker Red CMXRos für 20min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit DAPI inkubiert um die Zellkerne und Kinetoplasten sichtbar zu machen. Danach wurden die Zellen auf einen poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger gegeben und mit „ProLong® Gold Antifade“ eingebettet. Anschließend erfolgte die Auswertung an einem Zeiss CellObserver Fluoreszenzmikroskop. Gezeigt sind TbEndoG-eGFP-Zellen, die für 24h mit 10µM PGD₂ (A, B) bzw. 10nM STS (C,D) inkubiert wurden.

4 Diskussion

4.1 Isolierung eines Cyclooxygenase-ähnlichen Enzyms aus *T.*

brucei

Über den Verlauf des apoptotischen Zelltodes bei *Trypanosoma brucei* ist noch immer sehr wenig bekannt. Selbst über die beteiligten Enzyme bei der Produktion des Apoptose-Auslösers PGD_2 , das aus Arachidonsäure gebildet wird, ist bisher nichts bekannt. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass nach der Zugabe von Arachidonsäure zu Trypanosomenkulturen die Konzentration von Prostaglandinen in den Zellen und im Medium erhöht sind [Kubata *et al.*, 2000]. Allerdings konnte bisher nur eine Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ Synthase aus Trypanosomen isoliert und charakterisiert werden [Kubata *et al.*, 2000]. Ein Enzym, welches Arachidonsäure zu Prostaglandinen umwandelt wie die aus höheren Eukaryonten bekannten COX-1 und COX-2 Isoformen, ist in den Parasiten bisher nicht bekannt. Sequenzvergleiche des trypanosomalen Genoms mit Enzymen der Arachidonsäure-Kaskade in höheren Organismen führten zu keinem Ergebnis mit ausreichender Sequenzhomologie. Auch die Zugabe verschiedener NSAIDs wie Acetylsalicylsäure, Flubiprofen, Ibuprofen, Indomethacin, Niflumsäure und Piroxicam hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Parasitenkulturen. Trotzdem zeigte die Zugabe von ETYA (5,8,11,14-*Eicosatetratraynoic acid*), ein Arachidonsäurederivat das von der COX erkannt aber nicht umgesetzt werden kann, bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *T. brucei* [Rawer, 2004].

Die *in vitro* Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen durch Zelllysat aus BF221-Trypanosomen, wie in dieser Arbeit durch die Dünnschicht-Chromatographie gezeigt, legt allerdings die Vermutung nahe, dass in den Parasiten ein Enzym, ähnlich den Cyclooxygenasen (COX) höherer Eukaryonten existiert. Durch einen Western Blot mit anti-COX-1 Antikörpern konnte in Trypanosomenlysat eine Proteinbande mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie dem, der zur Kontrolle aufgetragenen COX-1 aus Schafen, detektiert werden. Zur Isolierung dieses Enzyms aus BF221-Trypanosomen wurden klassische Proteinreinigungsverfahren wie Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration und Immunpräzipitation verwendet. Nach jedem Isolierungsschritt wurden die erhaltenen Fraktionen durch unterschiedliche Nachweismethoden wie dem *Amplex Red assay*,

Western Blot und Dünnschicht-Chromatographie auf die Anwesenheit des Enzyms kontrolliert.

Nach der Lyse der Trypanosomen wurde die Proteinlösung mit Ammoniumsulfat gefällt und mit Amplex Red, einem Farbstoff der durch die Peroxidaseaktivität des Enzyms zu rot-fluoreszierendem Resorufin umgewandelt wird, getestet. Auch die SDS-PAGE und Western Blot wurden zur Analyse der Fraktionen verwendet. Nach der AS-Fällung konnten in den Fraktionen, die mit 80% bzw. 100% AS versetzt worden waren Peroxidaseaktivität sowie positive Proteinbanden im Western Blot detektiert werden. Anschließend wurde das gesuchte Protein in der 70% Fraktion, die noch eine ausreichende Konzentration an dem gesuchten Protein allerdings kein VSG mehr enthielt, durch Kationenaustausch-Chromatographie über eine HiTrap SP Säule gereinigt. Danach wurde die Fraktion mit COX-Aktivität mittels Gelfiltration über eine Superdex G200 HR 10/30 Säule weiter getrennt und schließlich mit Protein A-gekoppelten MagBeads, die an anti-COX-1 Antikörper gebunden waren isoliert. Nach dieser Immunpräzipitation konnte das eluierte Protein als singuläre Bande durch SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Proteinbande wurde aus dem 10%igen SDS-Gel ausgeschnitten und im Proteomcenter der Universität Tübingen verdaut und analysiert. Durch die massenspektrometrische Analyse durch ein LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer konnte die Proteinbande dem Protein Tb427.10.13790 (TriTrypDB ID) zugeordnet werden. Dieses Protein, TbCOX genannt, wurde dann in *E. coli* Zellen kloniert und exprimiert um weitere Erkenntnisse über die Struktur und Aktivität des Proteins zu erhalten.

Sequenzanalysen der TbCOX ergaben eine 13%ige Homologie zu boviner COX-1. Zu der, für die Western Blot Analyse eingesetzten, ovinen COX-1 besteht sogar nur eine 10%ige Sequenzhomologie auf Proteinebene. Selbst zu dem COX-ähnlichen Enzym aus *Endamoeba histolytica*, welches Arachidonsäure zu Prostaglandin E₂ umsetzt und bislang das einzige aus Protozoen isolierte Protein mit COX-ähnlichen Eigenschaften ist, besitzt die TbCOX nur eine Homologie von 3%. Da das Enzym aus *E. histolytica* kaum Homologie zu COX-1 Enzymen aus anderen Organismen aufweist und auch keine konservierten COX-Motive in seiner Sequenz auftreten, kann auch eine COX-ähnliche Aktivität in der TbCOX nicht ausgeschlossen werden.

4.1.1 Expression von rTbCOX in *E. coli*

Die Expression der rTbCOX mit 0,5mM IPTG in *Rosetta2(DE3)pLysS E. coli* Zellen führte zum Einschluss in *inclusion bodies*. Dies konnte auch durch Änderung der Parameter Zeit, Temperatur oder IPTG-Konzentration sowie dem Wechsel des Expressionsvektors nicht geändert werden. Nach Isolierung und Lösung der *inclusion bodies* mit 1% Lauroylsarkosin und anschließender Dialyse gegen Bindepuffer (s. 2.3.4.1) war eine leichte und schwer zu definierende Umsetzung von [¹⁴C]-Arachidonsäure durch die Dünnschicht-Chromatographie zu detektieren. Die folgende Affinitätschromatographie mit Ni-NTA und Abspaltung des His-Tags konnten diese Umsetzung nicht verbessern. Zwar wurde eine Umsetzung von Amplex Red zu Resorufin gemessen, bei der darauf folgenden Dünnschicht-Chromatographie konnte aber nur eine sehr schwache Arachidonsäure-Metabolisierung detektiert werden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur rekombinanten Expression und Isolierung des hypothetischen Proteins aus *T. brucei* führte somit noch nicht zur eindeutigen Isolierung eines Enzyms mit Cyclooxygenaseaktivität. Eine Optimierung der Expression in *E. coli* Zellen durch den Einsatz anderer Vektoren oder Expressionszellen sowie weitere Untersuchungen mit der gereinigten rTbCOX wie die Verwendung sensitiverer Nachweismethoden und eine effizientere Rückfaltung des denaturierten Proteins in seine native Konformation sind daher erforderlich, um eine eindeutige Zuordnung des bislang hypothetischen Proteins aus *T. brucei* zu erhalten.

4.2 Einfluss von PGD₂ und Staurosporin auf *T. brucei*

Das Fehlen von Caspasen oder pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie bei Trypanosomen ließ viele Jahre lang die Annahme eines apoptotischen Zelltodes in einzelligen Parasiten erst gar nicht zu. Heute ist diese Art des Zelltodes in vielen Studien, auch bei anderen einzelligen Organismen, untersucht und bestätigt worden. Über den Mechanismus, die Kinetik und die beteiligten Enzyme ist jedoch weiterhin sehr wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte mit der Untersuchung des bereits bekannten Apoptose-Auslösers Prostaglandin D₂ und eines weiteren Auslösers der Apoptose in höheren Organismen und Leishmanien, dem Staurosporin, zum einen die Art des Zelltodes, zum anderen der zeitliche Verlauf der intrazellulär auftretenden Effekte dieser beiden Wirkstoffe bestimmt werden.

Die Zugabe von Prostaglandin D₂ (nicht aber von PGE₂ und PGF_{2α}) zu Trypanosomen-Zellkulturen führt bei Konzentrationen im niederen mikromolaren Bereich (IC₅₀: PGD₂ 3,7μM und PGJ₂ 2,7μM) zum Zelltod der Parasiten. Wie in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, ist dieser Effekt auf die Metabolisierung des PGD₂ zu seinen Derivaten der J-Serie zurückzuführen und ist bei Zellen aus der stationären Phase ausgeprägter als bei Zellen der logarithmischen Wachstumsphase [Figarella *et al.*, 2006]. Während die Zellen aus der stationären Phase direkt nach PGD₂-Zugabe in ihrer Differenzierung und somit auch in ihrem Wachstum gestört sind, hat die Zugabe dieses Prostanoids zu logarithmisch wachsenden Zellen nur eine sehr geringe Wachstumshemmung zur Folge. Dieser Effekt konnte bei der Zugabe von Staurosporin zu Trypanosomenkulturen nicht beobachtet werden. Hier tritt die Wirkung in der logarithmischen ebenso wie in der stationären Wachstumsphase direkt nach Zugabe des STS ein. Über die trypanozide Wirkung von Staurosporin, einem unspezifischen Proteinkinaseinhibitor wurde schon mehrfach berichtet; die Art des Zelltodes wurde allerdings noch nicht näher beschrieben [Gale, 1994; Braga, 2005; Bruges *et al.*, 2012]. In Säugerzellen dient STS als Kontrollsubstanz bei Apoptoseuntersuchungen und bei Leishmanien löst STS einen Zelltod mit vielen der typischen Merkmale der Apoptose aus, wenn man von den Caspasen absieht. So werden Phosphatidylserin-Exposition, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, DNA-Degradation und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beobachtet [Arnoult *et al.*, 2002]. Daher wird STS auch bei Leishmanien als typischer Apoptose-Auslöser verwendet. Als Auslöser von Apoptose bei Trypanosomen wurde STS noch nicht beschrieben.

Um die Art des Zelltodes bei *Trypanosoma brucei* zu untersuchen, wurden die Effekte von STS mit denen von PGD₂ bei der induzierten Apoptose verglichen. Die erste Beobachtung die dabei gemacht werden konnte war, dass die Wirkung von STS auf das Wachstum der Trypanosomen direkt nach Zugabe zu den Zellkulturen einsetzte und somit, nicht wie bei PGD₂, eine der beiden Formen (LS oder SS) sensitiver reagierte. Dabei wirkte STS schon in sehr geringen Konzentrationen. Die IC₅₀ von STS in *T. brucei* liegt bei 7,6nM. Im Vergleich dazu liegt die IC₅₀ von PGD₂ bei 3,7μM, wobei allerdings zu beachten ist, dass PGD₂ in erheblichem Maße an Albumin bindet [Figarella *et al.*, 2005]. Dies spiegelt auch die Erwartung wieder, da STS allgemein hemmend auf die Proteinkinasen wirkt, wohingegen Prostaglandine über ihre spezifischen Rezeptoren diverse Effekte, zumeist durch Modulation der unterschiedlichen *second messenger*-Systeme, auslösen.

Die Proteinbiosynthese kommt bei Trypanosomen, die mit STS behandelt wurden, bereits nach 2h fast vollständig zum Erliegen. Dies steht im Widerspruch zu der allgemeinen Annahme der Notwendigkeit einer *de novo* Proteinsynthese bei der Apoptose wie sie auch für PGD₂ belegt ist [Figarella *et al.*, 2005]. Es gibt allerdings Studien, die belegen, dass durch STS ausgelöste Apoptose in höheren Eukaryonten auch ohne *de novo* Proteinsynthese stattfindet [Bertrand *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1996].

Wie die Licht- sowie TE- und RE-Mikroskopie zeigten, durchlaufen STS-behandelte Zellen starke Veränderungen in ihrer Zellmorphologie sowie in der Motilität. Die beobachtete Hemmung des Zellwachstums geht damit einher. Zellen, die mit STS behandelt wurden durchlaufen diese Veränderungen weitaus schneller als PGD₂-behandelte Zellen. PGD₂ das zu Kulturmedium gegeben wird muss entweder erst eine ausreichend hohe Konzentration in den Zellen erreichen oder zu seinen Derivaten der J-Serie umgewandelt werden. Die Zellen der stationären Phase reagieren wahrscheinlich sehr viel empfindlicher auf PGD₂, weil hier mehr Zellen zu SS-Formen differenziert sind und schon eine höhere Konzentration PGD₂ in den Zellen vorliegt. Zusätzlich leitet PGD₂ wohl einen spezifischeren Mechanismus ein als die breite Hemmung der Proteinkinasen, die durch STS induziert wird. Bei Zellen, die in der logarithmischen Wachstumsphase mit PGD₂ behandelt wurden, trat eine Hemmung des Wachstums nach 8-12h auf. Bei PGD₂-behandelten Zellen der stationären Phase (nach ca. 40h) trat eine hemmende Wirkung bereits nach ca. 2h auf.

Nach STS-Behandlung traten erste Veränderungen der Zellmorphologie, insbesondere die Erweiterung der Flagellumtasche und das damit verbundene Abrunden des Zellkörpers bereits nach 2-3h auf. Zu dieser Zeit konnte auch die Hemmung des Wachstums in der logarithmischen als auch der stationären Wachstumsphase beobachtet werden.

4.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Zelltod von PGD₂ bzw. STS behandelten Trypanosomen

Auch bei den durchflusszytometrischen Analysen wurden Unterschiede in der Wirkung von PGD₂ und STS beobachtet. So führte die Zugabe von PGD₂ zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase, was zu der Beobachtung von neu gebildeten Flagellen in Zellen, die keine Zellteilung mehr durchführten, passt. Dagegen führte die Zugabe von STS zu einem Arrest der Zellen in der G2-Phase. Dies lässt darauf schließen, dass die DNA oder andere Strukturen bei STS-

behandelten Zellen derart geschädigt sind, dass die Reparaturmechanismen der Zellen nicht mehr greifen können und die Zellen einen apoptose-ähnlichen Zelltod einleiten.

Einige der Apoptosemerkmale, die mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden, traten allerdings bei beiden Arten der Zelltod-Induktion ungefähr gleichzeitig auf. In den, durch PGD₂ sowie STS induzierten Zellen, konnten nach wenigen Stunden erhöhte Level an intrazellulären ROS nachgewiesen werden. Im Verlauf des Zelltodes nahm die Produktion der ROS wieder ab und aufgrund der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und dem Abbau der ROS wurden im späteren Stadium des Zelltodes kaum noch ROS-positive Zellen detektiert. Auch innerhalb einer Population konnte diese Verteilung von ROS-positiven und ROS-negativen Zellen beobachtet werden. Noch intakte Zellen, die sich durch ihre Größe und Granularität von geschädigten Zellen selektieren ließen, enthielten einen hohen Anteil an ROS, während in Zellen die zugrunde gingen kaum ROS nachzuweisen waren. Durch den Ausschluss der ROS, die mit APF nachgewiesen werden konnten sowie der positiven Detektion von Superoxid-Anionen mit dem ROS-Marker DHE, konnte zusätzlich eine Aussage über die maßgeblich an dem apoptotischen Zelltod beteiligte ROS gemacht werden. Superoxid-Anionen wurden bereits bei anderen Organismen, aber auch in den verwandten Parasiten *T. cruzi* als Apoptose-auslösende ROS beschrieben [Alzate *et al.*, 2007; Piacenta *et al.*, 2007]. Diese ROS spielt also auch eine zentrale Rolle bei der Apoptoseinduktion in *T. brucei*.

Im Laufe des Prozesses konnten bei beiden Arten der Induktion des Zelltodes eine Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials gemessen werden. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von TbEndoG-eGFP Zellen konnte die Translokation der Endonuklease aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol und den Zellkern eindeutig gezeigt werden. Diese Translokation geht mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials einher, wie die Färbung des Mitochondriums durch den Farbstoff Mitotracker gezeigt hat. In Zellen, bei denen TbEndoG-eGFP im Zytosol bzw. im Zellkern lokalisiert vorlag, konnte kein Mitotracker mehr detektiert werden.

Das am stärksten mit Apoptose assoziierten Merkmal ist wohl der *flip-flop* von Phosphatidylserin vom inneren auf das äußere *leaflet* der Plasmamembran. Dieser Nachweis wurde mit der Färbungen der Zellen mit Annexin-V zum Nachweis Phosphatidylserin-externalisierender Zellen und Propidiumiodid zum Nachweis nekrotischer Zellen durchgeführt. PGD₂ wie auch STS führten zu einer Zunahme an Annexin-V-positiven Zellen jedoch nicht zu einer Zunahme an PI-positiven Zellen. Bei den mit STS behandelten Zellen ist gegenüber PGD₂-behandelten Zellen ein signifikanter Anstieg von Annexin-V-positiven

Zellen beobachtet worden. Dies könnte mit einer Lockerung des VSG-Oberflächenmantels durch die morphologische Veränderung der Zellen zusammenhängen. Annexin-V ist mit 36kDa relativ groß und sollte durch die dicht gepackten VSG-Moleküle sterisch an der Bindung an PS gehindert werden. Allerdings sind auch Veränderungen der VSG-Proteine während des Zelltodes nicht auszuschließen. Die Färbung mit PI und Annexin-V zeigt also, dass PS nur an Membranen von intakten Zellen gemessen wurde.

Die Merkmale von Apoptose wie die Steigerung von intrazellulären ROS, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, PS-Exposition und DNA-Fragmentierung konnten im Durchflusszytometer bei PGD₂ sowie STS gemessen werden. Dadurch konnte die Nekrose als mögliche Art des Zelltodes ausgeschlossen werden. Typische Merkmale wie ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase, eine *de novo* Proteinbiosynthese oder *blebbing* konnten nur in PGD₂ induzierten Trypanosomen nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von Caspasen lässt den PGD₂-induzierten Zelltod bei *T. brucei* zwar nicht als Apoptose im klassischen Sinne, wie vom *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) beschrieben [Kroemer *et al.*, 2009], bezeichnen. Da sich diese Nomenklatur aber auf Eukaryonten bezieht, sollte man diese Art von Zelltod bei Protozoen durchaus als Apoptose oder caspase-unabhängige Apoptose bezeichnen.

Der induzierte Zelltod durch STS-Einwirkung erfüllt allerdings nicht alle Kriterien, die für die Apoptose essentiell sind und ist auch kein physiologischer Mediator wie das PGD₂, das von den Trypanosomen selbst produziert wird. Somit sollten Bezeichnungen wie Apoptose oder Apoptose-ähnlich im Zusammenhang mit STS vermieden werden. Hier trifft eher die Bezeichnung eines induzierten Zelltodes mit den o.g. durchflusszytometrisch gemessenen Parametern zu.

4.3 Einfluss von Endonuklease G auf *T. brucei*

Die Untersuchung der Endonuklease G in Trypanosomen sollte Aufschlüsse über ein Enzym geben, welches bei der Apoptose in höheren Organismen eine zentrale Rolle einnimmt.

Die Endonuklease G aus Trypanosomen weist einige Merkmale auf, die in der entsprechenden Endonuklease höherer Organismen nicht auftreten. Signifikant ist der Unterschied der Größe. Die Sequenz der TbEndoG besteht aus 506 Aminosäuren. Zum

Vergleich ist die humane EndoG aus 297 Aminosäuren aufgebaut. Trotz ihres viel größeren Molekulargewichtes vermittelt die TbEndoG dieselben Effekte wie ihre bekannten orthologen Endonukleasen in anderen Organismen. Zudem ist im aktiven Zentrum der Protozoen-EndoG der Asparaginsäure-Rest durch einen Serin-Rest ersetzt. Auch diese Modifikation wirkt sich nicht auf die Nukleaseaktivität aus, was auch schon z.B. bei *L. infantum* und *L. donovani* beschrieben wurde [Rico *et al.*, 2009; Gannavaram *et al.*, 2008].

4.3.1 Überexpression von EndoG in *T. brucei*

Die Überexpression von EndoG in *T. brucei* führte zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Die TbEndoG-over-Zellen exprimierten bereits ohne Induktion der Expression durch Doxycyclin die EndoG in so großer Menge, dass die Generationszeit in HMI-9 Medium von 6h auf ca. 24h anstieg. Nach der Induktion der EndoG-Expression konnte in TbEndoG-over-Zellkulturen kein Wachstum der Zellen mehr beobachtet werden und die Zellen starben bereits nach wenigen Stunden. Dies lässt vermuten, dass EndoG in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, da eine unkontrollierte DNA-Fragmentierung aufgrund von falsch lokalisierter EndoG durch die Beobachtungen der Expression von TbEndoG-eGFP ausgeschlossen werden konnte. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das TbEndoG-eGFP (zumindest im Rahmen der Messparameter) nur im Mitochondrium der Trypanosomen lokalisiert vorlag. Die Expression des TbEndoG-eGFP führte ebenfalls zu einer Hemmung des Wachstums. Hier lag die Generationszeit bei ca. 11h was aus einer geringeren Überexpression von EndoG im Vergleich zu TbEndoG-over-Zellen resultierte.

Erst nach der Induktion des Zelltodes entweder mit PGD₂ oder mit STS wurde TbEndoG-eGFP aus dem Mitochondrium in das Zytosol und auch in den Zellkern transloziert. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass TbEndoG über seine Transmembrandomäne an die inneren Mitochondrienmembran assoziiert vorliegt, aber nicht in die Matrix des Mitochondriums eindringt, um dort Einfluss auf die mtDNA zu nehmen. Vom Intermembranraum aus kann die TbEndoG dann (wahrscheinlich nach der Abspaltung der Transmembrandomäne) in das Zytosol freigesetzt werden.

Wie die Beobachtungen im TEM gezeigt haben, hat die Überexpression von EndoG auch Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen. So konnte ein gesteigertes Auftreten von Glykosomen und ungewöhnlich hohe Konzentrationen an gespeicherten Ca²⁺-Phosphaten in

den Acidocalcisomen festgestellt werden. Zudem war auch eine erhöhte Fragmentierung der DNA der Zellkerne zu erkennen. TEM-Aufnahmen von TbEndoG-eGFP-Zellen bestätigten die EndoG-Überexpression als Auslöser der beobachteten Auswirkungen auf die Organellen, da hier die Steigerung der Glykosomen bzw. Ca^{2+} -Phosphaten in den Acidocalcisomen nicht so ausgeprägt war wie bei TbEndoG-over-Zellen.

Die Beobachtungen des trypanoziden Effekts der EndoG-Überexpression in *T. brucei* in TbEndoG-over-Zellen sind also mit den schon beschriebenen EndoG-Effekten bei Leishmanien [Rico *et al.*, 2009] oder Säugerzellen [Schäfer *et al.*, 2004] vergleichbar.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die TbEndoG-over-Zellen bei allen gemessenen Merkmalen der Apoptose, bis auf die Produktion der ROS, ausgeprägter auf die Wirkung von PGD_2 und STS reagierten als die SMB-Kontroll-Zellen.

4.3.2 Expression von rTbEndoG in *E. coli*

Die Expression der rekombinanten trypanosomalen EndoG in *E. coli* Zellen führte zum Einschluss des Enzyms in *inclusion bodies*. Wie auch bei EndoG-Expressionen höherer Organismen beschrieben, ist die Endonuklease in hohen Konzentrationen wohl auch für die Bakterienzellen toxisch und wird somit in diesen Kompartimenten verpackt [Yoon *et al.*, 2009].

Nach der Isolierung der *inclusion bodies* konnte eine erfolgreiche Rückfaltung des Proteins in seine aktive Konformation erreicht werden, was eindeutig durch den EndoG-Aktivitätstest gezeigt werden konnte. Hierbei haben schon geringe Mengen des Enzyms, sowohl mit als auch ohne den exprimierten His-Tag, die zugegebene Plasmid-DNA fragmentiert. Somit sollte auch die Nukleaseaktivität der in Trypanosomen exprimierten TbEndoG, derjenigen der rTbEndoG entsprechen. In TbEndoG-over-Zellen weisen beispielsweise in den o.g. durchflusszytometrischen Analysen 8% der Zellen DNA-Fragmentierung auf, in Kontroll-Zellen sind dies nur ca. 3% der Zellen. Diese geringfügige Steigerung kann auf die Überexpression der EndoG zurückzuführen sein, zeigt aber auch, dass ein aktiver Prozess benötigt wird, um EndoG in den Zellkern zu translozieren. Nicht nur die DNA-fragmentierende Aktivität von TbEndoG sondern auch der wachstumshemmende Effekt, des in Trypanosomen überexprimierten Enzyms, lassen auf eine wichtige Rolle, vor allem beim programmierten Zelltod der Parasiten, schließen.

5 Zusammenfassung

Trypanosoma brucei, der Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit bei Menschen und der Tierseuche Nagana, durchläuft während seines komplexen Lebenszyklus mehrere Stadien sowohl im Insektenvektor, der Tsetse-Fliege als auch im Säugerwirt. Im Blut des Wirtes wird die Zelldichte der Parasiten zum einen durch das Immunsystem zum anderen aber auch durch die Produktion von Prostaglandin D₂ durch die Parasiten selbst immer wieder herabgesetzt. Dadurch können die Parasiten im letzten Stadium der Krankheit das Gehirn der betroffenen Patienten befallen. Auch im Liquor von Schlafkrankheitspatienten konnten erhöhte Konzentrationen von Prostaglandin D₂ gemessen werden [Pentreath *et al.*, 1990].

Der altruistische Zelltod einzelliger Parasiten wie *Trypanosoma brucei* ist der Fokus vieler wissenschaftlicher Fragen. Die Existenz eines programmierten Zelltodes in *T. brucei* ist weitläufig anerkannt. Dessen Mechanismus und die beteiligten Enzyme sind allerdings längst noch nicht aufgeklärt. Mit der Entdeckung des Prostaglandins D₂ als von den Parasiten selbst produzierten Auslöser des Zelltodes wurde ein erster wichtiger Schritt für die Entschlüsselung dieses Mechanismus gemacht [Kubata *et al.*, 2000]. Schlüsselenzyme wie die Cyclooxygenase, der Differenzierungsfaktor (DIF) oder ein Apoptose induzierender Faktor (AIF) wie sie in höheren Organismen vorhanden sind, fehlen allerdings noch immer auf der Karte der Trypanosomen. Das Vorhandensein eines COX-ähnlichen Enzyms steht außer Frage, wie die Ergebnisse der Dünnschicht-Chromatographie mit trypanosomalem Zelllysate und [¹⁴C]-Arachidonsäure gezeigt haben. Die schrittweise Isolierung des Proteins führte zu einem, durch die massenspektrometrische Analyse, eindeutig zugeordneten Protein, welches als Tb427.10.13790 identifiziert werden konnte. Nach der Expression dieses Proteins in *E. coli* Zellen konnte allerdings aufgrund der Expression in *inclusion bodies* keine eindeutige Cyclooxygenaseaktivität durch die Dünnschicht-Chromatographie mit [¹⁴C]-Arachidonsäure gezeigt werden. Die endgültige Verifizierung des in dieser Arbeit als TbCOX isolierten Proteins steht also noch aus. Allerdings sind die vorhandenen Ergebnisse vielversprechend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der löslichen Fraktion von *T. brucei* Zelllysate ein Protein mit nachweisbarer Peroxidaseaktivität und wohl auch Cyclooxygenaseaktivität, das ein ähnliches Molekulargewicht wie die Cyclooxygenasen höherer Organismen besitzt und mit anti COX-1 Antikörper detektiert werden kann, existiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Staurosporin, ein Alkaloid, das in Säugerzellen aber auch Protozoen wie Leishmanien ein Auslöser der Apoptose ist, in *T. brucei* eine andere Art von Zelltod induziert als PGD₂. Die durchflusszytometrischen Analysen von STS-induzierten Trypanosomen zeigten die gleichen apoptotischen Charakteristika wie die Apoptose höherer Organismen oder PGD₂-induzierter Trypanosomen. Allerdings wurden Merkmale wie der G1-Phasen-Arrest oder eine *de novo* Proteinbiosynthese mit STS nicht erfüllt, was aber auch bei Studien unterschiedlichster Zelllinien beobachtet wurde [Bertrand *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1996]. Somit konnte in dieser Arbeit ein weiterer Induktor eines programmierten Zelltodes in *T. brucei* gefunden werden, dessen Wirkweise sich aber vom apoptotischen Zelltod, ausgelöst durch PGD₂ und dessen Metabolite der J-Serie, unterscheidet.

Der zeitliche Verlauf der durch PGD₂ bzw. STS ausgelösten Zelltodarten lässt sich mit der Apoptose Typ II vergleichen. Zu Beginn der Apoptose steigt die Produktion intrazellulärer ROS, insbesondere der Superoxid-Anionen stark an, gefolgt von einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und Externalisierung von Phosphatidylserin. Der Verlust des MMP führt, wie in höheren Eukaryonten, zur Freisetzung der Endonuklease G in das Zytosol und den Zellkern. Die freigesetzte EndoG führt dann, wahrscheinlich in einem DNA-Degradasomen-Komplex mit weiteren Nukleasen, wie er z.B. bei *L. donovani* oder *C. elegans* schon beschrieben wurde, zur Fragmentierung der DNA im Zellkern [Parrish und Xue, 2006; BoseDasgupta *et al.*, 2008; Gannavaram und Debrabant, 2012]. Die DNA-Fragmentierung ist der letzte messbare Vorgang des Apoptoseprozesses in *T. brucei*. Somit konnte hier das Superoxid-Anion als zentrale ROS bei der Induktion und die EndoG als wichtige Nuklease bei der Apoptose in *T. brucei* identifiziert werden.

Die Überexpression der EndoG in *T. brucei* führte zum raschen Absterben der Zellpopulation und molekularbiologischen Veränderungen in den Zellen. Dies und die Tatsache, dass die Expression von trypanosomaler wie auch eukaryontischer EndoG in *E. coli* Zellen zum Einschluss in *inclusion bodies* führt, ist ein Indiz für die Vorläuferstellung des viel größeren, dennoch in seiner Aktivität gleichen Enzyms der Protozoen. Auch hier ist EndoG ein wichtiger Bestandteil des programmierten Zelltodes. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass noch weitere, am apoptotischen Zelltod beteiligte Enzyme, die in *T. brucei* bisher noch nicht bekannt sind, folgen.

6 Literaturverzeichnis

- Al-Olayan, E. M., Williams, G. T., and Hurd, H. (2002). "Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito." *Int J Parasitol*, 32(9), 1133-43.
- Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno-Mateos, D., Alvarez-Barrientos, A., and Jimenez-Ruiz, A. (2007). "Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*." *Mol Biochem Parasitol*, 152(2), 192-202.
- Ameisen, J. C. (1996). "The origin of programmed cell death." *Science*, 272(5266), 1278-9.
- Ameisen, J. C., and Capron, A. (1991). "Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis." *Immunol Today*, 12(4), 102-5.
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P. X., Estaquier, J., and Ameisen, J. C. (2002). "On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization." *Cell Death Differ*, 9(1), 65-81.
- Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J. P., Grodet, A., Dellinger, M., Traincard, F., Kahn, A., Ameisen, J. C., and Petit, P. X. (2001). "On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death." *Mol Biol Cell*, 12(10), 3016-30.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., and Krishna, S. (2003). "The trypanosomiasis." *Lancet*, 362(9394), 1469-80.
- Barry, J. D., and Emery, D. L. (1984). "Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly." *Parasitology*, 88 (Pt 1), 67-84.
- Beers, M. B., R. (1999). "Merck Research, Laboratories: The Merck manual of diagnosis and therapy." *Whitehouse Station, N.J. : Merck Research Laboratories*.
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., and Segal-Bendirdjian, E. (2001). "Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms." *Oncogene*, 20(26), 3354-62.
- Berberof, M., Perez-Morga, D., and Pays, E. (2001). "A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*." *Mol Biochem Parasitol*, 113(1), 127-38.

- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., and Pommier, Y. (1994). "Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine." *Exp Cell Res*, 211(2), 314-21.
- BioLib. (2010). ""Genus Trypanosoma."" Retrieved 21.01.2010, from <http://www.biolib.cz/en/taxonsubtaxa/id132281/>.
- Bodley, A. L., McGarry, M. W., and Shapiro, T. A. (1995). "Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and Leishmania species." *J Infect Dis*, 172(4), 1157-9.
- Borner, C., and Monney, L. (1999). "Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?" *Cell Death Differ*, 6(6), 497-507.
- Borst, P. (1986). "Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes." *Annu Rev Biochem*, 55, 701-32.
- Borst, P., Bitter, W., Blundell, PA, Chaves, I, Cross, M, Gerrits, H, van Leeuwen, F, McCulloch, R, Taylor, M, Rudenko, G. (1998). "Control of VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 91:67-76.
- BoseDasgupta, S., Das, B. B., Sengupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Dey, S., Tripathi, G., Dinda, B., and Majumder, H. K. (2008). "The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'." *Cell Death Differ*, 15(10), 1629-40.
- Braga, M. V., and de Souza, W. (2006). "Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*." *FEMS Microbiol Lett*, 256(2), 209-16.
- Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A., and de Koning, H. P. (2003). "Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future." *Trends Parasitol*, 19(5), 232-9.
- Broadhead, R., Dawe, H. R. (2006). "Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome." *Nature* 440(7081): 224-7.
- Bruce, D. (1895). "Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zululand." *Bennett and David, Durban (South Africa)*.
- Bruce, D. (1903). "Further report on sleeping sickness in Uganda." *Rep. Sleeping Sickness Comm. R. Soc.* 4: 3-6.
- Bruges, G., Betancourt, M., March, M., Sanchez, E., and Mijares, A. "Apoptotic-like activity of staurosporine in axenic cultures of *Trypanosoma evansi*." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 54(2), 103-8.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., and Burri, C. "Human African trypanosomiasis." *Lancet*, 375(9709), 148-59.

- Brun, R., Don, R., Jacobs, R. T., Wang, M. Z., and Barrett, M. P. "Development of novel drugs for human African trypanosomiasis." *Future Microbiol*, 6(6), 677-91.
- Buguet, A., Bourdon, L., Bisser, S., Chapotot, F., Radomski, M. W., and Dumas, M. (2001). "Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm." *Med Trop (Mars)*, 61(4-5), 328-39.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. (2000). "Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?" *Ann N Y Acad Sci*, 926, 1-12.
- Cattand, P. P. (1994). "Human African trypanosomiasis. The current epidemiologic situation, an alarming recrudescence of the disease." *Bull Soc Pathol Exot*, 87(5), 307-10.
- Chandrasekharan, N. V., and Simmons, D. L. (2004). "The cyclooxygenases." *Genome Biol*, 5(9), 241.
- Chappuis, F., Udayraj, N., Stietenroth, K., Meussen, A., and Bovier, P. A. (2005). "Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei* gambiense human African trypanosomiasis." *Clin Infect Dis*, 41(5), 748-51.
- Chen, J., Rauch, C. A., White, J. H., Englund, P. T., and Cozzarelli, N. R. (1995). "The topology of the kinetoplast DNA network." *Cell*, 80(1), 61-9.
- Chimelli, L., and Scaravilli, F. (1997). "Trypanosomiasis." *Brain Pathol*, 7(1), 599-611.
- Christensen, S. T., Kemp, K., Quie, H., and Rasmussen, L. (1996). "Cell death, survival and proliferation in *Tetrahymena thermophila*. Effects of insulin, sodium nitroprusside, 8-Bromo cyclic GMP, NG-methyl-L-arginine and methylene blue." *Cell Biol Int*, 20(10), 653-66.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)*, 181(3), 195-213.
- Clarkson, A. B., Jr., Bienen, E. J., Pollakis, G., and Grady, R. W. (1989). "Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase." *J Biol Chem*, 264(30), 17770-6.
- Clayton, C., Adams, M., Almeida, R., Baltz, T., Barrett, M., Bastien, P., Belli, S., Beverley, S., Biteau, N., Blackwell, J., Blaineau, C., Boshart, M., Bringaud, F., Cross, G., Cruz, A., Degrave, W., Donelson, J., El-Sayed, N., Fu, G., Ersfeld, K., Gibson, W., Gull, K., Ivens, A., Kelly, J., Vanhamme, L., and et al. (1998). "Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol*, 97(1-2), 221-4.
- Comini, M., Menge, U., and Flohe, L. (2003). "Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*." *Biol Chem*, 384(4), 653-6.

- Cote, J., and Ruiz-Carrillo, A. (1993). "Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G." *Science*, 261(5122), 765-9.
- Cross, G. A. (1975). "Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*." *Parasitology*, 71(3), 393-417.
- Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., and Nakhasi, H. L. (2003). "Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms." *Int J Parasitol*, 33(3), 257-67.
- Dey, I., Keller, K., Belley, A., and Chadee, K. (2003). "Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13561-6.
- Dönges, J. (1988). "Parasitologie. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage " *Georg Thieme Verlag*
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., Tamar, S., Olivier, M., and Papadopoulou, B. (1997). "Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages." *Embo J*, 16(10), 2590-8.
- Duszenko, M. (1998). "Aspekte der Infektionsbiologie: Afrikanische Trypanosomen und Schlafkrankheit." *Biologie in unserer Zeit* 28, 72-81.
- Dutton, J. E. (1902). "Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man." *Thompson Yates Lab Rep* 4: 455-468.
- Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures." *Science*, 130(3373), 432-7.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Utzmann, R., and Schnitzler, C. (1995). "Antiinflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance." *Inflamm Res* 44, 423-33.
- Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Janicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. (2000). "Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis." *Oncogene*, 19(40), 4563-73.

- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., and Overath, P. (2007). "Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes." *Cell*, 131(3), 505-15.
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., and Cerami, A. (1985). "Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids." *Science*, 227(4693), 1485-7.
- Fairlamb, A. H., and Cerami, A. (1992). "Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida." *Annu Rev Microbiol*, 46, 695-729.
- Fang, J., and Beattie, D. S. (2003). "Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide." *Arch Biochem Biophys*, 414(2), 294-302.
- Farber, E., Liang, H., and Shinozuka, H. (1971). "Dissociation of effects on protein synthesis and ribosomes from membrane changes induced by carbon tetrachloride." *Am J Pathol*, 64(3), 601-17.
- Farr, S. B., and Kogoma, T. (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Microbiol Rev*, 55(4), 561-85.
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L., Kubata, B. K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S., and Duszenko, M. (2005). "Prostaglandin D₂ induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form." *Cell Death Differ*, 12(4), 335-46.
- Figarella, K., Uzcategui, N. L., Beck, A., Schoenfeld, C., Kubata, B. K., Lang, F., and Duszenko, M. (2006). "Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress." *Cell Death Differ*, 13(10), 1802-14.
- Fitzpatrick, F. A., Liggett, W. F., and Wynalda, M. A. (1984). "Albumin-eicosanoid interactions. A model system to determine their attributes and inhibition." *J Biol Chem*, 259(5), 2722-7.
- Fitzpatrick, F. A., and Wynalda, M. A. (1983). "Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂. Identification of products formed in vitro." *J Biol Chem*, 258(19), 11713-8.
- Flynn, I. W., and Bowman, I. B. (1973). "The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes." *Comp Biochem Physiol B*, 45(1), 25-42.
- Forde, R. (1902). "Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed." *J Trop Med* 5: 261-263.
- Fraser, A., and James, C. (1998). "Fermenting debate: do yeast undergo apoptosis?" *Trends Cell Biol*, 8(6), 219-21.

- Frey, H.-H. L., W. (2001). "Lehrbuch der Pharamkologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin." *Stuttgart, Enke-Verlag.*
- Freymann, D. M., Metcalf, P., Turner, M., and Wiley, D. C. (1984). "6 A-resolution X-ray structure of a variable surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*." *Nature*, 311(5982), 167-9.
- Friedheim, E. A. (1949). "Mel B in the treatment of human trypanosomiasis." *Am J Trop Med Hyg*, 29(2), 173-80.
- Gale, M., Jr., Carter, V., and Parsons, M. (1994). "Cell cycle-specific induction of an 89 kDa serine/threonine protein kinase activity in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci*, 107 (Pt 7), 1825-32.
- Gannavaram, S., and Debrabant, A. "Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol*, 83(5), 926-35.
- Gannavaram, S., Vedvyas, C., and Debrabant, A. (2008). "Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites." *J Cell Sci*, 121(Pt 1), 99-109.
- Glättli, E. (1988). "Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Entwicklung von *Trypanosoma brucei brucei* (Protozoa, Kinetoplastida) in der Tsetsefliege, *Glossina morsitans centralis* (Insecta, Diptera)." *Dissertation, Universität Basel, Schweiz.*
- Gommel, D. U., Nogoceke, E., Morr, M., Kiess, M., Kalisz, H. M., and Flohe, L. (1997). "Catalytic characteristics of tryparedoxin." *Eur J Biochem*, 248(3), 913-8.
- Gruby, D. (1843). "Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*." *Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences. Paris. 17: 1134-1136.*
- Hamm, B., Schindler, A., Mecke, D., and Duszenko, M. (1990). "Differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture." *Mol Biochem Parasitol*, 40(1), 13-22.
- Helms, M. J., Ambit, A., Appleton, P., Tetley, L., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2006). "Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes." *J Cell Sci*, 119(Pt 6), 1105-17.
- Hemler, M., and Lands, W. E. (1976). "Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme." *J Biol Chem*, 251(18), 5575-9.

- Hemphill, A., Lawson, D., and Seebeck, T. (1991). "The cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*." *J Parasitol*, 77(4), 603-12.
- Hide, G. (1999). "History of sleeping sickness in East Africa." *Clin Microbiol Rev*, 12(1), 112-25.
- Hide, G., Tait, A., Maudlin, I., and Welburn, S. C. (1996). "The origins, dynamics and generation of *Trypanosoma brucei rhodesiense* epidemics in East Africa." *Parasitol Today*, 12(2), 50-5.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-88.
- Irvine, R. A., Adachi, N., Shibata, D. K., Cassell, G. D., Yu, K., Karanjawala, Z. E., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2005). "Generation and characterization of endonuclease G null mice." *Mol Cell Biol*, 25(1), 294-302.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1996). "Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death." *J Cell Biol*, 133(5), 1041-51.
- Jacobson, M. D., Burne, J. F., and Raff, M. C. (1994). "Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus." *Embo J*, 13(8), 1899-910.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." *J Biol Chem*, 273(16), 9357-60.
- Keiser, J., Stich, A., and Burri, C. (2001). "New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development." *Trends Parasitol*, 17(1), 42-9.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer*, 26(4), 239-57.
- Kieft, R., Capewell, P., Turner, C. M., Veitch, N. J., MacLeod, A., and Hajduk, S. (2010). "Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(37), 16137-41.
- Kleine, F. K. (1909). "Weitere wissenschaftliche Beobachtungen über die Entwicklung von Trypanosomen in Glossinen." *Dtsch Med Wochenschr* 35:924-925.
- Koenig, K., Menge, U., Kiess, M., Wray, V., and Flohe, L. (1997). "Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*." *J Biol Chem*, 272(18), 11908-15.

- Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., and Uchida, K. (2001). "Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress." *J Biol Chem*, 276(15), 12076-83.
- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H., Krauth-Siegel, R. L., and Clayton, C. (2000). "Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress." *Mol Microbiol*, 35(3), 542-52.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ*, 16(1), 3-11.
- Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). "Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*." *J Exp Med*, 192(9), 1327-38.
- Kuzoe, F. A. (1991). "Perspectives in research on and control of African trypanosomiasis." *Ann Trop Med Parasitol*, 85(1), 33-41.
- Kuzoe, F. A. (1993). "Current situation of African trypanosomiasis." *Acta Trop*, 54(3-4), 153-62.
- Kwan, W. P., and Voelker, B. M. (2003). "Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems." *Environ Sci Technol*, 37(6), 1150-8.
- Lamont, G. S., Tucker, R. S., and Cross, G. A. (1986). "Analysis of antigen switching rates in *Trypanosoma brucei*." *Parasitology*, 92 (Pt 2), 355-67.
- Landfear, S. M., and Ignatushchenko, M. (2001). "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids." *Mol Biochem Parasitol*, 115(1), 1-17.
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., and Nakhasi, H. L. (2002). "Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*." *Cell Death Differ*, 9(1), 53-64.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(8), 589-98.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky,

- G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F. G. (1980). "A newly revised classification of the protozoa." *J Protozool*, 27(1), 37-58.
- Lewis, R. A., Soter, N. A., Diamond, P. T., Austen, K. F., Oates, J. A., and Roberts, L. J., 2nd. (1982). "Prostaglandin D₂ generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE." *J Immunol*, 129(4), 1627-31.
- Lillico, S. G., Mottram, J. C., Murphy, N. B., and Welburn, S. C. (2002). "Characterisation of the QM gene of *Trypanosoma brucei*." *FEMS Microbiol Lett*, 211(2), 123-8.
- Lukes, J., Guilbride, D. L., Votypka, J., Zikova, A., Benne, R., and Englund, P. T. (2002). "Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure." *Eukaryot Cell*, 1(4), 495-502.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., and Frohlich, K. U. (2002). "Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine." *Curr Genet*, 41(4), 208-16.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Frohlich, K. U. (1999). "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast." *J Cell Biol*, 145(4), 757-67.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., and Frohlich, K. U. (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." *Mol Cell*, 9(4), 911-7.
- Martin, S. J., and Green, D. R. (1995). "Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival." *Crit Rev Oncol Hematol*, 18(2), 137-53.
- Meyer, T., Regenass, U., Fabbro, D., Alteri, E., Rosel, J., Muller, M., Caravatti, G. and Matter, A. (1989). "A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity." *Int J Cancer*, 43, 851-856.
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976). "Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes." *J Biol Chem*, 251(9), 2629-36.
- Molenaar, J. C. (2003). "[From the library of the Netherlands Journal of Medicine. Rudolf Virchow: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre; 1858]." *Ned Tijdschr Geneesk*, 147(45), 2236-44.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K. (1995). "Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation." *Anat Rec*, 242(1), 103-10.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). "The Fas death factor." *Science*, 267(5203), 1449-56.

- Nakahata, N., Abe, M. T., and Nakanishi, H. (1990). "PGJ₂ and delta 12PGJ₂ inhibit cell growth accompanied with inhibition of phosphoinositide turnover in human astrocytoma cells." *Prostaglandins*, 40(4), 405-16.
- Nakano, H., Kobayashi, E., Takahashi, I., Tamaoki, T., Kuzuu, Y., and Iba, H. (1987). "Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60." *J Antibiot (Tokyo)*, 40(5), 706-8.
- Narumiya, S. (1995). "Structures, properties and distributions of prostanoid receptors." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 23, 17-22.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." *Physiol Rev*, 79(4), 1193-226.
- Nguewa, P. A., Fuertes, M. A., Valladares, B., Alonso, C., and Perez, J. M. (2004). "Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?" *Trends Parasitol*, 20(8), 375-80.
- Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M., and Flohe, L. (1997). "A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*." *Biol Chem*, 378(8), 827-36.
- Ohsato, T., Ishihara, N., Muta, T., Umeda, S., Ikeda, S., Mihara, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2002). "Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space." *Eur J Biochem*, 269(23), 5765-70.
- Oida, H., Hirata, M., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Mizuno, N., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1997). "Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain." *FEBS Lett*, 417(1), 53-6.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., and Masuma, R. (1977). "A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization." *J Antibiot (Tokyo)*, 30(4), 275-82.
- Opperdoes, F. R. a. P. B. (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbodylike organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." *FEBS Lett* 80(2): 360-4.
- Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., Forstova, J. (1997). "Ammonia mediates communication between yeast colonies." *Nature* 390:532-536.
- Parrish, J. Z., and Xue, D. (2006). "Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development." *Chromosoma*, 115(2), 89-97.
- Pays, E., and Vanhollebeke, B. (2008). "Mutual self-defence: the trypanolytic factor story." *Microbes Infect*, 10(9), 985-9.

- Pentreath, V. W., Rees, K., Owolabi, O. A., Philip, K. A., and Doua, F. (1990). "The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D₂ is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(6), 795-9.
- Pepin, J., and Meda, H. A. (2001). "The epidemiology and control of human African trypanosomiasis." *Adv Parasitol*, 49, 71-132.
- Piacenza, L., Irigoien, F., Alvarez, M. N., Peluffo, G., Taylor, M. C., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., and Radi, R. (2007). "Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression." *Biochem J*, 403(2), 323-34.
- Piacenza, L., Peluffo, G., and Radi, R. (2001). "L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7301-6.
- Picot, S., Burnod, J., Bracchi, V., Chumpitazi, B. F., and Ambroise-Thomas, P. (1997). "Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(5), 590-1.
- Pignatelli, M., Sanchez-Rodriguez, J., Santos, A., and Perez-Castillo, A. (2005). "15-deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J₂ induces programmed cell death of breast cancer cells by a pleiotropic mechanism." *Carcinogenesis*, 26(1), 81-92.
- Ploubidou, A., Robinson, D. R., Docherty, R. C., Ogbadoyi, E. O., and Gull, K. (1999). "Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis." *J Cell Sci*, 112 (Pt 24), 4641-50.
- Priest, J. W., and Hajduk, S. L. (1994). "Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*." *J Bioenerg Biomembr*, 26(2), 179-91.
- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Nguouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torrelee, E., and Kande, V. (2009). "Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial." *Lancet*, 374(9683), 56-64.
- Rawer, M. (2004). "Prostaglandinstoffwechsel in *Trypanosoma brucei*: Klonierung und Charakterisierung der Prostaglandin F_{2α} Synthase und der PGD₂ induzierte Zelltod." *Dissertation, Universität Tübingen, AG Duszenko*.

- Raz, A., Wyche, A., Siegel, N., and Needleman, P. (1988). "Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1." *J Biol Chem*, 263(6), 3022-8.
- Rico, E., Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno, D., Clos, J., Gago, F., Moreno, I., Dominguez, M., and Jimenez-Ruiz, A. (2009). "Leishmania infantum expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus." *Mol Biochem Parasitol*, 163(1), 28-38.
- Ridgley, E. L., Xiong, Z. H., and Ruben, L. (1999). "Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei* brucei." *Biochem J*, 340 (Pt 1), 33-40.
- Roditi, I., and Clayton, C. (1999). "An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol*, 103(1), 99-100.
- Roditi, I., Schwarz, H., Pearson, T. W., Beecroft, R. P., Liu, M. K., Richardson, J. P., Buhning, H. J., Pleiss, J., Bulow, R., Williams, R. O., and et al. (1989). "Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*." *J Cell Biol*, 108(2), 737-46.
- Ross, R., and Thomson, D. (1910). "A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed." *Br Med J*, 1(2582), 1544-5.
- Ruiz-Carrillo, A., and Renaud, J. (1987). "Endonuclease G: a (dG)_n X (dC)_n-specific DNase from higher eukaryotes." *Embo J*, 6(2), 401-7.
- Saunders, J. W., Jr. (1966). "Death in embryonic systems." *Science*, 154(3749), 604-12.
- Scammell, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., Onoe, H., Saper, C., and Hayaishi, O. (1998). "Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D₂." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7754-9.
- Schafer, P., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Cymerman, I. A., Bujnicki, J. M., Ruiz-Carrillo, A., Pingoud, A., and Meiss, G. (2004). "Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis." *J Mol Biol*, 338(2), 217-28.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M, Wesselborg, S, Peter, ME. (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." *European Journal of Biochemistry* 254:439-459.
- Secrist, J. P., Sehgal, I., Powis, G., and Abraham, R. T. (1990). "Preferential inhibition of the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase by staurosporine." *J Biol Chem*, 265(33), 20394-400.

- Sereno, D., Holzmüller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaiissi, A., and Lemesre, J. L. (2001). "Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes." *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 2064-9.
- Shapiro, J. A. (1995). "The significances of bacterial colony patterns." *Bioessays*, 17(7), 597-607.
- Shub, D. A. (1994). "Bacterial viruses. Bacterial altruism?" *Curr Biol*, 4(6), 555-6.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., and Hla, T. (2004). "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." *Pharmacol Rev*, 56(3), 387-437.
- Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." *Annu Rev Microbiol*, 41, 363-82.
- Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J., and Bredesen, D. E. (2004). "Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix." *Cell Death Differ*, 11(10), 1066-75.
- Stephens, J. W. W. u. F., H.B. . (1910). "On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*)." *Proc R Soc Lond B* 83: 28-33.
- Stich, A. a. S., D. (2002). "Die Rückkehr einer Seuche: Trypanosomen." *Biologie in unserer Zeit* 32, 294-301.
- Stuart, K. (1998). "RNA editing: trypanosomes rewrite the genetic code." *Verh K Acad Geneesk Belg*, 60(1), 63-74.
- Szallies, A., Kubata, B. K., and Duszenko, M. (2002). "A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett*, 517(1-3), 144-50.
- Takahashi, A., Hirata, H., Yonehara, S., Imai, Y., Lee, K. K., Moyer, R. W., Turner, P. C., Mesner, P. W., Okazaki, T., Sawai, H., Kishi, S., Yamamoto, K., Okuma, M., and Sasada, M. (1997). "Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8." *Oncogene*, 14(23), 2741-52.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). "Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase." *Biochem Biophys Res Commun*, 135(2), 397-402.

- Tsuda, A., Witola, W. H., Ohashi, K., and Onuma, M. (2005). "Expression of alternative oxidase inhibits programmed cell death-like phenomenon in bloodstream form of *Trypanosoma brucei rhodesiense*." *Parasitol Int*, 54(4), 243-51.
- Turner, C. M. (1999). "Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* infections: an holistic view." *J Cell Sci*, 112 (Pt 19), 3187-92.
- Tyler, K. M. (2003). "Maintenance of parasitaemia - is it to die for?" *Kinetoplastid Biol Dis*, 2(1), 2.
- Ujihara, M., Urade, Y., Eguchi, N., Hayashi, H., Ikai, K., and Hayaishi, O. (1988). "Prostaglandin D₂ formation and characterization of its synthetases in various tissues of adult rats." *Arch Biochem Biophys*, 260(2), 521-31.
- Urade, Y., Kitahama, K., Ohishi, H., Kaneko, T., Mizuno, N., and Hayaishi, O. (1993). "Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), 9070-4.
- Urade, Y., Ujihara, M., Horiguchi, Y., Ikai, K., and Hayaishi, O. (1989). "The major source of endogenous prostaglandin D₂ production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues." *J Immunol*, 143(9), 2982-9.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off." *Science*, 280(5361), 243-8.
- Vickerman, K. (1969). "On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes." *J Cell Sci*, 5(1), 163-93.
- Vickerman, K., and Tetley, L. (1977). "Recent ultrastructural studies on trypanosomes." *Ann Soc Belg Med Trop*, 57(4-5), 441-57.
- Virchow, R. (1871). "Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre." 4. Auflage. Hirschwald. Berlin.
- Vogt, K. C. (1842). "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*)." *Solothum: Jent und Gassmann*, pp 130.
- Welburn, S. C., Barcinski, M. A., and Williams, G. T. (1997). "Programmed cell death in trypanosomatids." *Parasitol Today*, 13(1), 22-6.
- Welburn, S. C., Lillico, S., and Murphy, N. B. (1999). "Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense* -identification of differentially expressed genes during con A induced death." *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2), 229-34.

- Welburn, S. C., and Murphy, N. B. (1998). "Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms." *Cell Death Differ*, 5(7), 615-22.
- WHO. (2010). "Fact sheet No. 259 - African trypanosomiasis (sleeping sickness)." Retrieved 22.12.2010, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
- Winkle, S. (2005). "Geißeln der Menschheit. Kulturgeschichte der Seuchen." *Artemis & Winkler, Düsseldorf*.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol*, 99(1), 89-101.
- Witzel, S. D., Otto ; Pschyrembel, Willibald. (2007). "Pschyrembel Klinisches Woerterbuch." *neu bearb. und erw. Auflage Berlin [u.a.] : deGruyter, 2007 (Klinisches Woerterbuch)*.
- Wolburg, H., Mogk, S., Acker, S., Frey, C., Meinert, M., Schonfeld, C., Lazarus, M., Urade, Y., Kubata, B. K., and Duszenko, M. (2012). "Late stage infection in sleeping sickness." *PLoS One*, 7(3), e34304.
- Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H., and Miyamoto, E. (1991). "Staurosporine: an effective inhibitor for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Neurochem*, 56(1), 294-8.
- Yoon, S. M., Song, H. N., Yang, J. H., Lim, M. Y., Chung, Y. J., Ryu, S. E., and Woo, E. J. (2009). "Purification, crystallization and data collection of the apoptotic nuclease endonuclease G." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 65(Pt 5), 504-7.
- Yuan, L., J. G. Liu, et al. (2000). "The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility." *Mol Cell* 5(1): 73-83.
- Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., and Chappuis, F. "NECT is next: implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness." *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5), e720.
- Zangger, H., Mottram, J. C., and Fasel, N. (2002). "Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis?" *Cell Death Differ*, 9(10), 1126-39.
- Zhang, J., Dong, M., Li, L., Fan, Y., Pathre, P., Dong, J., Lou, D., Wells, J. M., Olivares-Villagomez, D., Van Kaer, L., Wang, X., and Xu, M. (2003). "Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15782-7.

Curriculum vitae

■ Persönliche Daten

Name: Torsten Barth
Geburtsdatum: 31.05.1981
Geburtsort: Hechingen
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

■ Wissenschaftliche Laufbahn

03/2008 – 02/2013 **Promotion (Dr. rer. nat.)**, *Universität Tübingen*,
Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Duszenko
Titel: “Untersuchungen zum Apoptosemechanismus bei
Trypanosoma brucei.”

12/2007 **Diplom** in Biochemie

04/2007 – 12/2007 **Diplomarbeit**, *Universität Tübingen*,
Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Duszenko,
Titel: “Untersuchungen zum Wasserstoffperoxid-induzierten
Zelltod bei *Trypanosoma brucei brucei*.”

09/2004 **Vordiplom**, *Universität Tübingen*

10/2002 **Studienfachwechsel zu Biochemie**, *Universität Tübingen*

10/2001 **Studium der Chemie**, *Universität Tübingen*

■ Schulbildung/ Zivildienst

09/2000 – 07/2001 Zivildienstleistender im Kreiskrankenhaus Hechingen

06/2000 Abitur

09/1991 – 06/2000 Allgemeinbildendes Gymnasium Hechingen

09/1987 – 06/1991 Grundschule Hechingen

■ **Fortbildung / Konferenzen**

- | | |
|---------|--|
| 10/2012 | COST meeting, Edinburgh, Großbritannien |
| 09/2010 | Lodopp COST action training school on bioinformatics and flow cytometry, Madrid, Spanien |
| 06/2010 | Young scientists symposium, Blaubeuren, Deutschland |
| 04/2010 | COST meeting, Lausanne, Schweiz |

■ **Publikationen**

Barth T, Stein J, Mogk S, Kubata BK, Duszenko M. (2013) "Life and death of *T. brucei*: New perspectives for drug development." Jäger, Koch, Flohé (eds.) Drug discovery for trypanosomatid diseases. Wiley VCH Verlag

Redecke L, *et al.* (2012) "Natively Inhibited Trypanosoma brucei Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser." Science, 339(6116), 227-30.

Denninger V, Koopmann R, Muhammad K, Barth T, Bassarak B, Schönfeld C, Kilunga BK, Duszenko M. (2008) "Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways?" Methods Enzymol. 2008;451:373-408. online