

**Herstellung von *T.b.* EndonukleaseG-eGFP exprimierenden  
Trypanosomen zur Untersuchung der Funktion von  
*T.b.* EndonukleaseG während der Apoptose in der Blutform  
von *Trypanosoma brucei brucei***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Meiwes, Andreas Gabor David

2015

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Michael Duszenko

2. Berichterstatter: Professor Dr. Michael Schwarz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	GESCHICHTE.....	1
1.1.1	Die Entdeckung der Trypanosomiasis .....	1
1.1.2	Epidemien des letzten Jahrhunderts .....	3
1.2	TRYPANOSOMA BRUCEI .....	4
1.2.1	Systematische Einteilung von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	4
1.2.2	Zellmorphologie .....	5
1.2.3	Besonderheiten von <i>Trypanosoma brucei</i> : VSG, Glykosom, Polyaminstoffwechsel, Genexpression.....	7
1.2.4	Zellzyklus .....	12
1.3	TSETSEFLIEGE .....	13
1.4	TRYPANOSOMIASIS .....	13
1.4.1	Epidemiologie.....	13
1.4.2	Klinik.....	14
1.4.3	Diagnose.....	15
1.4.4	Therapie .....	16
1.4.5	Impfung.....	18
1.4.6	Prävention .....	18
1.5	ZELLDICHTEREGULATION VON <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i> .....	19
1.6	DER ZELLTOD .....	21
1.6.1	Nekrose .....	22
1.6.2	Apoptose .....	22
1.6.3	Autophagie.....	25
1.6.4	Caspase-unabhängiger Zelltod .....	26
1.6.5	Apoptose bei Protozoen.....	27
1.7	ENDONUKLEASE G.....	28
1.7.1	Endonuklease G während der Apoptose .....	29
1.7.2	Beteiligung an Reparatur und Replikation .....	31
1.7.3	Trypanosomale Endonuklease G .....	31
1.8	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>33</b>
2.1	MATERIAL .....	33
2.1.1	Organismen .....	33
2.1.2	Geräte.....	33

2.1.3	Chemikalien .....	36
2.1.4	Plasmide .....	40
2.1.5	Medien, (Stamm-)Lösungen, Puffer .....	41
2.1.6	Oligonukleotide .....	52
2.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	52
2.1.8	Kits .....	53
2.1.9	Software .....	54
2.2	METHODIK.....	55
2.2.1	Kultivierung .....	55
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	57
2.2.3	Gewinnung von RNA.....	61
2.2.4	Reverse Transkription.....	61
2.2.5	Proteinbiochemie .....	62
2.2.6	Durchflusszytometrie .....	64
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie .....	65
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
3.1	GENERATION EINES <i>T.b.</i> ENDOG-EGFP-FUSIONSPROTEINS ZUR LOKALISATION VON ENDOG IN TRYPANOSOMEN	67
3.1.1	Amplifikation der trypanosomalen EndoG Sequenz mithilfe der <i>TAQ</i> -Polymerase .....	67
3.1.2	Sequenzierung und Klonierung des EndoG-Konstruktes in den induzierbaren eGFP-Fusionsvektor pCO57 .....	68
3.2	TRANSFORMATION DES NAIVEN- UND DES <i>T.b.</i> -ENDOG-VEKTORS pCO57 IN TRYPANOSOMEN .....	74
3.2.1	Transformation mithilfe der Elektroporation und der homologen Rekombination .....	74
3.2.2	Induktion der transformierten Klone mithilfe von Doxycyclin .....	75
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION VON ENDOG-EGFP AUF mRNA-EBENE UND PROTEIN-EBENE .....	75
3.3.1	Qualitativer Nachweis von mRNA des Klons SMB-eGFP und SMB-EndoG-eGFP .....	75
3.3.2	Qualitativer Proteinnachweis von eGFP und <i>T.b.</i> EndoG-eGFP.....	76
3.4	QUANTITATIVE CHARAKTERISIERUNG DER INDUZIERTEN APOPTOSE MITHILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	78
3.4.1	Ausschluss von Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid .....	79
3.4.2	Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der DNA Degradation.....	80
3.4.3	Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der Phosphatidylserinexposition .....	81
3.4.4	Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der ROS .....	82
3.4.5	Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe des mitochondrialen Potentials .....	83
3.5	PROLIFERATIONSASSAY DES KLONS SMB-ENDOG-EGFP IM VERGLEICH MIT SMB-ZELLEN.....	83
3.6	CHARAKTERISIERUNG DER LOKALISATION VON ENDOG-EGFP IN TRANSFORMIERTEN TRYPANOSOMEN MITHILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE .....	85
3.6.1	Lokalisation des eGFP-Klons und des EndoG-eGFP-Klons .....	85

3.6.2	Kolokalisation von EndoG-eGFP mit Mitotracker in Trypanosomen .....	86
3.6.3	Lokalisation von <i>T.b.</i> EndoG-eGFP in transformierten Trypanosomen im frühen Stadium der Apoptose, induziert mit PGD <sub>2</sub> .....	87
3.6.4	Lokalisation von <i>T.b.</i> EndoG-eGFP in transformierten Trypanosomen 20 h nach Induktion der Apoptose mit Staurosporin .....	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
4.1	GENERATION DER FUSIONSSEQUENZ ENDOG-EGFP IM pCO57-VEKTOR .....	90
4.2	TRANSFORMATION DES NAIVEN UND DES <i>T.b.</i> ENDOG-pCO57 VEKTORS IN TRYPANOSOMEN .....	91
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSKRIPTION UND TRANSLATION MITTELS RNA UND PROTEIN-NACHWEIS .....	92
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER APOPTOSE MITHILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	93
4.5	WACHSTUMSEIGENSCHAFTEN MITHILFE DES PROLIFERATIONSASSAY .....	94
4.6	LOKALISATION MITHILFE DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE .....	95
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS-, TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS: .....	100
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	101
6.3	TABELLENVERZEICHNIS .....	103
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>118</b>
8.1	DANKSAGUNG .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
8.2	CURICULUM VITAE .....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
8.3	VERÖFFENTLICHUNGEN .....	118
8.4	AUTHENTIZITÄTSERKLÄRUNG .....	119

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte

Trypanosomen beeinflussten die Evolution des Menschen. So sind auf Bäumen lebende Primaten gegen alle Trypanosomen-Arten anfällig, der Mensch dagegen entwickelte eine Immunität gegen Trypanosomen, mit der Ausnahme von *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*). Steverding et al. diskutiert, dass diese Immunität dem Menschen einen bedeutenden Überlebensvorteil gebracht hat (Steverding, 2008).

Von Senegal/Gambia bis zum Tschadsee siedelt seit dem 13. Jh. das westafrikanische Volk der Fulbe. Da Rinder an Nagana (N'gana steht in der Sprache *Zulu* für kraftlos/nutzlos (Winkle, 2005)) erkrankten und Rinderherden die wirtschaftliche Grundlage der Fulbe sind, siedeln sie bis heute nördlich des Tsetsefliegen-Gürtels (Winkle, 2003). Europäische Rinder erkrankten stärker an Nagana als ansässige Rinder, die ähnlich wie Wildtiere häufig eine asymptomatischere Infektion aufweisen.

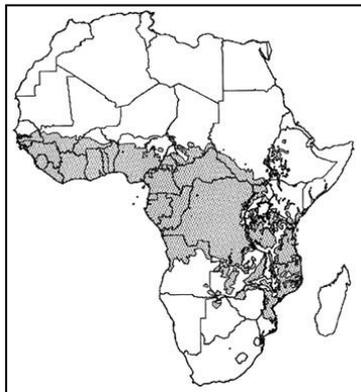


Abbildung 1: Tsetsefliegen-Gürtel in Afrika (<http://www.fao.org/docrep/006/X0413E/X0413E02.htm>).

### 1.1.1 Die Entdeckung der Trypanosomiasis

Die ersten historischen Berichte stammen von Arabern, die mit Westafrika Handel betrieben (Steverding, 2008). So beschreibt Abu Abdallah Yaqut (1179 - 1229) ein Dorf, dessen Einwohner und sogar Hunde nur noch aus Haut und Knochen bestanden hätten. Der erste konkrete Fallbericht stammt jedoch erst aus dem 14. Jh. von dem

---

Historiker Ibn Khaldun (Cox, 2004). Er berichtete 1373 vom Tod des Sultan Mari Diata (Sultan von Mali), der an der Schlafkrankheit erkrankt gewesen sei (Steverding, 2008).

Mit der Erkundung Afrikas um 1500 sahen Europäer erstmals Menschen mit den typischen Symptomen (siehe Kap. 1.4.2) (Cox, 2004). Allerdings wurden die Symptome von Atkins (ca. 1740) als „*sleepy distemper*“ missinterpretiert. Winterbottom (um 1800) beobachtete, dass Sklavenhändler vor dem Kauf die Nacken der Sklaven auf geschwollene cervicale Lymphknoten abtasteten (De Raadt, 2005). Weitere Symptome der Erkrankung missdeutete er jedoch als „*Negro Lethargy*“ (Cox, 2004).

Durch die dynamische Entwicklung des Mikroskops im 19. Jahrhundert wurden die Pathomechanismen vieler Infektionserkrankungen aufgedeckt. Bezogen auf Trypanosomen beschrieb Valentine 1841 Flagellaten im Blut von braunen Forellen (*Salmo fario*) (Valentin, 1841). Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht klar, um welche Parasiten es sich dabei handelte. In den folgenden Jahren wurden von Gluge, Mayer, und Gruby erneut Trypanosomen gefunden, und zwar in Fröschen (Cox, 2004). 1894 identifizierte David Bruce *Trypanosoma brucei* als den Erreger der Nagana-Seuche (Bruce, 1895) und vermutete, dass Trypanosomen durch die Tsetsefliege mechanisch übertragen werden (Cox, 2004).

Forde, ein britischer Kolonialarzt in Gambia, isolierte 1901 als Erster Parasiten aus dem Blut eines englischen Patienten, die Dutton als Trypanosomen identifizierte und sie mit dem Namen „*Trypanosoma gambiense*“ (heute: *Trypanosoma brucei gambiense*, *T.b. gambiense*) benannte (De Raadt, 2005). 1910 beschrieben Stephens und Fantham die akute Form der Schlafkrankheit. Sie erkannten Unterschiede zu den bereits bekannten *Trypanosoma brucei gambiense* und nannten diese „*Trypanosoma rhodesiense*“ (heute: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T.b. rhodesiense*) (Stephens & Fantham, 1910).

1902 fand Aldo Castellani zum ersten Mal Trypanosomen im Liquor erkrankter Menschen (Castellani, 1903). Im gleichen Jahr suchten Dutton und Todd durch Haemofiltration nach Trypanosomen. Bei den positiv getesteten Patienten zeigten sich nur unspezifische Symptome wie z.B. Fieber. Dutton und Todd nannten dieses

---

Krankheitsbild „*Trypanosoma fever*“ und „*a mild tropical infection*“ (De Raadt, 2005) und erkannten noch nicht, dass es sich dabei nur um die Frühsymptome handelte.

Emile Brumpt stellte 1902 eine Übereinstimmung zwischen der geographischen Ausbreitung der Tsetsefliege und der tropischen Schlafkrankheit (Human African Trypanosomiasis, HAT) fest (De Raadt, 2005). Im Gegensatz zu Bruce ging Robert Koch nicht von einer rein mechanischen Übertragung aus, sondern vermutete bereits, dass die Tsetsefliege als Zwischenwirt der Trypanosomen fungiert (Kleine, 1909).

### **1.1.2 Epidemien des letzten Jahrhunderts**

Die erste Epidemie dauerte von 1896 - 1906 und kostete im Kongobecken 300000 - 500000 Menschen das Leben (WHO, 2012). Als Erreger wurde zuerst *T.b. gambiense* vermutet, Koerner konnte jedoch zeigen, dass die Epidemie durch *T.b. rhodesiense* verursacht wurde (Koerner, De Raadt, & Maudlin, 1995). Die Ausbreitung der Trypanosomiasis wurde dadurch begünstigt, dass der Handel unter den einheimischen Stämmen durch die Kolonialmächte gefördert wurde. Dieser Handel förderte einen Austausch zwischen den Stämmen und die Erkrankung konnte in weniger betroffene Gebiete verschleppt werden. Wegen der schweren Epidemie waren die Kolonialmächte besorgt und schickten Kommissionen zur Erforschung nach Afrika. Deshalb sind viele der bahnbrechenden Entdeckungen über den Krankheitsverlauf genau in dieser Zeit entstanden.

Die zweite Epidemie war in den 1920er Jahren (WHO, 2012). Sie wurde durch die Bekämpfung der Tsetsefliege und durch Kombinationen neuer Medikamente gegen HAT eingedämmt. Durch die Verbesserung der medizinischen Versorgung und durch das Screening von Millionen von Patienten schafften es die Kolonialmächte letztendlich die Fallzahlen von HAT bis zum Anfang der 1960er kontinuierlich zu senken (Simarro, Jannin, & Cattand, 2008).

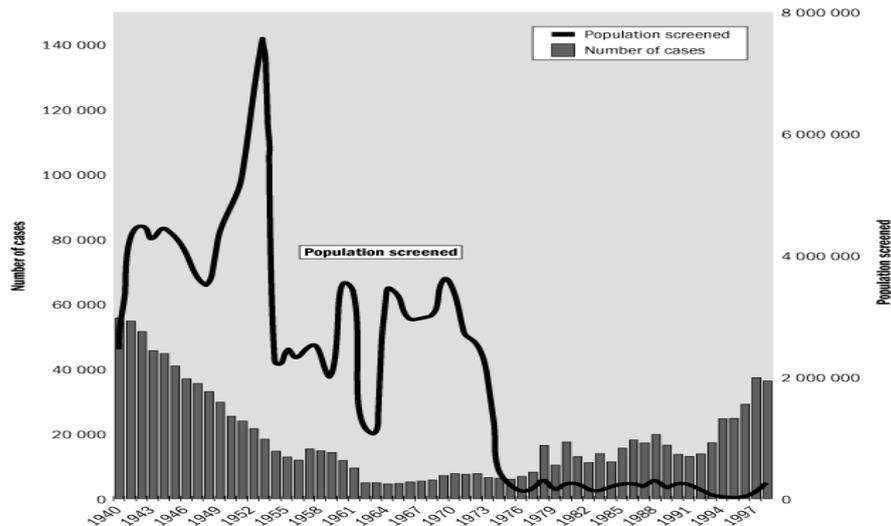


Abbildung 2: Fallzahlen und Menge der gescreenten Personen von 1940 – 2000 (WHO).

Wegen der geringen Fallzahlen und der Unabhängigkeit betroffener Länder (ab den 1960er Jahren) wurden viele Programme zur Eingrenzung von HAT gestoppt (Simarro et al., 2008). Als Folge stieg die Anzahl der berichteten Fälle ab Mitte der 1970er Jahren wieder an. Dies war der Beginn der dritten Epidemie (WHO, 2012), welche bis in die 1990er Jahre reichte.

## 1.2 Trypanosoma brucei

### 1.2.1 Systematische Einteilung von Trypanosoma brucei

Trypanosomen sind unter den Eukaryonten in der Evolution sehr früh entstandene sich teilende Zellen (Barrett et al., 2003). Innerhalb der Protozoen gehören Trypanosomen als einzellige Parasiten mit einem Flagellum zu der Gruppe der Flagellaten (Geißeltiere). Durch den Kinetoplast, einem DNA-haltigen Bereich des Mitochondriums, gehören sie zu der Ordnung der Kinetoplastiden. Innerhalb der Kinetoplastiden gehören sie mit einem Flagellum zu der Unterordnung der *Trypanosomatidae* (Monoflagellaten). Neben anderen Gattungen sind Trypanosomen eine von sieben Gattungen der *Trypanosomatidae*. Da sich ihr Lebenszyklus über zwei Wirtstypen erstreckt, gehören sie zu den heteroxenen Arten. Die Gattung *Trypanosoma* wird in die Sektionen *Stercoraria* und *Salvaria* unterteilt, wobei *Stercoraria* über die Faeces der Invertebraten und *Salvaria* über den Speichel der Invertebraten übertragen

werden (Barrett et al., 2003). Alle drei Subspezies von *Trypanosoma brucei* gehören der Sektion der *Salvaria* an.

Tabelle 1: Übersicht der Art *Trypanosoma brucei*.

Name	<i>T.b. brucei</i>	<i>T.b. gambiense</i>	<i>T.b. rhodesiense</i>
<b>Pathogenität</b>	Tierpathogen	tier-/humanpathogen	tier-/humanpathogen
<b>Vorkommen</b>	Ostafrika	Westafrika	Ostafrika
<b>Vektor</b>	<i>Glossina Morsitans</i>	<i>Glossina Palpalis</i>	<i>Glossina Morsitans</i>

*T.b. rhodesiense* und *T.b. gambiense* sind humanpathogen. *T.b. brucei* dagegen ist nur tierpathogen. Das Protein ApoL1 in der HDL-Fraktion des Menschen ist für *T.b. brucei* toxisch (Wheeler, 2010). Da humanpathogene Trypanosomen phänotypisch nicht eindeutig unterscheidbar sind (Tait, Babiker, & Le Ray, 1984), ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen den zwei Stämmen nur genotypisch zu stellen (Barrett et al., 2003).

### 1.2.2 Zellmorphologie

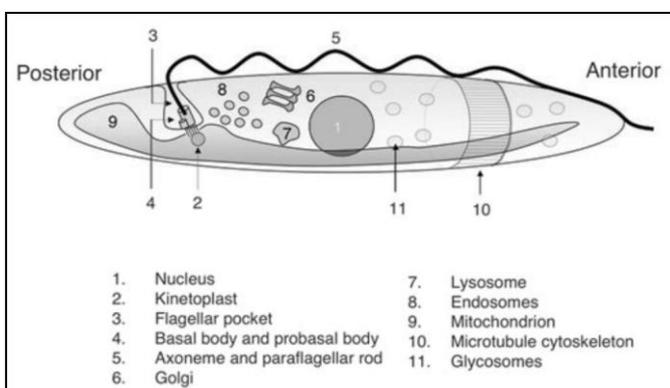


Abbildung 3: Morphologische Übersicht eines Trypanosoms (Overath & Engstler, 2004).

Trypanosomen sind einzellige Parasiten. Der Name ist aus dem Griechischen (gr. τρύπανον – Bohrer, σωμα - Körper) abgeleitet und beschreibt zum einen das spindelförmige Aussehen, zum anderen die wellenartige Bewegung der Trypanosomen. Je nach Lebenszyklus sind die Parasiten 15 – 40 µm lang und ca. 0,5 – 2 µm breit. Innen an der Zellmembran anliegend erstreckt sich über die ganze Zelle ein Zytoskelett, welches aus entlang an der Längsachse verlaufenden Mikrotubuli besteht. Sie besitzen

eine einheitliche Polarität: der Minuspol liegt am vorderen Teil und der Pluspol am hinteren Teil der Zelle (Robinson, Sherwin, Ploubidou, Byard, & Gull, 1995). Außen an der Membran angelagert befindet sich bei dem Blutstadium ein dicht gepackter Mantel aus „*Variant Surface Glycoprotein*“ (VSG). Bei prozyklischen Formen, welche in der Fliege vorkommen, besteht dieser Mantel aus Prozyklin. Prozyklin besteht größtenteils aus Glutaminsäure und Prolin, welches in der Fliege gut verfügbar ist. Prozyklin ist weniger dicht gepackt als VSG (Roditi et al., 1989). Beide Oberflächenproteine sind jeweils über Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran befestigt (Zamze, Ferguson, Collins, Dwek, & Rademacher, 1988). Trypanosomen besitzen nur ein einzelnes Mitochondrium, welches sich als lang gestreckter Schlauch über die ganze Zelle erstreckt (Rico et al., 2009). Die Cristae des Mitochondriums sind in den Blutformen stark zurückgebildet. Der Energiestoffwechsel der Blutform läuft ausschließlich über die Glykolyse ab. In der prozyklischen Fliegenform bilden sich die Mitochondrien erneut aus und die Energie wird über die oxidative Phosphorylierung gewonnen. Der sogenannte Kinetoplast, der Teil des Mitochondriums, der kDNA beinhaltet, enthält viele ineinander verschlungene mitochondriale DNA-Ringe (Lukes et al., 2002). Bei der Blutform befindet er sich am hinteren Ende der Zelle, beim epimastigoten Stadium vor dem Nukleus und bei der Fliegenform in der Mitte zwischen Nukleus und dem hinteren Zellende (Matthews, 2005).

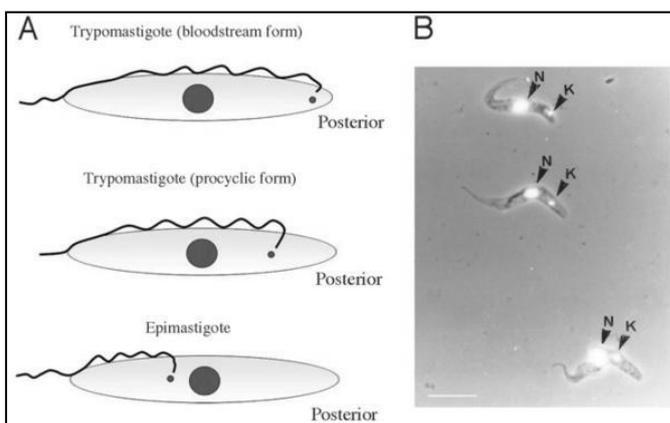


Abbildung 4: Lokalisation des Kinetoplasten (Matthews, Sherwin, & Gull, 1995).

Im hinteren Teil der Zelle zwischen Kinetoplast und Zellkern liegen große Teile des Golgi-Apparats, der Lysosomen und der Endosomen. Als Besonderheit besitzen Trypanosomen sogenannte Glykosomen. Glykosomen kommen diffus verteilt in der

---

gesamten Zelle vor (Parsons, 2004). In ihnen findet die Glykolyse von der Glukose bis zum 3-Phosphoglycerat statt. Zur Fortbewegung besitzen Trypanosomen ein Flagellum. Es fungiert als Zuggeißel, ist am Basalkörper befestigt und geht in der Flagellumtasche aus der Zelle heraus. Im Inneren des Flagellums befindet sich, wie typisch bei Geißeln, eine  $9 \times 2 + 2$  Struktur (Woolley, Gadelha, & Gull, 2006). Das Flagellum ist von einer Flagellummembran umgeben. Diese ist in regelmäßigen Abständen über Punkt-desmosomen an der Zellmembran verankert (Vaughan, 2010). Am vorderen Teil der Trypanosomen ist das Flagellum nicht verankert. Durch die Bewegungen des Flagellums entsteht der Eindruck einer undulierenden Membran. Die Flagellumtasche ist der einzige Ort, an dem Trypanosomen in der Lage sind Endo- und Exozytose durchzuführen (Overath & Engstler, 2004). Auch ist diese für die Entfernung von Antikörpern zuständig (Morgan, Hall, Denny, Carrington, & Field, 2002). An der restlichen Oberfläche der Zelle verhindert das Zytoskelett die Endo- bzw. Exozytose. Die Flagellumtasche ist bei trypomastigoten Formen hinter dem Nukleus und bei epimastigoten Formen vor dem Nukleus lokalisiert.

### **1.2.3 Besonderheiten von *Trypanosoma brucei*: VSG, Glykosom, Polyaminstoffwechsel, Genexpression**

#### **1.2.3.1 VSG (*Variant Surface Glycoprotein*)**

Seit 1885 ist bekannt, dass die Zelldichte der Parasiten im Blut fluktuiert (Cox, 2004). Der für die Fluktuation ursächliche Glykoproteinmantel wurde 1970 von Vickerman entdeckt (Vickerman, 1970) und fünf Jahre später von Cross genauer charakterisiert. Er fand heraus, dass der Glykoproteinmantel auf jeder Zelle aus ca.  $10^7$  Molekülen des „*Variant surface Glycoproteins*“ (VSG) besteht (G A Cross, 1975). VSGs sind auf der Zelloberfläche so dicht exprimiert, dass sie jegliche Rezeptoren verdecken und dadurch als Schutz gegen die zelluläre Immunabwehr und das Komplementsystem dienen (Young et al., 2008). Zu einem beliebigen Zeitpunkt besitzt ein Großteil der Parasiten nur eine Variante des VSGs. Sobald das Immunsystem Antikörper gegen dieses VSG entwickelt, wird die klonale Population immunologisch bekämpft, parallel wächst jedoch spontan ein Klon mit einem anderen VSG-Mantel heran. Durch diese Antigenvariation entkommt der Parasit auch dem spezifischen Immunsystem (McCulloch, 2004).

---

Die parasitärischen Wellen betragen ca. 8 - 10 Tage (Ross & Thomson, 1910). Es gibt über 1000 Gene für verschiedene VSG-Varianten (Borst, 1986), welche ca. 10 % des Genoms einnehmen. N-terminal, dem nach außen gerichteten Bereich des Moleküls, liegt eine hohe Variabilität der Moleküle vor (Field & Boothroyd, 1996). Die einzelnen Genvarianten liegen auf sogenannten „*silent sites*“. Um diese zu exprimieren wird zufällig ein VSG-Gen in eine „*expression site*“ kopiert (Morrison, Marcello, & McCulloch, 2009). Es gibt ca. 20 solcher „*expression sites*“. Sie liegen ca. 1 – 3 kbp *upstream* des Telomers (G. A. Cross, Wirtz, & Navarro, 1998). Zu einem Zeitpunkt wird nur von einer „*expression site*“ aus exprimiert (Young et al., 2008).

#### **1.2.3.2 Glykosom, Energiestoffwechsel**

Blutform (BF) Trypanosomen gewinnen die von ihnen benötigte Energie über die Glykolyse. Die Mitochondrien sind stark zurückgebildet, daher finden der Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung nicht statt. ATP können BF Trypanosomen nur aus Glukose oder alternativ aus Glycerin gewinnen. Anders als bei anderen Eukaryonten läuft die Glykolyse hauptsächlich in einem speziellen Kompartiment, dem Glykosom, und nicht im Zytosol ab. Glykosomen sind DNA-freie Organellen, die von einer Membran umgeben sind und den Peroxisomen ähneln (Parsons, Furuya, Pal, & Kessler, 2001). Im Glykosom existieren auch Glykolyse unabhängige Enzyme, wie z.B. Enzyme gegen radikale Sauerstoffspezies (ROS) (Dey & Datta, 1994), Enzyme des Pentosephosphatweges oder die Malatdehydrogenase (Hart, Misset, Edwards, & Opperdoes, 1984). Die Expression der jeweiligen Enzyme variiert stark zwischen der Blutform und der prozyklischen Fliegenform (Hannaert & Michels, 1994).

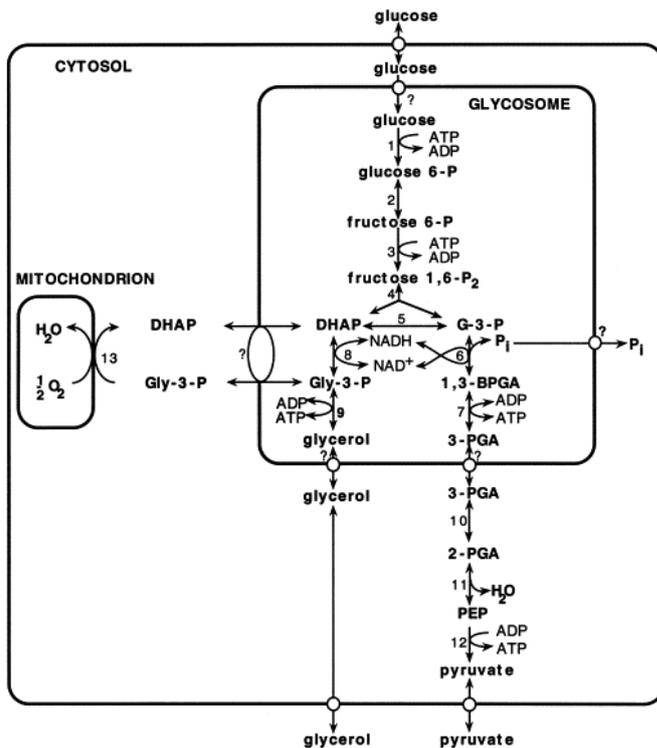


Abbildung 5: Energiestoffwechsel der Blutform (Bakker, Westerhoff, Opperdoes, & Michels, 2000).

In der BF wird Glukose zunächst aus dem Blut in die Zelle und dann in das Glykosom transportiert. Dort verlaufen die Schritte bis zum 3-Phosphoglycerat, welches aus dem Glykosom ins Zytosol transportiert wird. Im Zytosol finden die letzten ATP generierenden Schritte der Glykolyse statt. Pyruvat wird zum Schluss aus der Zelle ins Blut abgegeben.

Da NAD/NADH die Membran des Glykosoms nicht passieren kann und bei dem Reaktionsweg von Glukose zu 3-Phosphoglycerat vermehrt NADH gebildet wird, bedienen sich Trypanosomen eines speziellen Transportsystems um das Verhältnis von NAD zu NADH innerhalb des Glykosoms zu erhalten. Das Dihydroxyacetonphosphat wird unter Bildung von NAD zu Glycerin-3-Phosphat reduziert. Glycerin-3-Phosphat wird in das Mitochondrium transportiert und dort unter Verwendung von Sauerstoff (durch die „*Trypanosomale Alternative Oxidase*“, TAO) zurück zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert. Aus diesem Grund kann bei Trypanosomen trotz anaerober Glykolyse und nicht vorhandener Atmungskette Sauerstoffverbrauch nachgewiesen werden (Clarkson, Bienen, Pollakis, & Grady, 1989).

Dihydroxyacetonphosphat gelangt nun wieder in das Glykosom und kann zu Glycerin-3-Phosphat isomerisiert werden.

Bei Sauerstoffmangel läuft die Reaktion der TAO nicht mehr ab. Somit kann das Verhältnis von NAD/NADH nicht mehr über das spezielle Transportsystem aufrechterhalten bleiben. Alternativ wird das Verhältnis von NAD/NADH über die Reaktion vom Dihydroxyacetonphosphat bis zum Glycerin, welches dann ohne energetischen Nutzen aus der Zelle ausgeschleust wird, regeneriert (Bakker, Menonides, et al., 2000).

Bei Glukosemangel und Verfügbarkeit von Glycerin verläuft die Reaktion folgendermaßen. Das Glycerin wird in das Glykosom transportiert, unter ATP Verbrauch zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert und zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert. Dihydroxyacetonphosphat wird zu Glycerinaldehyd-3-phosphat isomerisiert und weiter bis zum 3-Phosphoglycerat verstoffwechselt. Auch bei diesem Reaktionsweg entsteht vermehrt NADH. Dies kann jedoch bei Anwesenheit von Sauerstoff über das spezielle Transportsystem und die TAO regeneriert werden.

### 1.2.3.3 Trypanothion, Polyaminstoffwechsel

Trypanothion ist dem Glutathion anderer Eukaryonten sehr ähnlich. Es besteht aus zwei über ein Spermidin miteinander verbundenen Glutathionmolekülen:

N1-N8-bis(glutathionyl)spermidin (A H Fairlamb, Blackburn, Ulrich, Chait, & Cerami, 1985). Die Haupteigenschaft des Trypanothions ist der Abbau von oxidativem Stress. Da Trypanosomen keine Katalase und Tryparedoxinreduktase haben, verläuft die Reaktion folgendermaßen:

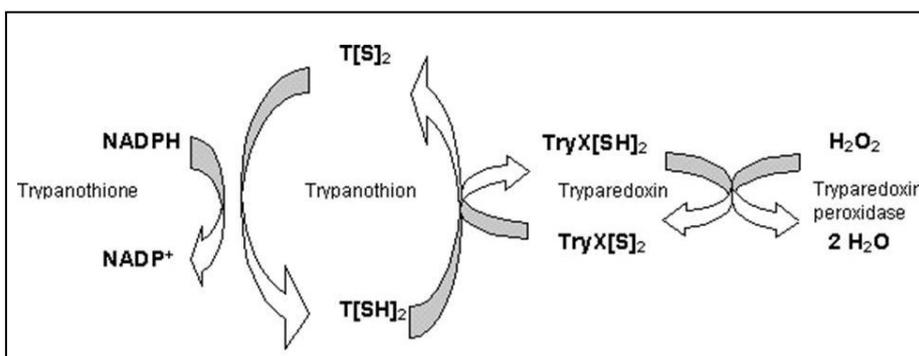


Abbildung 6: Redoxmetabolismus über Trypanothion (<http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c308/paglini.htm>).

---

Das Enzym Tryparedoxin-Peroxidase reduziert reaktive Sauerstoffspezies trypanothion- oder tryparedoxinabhängig. Durch Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Trypanothions wird Tryparedoxin regeneriert. Die Dithiolform des Trypanothions wird wiederum durch das Enzym Trypanothion-Disulfid-Reduktase regeneriert (A H Fairlamb & Cerami, 1992). Diese letzte Reduktion der Disulfidbrücke läuft NADPH-abhängig ab.

Da die genannten Enzyme spezifisch für Trypanosomen sind, sind sie für die Medikamentenentwicklung interessant. Die Ornithindekarboxylase, das Schlüsselenzym der Polyaminsynthese und damit der Herstellung von Spermidin und Trypanothion, kann durch DFMO (Eflornithin) gehemmt werden.

#### **1.2.3.4 Polycistronische Transkription, Transsplicing**

Im Gegensatz zu anderen Eukaryonten erfolgt die Transkription bei Trypanosomen polycistronisch. Das bedeutet, dass durch die RNA-Polymerase II polycistronische Transkriptionseinheiten mit bis zu über 100 Genen pro RNA Molekül transkribiert werden (Siegel et al., 2009). Diese prä-mRNA-Moleküle werden dann in einzelne mRNA-Moleküle zerschnitten. Ähnlich dem in klassischen Vertebraten vorkommenden Cissplicing, wird durch Transsplicing die mRNA weiter prozessiert (Nilsen, 1992). Dabei werden aber nicht wie beim Cissplicing zwei Exons durch Entfernung des dazwischenliegenden Introns zusammengefügt, sondern es wird ein Teil der *splice leader*-RNA (slRNA, ca. 100 Nukleotide) an die mRNA angefügt (Nilsen, 1993). So befindet sich nach dem Prozessieren an jedem 5' Ende eines Exons eine 22 Nukleotid lange SL-Sequenz (Lucke et al., 1996), in welcher unter anderem das Startcodon AUG liegt und das somit essentiell für die mRNA und für das richtige Leseraster ist.

#### **1.2.3.5 RNA-Editing**

Die mitochondriale DNA besteht aus dutzenden Maxizirkeln und tausenden Minizirkeln. Minizirkel liegen in der *relaxed* Form vor und sind ca. 1 kbp groß, Maxizirkel (22 kbp) codieren für einen Großteil der mitochondrialen Gene. Die DNA-Zirkel sind ineinander verknüpft und bilden den Kinetoplasten (A. Simpson, Stevens, & Lukes 2006). Durch sogenanntes RNA-Editing werden die Transkripte der Maxizirkel durch Einfügung oder Deletion von Uridinen modifiziert. Dieser Prozess geschieht über

verschiedene *guide*-RNA's, deren Sequenzen auf Minizirkeln kodiert sind (L. Simpson, Aphasizhev, Gao, & Kang, 2004).

### 1.2.4 Zellzyklus

Der Lebenszyklus der Trypanosomen besteht aus einem obligaten Wirtswechsel zwischen Säugetieren (darunter domestizierte Tiere, Wildtiere und Mensch) und der Tsetsefliege. Dabei machen alle Unterarten von *Trypanosoma brucei* folgende Entwicklung durch:

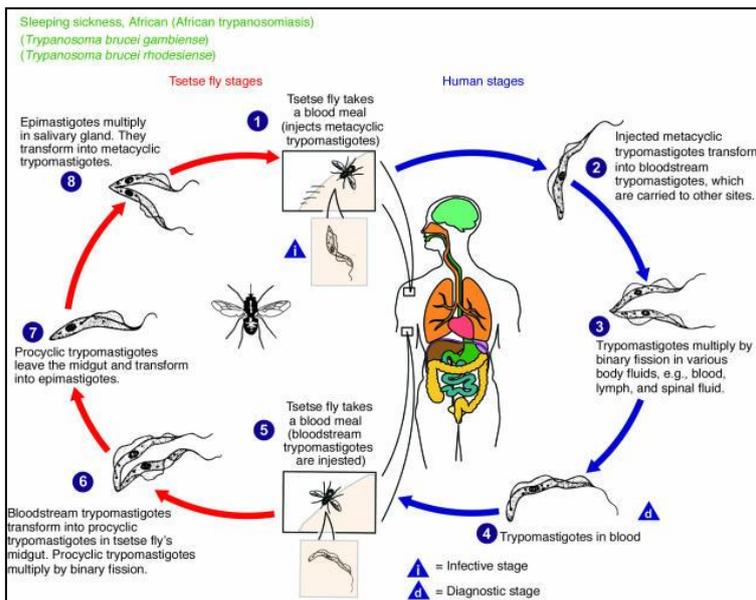


Abbildung 7: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* (Kennedy, 2004).

Nach einem Biss durch die Tsetsefliege gelangen metazyklische Trypanosomen direkt oder indirekt durch die Lymphe in den Blutkreislauf des Säugers. Trypanosomen ändern ihre Morphologie und differenzieren zu einer heterogenen Population.

Werden Trypanosomen umgekehrt aus dem Blut des Säugers in den Darm der Tsetsefliege aufgenommen, spalten sie das VSG über eine Metalloprotease ab (LaCount, Gruszynski, Grandgenett, Bangs, & Donelson, 2003) und exprimieren fast zeitgleich Prozyklin (Sbicego, Vassella, Kurath, Blum, & Roditi, 1999). Der Kinetoplast verschiebt seine Position an das hintere Ende der Zelle, das Zytoskelett verändert sich, der Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung fangen an abzulaufen - die prozyklische Form entsteht (Matthews, Ellis, & Paterou, 2004). Entscheidend für die Differenzierung zu der prozyklischen trypomastigoten Form ist die

---

Abkühlung von 37°C auf 20°C und der Wechsel des Milieus von Blut zu Darminhalt (Engstler & Boshart, 2004). Im Mitteldarm differenzieren Trypanosomen zur sehr langen epimastigoten Form. Vom Darm der Fliege aus gelangen Trypanosomen in die Speicheldrüse der Fliege und differenzieren zur kurzen infektiösen metazyklischen Form (Kennedy, 2004). In den verschiedenen Stadien unterscheiden sich Trypanosomen in Morphologie, Biochemie und Zellbiologie.

### **1.3 Tsetsefliege**

Tsetsefliegen ernähren sich ähnlich wie Bremsen von Blut und Lymphe aus Säugern. Die Tsetsefliegen der Gattung *Glossina spp.* übertragen alle Trypanosomen der Art *brucei*. Glossidien der Gruppe *palpalis* übertragen hauptsächlich *T.b. gambiense* und kommen in West- und Zentralafrika vor. Sie leben bevorzugt in feuchten und dichten Waldgebieten, wie zum Beispiel Uferwäldern, Seen und Flüssen. Glossidien der Gruppe *morsitans* übertragen hauptsächlich *T.b. rhodesiense* und *T.b. brucei*. Sie kommen in Ostafrika vor und leben in offenen Buschsavannen (Rogers, Hay, & Packer, 1996). Beide Endemiegebiete werden durch den ostafrikanischen Graben getrennt. Die Tsetsefliege ist tagaktiv. Sie sticht anders als die Anophelesmücke nicht direkt in ein Blutgefäß, sondern erzeugt ähnlich wie Bremsen mit ihren Mundwerkzeugen eine schmerzhaft Wunde, aus der sie das austretende Blut und die Lymphe aufnimmt. Infiziert sich eine Tsetsefliege, bleibt sie ihr Leben lang infektiös (Kennedy, 2004).

### **1.4 Trypanosomiasis**

#### **1.4.1 Epidemiologie**

Die amerikanische und afrikanische Trypanosomiasis betrifft vor allem arme Länder der Erde. Beide Erkrankungen werden mit zu wenigen Mitteln im Vergleich zu der Anzahl der Betroffenen bekämpft. Damit gehören beide Erkrankungen zu den *neglected diseases* (Barrett et al., 2003).

HAT erstreckt sich in Afrika südlich der Sahara über 36 Länder (Hide, 1999). Das Gebiet der Tsetsefliegen erstreckt sich ungefähr über den gleichen Raum, nämlich südlich der Sahara bis zum Land der Zulu über fast 12 Mio. km<sup>2</sup> (Winkle, 2003). In den betroffenen Ländern ist HAT ein entscheidender Faktor für Sterblichkeit und Morbidität, wobei ca. 60 Mio. Menschen zu der Risikogruppe gehören. Jedes Jahr gibt

---

es ca. 50000 berichtete Neuerkrankungen (Hide, 1999), die Dunkelziffer wird höher geschätzt. Die WHO schätze, dass im Jahr 1998 nur 27000 von ca. 300000 Fällen in der Demokratischen Republik Kongo dokumentiert worden sind. In DALYS (*disability-adjusted life years lost*) gemessen sei HAT für 1,78 Mio. DALYS weltweit verantwortlich (Hide, 1999). Damit gehört HAT bis heute zu den bedeutendsten Infektionserkrankungen der Tropen.

HAT wird durch zwei Subspezies von *Trypanosoma brucei* hervorgerufen. *T.b. rhodesiense* verursacht eine akute Form und wird von der Tsetsefliege der Gattung *Glossina Morsitans* übertragen (Taute, 1911). Diese Form kommt in Ostafrika vor. Neben dem Menschen sind hauptsächlich Wildtiere betroffen (Cox, 2004). In Tieren ist die Erkrankung mit den humanpathogenen Trypanosomen häufig asymptomatisch (Morrison et al., 2009).

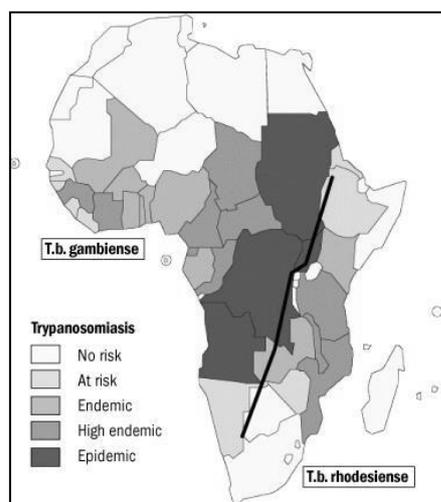


Abbildung 8: Verteilung von *T.b. gambiense* und *T.b. rhodesiense* (WHO).

*T.b. gambiense* ist für die chronische Form verantwortlich und wird von der Tsetsefliege der Gattung *Glossina Palpalis* übertragen (Barrett et al., 2003), kann experimentell aber auch von *Glossina Morsitans* übertragen werden (Taute, 1911). Betroffen ist vor allem der Mensch, es können aber auch Schweine und Hunde als Reservoir dienen (Cox, 2004). Diese Form kommt hauptsächlich in Westafrika vor.

#### 1.4.2 Klinik

An einer Bissstelle vermehren sich Trypanosomen lokal. Initial kann eine inflammatorische Immunantwort folgen (Cox, 2004). Diese Schwellung wird auch als

---

Trypanosomenschanker bezeichnet. Im weiteren Verlauf wird die Erkrankung in zwei Krankheitsstadien eingeteilt:

Während des ersten, des sogenannten hämatolymphatischen Stadiums, verteilen sich die Parasiten vom Ort des Tsetsefliegenbisses im Blut und in der Lymphe des Körpers (Rodgers et al., 2011). Es entstehen unspezifische Symptome, wie z.B. Fieber, Kopfschmerzen, Athralgien und Myalgien, Abgeschlagenheit, Exantheme und Ödeme. Diese unspezifischen Symptome sind sehr leicht mit Symptomen von Influenza oder Malaria zu verwechseln (Hide, 1999) und daher nicht wegweisend für eine Therapie. Ein weiteres wichtiges Symptom sind zervicale Lymphknotenschwellungen, welche auch als Winterbottom-Zeichen bezeichnet werden (Kleine, 1943). Im weiteren Verlauf können eine Splenomegalie und Herzrhythmusstörungen auftreten.

Während des zweiten, des sogenannten cerebrospinalen Stadiums, treten die Symptome auf, die für die Namensgebung „Schlafkrankheit“ verantwortlich sind: Veränderung des Schlaf-Wach-Rhythmus mit irregulärem Schlafmuster, Konzentrationsstörung, Koordinationsstörung (Hide, 1999), Schmerzen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Tremor, Ataxie, sensomotorische und neuroendokrine Dysfunktion (Schultzberg, Ambatsis, Samuelsson, Kristensson, & Van Meirvenne, 1988). Unbehandelt verläuft HAT stets tödlich (MacGregor & Matthews, 2010).

### **1.4.3 Diagnose**

Die Therapie von HAT ist bis heute noch immer sehr toxisch. Klinische Symptome, serologische Marker und molekulare Methoden sind zwar sehr sensitiv, die Spezifität dieser Marker ist jedoch schlecht. So können Patienten, obwohl sie frei von Parasiten sind, positive Serologien bzw. Symptome haben (Garcia et al., 2000). Wegen der unzureichenden Spezifität der Tests und der so toxischen Therapie, besteht man bei der Diagnostik bis heute auf den Nachweis einer Infektion mithilfe der Lichtmikroskopie und den Nachweis von Trypanosomen in Blut, Lymphe oder Liquor (Wastling & Welburn, 2011).

Die Lichtmikroskopie hat eine 100-prozentige Spezifität. Wird ein Trypanosom gefunden, ist die Infektion bestätigt. Allerdings ist es schwierig Trypanosomen aus Proben lichtmikroskopisch zu finden, die Sensitivität ist also gering. Um diese zu

erhöhen, kann das Blut zentrifugiert werden und der sogenannte „*buffy coat*“, die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Plasma, in dem sich Leukozyten, Thrombozyten und Trypanosomen anreichern, mikroskopiert werden (Woo, 1970).

Weil die Behandlung des meningoenzephalitischen Stadiums schwierig ist, wird bei einem Nachweis von Trypanosomen im Blut immer ein Staging durchgeführt. Das Staging beinhaltet Untersuchungen des Liquors auf Trypanosomen oder auf die Menge der Leukozyten. Durch eine spezielle Zentrifugationstechnik des Liquors wird auch hier die Sensitivität verbessert.

Wegen der unterschiedlichen Wirksamkeit der Medikamente auf *T.b. gambiense* oder *T.b. rhodesiense* müssen beide Unterarten vor einer Therapie genotypisch unterschieden werden.

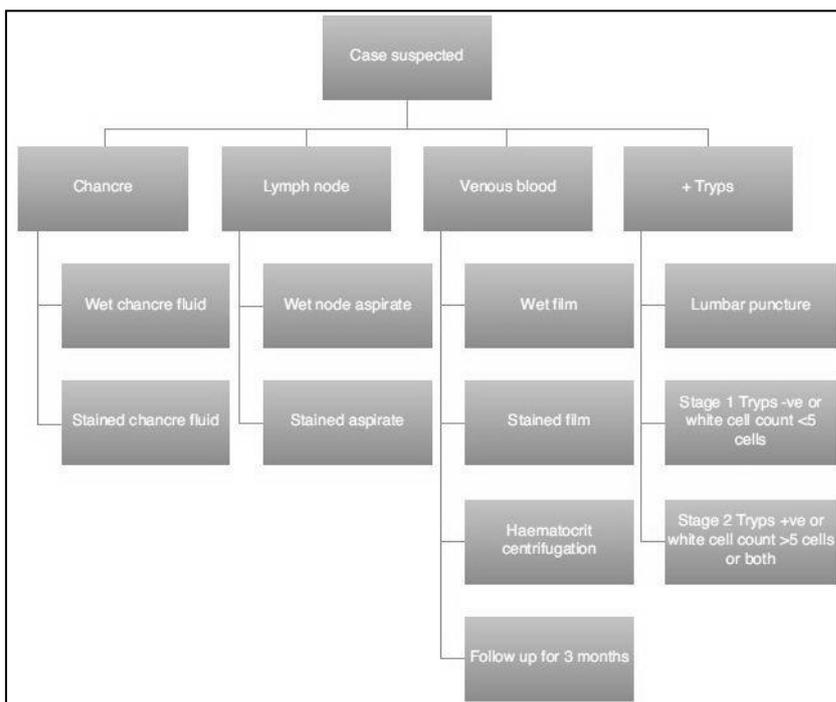


Abbildung 9: Diagnostische Maßnahmen, *T.b. rhodesiense* Serere health Facility, Uganda (Wastling & Welburn, 2011).

#### 1.4.4 Therapie

Das hämolymphatische Stadium von HAT lässt sich relativ gut behandeln. Jedoch bringt die Behandlung des meningoenzephalitischen Stadiums bis heute große Schwierigkeiten mit sich. Leider wird HAT oft erst im meningoenzephalitischen

Stadium diagnostiziert (Barrett et al., 2003). Zur Behandlung des meningoenzephalitischen Stadiums wird heutzutage zunächst mit Suramin oder Pentamidin anbehandelt, um die Parasiten im Blut zu beseitigen. Danach bleibt für die im Gewebe persistierenden Trypanosomen weiterhin hauptsächlich das sehr toxische Medikament Melarsoprol - mit all seinen Problemen (Schlitzer, 2009). Für HAT gibt es heute im Wesentlichen 5 zugelassene Medikamente:

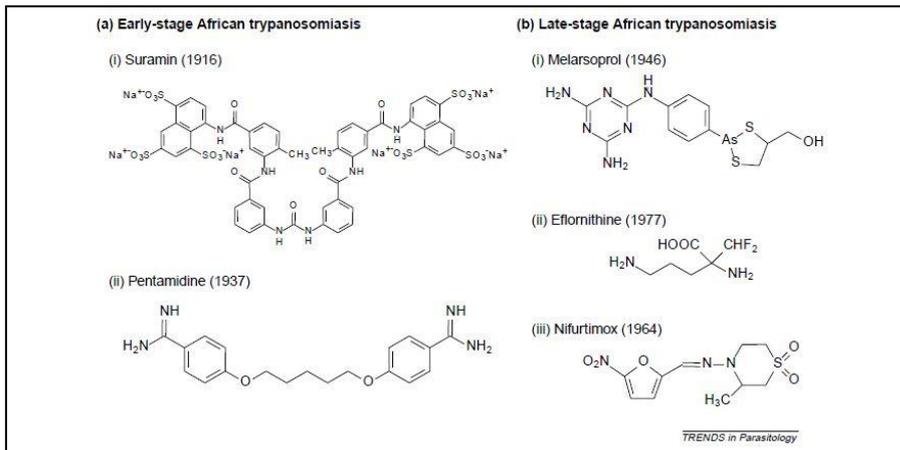


Abbildung 10: Medikamente zur Behandlung von HAT (A.H. Fairlamb, 2003).

- Suramin: Aufbauend auf dem von Paul Ehrlich entdeckten Trypanred, wurde 1916 ein Derivat namens Suramin synthetisiert (Cox, 2004). Zunächst verursachte Trypanred in wirksamen Dosen inakzeptable Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Blindheit. Von Trypanred ausgehend entwickelte Bayer Suramin und brachte es unter den Handelsnamen Germanin auf den Markt. Da Suramin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, ist es nur für das hämolympathische Stadium erfolgreich einsetzbar (Schlitzer, 2009).
- Pentamidin wurde im Jahr 1936 auf den Markt gebracht. Es wurde hauptsächlich in den 1950ern und 1960ern eingesetzt (Cox, 2004). Pentamidin dient klassischerweise zur Behandlung des hämolympathischen Krankheitsstadiums (Hide, 1999).
- Melarsoprol ist ein arsenhaltiges Medikament, eine Weiterentwicklung des Atoxyls und wurde 1949 eingeführt (Cox, 2004). Es ruft in 10 % der Fälle eine reaktive Enzephalopathie hervor, die in der Hälfte der Fälle tödlich ist. Da Melarsoprol gegen Parasiten im zentralen Nervensystem wirkt, wird es

- 
- bevorzugt im meningoenzephalitischen Stadium der Erkrankung eingesetzt (Hide, 1999).
- Eflornithine (Difluormethylornithin, DFMO) wurde in den späten 1950er als Krebstherapeutikum entwickelt. Trotz der Wirkung gegen Trypanosomen kam es wegen mangelnder Wirkung auf Krebszellen nie auf den Markt. Im zweiten Anlauf schaffte DFMO die Zulassung als Enthaarungsmittel. 1990 wurde es dann auch für die Behandlung von HAT zugelassen. Als Designer-Medikament hemmt DFMO spezifisch die Ornithindecaboxylase, welche bei Trypanosomen vorkommt (Cox, 2004). DFMO ist jedoch teuer und wirkt nur gegen *T.b. gambiense* (Hide, 1999).
  - Nifurtimox wurde 1967 zur Therapie der amerikanischen Trypanosomiasis eingeführt (Schlitzer, 2009). Die Substanz ist bluthirnschrankengängig und wird im meningoenzephalitischen Stadium eingesetzt, wenn Melarsoprol und Eflornithine keine Wirkung mehr zeigen (A.H. Fairlamb, 2003).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass es nicht genügend Therapeutika für HAT gibt. Vier der fünf Medikamente wurden vor über 50 Jahren entwickelt, sind ineffizient und haben inakzeptable Nebenwirkungen (A.H. Fairlamb, 2003).

Es bleibt zu hoffen, dass in Zukunft die Besonderheiten der Trypanosomen, wie z.B. das Transsplicing, RNA-editing, Glykosom, Proteindegradation, Polyaminstoffwechsel, Thiolmetabolismus und die Glykolipidanker attraktive Möglichkeiten für eine spezifische trypanolytische Therapie bieten (Wang, 1995).

#### **1.4.5 Impfung**

Aufgrund der Eigenschaft, dass Trypanosomen ihren Oberflächenmantel alle 8 - 10 Tage wechseln und es keine konstanten frei zugänglichen Proteine auf der Zellmembran gibt, ist es bis heute nicht gelungen einen wirksamen Impfstoff gegen HAT zu entwickeln.

#### **1.4.6 Prävention**

Bis heute ist man wegen fehlender Impfung und unzulänglicher Therapie auf Prävention angewiesen. Die Bekämpfung der Tsetsefliege ist wohl die beste Methode HAT einzudämmen (Cox, 2004).

---

Größere Siedlungen werden eher von HAT verschont als kleinere, da sie einen größeren Ackerlandgürtel benötigen, um ihre Bewohner zu versorgen. Glossidien brauchen Schatten und Bäume und sind deshalb kaum in der Lage einen Ackerlandgürtel von 1 - 3 km zu überwinden (Winkle, 2003).

Die Bekämpfung der Tsetsefliege mit DDT oder Dieldrin in den 1940ern brachte einen rapiden Rückgang der Neuerkrankungen mit sich. Da die Verwendung dieser toxischen Substanzen heutzutage ökologisch nicht mehr tragbar ist, werden Tsetsefliegen mit Endosulfan und Fliegenfallen bekämpft (Cox, 2004). Da Sansibar eine Insel ist und dort nur eine bestimmte Population der Tsetsefliege vorkam, war es möglich diese zu eliminieren. Damit ist HAT seit 1997 in Sansibar eradiziert. Ziel der sogenannten PATTEC (*Pan african tsetse and trypanosomiasis eradication campaign*) ist es, alle 7 unterschiedlichen Tsetsefliegen Spezies des kompletten Endemiegebietes zu eradizieren (Steverding, 2008). Im Jahr 2000 unterzeichneten alle 36 betroffenen Länder Afrikas eine Erklärung, die Tsetsefliege gemeinsam in möglichst kurzer Zeit auszurotten (Schofield & Maudlin, 2001).

Während der Epidemie von 1988 - 1990 in Uganda zeigte sich, dass eine Übertragung über Rinder fünf mal wahrscheinlicher ist als eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch (Hide, 1999). Die Kontrolle der Vegetation und des Wildes und der landwirtschaftlichen Tiere kann somit auch sehr effektiv sein.

### **1.5 Zelldichteregulation von *Trypanosoma brucei***

Trypanosomen haben die Eigenschaft ihre Zelldichte selbst zu regulieren. So zeigen immunsupprimierte und infizierte Tiere einen wellenförmigen Verlauf der Parasitämie (Black et al., 1985). Darüber hinaus regulieren Trypanosomen auch *in vitro* ihre Zelldichte (Reuner, Vassella, Yutzy, & Boshart, 1997).

Eine heranwachsende klonale Population schüttet ab einer bestimmten Zelldichte einen niedermolekularen „*Stumpy Inducing Factor*“ (SIF) aus. Über einen cAMP-Signalweg differenzieren die Zellen zu *Stumpy*-Formen und hören auf sich zu teilen (Vassella, Reuner, Yutzy, & Boshart, 1997). Dadurch verhindern die Parasiten, dass der Wirt durch eine zu hohe Zelldichte an einer Hypoglykämie stirbt.

---

Im Wirt kommen Trypanosomen in verschiedenen Formen vor: Sich schnell teilende *Slender*-Formen, sich nicht teilende und auf die Fliege übertragbare *Stumpy*-Formen und *Intermediate*-Formen, welche sich ebenfalls nicht teilen aber noch nicht auf die Fliege übertragbar sind (MacGregor & Matthews, 2010). Daher bezeichnet man die Blutform auch als *pleomorphe* (gr.:  $\pi\lambda\epsilon\omicron\nu$  - mehr,  $\mu\omicron\rho\rho\eta$  - Gestalt) Zellen (Matthews et al., 2004).

Die verschiedenen Formen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Teilungsaktivität, sondern auch in ihrer mitochondrialen Aktivität und einer relativen Resistenz gegen Lyse durch Antikörper (Matthews et al., 2004). So zeigen *Stumpy*-Formen eine gering erhöhte mitochondriale Aktivität und sind daher präadaptiert für die Umgebung in der Fliege. Dadurch können sie nach der Aufnahme in die Fliege besser überleben (Tyler, Higgs, Matthews, & Gull, 2001).

Während einer Infektion durch Parasiten produziert der Wirt vermehrt Prostaglandine (PG), welche in erhöhter Konzentration im Serum und Liquor nachgewiesen werden können (Pentreath, Rees, Owolabi, Philip, & Doua, 1990). PG modulieren die Immunantwort und sind unter anderem für Symptome der Infektion verantwortlich (Noverr, Erb-Downward, & Huffnagle, 2003). Allerdings produzieren auch Trypanosomen PG; *Slender*-Formen hauptsächlich  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und *Stumpy*-Formen hauptsächlich  $\text{PGD}_2$  (B K Kubata et al., 2000).

Experimentell konnte gezeigt werden, dass  $\text{PGD}_2$  das Zellwachstum von Trypanosomen signifikant hemmt.  $\text{PGD}_2$  löst sogar einen Caspase unabhängigen Zelltod aus und spielt somit eine Rolle bei der Regulation der Zelldichte bei infizierten Tieren (K Figarella et al., 2005). Auch scheinen Zelldifferenzierung und Apoptose es möglich zu machen, dass Trypanosomen im Wirt Subpopulationen bilden und dadurch in weiteren Lebensräumen, wie z.B. im Gehirn persistieren können (van Zandbergen, Luder, Heussler, & Duszenko, 2010).

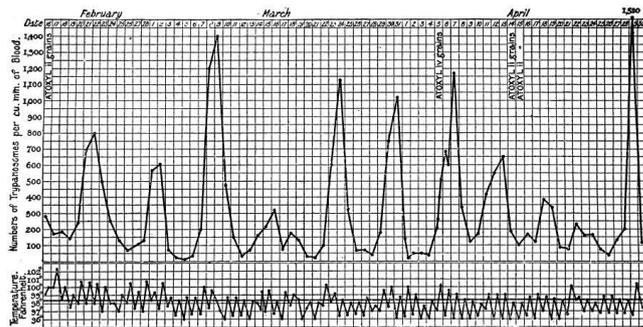


Abbildung 11: Ausführlichste Aufzeichnung der Parasitämiekurve beim infizierten Menschen (Ross and Thomson 1910).

## 1.6 Der Zelltod

Zwar entdeckte Carl Vogt schon 1842 einen geregelten Zelltod bei Kaulquappen (Peter, Heufelder, & Hengartner, 1997), der Begriff Apoptose (gr.: *αποπτωσις* - der Abwurf, der Niedergang) wurde jedoch erst im Jahr 1972 von Currie, Kerr und Wyllie eingeführt. Sie beschrieben den Vorgang des geregelten Zelltods und haben dessen Wichtigkeit erkannt (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972). An dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurde zuerst eine Vielzahl wichtiger apoptotischer regulierender Gene entdeckt, wie z.B. EGL1 und CED's (Liu & Hengartner, 1999). Zu vielen Genen von *C. elegans* wurden in Säugern homologe Sequenzen gefunden (Beispiel: Caspase 3 bei Säugern ist homolog zu CED-3 bei *C. elegans*). Diese Homologien deuten auf einen evolutionär stark konservierten Ablauf der Apoptose hin. Allerdings sind Ablauf und Regulation der Apoptose in Säugern wesentlich komplizierter.

Eine genauere Beschreibung des Zelltods nahm Virchow schon im Jahr 1858 vor. Mit den Begriffen Nekrose und Nekrobiose versuchte er zwischen Nekrose und Apoptose zu differenzieren. Charakteristisch für Nekrobiose sei nach Virchow vor allem der langsame Sterbeprozess (Virchow, 1858). Zwischenzeitlich wurde der Zelltod in intrinsische und extrinsische Apoptose, Nekrose, Autophagie, Pyroptosis und mitotischer Katastrophe unterteilt (Jin & El-Deiry, 2005). Das *Nomenclature Committee in Cell Death* (NCCD) schlägt heute vor, die alten Nomenklaturen des Zelltods zu vermeiden und den Zelltod anhand biochemisch messbarer Daten einzuteilen, nämlich in Nekrose, Apoptose und Autophagie (Kroemer et al., 2009).

---

Apoptose dient der Regulation des Zellwachstums und ist fähig schädliche oder unbrauchbare Zellen zu eliminieren (McCarthy, 2003). Fehlfunktionen innerhalb der Apoptose führen zu verschiedensten Erkrankungen. Beispiele sind neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Autoimmunerkrankungen, Fehlentwicklungen während der Embryogenese und die Entstehung von Tumorerkrankungen (Welburn, Macleod, Figarella, & Duzensko, 2006).

### **1.6.1 Nekrose**

Der nekrotische Zelltod läuft schnell ab und ist energieunabhängig. Nekrose kann durch Nährstoffmangel, Hypoxie, UV- oder radioaktiver Strahlung, Gifte, Hypothermie oder auch Bakterien ausgelöst werden. Lange wurde vermutet, dass diese Art des Zelltodes komplett unkontrolliert stattfindet. In den letzten Jahren wurden allerdings regulatorische Proteine gefunden. Messbare und charakteristische Parameter sind eine Schwellung der zytoplasmatischen Organellen und des Zytoplasmas (*Oncosis*). Durch diese Schwellung reißt die Plasmamembran, und der Zellinhalt wird unkontrolliert in die Umgebung ausgeschüttet (Kroemer et al., 2009). Oft folgt eine inflammatorische Reaktion.

### **1.6.2 Apoptose**

Die wohl bekanntesten Beispiele der Apoptose sind die Elimination von unbrauchbaren Zellen während der Embryogenese (Kerr et al., 1972), die negative Selektion der Autoantikörper produzierenden B-Lymphozyten (Speiser, Lees, Hengartner, Zinkernagel, & MacDonald, 1989) und die Bedeutung auf die Gewebshomöostase (Searle, Collins, Harmon, & Kerr, 1973). Dabei laufen die Vorgänge während der Apoptose zielgerichtet ab. Ein wichtiges Merkmal der Apoptose ist, dass es ein aktiver, induzierbarer und programmierter Prozess ist. Manchmal können bei der Apoptose sogar inflammatorische Zytokine freigesetzt werden (Fink & Cookson, 2005). Die Annahme, dass die Apoptose immer „still“ abläuft, ist somit überholt.

Das Markenzeichen der Apoptose bei Säugern sind Caspasen (*cysteinyl-aspartate specific protease*). Es gibt insgesamt 14 identifizierte Caspasen. Diese werden in inflammatorische (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14), Initiator- (2, 8, 9, 10) und Effektorcaspasen (3, 6, 7) eingeteilt. Caspasen aktivieren sich über limitierte Proteolyse (Stennicke & Salvesen, 2000). In der katalytischen Triade haben sie immer ein Cystein

---

an 285, ein Histidin an 237 und eine Carbonylgruppe an 177. Sie schneiden damit meistens an zwei Stellen jeweils hinter einem Aspartat. Caspasen schneiden aber auch mehr als 100 weitere Substrate, wie z.B. antiapoptotische Proteine, DFF (*DNA-Fragmentation Faktor*) (Enari et al., 1998) oder PARP (*Poly ADP ribose polymerase*) (Hotti, Jarvinen, Siivola, & Holtta, 2000). Caspase 3 ist die bedeutendste Effektorcaspase. So zeigen Caspase 3-Knockoutmäuse erhebliche Defekte in der Apoptose (Kuida et al., 1996).

Die wichtigsten antiapoptotischen Proteine sind NF- $\kappa$ B, AKT, Teile aus der Bcl-2-Familie und IAP-Proteine. IAP-Proteine sind die bedeutendsten negativen Regulatoren der Caspasen. Die Proteine aus der Bcl-2 Familie werden in 2 Untergruppen unterteilt: antiapoptotische Proteine wie z.B. Bcl-2, Bcl-XI, Bcl-w, A1 und Mcl-1, und apoptotische Proteine wie z.B. Bax, Bak und Bok.

Der Vorgang der Apoptose kann in drei Phasen eingeteilt werden: die Induktionsphase, die Effektorphase und die Degradationsphase.

- Induktionsphase: Vereinfacht kann die klassische Apoptose in der Induktionsphase durch zwei verschiedene Wege eingeleitet werden. Einerseits über den extrinsischen Weg, das heißt über Mediatoren, die an membrangebundene Todesrezeptoren (wie z.B. TNF-Rezeptor, FAS, TRAIL) binden. Andererseits über den intrinsischen Weg: Dieser wird unter anderem durch DNA Schäden (p53), oxidativen Stress oder Wachstumsfaktormangel ausgelöst. Beim intrinsischen Weg ist das Mitochondrium involviert. Das endoplasmatische Retikulum induziert durch Calcium-Freisetzung eine Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium (Breckenridge, Germain, Mathai, Nguyen, & Shore, 2003).

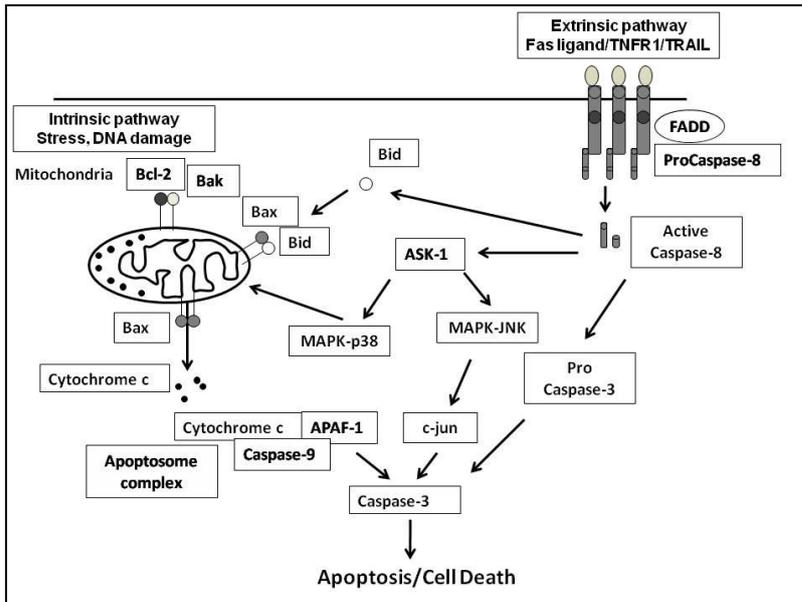


Abbildung 12: Apoptotische Signalwege (Shimizu, 2012).

**Extrinsisch:** Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor Familie, darunter auch CD95 (FAS), der beim Immunsystem eine physiologische Apoptose hervorruft, und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) oligomerisieren bei Stimulation. Weitere Proteine wie Caspase 8 binden an diesen Komplex. Der Komplex wird dann DISC (*death-inducing signaling complex*) genannt. Caspase 8 bildet ein Dimer, wird (auto-)aktiviert und aktiviert dann selbst Effektorcaspasen wie Caspase 3, 6 und 7.

**Intrinsisch:** Bei oxidativem Stress wird durch Bcl-2-Mitglieder MOMP (*mitochondrium outer membran permeabilisation*) ausgelöst. Die Zelle geht am Verlust der mitochondrialen Funktion zugrunde (Green & Kroemer, 2004). Verschiedene Substanzen wie Cytochrom c, Procaspasen, AIF oder Endonuklease G werden aus dem Mitochondrium freigesetzt (Susin et al., 1999; Yoon et al., 2009). Cytochrom c initiiert die Caspasenkaskade. Dabei bindet Cytochrom c an Apaf-1 und Procaspase 9 bindet als Dimer an Apaf-1. Der intrazelluläre DISC-like Komplex, auch Apoptosom genannt, aktiviert durch limitierte Proteolyse Caspase 3.

- Effektorphase: Verschiedene Signalwege inklusive Myc, MAPK/JNK, PI-3K und NfκB beeinflussen den apoptotischen Vorgang (Jin & El-Deiry, 2005). NfκB wird aktiviert, sobald es von IκB gelöst ist, transloziert in den Kern und reguliert die Expression von inflammatorischen und antiapoptotischen Genen (Kucharczak, Simmons, Fan, & Gelinas, 2003), kann aber auch proapoptotisch wirken.
- Degradationsphase: In dieser Phase laufen die typischen apoptotischen Vorgänge ab: Die Konzentration radikaler Sauerstoffspezies (ROS) in einer Zelle steigt an. ROS aktivieren dabei Nukleasen und Proteasen. Bei Hemmung ROS-abbauender Enzyme wird vermehrt Apoptose induziert (Zucker, Hanusch,

---

& Bauer, 1997). Zu Beginn der Degradationsphase transloziert das Phosphatidylserin, welches sich bei gesunden Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet, auf die Außenseite der Membran (Schlegel & Williamson, 2001) – dieser FlipFlop-Mechanismus scheint Enzym gesteuert zu sein, jedoch sind die verantwortlichen Enzyme noch nicht gefunden (van Zandbergen et al., 2010). Vermutet wird ein Signal für Makrophagen zur Phagozytose (Savill & Fadok, 2000). Nachweisen kann man die Externalisation in der Durchflusszytometrie über Annexin A5. Annexin A5 erkennt allerdings auch andere negativ geladene Phospholipide (van Zandbergen et al., 2010). Bei fortschreitender Apoptose erkennt man Chromatin-Kondensation (Pyknosis) und DNA-Fragmentierung (Karyhorrexis). Die Zelle schrumpft und zerfällt durch sogenanntes „blebbing“ in abgeschnürte apoptotische Vesikel. In *vivo* werden diese Zellbestandteile von Makrophagen phagozytiert.

### **1.6.3 Autophagie**

Autophagie (gr.: *αυτο* - freiwillig, *φαγεῖν* - essen) ist ein in der Evolution konservierter Mechanismus (Jin & El-Deiry, 2005). Auslöser für Autophagie sind z.B. Stress, wie Hypoxie oder Hyperthermie. Bei Hunger wird Autophagie induziert, um den Aminosäurepool für die Synthese lebenswichtiger Proteine aufrecht zu erhalten (Yoshimori, 2004). Als Reaktion auf Stress verhindert Autophagie Apoptose. Je nach Situation kann Autophagie aber auch Apoptose begünstigen (Maiuri, Zalckvar, Kimchi, & Kroemer, 2007). Zeichen der Autophagie sind Autophagosomen und Autophagolysosomen. Diese können im Transmissionselektronenmikroskop nachgewiesen werden.

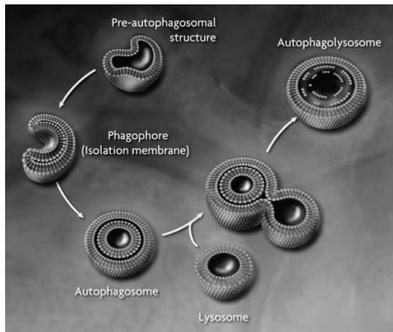


Abbildung 13: Autophagie (Shintani & Klionsky, 2004). Es bildet sich zunächst eine sogenannte Phagophore, entweder aus dem frühen sekretorischen Pathway oder aus dem endoplasmatischen Retikulum. Diese schließt durch eine doppelte Membran Zytoplast ein und bildet dann ein sogenanntes Autophagosom. Das Autophagosom verschmilzt mit einem Lysosom und bildet dann ein Autophagolysosom (Shintani & Klionsky, 2004).

Das Zellwachstum einer Zelle wird über TOR (*Target of Rapamycin*) reguliert. TOR ist eine Kinase, die abhängig von Nahrungsangebot und Wachstumsfaktoren das Zellwachstum und die Zellentwicklung koordiniert (Fingar & Blenis, 2004) oder Autophagie initiiert (Diaz-Troya, Perez-Perez, Florencio, & Crespo, 2008). Dem TOR-Signal nachgeschaltet sind sogenannte „*autophagy related proteins*“ (ATG) (Raught, Gingras, & Sonenberg, 2001). ATG's sind für die Bildung des Autophagosoms zuständig und sind somit essentiell für Autophagie (Nakatogawa, Suzuki, Kamada, & Ohsumi, 2009). ATG's wurden zunächst in Hefe entdeckt, homologe Sequenzen wurden jedoch in allen Eukaryonten gefunden (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

Bei Trypanosomen können Neuropeptide durch ihre Aufnahme die Funktionsweise der Lysosomen stören. So akkumulieren zytosolische Enzyme der Glykolyse und darauf folgend wird ein autophagischer Zelltod initiiert (Delgado, Anderson, Garcia-Salcedo, Caro, & Gonzalez-Rey, 2009).

#### 1.6.4 Caspase-unabhängiger Zelltod

Apoptose wurde lange für Caspase-abhängig gehalten. Jedoch zeigen Zellen, deren Caspasen inhibiert werden, auch Zelltodmechanismen (Kroemer & Martin, 2005). Endonuklease G und „*Apoptose inducing factor*“ (AIF) können beide aus dem Mitochondrium freigesetzt werden. AIF transloziert in den Nukleus und induziert Chromatin-Kondensation und *large scale* DNA-Fragmentierung (Arnoult et al., 2001). Der Weg über AIF ist Caspase-unabhängig und zeigt verschiedene apoptotische Zeichen

---

wie Zellschrumpfen, Verlust des mitochondrialen Potentials und *large scale* DNA-Fragmentierung (Susin et al., 2000).

### 1.6.5 Apoptose bei Protozoen

In den letzten Jahren wurden verschiedene Marker in Protozoen gefunden, die typisch für einen geregelten Zelltod sind. Dies hat die Debatte über die Frage angestoßen, ob einzellige Parasiten in der Lage sind, Apoptose zu begehen. Den Protozoen fehlen zwar Schlüsselenzyme der klassischen Apoptose, jedoch bringen sie auch Proteine mit sich, die in höheren Eukaryonten den geregelten Zelltod steuern. Leishmanien oder prozyklische Formen von Trypanosomen werden für die Forschung über Apoptose bei Prokaryonten verwendet. BFen der Trypanosomen unterscheiden sich im Metabolismus zusätzlich von der prozyklischen Form (Worthen, Jensen, & Parsons, 2010). Trypanosomen fehlen zusammengefasst folgende Mechanismen:

- Der intrinsische Pathway der Induktionsphase während der Apoptose wird bei BFen nicht über Cytochrom c aktiviert. Normalerweise läuft der intrinsische Pathway über eine Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran ab (MOMP - *mitochondrial outer membran permeabilisation*). Proteine aus dem Intermembranraum verteilen sich durch diese Durchlässigkeit im Zytosol. Cytochrom c spielt die Schlüsselrolle dieses Weges und aktiviert Caspase 9. Den BFen fehlt jedoch die Atmungskette und somit auch Cytochrom c (Torri & Hajduk, 1988).
- Der extrinsische Pathway, wie z.B. über den FAS-Rezeptor, existiert bei BF-Trypanosomen auch nicht. Trypanosomen haben durch ihren dicht gepackten Oberflächenmantel keine Rezeptoren an der Zelloberfläche. Genauso wenig existieren weiterführenden Mediatoren wie „*death effector domain*“ (DED) (Worthen et al., 2010).
- Allgemein exprimieren Protozoen keine Caspasen (Koonin & Aravind, 2002). Trypanosomen können folglich keinen Caspasen gesteuerten Zelltod begehen.

Allerdings exprimiert die BF von *Trypanosoma brucei* 5 Metacaspasen, welche der Sequenz der Caspasen sehr ähnlich sind (Worthen et al., 2010). Die Funktion dieser Metacaspasen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Überexpression dieser Metacaspasen sensibilisiert die Zellen für einen Caspase-unabhängigen Zelltod (Lee,

---

Gannavaram, Selvapandiyan, & Debrabant, 2007). Trypanosomen besitzen außerdem *T.b.* CathepsinB, welches entscheidend für lysosomale Proteindegradation ist. Durch Inhibierung von *T.b.* CatB über RNAi wird zunächst eine Vergrößerung des Endosoms induziert. Dies führt bei kultivierten Trypanosomen schließlich zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod (Mackey, O'Brien, Greenbaum, Blank, & McKerrow, 2004). Außerdem können BFn von *T.b. gambiense* durch Quercetin (3, 3', 4', 5, 7 -Pentahydroxyflavone) getötet werden, dabei ist eine Phosphatidylserinexposition auf dem äußeren *Leaflet* messbar (Mamani-Matsuda et al., 2004).

Trypanosomen synthetisieren verschiedene Prostaglandine, wie z.B. PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> (B. K. Kubata et al., 2000). Wird PGD<sub>2</sub> auf Zellkulturen von Trypanosomen gegeben, erkennt man einen signifikanten Rückgang des Zellwachstums. Des Weiteren induziert PGD<sub>2</sub> über einen noch nicht bekannten Mechanismus Apoptose bei *Trypanosoma brucei*. Messbare Eigenschaften der Apoptose, wie Phosphatidylserinexposition, DNA-Degradation, Chromatinkondensation und Anstieg der ROS sind dabei messbar (K. Figarella et al., 2005).

### **1.7 Endonuklease G**

Entdeckt wurde Endonuklease G (EndoG) in Mitochondrien von Zellen von Säugetieren. Es wurde aus Erythrozyten von Hühnern aufgereinigt (Kalinski, Takamatsu, & Laskowski, 1980). Später wurde EndoG auch in Mitochondrien von *Neurospora* (Fraser & Cohen, 1983) und *Hefe* gefunden (Morosoli & Lusena, 1980). *Escherichia coli* dagegen exprimieren kein EndoG (Low & Gerschenson, 2002).

EndoG ist ein nukleär kodiertes Protein, welches eine Mg<sup>2+</sup> abhängige DNA-Endonukleaseaktivität hat. So wird EndoG im Kern transkribiert, besitzt N-terminal eine mitochondriale Erkennungssequenz und wird nach der Translation ins Mitochondrium transportiert. Dabei ist EndoG im Intermembranraum mit Cytochrom c kolokalisiert (Li, Luo, & Wang, 2001). Fast das komplette EndoG befindet sich im Mitochondrium (>95 %). EndoG, welches im Kern gefunden wird, unterscheidet sich nicht von dem des Mitochondriums. Vermutlich ist nukleär gefundenes EndoG auf eine Verunreinigung zurückzuführen (Gerschenson, Houmiel, & Low, 1995).

---

In Säugerzellen ist EndoG fast für die komplette DNA-Endonukleaseaktivität des Mitochondriums verantwortlich (Cummings, King, Holden, & Low, 1987). Mitochondriale Phospholipide erhöhen die Aktivität von EndoG (Parks, Couper, & Low, 1990). In einem intakten Mitochondrium ist EndoG allerdings nicht aktiv. Erst durch Schäden oder Zugabe von Detergentien wie n-Oktylglukosid oder Triton X-100 wird EndoG aktiv und zerschneidet bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  bei Inkubation bei 37°C mitochondriale DNA in 9 - 11 Nukleotid große Stücke (Low & Gerschenson, 2002). Die Faktoren, welche EndoG *in vivo* davon abhalten DNA zu verdauen, sind bis heute unklar. Geringe Salzkonzentrationen ab 100 - 150 mM NaCl inhibieren EndoG (Low, 2003).

Der Name EndoG wurde gewählt, da EndoG DNA-Extrakt aus Hühnern hinter aufeinanderfolgenden Guaninbasen schneidet (Ruiz-Carrillo & Renaud, 1987). Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass EndoG auch hinter Cytosinbasen und einer Vielzahl von Basenkombinationen schneiden kann (Low, 2003). EndoG schneidet dabei nicht nur einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, sondern auch einzelsträngige RNA (Kalinowska, Garncarz, Pietrowska, Garrard, & Widlak, 2005). Damit gehört EndoG zu der Familie von unspezifischen DNA/RNA- $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ -Me-Finger Nukleasen (Schafer et al., 2004).

### **1.7.1 Endonuklease G während der Apoptose**

Während der Apoptose schneiden AIF, TopoII und *DNA-Fragmentation-Faktor* (DFF besteht aus einer Caspase-aktivierten Deoxyribonuklease (CAD) und ihrem Inhibitor (ICAD)) die DNA zunächst in Intervalle größer als 50 bp. DFF, EndoG und DNaseI zerschneiden diese DNA-Stücke dann weiter in kleinere Fragmente. Dabei bildet EndoG Komplexe mit AIF (Kalinowska et al., 2005) und interagiert z.B. mit DNaseI, mit Histonen H2B und DNA-Topoisomerase II  $\alpha$  (Varecha, Potesilova, Matula, & Kozubek, 2012).

Humanes EndoG schneidet bevorzugt einzelsträngige DNA. Es schneidet jedoch nicht so selektiv wie angenommen, sondern vielmehr innerhalb verschiedener Sequenzen. Dadurch ist es durchaus in der Lage, während der Apoptose nukleosomale DNA zu verdauen. Durch die Wechselwirkung mit DNaseI kann EndoG DNA sogar noch effizienter zerschneiden (P. Widlak, L.Y. Li, X. Wang, & W.T. Garrard, 2001a).

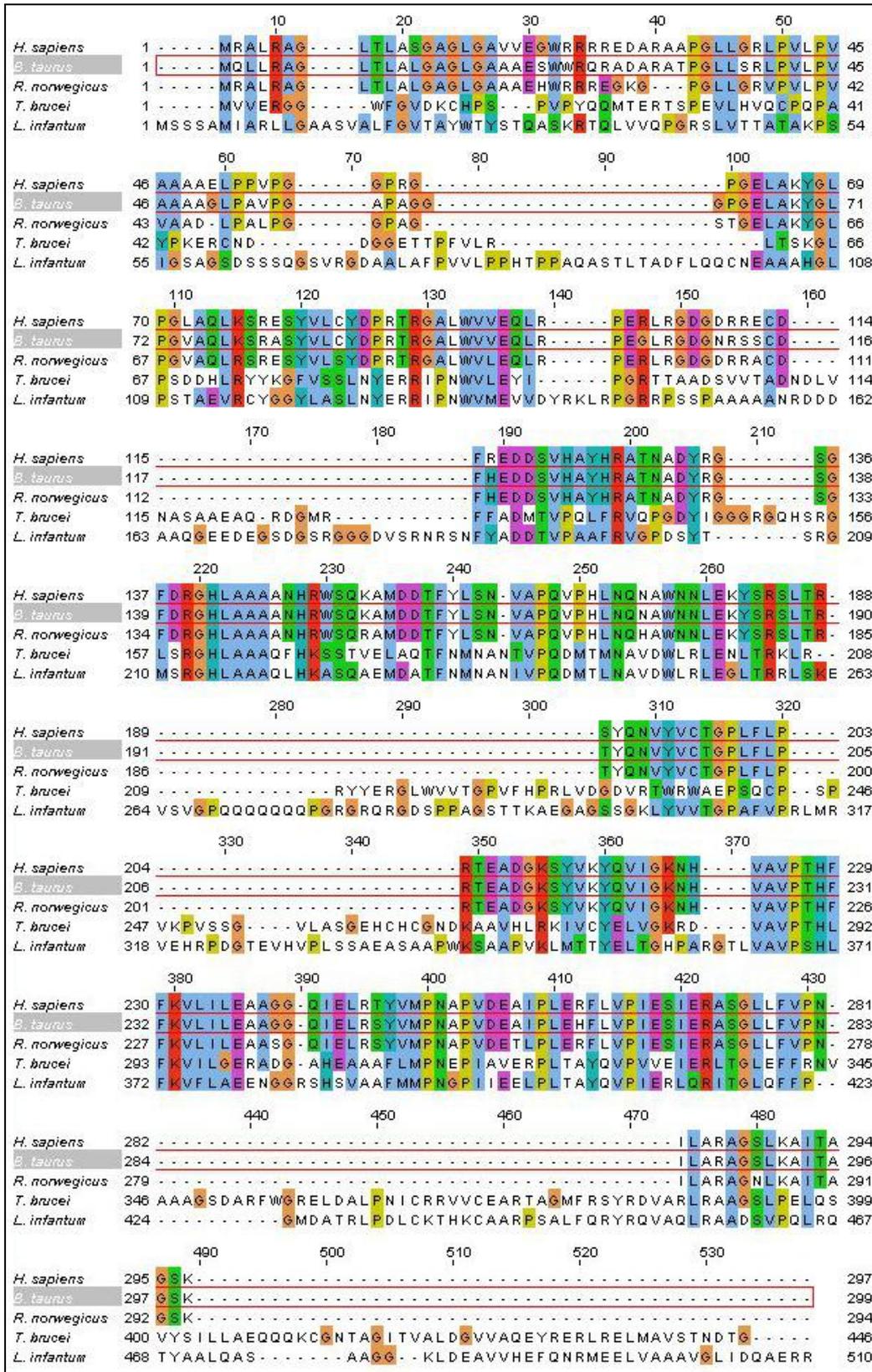


Abbildung 14: Multiples Alignment von Endonuclease G (ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

---

2001 wurde in transgenen Mäusen der DFF ausgeschaltet. Die Mäuse zeigten weiterhin eine restliche DNA-Fragmentierung. EndoG induziert diese nukleosomale DNA-Fragmentierung und transloziert dabei selber in den Nukleus (Li et al., 2001).

### **1.7.2 Beteiligung an Reparatur und Replikation**

EndoG interagiert mit Heatschockprotein 70 und bildet Komplexe mit FEN-1 (*flap structure-specific endonuclease 1*). Diese Komplexe sind an Reparatur und Replikation der DNA beteiligt (Kalinowska et al., 2005). Im Mitochondrium ist die DNA starkem Stress ausgesetzt. Die genauen Reparaturmechanismen sind noch nicht bekannt. EndoG schneidet im Mitochondrium bei oder an DNA Einzelstrangbrüchen. Auch schneidet EndoG, wenn zwei benachbarte Guaninreste cisplatin vermittelt verbunden sind. Somit scheint EndoG auch an der Reparatur der mitochondrialen DNA beteiligt zu sein (Ikeda & Ozaki, 1997).

Des Weiteren schneidet EndoG *in vitro* RNA durch eine RNase-Aktivität gezielt an der CSBII (*conserved sequence box II*). Cote et al. diskutiert, dass EndoG Primer für die Replikation herstellt und somit an der Replikation der mitochondrialen DNA beteiligt ist (Cote & Ruiz-Carrillo, 1993).

### **1.7.3 Trypanosomale Endonuklease G**

EndoG von Trypanosomen bzw. Leishmanien ist ca. 1,5 fach größer als das menschliche EndoG. Ein Vergleich der gesamten Aminosäuresequenz zeigt zwischen den parasitären und menschlichen EndoG eine Homologie von ca. 30 %. EndoG von Trypanosomen hat ca. 50 % Homologie zu EndoG von Leishmanien (Sreenivas Gannavaram, Vedvyas, & Debrabant, 2008). Nach Low und Gerschenson resultiert die starke Homologie der Sequenzen von EndoG aus dem evolutionären Ursprung der Mitochondrien aus endosymbiotischen alpha Proteobakterien (Low & Gerschenson, 2002).

EndoG benötigt für die Substratbindung, Wasseraktivierung und Metallionenbindung folgende Aminosäuren: Arg219, His221, Asn253, Glu261. Folglich sind diese Aminosäuren sehr stark konserviert (Schafer et al., 2004). Das DRGH-Motiv (218 - 221) enthält die wichtigen Aminosäurereste des katalytischen Zentrums. Die Protozoen *Trypanosoma* und *Leishmania* haben statt der Asparaginsäure ein Serin. Eine

---

Überexpression von EndoG zeigte bei Trypanosomen nach Zugabe von PGD<sub>2</sub> oder Staurosporin vermehrt apoptotische Marker (Barth et al., 2014).

Das Programm Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) sagt im trypanosomalen EndoG eine mitochondriale Erkennungssequenz der ersten 55 Aminosäuren voraus. Bis jetzt existieren keine funktionierenden Antikörper oder spezifischen Inhibitoren gegen trypanosomales EndoG (Low & Gerschenson, 2002).

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Blutform Trypanosomen regulieren ihre Zelldichte im Wirt selber. Dabei spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. Da den Trypanosomen viele klassische Wege der Apoptose fehlen, wie z.B. Abwesenheit von Caspasen, muss untersucht werden, wie Trypanosomen dennoch Apoptose begehen können. EndoG ist ein wichtiges Enzym während der Apoptose in Zellen von Säugetieren, da es in diesen Zellen nukleosomale DNA degradiert. Das trypanosomale EndoG hat eine hohe Homologie zu EndoG aus Zellen von Säugetieren. Das Ziel dieser Arbeit ist es folglich, die Analyse der Funktion von trypanosomalen EndoG während der Apoptose in Blutformen von *Trypanosoma brucei* zu analysieren. Dabei will diese Arbeit an Ergebnisse früherer Arbeiten anknüpfen.

*T.b.* EndoG sollte zunächst durch einen eGFP-Tag fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden, um dann im Fluoreszenzmikroskop lokalisiert werden zu können. Nach Induktion von Apoptose durch PGD<sub>2</sub> und Staurosporin sollte erneut geprüft werden, in welchem Kompartiment sich *T.b.* EndoG befindet. Der Klon, der EndoG-eGFP exprimiert, wurde zusätzlich auf Wachstumseigenschaften und Verhalten während der Apoptose untersucht.

Zusammengefasst ist das Ziel die Funktion von *T.b.* EndoG in der Blutform nachzuvollziehen. Die Arbeit will neue Erkenntnisse und Ergebnisse liefern, die zu einem besseren Verständnis der Zelldichteregulation und der Apoptose von Trypanosomen führen.

---

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

##### 2.1.1.1 Trypanosomen

Für die Expression in Trypanosomen wurden SMB-Zellen (*single marker bloodstream form*) verwendet. Diese stammen aus der klonalen BF-Zelllinie 221 ab (Wirtz, Leal, Ochatt, & Cross, 1999). Der Nomenklaturname ist: MITat1.2 T7RNAP TETR NEO. Über das Plasmid pHD328 exprimiert dieser Stamm eine T7-RNA-Polymerase und hat über das Plasmid pLEW114hyg5' eine NEO-Resistenz und einen TN10 Tetracyclin Repressor. SMB-Zellen sind ein sogenannter *monomorpher* Stamm, d.h. es findet keine natürliche Zellregulation mehr statt. Ein mit SMB-Zellen infiziertes Tier stirbt somit zügig aufgrund einer Hypoglykämie (Matthews et al., 2004).

##### 2.1.1.2 Bakterien

Tabelle 2: Verwendete Bakterien.

One Shot TOP10 Competent Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NEB Turbo Competent E.coli (High Efficiency)	New England BioLabs, Ipswich
Rosetta Competent Cells	Merck, Darmstadt

#### 2.1.2 Geräte

##### 2.1.2.1 Allgemein

Tabelle 3: Geräte allgemein.

Vortex 2 Genie	Knick, Freiburg
pH-Meter 539	Bachhofer, Reutlingen
RCT Classic Herd/Magnetmischer	IKA-Werke GmbH, Staufen

Pipetboy acu	Integra Biosciences, Giessen
Analytical Plus Feinwaage	Ohaus GmbH, Giessen
Grobwaage PJ3000	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Feinwaage	Ohaus GmbH, Giessen
Heizblock neoBlock1	neoLab, Heidelberg
Autoklav, Dampfsterilisator LSS	Münchener Mechanik, Stadlern
Caso Eco 2000, Induktionsherd	Braukmann GmbH, Arnsberg
Filtrationsapparatur 1225 Sampling Manifold	Millipore, Bedford
Mikropipetten, Pipetman	Gilson, Middleton
Microfuge E™	Beckman, München
Mikrozentrifuge MC-13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Schnellkochtopf	CS, Solingen
Vacuum Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Reax top	Knick, Freiburg
Magnetrührer, MR2002	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer, MR3001 K	Heidolph, Schwabach

### 2.1.2.2 Zelllabor

Tabelle 4: Geräte Zelllabor.

Fireboy plus Bunsenbrenner	Integra Biosciences
Hämozytometer (Tiefe 0,02 mm) nach Neubauer	Brand, Wertheim
HERA cell, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub> Brutschrank	Heraeus, Osterode
LaminAir®HLB 2448 GS Sterilbank	Heraeus, Osterode
MicroOne Mikropipetten	STARLAB, Ahrensburg
Multifuge 1L-R Zentrifuge	Heraeus, Thermo Scientific

Safe 2020 Sterilbank	Thermo Scientific
Sigma 3K12 Laborzentrifuge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### **2.1.2.3 Mikroskopie**

Tabelle 5: Mikroskopische Geräte.

DMIL LED	Leica, Wetzlar
ID02 Invertmikroskop	Zeiss, Oberkochen
LM Axiostar plus	Zeiss, Oberkochen

### **2.1.2.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Tabelle 6: Geräte für die Fluoreszenzmikroskopie.

Axio Observer Z1	Zeiss, Oberkochen
AxioCamMR3 Kamera	Zeiss, Oberkochen

### **2.1.2.5 Molekularbiologie**

Tabelle 7: Geräte für die Molekularbiologie.

BlueMarine100 Gelkammer	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
FastGene GELPic Imaging System	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare, Buckinghamshire
HLB 2448 GS LaminAir Sterilbank	Haraeus, Hanau
MiniCycler™ Thermocycler	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Shaker Dos-10L Schüttler	neoLAB, Heidelberg
Wasserbad	GFL, Burgwedel

### **2.1.2.6 Proteinbiochemie**

Tabelle 8: Geräte für die Proteinbiochemie.

Blotapparatur	Biotec Fischer, Reiskirchen
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech

Folienschweißgerät: Folio	Severin, Sundern
Gelapparatur, Mighty Small II SE 250	Hoefer Scientific, San Francisco
Gene Power Supply GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech
GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare, Buckinghamshire

### 2.1.2.7 Durchflusszytometrie

Tabelle 9: Gerät für die Durchflusszytometrie.

FACSCantoII® Durchflusszytometer	Becton Dickinson & Co, USA
----------------------------------	----------------------------

## 2.1.3 Chemikalien

### 2.1.3.1 Allgemein

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ethanol p.A. 100 %	VWR International, Darmstadt
FBS (30 min 56°C)	PAA The Cell Culture Company, Pasching
Formalin Solution neutral buffered 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin 87 %	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hypoxanthin (100×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iscove's modified Dulbecco's Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
KCl, Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
L-Arginin/HCl	Roth, Karlsruhe
L-Cystein (100×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Histidin/HCl * H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ornithin/HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM nicht essentielle Aminosäurenlösung (100×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM Vitamin-Lösung (100×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol p.A. 100 %	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O, Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Midori green stain	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl, Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

PBS Tabletten	GIBCO (Invitrogen™ GmbH), Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (100×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProLong Gold Antifade Reagent+A7	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Prostaglandin D <sub>2</sub>	Biomol, Hamburg
Serum Plus™	SAFC Biosciences, Hampshire
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidin (1000×)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

### 2.1.3.2 Marker

#### 2.1.3.2.1 Marker für DNA- und Proteingele:

Tabelle 11: Verwendete Marker.

Page Ruler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
1kb Gene Ruler DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

#### 2.1.3.2.2 Durchflusszytometrische Marker:

Tabelle 12: Verwendete durchflusszytometrische Marker.

Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin-V-Fluos	Roche, Mannheim
DCFH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylrodaminester (TMRE)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

---

### 2.1.3.3 Enzyme

Tabelle 13: Verwendete Enzyme.

T4 DNA Ligase (5U/ $\mu$ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A	Quiagen GmbH, Hilden
DNase I, lyophilizate	Roche, Penzberg
Taq-Polymerase	Quiagen GmbH, Hilden
Reverse Transkriptase	Quiagen GmbH, Hilden

### 2.1.3.4 Restriktionsenzyme

Tabelle 14: Verwendete Restriktionsenzyme.

HindIII	ThermoFisherScientific, Braunschweig
NotI	Fermentas, St. Leon-Rot
NdeI	ThermoFisherScientific, Braunschweig
PvuII	ThermoFisherScientific, Braunschweig

### 2.1.3.5 Antibiotika:

Tabelle 15: Verwendete Antibiotika.

Antibiotic Antimycotic Solution (100X) Stabilised	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Doxycylin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin, G418	Carl Roth, Karlsruhe
Phleomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

### 2.1.3.6 Antikörper:

Tabelle 16: Verwendete Antikörper.

Anti eGFP (Mouse)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Anti Mouse AP (Goat)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.3.7 Immunfluoreszenz:

Tabelle 17: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Mitotracker Red CMXRos	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.1.4 Plasmide

### 2.1.4.1 pCR2.1

Zur Subklonierung wurde das Plasmid pCR2.1 verwendet. Das Plasmid ist geöffnet und besitzt Thymin-Überhänge. Das gewünschte PCR-Produkt kann mit den Adenin-Überhängen, welche von der *TAQ*-Polymerase synthetisiert werden, direkt in das Plasmid ligiert werden. Das Gen für LacZ, welches für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, erstreckt sich über die „multiple cloning site“ (MCS).  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert X-Gal (*5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid*) zu Galaktose und *5-Brom-4-chlor-indoxyl*. Somit ist es nach Ligation und Transformation möglich Kolonien anhand ihrer blauen bzw. weißen Färbung zu selektieren.

### 2.1.4.2 pCO57

Als Expressionsplasmid diente das Plasmid pCO57. Hinter der MCS liegt mit einem Linker-Peptid verbunden das Gen für eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Wird die Sequenz eines Proteins ohne das Stoppcodon in die MCS kloniert, entsteht ein Fusionsprotein mit eGFP. *Upstream* des gewünschten *Inserts* befinden sich ein *Tet*-Operator und ein T7-Promoter. Das gewünschte Protein ist somit mit Doxycyclin induzierbar. Desweiteren besitzt das Plasmid zur Selektion in Trypanosomen eine Phleomycinresistenz. Zur Expression des Proteins werden wegen des T7-Promoters Trypanosomen benötigt, die eine T7-Polymerase besitzen. Weiter *Upstream* liegt ein



NaCl	6800 mg/l	116 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	140 mg/l	1 mM
HEPES	7140 mg/l	30 mM

Salze und HEPES wurden gelöst und auf pH = 7,4 titriert. Danach wurden folgende Aminosäuren und Adenosin dazugegeben:

Tabelle 19: Zusammensetzung der Aminosäuren.

L-Arginin/HCl	126 mg/l	0,6 mM
L-Histidin/HCl x H <sub>2</sub> O	42 mg/l	0,2 mM
L-Isoleucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Leucin	52 mg/l	0,5 mM
L-Lysin (-20°C)	73 mg/l	0,5 mM
L-Methionin	60 mg/l	0,4 mM
L-Phenylalanin	100 mg/l	0,6 mM
L-Threonin	48 mg/l	0,4 mM
L-Tryptophan	100 mg/l	0,5 mM
L-Tyrosin	100 mg/l	0,55 mM
L-Valin	46 mg/l	0,4 mM
L- Ornithin/HCl	50 mg/l	0,3 mM
L-Adenosin (4°C)	12 mg/l	0,045 mM

Nachfolgend wurden folgende Lösungen dazugegeben:

Tabelle 20: Zusammensetzung des Grundmediums.

MEM - nicht essentielle Aminosäurelösung	10 ml/l	
MEM Vitaminlösung	10 ml/l	
Phenolrot	10 mg/l	0,03 mM

Das Grundmedium wurde steril filtriert und bei 4°C bis zu 6 Monate haltbar aufbewahrt.

**BF-Medium, pH = 7.4:**

Folgende Substanzen bzw. Lösungen wurden dem Grundmedium zugegeben.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Blutform-Mediums.

D-Glukose		5940 mg/l	32,9 mM
NaHCO <sub>3</sub> 33,3x in ddH <sub>2</sub> O	30 ml/l	75 mg/ml	26,2 mM
L-Glutamin 100x in ddH <sub>2</sub> O	10 ml/l	29,2 mg/ml	2 mM
L-Cystein 100x in ddH <sub>2</sub> O	10 ml/l	3,03 mg/ml	0,25 mM
2'-Desoxythymidin 100x in ddH <sub>2</sub> O	10 ml/l	0,39 mg/ml	0,016 mM
Hypoxanthin 100x in 0,1 M NaOH	10 ml/l	1,36 mg/ml	0,1 mM
Bathocuproindisulfonat 1000x in ddH <sub>2</sub> O *	1 ml/l	5,65 mg/ml	0,016 mM
Myristinsäure, gekoppelt an BSA 50x **	20 ml/l	24 mg/ml	0,1 mM
Penicillin/Streptomycin ***	5 ml/l		

Grundmedium ad 850 ml

\* Gelöst in ddH<sub>2</sub>O mit wenigen Tropfen 0,5 M HCl

\*\* Die Herstellung der Myristinsäurelösung erfolgte nach Ferguson und Cross (G. A. Cross & Manning, 1973; Ferguson & Cross, 1984): 24 mg Myristinsäure wurden in 100 µl Ethanol p.a. und 1 g fettsäurefreies BSA in 20 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Myristinlösung wurde schrittweise in die BSA-Lösung überführt.

\*\*\* "Penicillin/Streptomycin" ist "*antibiotic antimycotic solution 100x*" (Penicillin G 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml) und wurde 1:200 eingesetzt.

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,4 titriert und sterilfiltriert. Danach wurde 150 ml fötales Kälberserum dazugegeben. Das Medium war ca. 6 Wochen bei 4°C haltbar.

### Lösungen für Elektroporation:

#### HMI-9 Medium, pH = 7,4:

Dieses BF-Medium dient durch Zugabe von Serum Plus<sup>TM</sup> zur Anzucht von klonalen Zellreihen der Trypanosomen.

Zuerst wurde das „*Iscove's modified Dulbecco's Medium*“ (IMDM) für 1 Liter hergestellt.

#### IMDM Grundmedium, pH = 7,1 - 7,4:

Tabelle 22: Zusammensetzung des IMDM.

IMDM	17,7 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	3,02 g/l
ddH <sub>2</sub> O ad 770 ml	

Nun wurden folgende Substanzen dazugegeben:

Tabelle 23: Zusammensetzung des HMI-9 Medium.

Hypoxanthin 1000x in 0,1 M NaOH	11 ml	13,6 mg/ml
L-Cystein 100x	11 ml	18,2 mg/ml
Pyruvat 1000x	1,11ml	110 mg/ml
Thymidin 1000x	1,11 ml	39 mg/ml
2-Mercaptoethanol	15,5 µl	
Bathocuproindisulfonat 1000x in ddH <sub>2</sub> O *	1,11 ml	28,2 mg/ml
Penicillin/Streptomycin **	11 ml	5 mg/ml

\* Gelöst in ddH<sub>2</sub>O mit wenigen Tropfen 0,5M HCl

---

\*\* "Penicillin/Streptomycin" ist "*antibiotic antimycotic solution 100x*" (Penicillin G 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml) und wurde 1:200 eingesetzt.

Der pH-Wert wurde auf erneut auf 7,4 titriert und das Medium steril filtriert.

Folgende Seren wurden dazugegeben:

Tabelle 24: Zusammensetzung des HMI-9 Medium (2).

FBS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C)	110 ml
Serum Plus TM (nicht erhitzt)	110 ml

Bei 4°C gelagert ist das Medium ca. 6 Wochen haltbar.

### **Cytomix, pH = 7,6:**

Tabelle 25: Zusammensetzung des Cytomix.

EGTA	0,38 g	2 mM
KCl	4,44 g	118 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	9,6 mg	0,14 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	505 mg	5 mM
Glukose	2,5 g	27 mM
BSA	50 mg	1,5 µM
HEPES	2,98 g	25 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,1 g	87 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,77 g	13 mM
Hypoxanthin (100×)	5 ml	0,1 mM

ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml, auf pH = 7,6 titrieren und steril filtrieren.

---

### LB-Medium, pH = 7,0:

Tabelle 26: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bacto-trypton	10 g/l
Bacto yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

Auf pH = 7 titrieren und autoklavieren.

### SOB-Medium, pH = 7,0:

Tabelle 27: Zusammensetzung des SOB-Mediums.

Hefeextrakt 0,5 % (w/v)	5 g/l	
Trypton 2 % (w/v)	20 g/l	
NaCl	0,6 g/l	10 mM
KCl	0,2 g/l	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,95 g/l	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,21 g/l	10 mM

Auf pH = 7 titrieren und autoklavieren.

### SOC-Medium, pH = 7,0:

Tabelle 28: Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Glukose	3,6 g/l	20 mM
SOB-Medium		

---

### 2.1.5.2 Lösungen

#### **PBS (*Phosphate buffered saline*), pH = 7,4:**

Tabelle 29: Zusammensetzung PBS.

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

#### **TBS (*Tris buffered saline*), pH = 7,4:**

Tabelle 30: Zusammensetzung TBS.

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

#### **TDB (*Trypanosome dilution buffer*), pH = 7,7 (G A Cross, 1975):**

Tabelle 31: Zusammensetzung TDB.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	6,45 g/l	18 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0,28 g/l	2 mM
KCl	0,37 g/l	5 mM
NaCl	4,67 g/l	80 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g/l	1 mM
D-Glukose x H <sub>2</sub> O	3,96 g/l	20 mM

---

### **Einfriermedium für Trypanosomen-Stabilate:**

Tabelle 32: Zusammensetzung des Einfriermediums.

TDB	77,00 ml	80 %
Glycerin, 87 %	23,00 ml	20 %

### **Proteaseinhibitor-Mix, 1000X:**

Tabelle 33: Zusammensetzung des Proteaseinhibitor-Mix.

Leupeptin	4,27 mg/ml	1 mM
Pepstatin A	6,86 mg/ml	1 mM
Chymostatin	6,03 mg/ml	1 mM

In DMSO gelöst, in 50 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **TAE Puffer, pH = 8,0:**

Tabelle 34: Zusammensetzung TAE.

Tris-HCl	4,85 g/l	40 mM
EDTA	0,29 g/l	1 mM

### **TSS Puffer:**

Tabelle 35: Zusammensetzung TSS.

PEG 6000	10 %
DMSO	5 %
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Gelöst in LB Medium.

---

### 2.1.5.3 Puffer für die SDS-Page und Westernblot

#### Laufpuffer, pH = 8,3:

Tabelle 36: Zusammensetzung des Laufpuffers.

Tris-HCl	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,10 %

#### Gelherstellung für vier 10-prozentige Gele

Tabelle 37: Zusammensetzung des SDS-Gels.

Lösung	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
ddH <sub>2</sub> O	8,4 ml	6,6 ml
30 % Acrylamid	2,0 ml	7,6 ml
1 M Tris-HCl, pH = 8,8		8,6 ml
1 M Tris-HCl, pH = 6,8	1,5 ml	
10 % SDS	120 µl	120 µl
10 % APS	60 µl	60 µl
TEMED	12 µl	12 µl

#### Transferpuffer, pH = 9,2:

Tabelle 38: Zusammensetzung des Transferpuffers.

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

---

### **Blockierpuffer:**

Tabelle 39: Zusammensetzung des Blockierpuffers.

Milchpulver in 2x PBS	10 %
-----------------------	------

### **Waschpuffer, pH = 7,4:**

Tabelle 40: Zusammensetzung des Waschpuffers.

Tris-HCl	10 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM
Tween 20	0,10 %

### **AP-Puffer, pH = 8,9:**

Tabelle 41: Zusammensetzung des AP-Puffers.

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM

### **Färbelösung für die alkalische Phosphatase (AP):**

Tabelle 42: Zusammensetzung der alkalischen Phosphatase.

BCIP ( <i>Bromo-chloro-indolyl-phosphat</i> )	0,38 mM
NBT ( <i>Nitro-Tetrazoliumblau</i> )	0,4 mM
AP-Puffer	100 ml

---

#### 2.1.5.4 Stammlösungen von Antibiotika

##### Antibiotika als Stammlösung, Selektion von Bakterien und Trypanosomen:

Tabelle 43: Zusammensetzung der Stammlösungen der Antibiotika.

Ampizillin	50 mg/ml
Geneticin	50 mg/ml
Phleomycin	2,5 mg/ml

##### Antibiotika als Stammlösung, Induktion von Trypanosomen:

Tabelle 44: Zusammensetzung der Stammlösungen der Antibiotika zur Induktion.

Doxycyclin	10 mg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml

#### 2.1.5.5 Stammlösungen für die Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

##### Immunfluoreszenz Stammlösungen:

Tabelle 45: Stammlösungen für die Immunfluoreszenz.

Mitotracker	20 $\mu$ M
4',6-Diamidin-2-phenylindol in dH <sub>2</sub> O	1 mg/ml

##### Stammlösung für die Durchflusszytometrie:

Tabelle 46: Stammlösungen für die Durchflusszytometrie.

Digitonin	6,4 mM
Propidiumiodid	100 $\mu$ g/ml
Propidiumiodid	1 mg/ml
Tetramethylrodaminester (TMRE)	2,5 $\mu$ M
DCFH	1 mM

## 2.1.6 Oligonukleotide

### Primer für Endonuklease G (Klonierung):

Tabelle 47: Primer *T.b.* EndoG.

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Schmelztemperatur (Base-stacking calculated)
<b>HindIII-EndoG-se:</b>	5' - AAGCTT - ATGCATCGCATCACCGTA - 3'	50 %	54°C
<b>PvuII-EndoG-as:</b>	5' - CAGCTG - ACCGGTGTCGTTGGTCG - 3'	64.71 %	57°C

### Primer für eGFP (Nachweis-PCR):

Tabelle 48: Primer eGFP.

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Schmelztemperatur (Base-stacking calculated)
<b>Hind-eGFPse:</b>	5' - AAGCTT - ATGGTGAGCAAGGGCGAG - 3'	61.11 %	57°C
<b>eGFP-as:</b>	5' - CTTGTACAGCTCGTCCATGCC - 3'	57.14 %	58°C

## 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 49: Verbrauchsmaterialien.

6-, 12-, 24- und 96-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Menzel-Glaser, Braunschweig
Elektroporationsküvetten 2mm	Bio-Rad, München
Eppendorf-/ PCR-Cups	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml, 650 ml)	Greiner, Frickenhausen
Handschuhe	VWR, Darmstadt
Hybond-ECL (Nitrozellulosemembran)	GE Healthcare, Freiburg
Immunofluoreszenz-Objektträger	bioMerieux, Nürtingen
Kulturröhrchen (14 ml)	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Menzel-Glaser, Braunschweig
Paraflim	Peching, Menasha
Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Schott Glasflaschen, autoklavierbar (50 ml bis 1 l)	Fischer Scientific, Steinheim
Skalpell	B Braun, Melsungen
Sterilfilter, SFCA-Membran	Nalge, Hereford, UK
Sterilium	Bode, Hamburg
UV-Küvette mikro	Sarstedt, Nümbrecht
Vollküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman Papier 3 mm	Whatman, Maidstone, USA

### 2.1.8 Kits

Tabelle 50: Verwendete Kits.

<i>TAQ</i> -Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, München
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen, Hilden
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Penzberg
TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden

---

QIAgen Plasmid Purification Kit (Mini, Midi)	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.9 Software

Tabelle 51: Verwendete Software.

BLAST Nucleotide Blast	National Center for Biotechnology Information, Bethesda
DNAMAN	Lynnon Biosoft, Quebec
GATC Viewer	GATC Biotech AG, Konstanz
HP Scanjet 2200	Hewlett-Packard, Palo Alto
Microsoft Excel 2010	Microsoft Cooperation, Redmond
Microsoft Word 2010	Microsoft Cooperation, Redmond
Microsoft Powerpoint 2010	Microsoft Cooperation, Redmond
PubMed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda
Cyfllogic	Perttu Terho & CyFlo Ltd
Axio vision	Zeiss, Oberkochen
EndNote	Thomson Reuters, New York
Acrobat Reader	Adobe, San Jose
Primer 3 v0.4.0	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>

---

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Kultivierung**

#### **2.2.1.1 *E. coli***

##### **E. Coli auf Agarplatten:**

2 x Agar (250 ml) wurde steril in der Mikrowelle erwärmt, verflüssigt und dann 1:1 mit 2 x LB-Medium (250 ml) gemischt. 500 µl der Ampizillin-Stammlösung wurden dazugegeben, sodass die Konzentration 50 µg/ml betrug. Nun wurde das Gemisch auf ca. 30 sterile Petrischalen verteilt. Nach dem Aushärten wurden die Platten bei 4°C gelagert. Für die Selektion über das β-Galaktosidase-Gen wurde X-Gal dazugegeben. Somit konnten die Klone über blaue bzw. weiße Färbung selektiert werden.

##### **E. Coli in Flüssigmedium:**

E. Coli wurden in Kulturröhrchen in 2 - 5 ml Flüssigmedium (LB-Medium 1x mit jeweils 2 - 5 µl Ampizillin) inokuliert. Die Zellen stammten aus Stabilaten, Agarplatten oder Flüssigkulturen. Die Kulturen wurden mit 225 rpm über Nacht in einem 37°C Brutschrank inkubiert. Falls mehr Zellen erforderlich waren, wurde am nächsten Tag eine 50 - 100 ml Kultur 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 160 rpm inkubiert.

##### **Herstellung von Kompetenten Zellen:**

Kompetente Zellen wurden nach der Methode (Chung, Niemela, & Miller, 1989) mittels Polyethylenglykol, Dimethylsulfoxid und divalenter Kationen hergestellt. Dafür wurden gekaufte kompetente Zellen über Nacht auf einer Petrischale inkubiert. Ein Klon wurde gepickt, eine 3 ml Übernachtskultur und am Folgetag eine 100 ml Kultur 1:1000 angeimpft. Um sicherzustellen, dass sich die Bakterien im exponentiellen Wachstumsstadium befinden, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und sollte zwischen 0,4 - 0,7 liegen. Die Zellen wurden bei 4°C und 4500 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 10 ml TSS resuspendiert und in 100 µl Portionen aliquotiert. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

---

## **Herstellung von Kulturstabilaten:**

850 µl des gewünschten Klons wurden im exponentiellen Wachstumsstadium mit 150 µl Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **2.2.1.2 Trypanosoma**

#### **Trypanosomen in Kultur:**

Für die Kultivierung von Trypanosomen wurden Stabilate verwendet, die direkt nach der Entnahme aus dem Stabilatebehälter unter fließend warmen Wasser aufgetaut wurden. Um das Glycerin zu entfernen, wurde das aufgetaute Stabilat in 9 ml kaltes Medium gegeben und bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml resuspendiert. In einer 1:100 Verdünnung wurde die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen für die Vorkultur in vorgewärmtes Medium gegeben. Die Zellzahl wurde auf eine Konzentration von  $2 - 2,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

#### **Transfektion und Selektion:**

Für die Transfektion wurde eine Dauerkultur von SMB-Zellen verwendet. Diese wurde in HMI-9 Medium durch tägliches Verdünnen auf einer Zellzahl zwischen  $10^5$  und  $10^6$  gehalten. Für die Transfektion wurden  $2,5 \times 10^7$  Zellen in ein 50 ml Falcontube gegeben und bei 1000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* mit 25 ml Cytomix gewaschen. Die Zellen wurden erneut bei 1000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in insgesamt 440 µl Cytomix aufgenommen. 10 µg NOT1 linearisiertes Plasmid wurde dazugegeben, der Ansatz wurde gemischt und in eine 450 µl Elektroporationsküvette überführt. Das Gemisch wurde einmal bei 1.1 kV und 0.3 ms gepulst und direkt auf Eis gestellt. Nun wurde der Ansatz in 36 ml vorgewärmtes HMI-9 Medium überführt und 6 h bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden 1,44 µl G418-Stammlösung (Geneticin, Endkonzentration 2 µg/ml) und 1,8 µl Phleomycin-Stammlösung (Endkonzentration 0,125 µg/ml) dazugegeben. Der Transfektionsansatz wurde auf 24-Wellplatten in 1 ml Portionen aliquotiert und im Brutschrank bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 Tagen wurden positive Wells resuspendiert und ausgezählt. Die Zellzahl wurde durch tägliches Verdünnen auf  $10^5$  Zellen/ml gehalten sodass sich das Gesamtvolumen sukzessive erhöht.

---

## **Herstellung von Kulturstabilaten:**

Zur Herstellung von Stabilaten wurden die Kulturen bei  $10^6$  Zellen/ml in Falcontubes gegeben, 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, danach in TDB gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das *Pellet* wurde mit TDB so resuspendiert, dass je nach Wunsch eine Zellzahl zwischen  $10^7$  und  $10^8$  erreicht wurde. Auf Eis wurden die Zellen nun 1:1 mit Einfriermedium gemischt und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden schonend 1 h bei  $-20^\circ\text{C}$  und über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Konstruktion der Primer**

Die Primer wurden mithilfe des Programms *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen. Hierbei war auf Länge, Lokalisation, GC-Gehalt, Selbstkomplementarität, Stop-, Startcodon und auf das Leseraster zu achten. Eine Verlängerung der Primer um passende Restriktionsschnittstellen ermöglichte einen Verdau und eine Ligation in den Expressionsvektor.

#### **2.2.2.2 PCR**

Für die PCR wurde die *TAQ-Hotstar*-Polymerase von Quiagen verwendet. Je nach weiterer Verwendung des PCR-Produktes wurden Ansätze zwischen 15 - 50  $\mu\text{l}$  gewählt. Nach Protokoll wurde für einen 50  $\mu\text{l}$  Ansatz 1 x PCR-Puffer, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0,5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen *sense* und *antisense* Primers, ca. 50 ng *Template* und 2,5 U Polymerase eingesetzt. Primer (100  $\mu\text{M}$ ) wurden davor 1:10 verdünnt. Wahlweise wurden unterschiedliche  $\text{Mg}^{2+}$  Konzentrationen zwischen 0,5 mM und 5 mM gewählt. Für die PCR wurden die Temperaturschritte im *Thermocycler* folgendermaßen eingestellt:

Zur initialen Aktivierung wurden die Proben 15 min auf  $94^\circ\text{C}$  erhitzt. Es folgten 25 - 35 Zyklen mit Denaturierung, Annealing und Elongation: Die Denaturierung der doppelstrang DNA erfolgte bei  $95^\circ\text{C}$  für 30 - 60 s. Zur Anlagerung der Primer wurde die Annealingtemperatur 30 - 60 s zwischen  $52^\circ\text{C}$  und  $60^\circ\text{C}$  gewählt. Beste Ergebnisse wurden ca.  $2^\circ\text{C}$  unter der Schmelztemperatur der Primer erzielt. Die Elongation erfolgte bei  $72^\circ\text{C}$ . Je nach Polymerase und Länge des gewünschten PCR-Produktes wurde die Zeit angepasst. Die Geschwindigkeit der *TAQ-Hotstar*-Polymerase beträgt 1000 bp/min.

---

Um nicht fertige PCR-Fragmente fertig zu synthetisieren, wurde ein letzter Elongationsschritt für 10 min bei 72°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde direkt weiterverwendet oder bei 4°C gelagert.

#### **2.2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration**

Um die Konzentration der DNA oder RNA zu bestimmen, wurde die Probe in UV-Küvetten und im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine OD 260 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Absorption sollte im linearen Bereich zwischen 0.1 und 2.0 liegen. Falls dies nicht der Fall war, musste die Probe je nach Wert verdünnt oder aufkonzentriert werden. Das Verhältnis von OD 260 und OD 280 gab Aufschluss über die Reinheit des Gemisches. Ein Wert unter 1,7 spricht für eine Proteinverunreinigung. Ein Wert bei ca. 1,8 spricht für reine DNA, ein Wert bei ca. 2,0 spricht für reine RNA.

#### **2.2.2.4 DNA-Gelelektrophorese**

Je nach Größe des DNA-Fragments wurden 0,8- bis 1,2-prozentige Agarosegele gegossen. Hierfür wurde die gewünschte Gelmenge abgewogen in 1 x TAE Puffer in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Die Lösung wurde ca. 5 min zum Abkühlen stehen gelassen. 0,7 µl des Farbstoffs „Midori Green Stain“ wurden zur Färbung von 50 ml Gel gegeben. Die Proben wurden mit Ladepuffer gemischt, in die Geltaschen gegeben und 45 min bei 80 V konstanter Spannung aufgetrennt. Wahlweise wurden die Banden zur Dokumentation fotografiert.

#### **2.2.2.5 Gelextraktion**

Falls mit der aufgetrennten DNA Bande weitergearbeitet werden sollte, wurde diese unter Sicht aus dem Gel ausgeschnitten. Um mit der gewünschten Probe weiter verfahren zu können, wurde das Gelstück mit Hilfe des Gelextraktionskit mit dem QC-Puffer 10 min bei 50°C verflüssigt. Die Probe wurde auf eine Säule gegeben und bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert. Die DNA bindet wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen an der *Silica-Gel*-Membran. Es wurde zweimal mit Ethanol gewaschen, einmal trocken zentrifugiert und je nach Menge mit 30 - 50 µl eluiert.

---

#### **2.2.2.6 Ligation**

Für die Ligation wurden 50 ng des Subklonierungsvektors und 200 ng des Expressionsvektors verwendet. Wahlweise wurden verschiedene Vektor:*Insert* Verhältnisse gewählt (1:1, 3:1 und 10:1). Da die Länge des *Inserts* unterschiedlich zu der des Vektors ist, musste die Menge des *Inserts* bezogen auf die Länge über folgende Formel

$$\text{Masse in ng [Insert]} = \frac{(\text{Länge in bp [Insert]}) * (\text{Masse in ng [Vektor]})}{\text{Länge in bp [Vektor]}}$$

errechnet werden. In jeder Ligation wurden 4 U T4 DNA-Ligase verwendet. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei wechselnden Temperaturenschritten (22°C, 16°C und 4°C, jeweils 1 h) ligiert.

#### **2.2.2.7 Transformation**

Für die Transformation wurde ein Stock kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. 2 - 10 µl des Ligationsansatz wurden in den Stock pipettiert und sanft mit der Pipettenspitze umgerührt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt, 30 s bei 42°C hitzegeschockt und direkt wieder auf Eis gegeben. Es wurden 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium dazugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen auf Agarplatten mit Antibiotikum und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 2 - 3 h bei 4°C gelagert, um eine bessere weiß bzw. blau Färbung der Klone zu erhalten.

#### **2.2.2.8 Quick and dirty PCR**

Um ein schnellere Analyse der Klone zu bekommen, wurde auf eine Plasmidisolierung verzichtet. Der gewünschte Klon wurde steril mit einer Pipettenspitze gepickt, die Pipette einmal in einen fertigen PCR-Ansatz getunkt und dann für eine Übernachtskultur in eine 4 ml Kultur gegeben.

#### **2.2.2.9 Mini-Plasmidpräparation (Minipräp)**

Für die Plasmidisolierung wurden 2 - 5 ml Übernachtskultur 10 - 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Pellet in Resuspensionspuffer resuspendiert. Es folgte eine alkalische Lyse mit nachfolgender Neutralisation. Die ausgefallenen Zelltrümmer inklusive Membranen, Proteine und genomischer DNA

---

wurden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit dem gewünschten Plasmid wurde auf die Säule gegeben und 1 min bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert. Die Plasmide binden wegen ihrer negativen Ladungen der Phosphatgruppen an die positiv geladene *Silica-Gel*-Membran. Die Membran wurde mit Ethanol gewaschen. Damit kein Ethanol in der Probe zurückbleibt, wurde erneut trocken zentrifugiert. Das Plasmid wurde mit 50 - 100 µl Elutionspuffer eluiert.

#### **2.2.2.10 Midi-Plamidpräparation (Midipräp)**

Für eine höhere Ausbeute an Plasmid wurde eine 100 ml Kultur mit 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Die Zellen wurden in zwei 50 ml Falkontubes bei 5000 g abzentrifugiert und das Medium verworfen. Die Lyse erfolgte wie bei der Mini Präp. Die Zelltrümmer wurden in der Ultrazentrifuge bei 20000 g 30 min und der Überstand erneut bei 20000 g 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine aktivierte *Silica-Gel*-Säule gegeben. Der Durchlauf erfolgte mittels Gravitationskraft. Es wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde mit 3 ml Elutionspuffer. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, abzentrifugiert und mit Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde im Vakuum-Konzentrator getrocknet und danach in 100 µl Elutionspuffer wiederaufgenommen.

#### **2.2.2.11 Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau wurden folgende Restriktionsenzyme, die in spezifischen palindromischen Sequenzen schneiden, verwendet: NotI schneidet in 5'-GC|GGCCGC-3', HindIII schneidet in 5'-A|AGCTT-3' und PvuII schneidet in 5'-CAG|CTG-3'. Es wurde der jeweils passende Puffer 1 x verwendet. 1 U Enzym schneidet nach Definition 1 µg DNA/h. Die maximale Konzentration der DNA sollte nicht über 1 µg/µl betragen. Bei einem Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen musste der am besten geeignete Puffer genommen werden. Es wurde soviel Enzym genommen, dass in der gewählten Zeit theoretisch die doppelte Menge DNA verdaut werden konnte.

#### **2.2.2.12 Sequenzierung**

Die Firma GATC führte die Sequenzierung durch. Für die Sequenzierung wurde das gewünschte Plasmid isoliert. Die Konzentration wurde auf 30 - 100 ng/µl eingestellt und in 20 µl Aliquots eingeschickt. Für die Sequenzierung wurden entweder Standardprimer oder 20 µl eigene Primer in einer Verdünnung von 1:10 (10 µM)

verwendet. Die Proben wurden nach der Sangermethode sequenziert. Die Sequenzen wurden aus den Rohdaten mit „*Chromaslite*“ ausgelesen und manuell kontrolliert.

### 2.2.3 Gewinnung von RNA

Die RNA der Trypanosomen wurde mittels „*High pure RNA Isolation Kit*“ isoliert. Dabei wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und mit 400  $\mu$ l Lysepuffer (bestehend aus 4.5 M Guanidin Hydrochlorid, 50 mM Tris-HCl und 30 % Triton X-100 (w/v), pH = 6.6, 25°C) lysiert. Zeitgleich werden RNAsen durch RNase-Inhibitoren inaktiviert. Das Lysat wird auf die Säule gegeben und 15 s bei 10000 rpm abzentrifugiert. 100  $\mu$ l der DNase-Lösung werden auf die Membran der Säule pipettiert und die DNA 15 - 25 min bei Raumtemperatur verdaut. Danach werden 500  $\mu$ l des Washpuffers I dazugegeben und erneut 15 s bei 10000 rpm abzentrifugiert. Nun wird zweimal mit dem Washpuffer II (500  $\mu$ l und 200  $\mu$ l) gewaschen. Zum Schluss wird 2 min bei maximalem Speed zentrifugiert, um Verunreinigungen durch Alkohol zu verhindern. Die RNA wird in 50 - 100  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.4 Reverse Transkription

Die Template RNA, der Reaktionspuffer, dNTP'S und RNase freies Wasser wurden auf Eis aufgetaut. Die Reaktionsbestandteile wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 52: Zusammensetzung der reversen Transkription.

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endgültige Konzentration</b>
10X RT Puffer	2 $\mu$ l	1 x
dNTP Mix (5 mM pro dNTP)	2 $\mu$ l	0,5 mM pro dNTP
Oligo-dT Primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	1 $\mu$ M
RNase-Inhibitor (10 Units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	10 U pro Reaktion
Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l	4 U pro Reaktion
RNase freies Wasser	Variabel	-
Template RNA	Variabel	bis zu 2 $\mu$ g pro Reaktion
<b>Totales Volumen</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

---

Nachdem die Template RNA dazugegeben wurde, wurden die Tubes 5 s gevortext und vorsichtig abzentrifugiert. Die reverse Transkription lief 1 h bei 37°C ab. Durch die Zugabe von Oligo-dT Primer wurde nur RNA revers transkribiert, welche einen poly A Schwanz besitzt, nämlich mRNA.

## **2.2.5 Proteinbiochemie**

### **2.2.5.1 Zelllysate**

Eine Hochgewachsene 4 ml Kultur der Rosettazellen wurde mittels „BaqBlaster“ lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation in eine lösliche und eine membranöse Fraktion aufgetrennt.

10 ml einer hochgewachsenen ( $10^6$  Zellen/ml) Kultur von Trypanosomen wurden abzentrifugiert und mittels hypotoner Lyse lysiert. Wahlweise wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt. Die Lyse wurde unter dem Mikroskop kontrolliert.

### **2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach dem Assay nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Mit Hilfe einer 0,2 µg/ml BSA-Stammlösung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve erstellt.

Tabelle 53: Proteinbestimmung nach Bradford.

<b>Proteinmenge (µg)</b>	<b>Stammlösung (µl)</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O (µl)</b>
2	10	790
4	20	780
6	30	770
8	40	760
10	50	750

Zur Messung wurden die Standardproben doppelt angesetzt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als Referenz wurden 800 µl ddH<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen und eine Standardkurve erstellt.

---

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde ein definiertes Volumen der zu bestimmenden Probe zu 800 µl ddH<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mithilfe der entsprechenden Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.2.5.3 SDS-Page**

Um die Proteine vollständig zu denaturieren, wurden die Proben mit dem reduzierendem Probenpuffer „*RotiLoad 1*“ für 5 min bei ca. 100°C gekocht. In die randständigen Taschen wurden 2,5 µl des Markers und in die mittleren Taschen ca. 25 - 30 µl der Proben pipettiert.

Zunächst wurde unter laufender Wasserkühlung 5 min eine Spannung von 100 V angelegt. Dadurch wurden die Proben im Sammelgel gesammelt. Danach wurden die Proteine bei 120 - 140 V und einer konstanten Stromstärke von 10 mA pro Gel ca. 1,5 h aufgetrennt.

### **2.2.5.4 Westernblot**

Im Anschluss an die SDS-Page wurde das Gel aus der Kammer herausgenommen. Das Ladegel wurde entfernt und das Trenngel in Transferpuffer gelegt. 3 Schichten des in Transferpuffer getränkten *Whatman*-Papiers wurde auf die Blotapparatur gelegt. Darüber wurden das SDS-Gel und die Nitrozellulose-Membran, die auch zuerst in Transferpuffer getränkt wurde, gelegt. Die Luftblasen wurden vorsichtig herausgestrichen und der Blot wurde erneut mit 3 schichten *Whatman*-Papier überschichtet. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt, die Blotapparatur wurde beschwert und der geschichtete Blot wurde ca. 40 min bei konstanter Stromstärke von 20 V und 400 mA geblottet.

Anschließend wurde die Zellulose-Membran 2 h in Blockierlösung blockiert. Danach 5 mal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper (1:1000) 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

Danach wurde erneut 5 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1:15000) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklungslösung wurde auf die Membran gegeben. Sobald Banden erschienen wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und der Blot zur Dokumentation eingescannt.

---

### **2.2.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse vieler Zellen in sehr kurzer Zeit. Dafür werden die vorbereiteten Zellen in dem Durchflusszytometer durch einen Hüllstrom fokussiert. Dieser Hüllstrom ist so fein, dass die Zellen einzeln an verschiedenen Lasern vorbei fließen. Das emittierte Streulicht jeder einzelnen Zelle wird detektiert und kann ausgewertet werden. Dies gibt dann Aufschluss über Größe, Granularität und Eigenschaften anhand der Fluoreszenz durch die vorherige Färbung der Zellen mit verschiedenen Farbstoffen.

#### **2.2.6.1 Färbung mit TMRE**

TMRE (*Tetramethylrhodamin-ethyl-ester*) kann leicht durch Zell- und Mitochondrienmembranen gelangen. TMRE gehört zu den Rhodaminen, und zwar zu den elektrometrischen Farbstoffen. Es reichert sich in gesunden und polarisierten Mitochondrien an. In diesem negativ geladenen Milieu emittiert TMRE eine rote Fluoreszenz bei ca. 570 nm. Wenn sich das Potential des Mitochondriums bei apoptotischen Zellen aufhebt, fließt TMRE in das Zytosol und emittiert nur noch sehr geringe Fluoreszenz. Um das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) zu messen, wurde 1  $\mu\text{l}$  der TMRE-Stammlösung auf 100  $\mu\text{l}$  der Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden anschließend 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden danach in ein FACS-Röhrchen überführt und lebend im Durchflusszytometer im roten Kanal gemessen.

#### **2.2.6.2 Färbung mit Annexin A5**

Bei gesunden Zellen befindet sich Phosphatidylserin an der Innenseite der Zellmembran. Wenn eine Zelle in Apoptose geht werden Phosphatidylserine auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Annexin ist mit FITC gekoppelt, bindet an Phosphatidylserin kann aber die Zellmembran nicht durchdringen. Somit werden Zellen nur positiv gemessen, wenn sich Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran befindet. Um die Menge des Phosphatidylserins auf der Außenseite der Zellmembran zu messen, wurden die Zellen mit 1:400 Annexin A5 versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und lebend im Durchflusszytometer im grünen Kanal gemessen.

---

### **2.2.6.3 Färbung mit Propidiumjodid**

Um auszuschließen, ob sich die Zellen in einem nekrotischen Prozess befinden wurde eine Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Propidiumiodid kann nicht durch Zellmembranen diffundieren. Folglich kommt Propidiumiodid bei einem apoptotischen Vorgang nicht zum Zellkern und fluoresziert daher nicht. Bei Nekrose zerreißt die Zellmembran, der Zellkern liegt frei und wird von Propidiumiodid angefärbt. Dazu wurden die Zellen mit 1:100 (100 µg/ml Stammlösung) Propidiumiodid versetzt, 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und lebend im Durchflusszytometer im roten Kanal gemessen.

### **2.2.6.4 Färbung mit DCFH-DA**

DCFH-DA (*2',7'-dichlorfluoresceindiacetat*) kann durch die Acetatgruppen Zellmembranen passieren. Im Zytosol wird DCFH-DA durch Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden DCFH (*2',7'-dichlorfluorescein*) deacetyliert. DCFH kann die Zelle nun nicht mehr über die Zellmembran verlassen. Falls reaktive Sauerstoffspezies im Zytosol vorhanden sind, wird DCFH zu dem grün fluoreszierenden DCF oxidiert. Um ROS (Radikale Sauerstoffspezies) zu messen wurde 1 ml Zellkultur mit 10 µl der DCFH-DA Stammlösung für 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen, in ein FACS-Röhrchen überführt und lebend im Durchflusszytometer im grünen Kanal gemessen.

### **2.2.6.5 Färbung mit Digitonin/ Propidiumjodid**

Um den DNA-Gehalt und damit die Zellzyklusphasen und DNA-Degradation zu messen, wurde 1 ml einer Kultur einmal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer und 1 µl Digitonin-Stammlösung aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran. Im zweiten Schritt wurde Propidiumiodid Färbelösung 1:100 (20 µg/ml) dazugegeben. Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer im roten Kanal gemessen.

### **2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie**

Eine Kultur wurde 20 min vor der Fixierung mit 50 nM Mitotracker inkubiert. Mitotracker besteht aus einem leicht thiol-reaktiven Chloromethyl-Rest, welcher selbst nach der Fixierung noch fluoresziert und sich im Mitochondrium befindet. 1 ml dieser Kultur wurde in 1-prozentiger Formalinlösung fixiert, um die Fluoreszenz nicht zu

---

schwächen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 1-prozentigem Formalin gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 100 µl 1-prozentiger Formalinlösung aufgenommen. Die Zellen wurden nun auf einen polylysinbeschichteten Objektträger gegeben und an der Luft getrocknet. Sobald der Objektträger trocken war, wurden die Zellen 5 min mit DAPI (1:1000) in Dunkelheit gefärbt. Der Objektträger wurde dreimal gewaschen, getrocknet und mit „*Antifade Reagent*“ eingedeckelt. Die Proben wurden an einem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

---

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generation eines *T.b.* EndoG-eGFP-Fusionsproteins zur Lokalisation von EndoG in Trypanosomen

##### 3.1.1 Amplifikation der trypanosomalen EndoG Sequenz mithilfe der TAQ-Polymerase

Für das Entwerfen der Primer wurde das Programm *Primer 3* verwendet. Der *Sense*-Primer startet am Startcodon und wurde in Richtung 5' um die Restriktionsschnittstelle HindIII verlängert, sodass er eine Länge von 24 bp hat. Der *Antisense*-Primer endet direkt vor dem Stopcodon TAA und wurde in Richtung 5' um die Restriktionsschnittstelle PvuII verlängert. So wurde erreicht, dass das Stopcodon von *T.b.* EndoG in der PCR nicht amplifiziert wurde. In einer späteren Expression wird die RNA-Polymerase somit über das Gen *T.b.* EndoG hinaus bis zum Stopcodon des Gens eGFP transkribieren. Die PCR wurde mit diesen Primern und verschiedenen *Annealing*-Temperaturen ausgetestet. Bei 56°C wurde die beste Ausbeute erzielt. Alle DNA-Gele wurden dabei mit folgendem Marker geelektrophoriert:

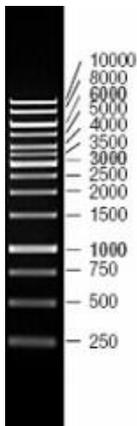


Abbildung 16: Gene-Ruler 1kb DNA-Ladder.

Nachfolgende Abbildung zeigt die Agarosegel-Auftrennung der PCR von *T.b.* EndoG:

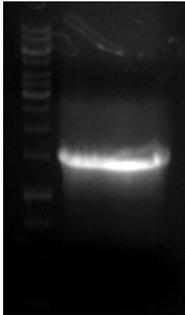


Abbildung 17: *Polymerasechainreaction* (PCR) des *T.b.* EndoG Gens. Die Bande ist bei ca. 1500 bp zu sehen. Literarischer Wert *T.b.* EndoG 1521 bp.

Um mit dem PCR-Produkt weiter verfahren zu können, wurde die Bande mithilfe des Gelextraktionskits (siehe Kap. 2.2.2.5) extrahiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt, sie betrug 13 ng/μl.

### 3.1.2 Sequenzierung und Klonierung des EndoG-Konstruktes in den induzierbaren eGFP-Fusionsvektor pCO57

#### 3.1.2.1 Subligation

Die Adenin-Überhänge, die bei der Amplifikation von *T.b.* EndoG von der *TAQ*-Polymerase entstehen, wurden genutzt, um das PCR-Produkt mittels *TA-Cloning-Kit* in den pCR2.1-Vektor zu klonieren. Überhängende Thymin-Reste des offenen Vektors ermöglichten eine hohe Ligationseffizienz. Die Ligation wurde, wie in Kap. 2.2.2.6 beschrieben, durchgeführt und war bei einem Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) erfolgreich:

Tabelle 54: Zusammensetzung der Subligation.

Bestandteil	Menge
Vektor (25 ng/μl)	2 μl
PCR-Produkt (13 ng/μl)	5 μl
10x Ligationspuffer	1 μl
T4 DNA Ligase (4 U/μl)	1 μl
dH <sub>2</sub> O	1 μl

---

### 3.1.2.2 Transformation in *Escherichia Coli*

Am folgenden Tag wurde eine Transformation mit den selbst hergestellten kompetenten Zellen durchgeführt (siehe Kap. 2.2.2.7). Die Selektion erfolgte mittels Ampizillin. Am nächsten Tag wurden die Klone nach ihrer Färbung selektiert. Dies war wegen des Gens  $\beta$ -Galaktosidase und der X-Gal enthaltenden Kulturplatten möglich. Weiße Klone wurden gepickt, und es wurde eine 3 ml Übernachtskultur angeimpft. Die *Colony*-PCR (siehe Kap. 2.2.2.8) zeigt folgendes Ergebnis zweier positiver Klone:

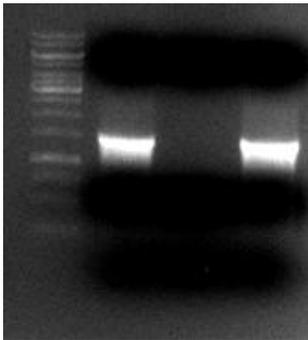


Abbildung 18: "Quick and Dirty"-PCR der Subligation. Beide Klone zeigen in der PCR eine Bande auf der Höhe von *T.b.* EndoG (ca. 1500 bp).

### 3.1.2.3 Sequenzierung

Das Plasmid des im Bild linken Klons wurde isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Standardprimer M13 und M13-*reverse*. Das Ergebnis verglichen mit dem Stamm *Tb927.8.4040* ist folgendermaßen:

Zusammengefasst sind es 4 Mutationen. Alle vier Mutationen in der Basensequenz führen zu einem Aminosäureaustausch:

- |                 |   |                         |
|-----------------|---|-------------------------|
| 476: C statt G  | → | Threonin statt Arginin  |
| 602: G statt A  | → | Arginin statt Glutamin  |
| 637: G statt C  | → | Aspartat statt Histidin |
| 1184: G statt A | → | Leucin statt Valin      |

Query	1	ATGCATCGCATCACCGTACGGCTCATGCCACTGATACGTGCACTGTCATCCCCTTACT	60
Sbjct	47	.....	106
Query	61	CCTTCTATTACACTTTGTGGCATCAACTGCAGGAAGAGCATACGATGGCGTTTCTGCT	120
Sbjct	107	.....	166
Query	121	TCTCCGTGGGACGTGCCTTTGCCTTCCTTGGTACGGCGCTGGCGGGAGGCGGATAGGA	180
Sbjct	167	.....	226
Query	181	ATGGTTGTGGAGCGTGGTGGTTGGTTGGTGTGGACAAATGCCATCCATCGCCTGTCCG	240
Sbjct	227	.....	286
Query	241	TATCAACAGATGACTGAGCGCACAAAGTCCGGAGGTGTACACGTGCAATGCCACAGCCC	300
Sbjct	287	.....	346
Query	301	GCATACCCCAAGGAGAGGTGTAAACGACGATGGTGGGAAACTACTCCTTTCGTGCTAAGA	360
Sbjct	347	.....	406
Query	361	CTTACAAGCAAGGGGCTTCCGTCCGACGATCACCTGCGCTACTACAAAGGCTTTGTTTCT	420
Sbjct	407	.....	466
Query	421	AGTCTGAATATGAGCGTCGTATCCCTAATTGGGTGTTGGAGTACATCCCCGGCAGGACC	480
Sbjct	467	.....C.....	526
Query	481	ACTGCTGCTGATTCACTGGTACGGCTGATAACGACTTAGTAAACGCTTCCGCAGCGGAA	540
Sbjct	527	.....	586
Query	541	GCCAGCGAGATGGAATGAGGTTCTTTCGGACATGACGGTGCCTCAGTTGTTCGCGGTG	600
Sbjct	587	.....	646
Query	601	CAGCCCGGTGACTATATGGGGGTGGCAGGGGACAGCACTCACGAGGCCTCAGCCGAGGT	660
Sbjct	647	.G.....G.....	706
Query	661	CACCTTGCTGCCGCACAGTTTACAAGAGCTCTACTGTTGAGTTGGCTCAGACCTTTAAC	720
Sbjct	707	.....	766
Query	721	ATGAATGCGAACACTGTACCACAGGACATGACAATGAATGCTGTGACTGGCTGCGGTTG	780
Sbjct	767	.....	826
Query	781	GAAAACCTCACACGGAGTTGCGGGCGTATTATGAGAGGGGATTGTGGGTAGTGACGGGA	840
Sbjct	827	.....	886
Query	841	CCTGTCTTCCACCCGCGGCTCGTGGATGGTGTGTGCGCACGTGGCGGTGGGCGGAACCA	900
Sbjct	887	.....	946
Query	901	TCGCAATGTCCGTCTCCAGTAAAACCTGTGAGTAGCGGAGTGTGGCTTCTGGAGAACAC	960
Sbjct	947	.....	1006
Query	961	TGCCACTGTGAAATGACAAGGCAGCAGTGCACTTGCGGAAGATTGTCTGCTATGAGCTT	1020
Sbjct	1007	.....	1066
Query	1021	GTGGGCAAGGCGACGTGCGGTCCCCACACACCTCTTCAAAGTTATATTAGGTGAGCGA	1080
Sbjct	1067	.....	1126
Query	1081	GCGGACGGGGCACATGAAGCTGCTGCCTTCTAATGCCGAACGAACCGATTGCCGTGGAG	1140
Sbjct	1127	.....	1186
Query	1141	CGGCCCCTCACAGCTTACCAGGTGCCTGTGGTAGAAATCGAGCGACTGACGGGTTGGAG	1200
Sbjct	1187	.....G.....	1246
Query	1201	TTCTTTCGGAATGTGGCCGCTGCTGGSTCAGACGCGGCTTCTGGGGCGGGAATGGAT	1260
Sbjct	1247	.....	1306
Query	1261	GCTCTGCCAAATATTGCAGACGCGTGGTGTGTGAAGCACGTACCCGAGGAATGTTTCGC	1320
Sbjct	1307	.....	1366
Query	1321	TCGTACCGAGACGTGGCGGCTACGGGCGGGGTTCTCTTCTGAAATTGCAGAGTGT	1380
Sbjct	1367	.....	1426
Query	1381	TACAGCATCCTGCTTGCAGAACAGCAGCAGAAGTGTGGCAACACAGCCGGAATAACAGTT	1440
Sbjct	1427	.....	1486
Query	1441	GCTCTGGATGGGTTGTAGCACAGGAATATAGAGCGCCTGAGGGAACTAATGGCTGTG	1500
Sbjct	1487	.....	1546
Query	1501	TCGACCAACGACACCGGT	1518
Sbjct	1547	.....	1564

Abbildung 19: Sequenzvergleich des amplifizierten *T.b.* EndoG mit *Tb927.8.4040*.

---

#### 3.1.2.4 Restriktionsverdau, Subklonierung

Das Plasmid pCR2.1 mit eingefügtem *T.b.* EndoG wurde mittels Minipräp isoliert (siehe Kap. 2.2.2.9). Anschließend wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und PvuII geschnitten. Der geeignete Puffer wurde mittels „fermentas double digest“ ermittelt. In diesem Fall war es „buffer red“. PvuII musste in doppelter Konzentration verwendet werden. Der Verdau wurde gelelektrophoriert und hatte, wie erwartet, geschnittene Fragmente in einer Länge von 1520 bp und 3930 bp. Die Bande des Gens für *T.b.* EndoG wurde gelextrahiert. Nach der Extraktion wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und betrug 17 ng/μl.

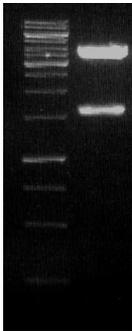


Abbildung 20: Gelelektrophorese des Verdaus von pCR2.1. Die Gelelektrophorese zeigt die Banden des verdauten pCR2.1-Vektors durch PvuII und HindIII. Die Banden sind auf einer Höhe von ca. 4000 bp (pCR2.1) und ca. 1500 bp (*T.b.* EndoG).

Um eine genügend hohe DNA-Konzentration für einen 10:1 Ligationsansatz zu haben, wurde die DNA über den Vakuum-Konzentrator aufkonzentriert. Dabei wurde die Konzentration auf 50 ng/μl eingestellt.

#### 3.1.2.5 Anzucht von *Escherichia Coli* mit pCO57/Isolation und Verdau von pCO57

Für die Ligation in den Expressionsvektor wurde eine 4 ml-Übernachtskultur des pCO57 enthaltenen Klons angeimpft. Das Plasmid wurde mittels Minipräp isoliert und auch mit HindIII und PvuII verdaut.

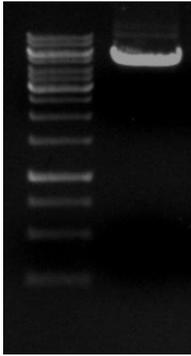


Abbildung 21: Gelelektrophorese des Verdaus von pCO57. Die Bande ist bei ca. 5500 bp zu sehen. Literarischer Wert von pCO57: 5423 bp.

Da bei dem Vektor pCO57 beide Restriktionsschnittstellen HindIII und PvuII unmittelbar nebeneinander liegen, ist es gelelektrophoretisch nicht möglich den vollständigen Verdau zu kontrollieren. Deshalb wurde statt standardmäßigem doppeltem Verdau fünffach verdaut. Das verdaute Plasmid wurde über ein 0,8-prozentiges Gel aufgetrennt und geextrahiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und betrug 20 ng/μl. Auch hier wurde die DNA-Konzentration über den Vakuum-Konzentrator aufkonzentriert und auf 38 ng/μl eingestellt.

### 3.1.2.6 Ligation EndoG mit pCO57

Für die Ligation wurden 2 Ansätze mit 200 ng Vektor und verschiedenen Vektor:Insert Verhältnissen (1:3 und 1:10) angesetzt und über Nacht ligiert. Bei der Transformation waren nur bei dem 1:3 Ansatz positive Klone dabei. Die *Colony*-PCR zeigt folgendes Ergebnis.



Abbildung 22: Gelelektrophorese der *Colony*-PCR. In den beiden linken Banden wurden die Primer HindIII-EndoG-se und PvuII-EndoG-as verwendet (ca. 1500 bp), in den beiden rechten der Primer HindIII-EndoG-se und der Primer eGFP-as (ca. 2200 bp). Das Ergebnis zeigt, dass das Gen für *T.b.* EndoG richtig herum eingebaut worden ist.

---

Zur Kontrolle wurde das Plasmid isoliert und mittels Restriktionsenzymen verdaut. Abbildung 23 zeigt die sichtbaren Banden. Die Banden stimmen mit den theoretischen Angaben überein.

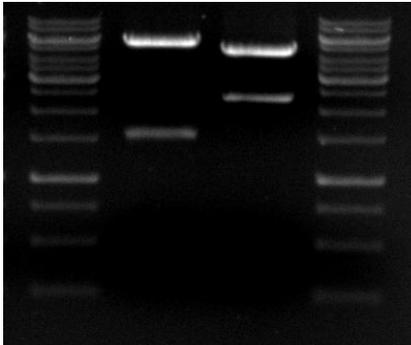


Abbildung 23: Testverdau pCO57 mit *T.b.* EndoG. Links Verdau mit HindIII und Pvull, *T.b.* EndoG (ca. 1500 bp) und der restliche Vektor (ca. 5400 bp). Rechts, Verdau mit BamHI und HindIII: *T.b.* EndoG-eGFP (ca. 2200 bp) und der restliche Vektor (ca. 4800 bp).

### **3.1.2.7 Herstellung der Stabilate**

Aus den Klonen pCR2.1 mit *T.b.* EndoG und pCO57 mit *T.b.* EndoG wurden Stabilate hergestellt und im Stickstofftank gelagert (siehe Kap. 2.2.1.1).

### **3.1.2.8 Linearisierung von pCO57**

Um genügend DNA-Material für die Transformation zu haben, wurde eine 100 ml Übernachtskultur angesetzt. Mittels Midipräp wurde das naive und das *T.b.* EndoG enthaltende Plasmid pCO57 isoliert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und auf 1 µg/µl eingestellt. Um das Konstrukt in Trypanosomen mittels homologer Rekombination einzubringen, wurden beide Plasmide NotI linearisiert. NotI schneidet innerhalb eines ribosomalen RNA-*Spacers*. Die verdauten und nun linearen Plasmide besitzen somit an beiden Enden eine rRNA-Sequenz. Diese kann mit der homologen Sequenz der trypanosomalen DNA interagieren. Es bildet sich eine sogenannte „*Holliday Struktur*“, bei der sich homologe Sequenzen aneinander anlagern. Mithilfe des Enzyms Rekombinase wird die chromosomale DNA geschnitten, mit dem Konstrukt getauscht und wieder ligiert.

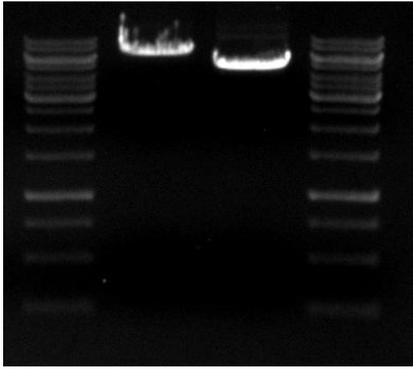


Abbildung 24: Gelelektrophorese der mit NotI linearisierten Vektoren. Links pCO57 mit *T.b.* EndoG (ca. 8000 bp), rechts pCO57 naiv (ca. 5500 bp).

## 3.2 Transformation des naiven- und des *T.b.*-EndoG-Vektors pCO57 in Trypanosomen

### 3.2.1 Transformation mithilfe der Elektroporation und der homologen Rekombination

SMB-Zellen wurden für die Elektroporation vorbereitet. Um das System zu testen und Zellreihen in ihren Eigenschaften zu vergleichen, wurde mit dem naiven und dem *T.b.* EndoG enthaltenden Vektor pCO57 elektroporiert (siehe Kap. 2.2.1.2). Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden folgende Parameter variiert: Das zur Selektion verwendete Phleomycin wurde in Konzentrationen zwischen 0,125 - 0,5 µg/ml eingesetzt. Auch wurde die DNA-Menge pro Elektroporationsansatz variiert. Ziel war es ca. 2 - 4 transformierte Klone pro Elektroporation (Transformationseffizienz von 5 - 10 %) zu erhalten. Mit beiden Ansätzen wurden stabile Klone unter Geneticin und Phleomycin Selektion erhalten.

Beide transgenen Zelllinien werden hier wie folgt benannt:

Tabelle 55: Nomenklatur des Klons SMB-eGFP.

<b>Name des trypanosomalen Klons</b>	<b>SMB-eGFP</b>
<b>Verwendetes Plasmid</b>	pCO57, leer
<b>Selektionsmarker</b>	G141, Phleomycin

Tabelle 56: Nomenklatur des Klons SMB-EndoG-eGFP.

<b>Name des trypanosomalen Klons</b>	<b>SMB-EndoG-eGFP</b>
<b>Verwendetes Plasmid</b>	pCO57, EndoG
<b>Selektionsmarker</b>	G141, Phleomycin

### 3.2.2 Induktion der transformierten Klone mithilfe von Doxycyclin

*Upstream* des gewünschten Gens befinden sich ein Tetracyclin-Operator und ein T7-Promoter. Für die Transformation wurden SMB-Zellen verwendet, die eine T7-Polymerase besitzen. Somit wurde mit einem induzierbaren System gearbeitet. Solange kein Tetracyclin im Medium ist, sollte das Gen stillgeschaltet sein. Um eine Expression zu erhalten, wurde über Nacht mit 10 µg/ml Tetracyclin oder Doxycyclin induziert.

### 3.3 Charakterisierung der Expression von EndoG-eGFP auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene

#### 3.3.1 Qualitativer Nachweis von mRNA des Klons SMB-eGFP und SMB-EndoG-eGFP

Um die Expression von eGFP bzw. *T.b.* EndoG-eGFP auf mRNA-Ebene zu verifizieren, wurden beide Klone zunächst über Nacht mit Doxycyclin induziert. Am folgenden Tag wurde die RNA isoliert (siehe Kap. 2.2.3) und revers transkribiert. Dabei wurden oligo-dT-Primer verwendet, damit nur die messenger-RNA revers transkribiert wird. Aus der revers transkribierten RNA wurden drei verschiedene PCRs nach folgender Tabelle angesetzt (siehe auch Kap. 2.2.2.2):

Tabelle 57: Zusammensetzung der Nachweis-PCR.

	<b>Links</b>	<b>Mitte</b>	<b>Rechts</b>
<b>Template</b>	cDNA des Klons SMB-eGFP	cDNA des Klons SMB-EndoG-eGFP	cDNA des Klons SMB-EndoG-eGFP
<b>Primer (se)</b>	eGFP	eGFP	EndoG
<b>Primer (as)</b>	eGFP	eGFP	eGFP

---

Nachfolgende Abbildung 25 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR:

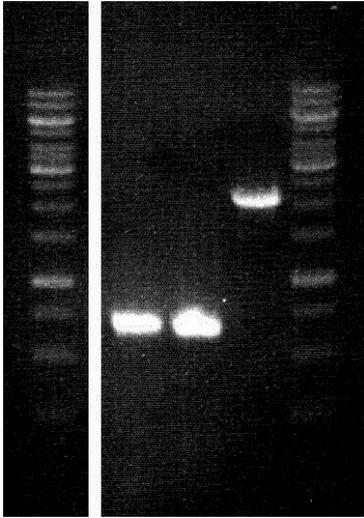


Abbildung 25: PCR Nachweis der mRNA aus Trypanosomen. Links: Nachweis von eGFP-mRNA des Klons SMB-eGFP (ca. 750 bp); Mitte: Nachweis von eGFP-mRNA des Klons SMB-EndoG-eGFP Vektor (ca. 750 bp); Rechts: Nachweis der Fusions-mRNA *T.b.* EndoG-eGFP des Klons SMB-EndoG-eGFP (ca. 2200 bp).

Zusätzlich wurden weitere PCRs angesetzt. Als Template enthielten sie statt der revers transkribierten mRNA die zuvor isolierte RNA, welche noch nicht in cDNA umgeschrieben war. Die Gelelektrophorese der PCR zeigte keine Banden (*Data not shown*).

### 3.3.2 Qualitativer Proteinnachweis von eGFP und *T.b.* EndoG-eGFP

Um die Expression von *T.b.* EndoG-eGFP auf Proteinebene zu verifizieren, wurden beide Vektoren pCO57 und pCO57-EndoG in Rosetta-Zellen transformiert und naives eGFP bzw. *T.b.* EndoG-eGFP exprimiert. Die induzierten Klone wurden mikroskopiert, auf Fluoreszenz kontrolliert und mittels „*Baq-baster*“ lysiert. Das Lysat wurde über Zentrifugation in eine zytosolische und membranöse Fraktion geteilt.

---

Folgender Marker wurde in allen Westernblots verwendet:

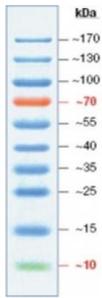


Abbildung 26: Pageruler, Prestained Protein Ladder.

Die zytosolische Fraktion enthielt die gesuchten Proteine. In den folgenden Westernblots wurden der 1. Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 und der 2. Antikörper in einer Verdünnung von 1:15000 eingesetzt:

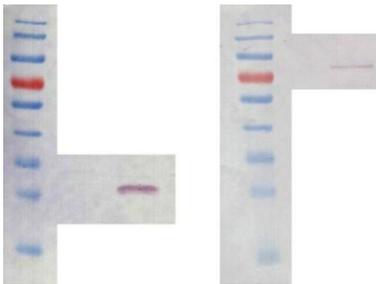


Abbildung 27: Westernblot aus Rosettazellen (*E. coli*): Links eGFP (ca. 25 kDa) und rechts *T.b.* EndoG-eGFP (ca. 80 kDa).

Im linken Blot sieht man das Lysat des Klons, welcher mit dem naiven Vektor transfiziert wurde. Die Bande befindet sich bei ca. 25 kD. Dieser Wert entspricht der Größe von eGFP (literarischer Wert: 26,9 kD). Im rechten Blot wurde das Lysat des Klons, welcher mit dem *T.b.* EndoG enthaltenen pCO57 Vektors transfiziert wurde, aufgetragen. Man sieht eine Bande bei ca. 80 kD. Dieser Wert entspricht der errechneten Größe des Proteins *T.b.* EndoG-eGFP (theoretischer Wert: 82,06 kD).

Desweiteren wurden beide trypanosomalen Klone (SMB-eGFP und SMB-EndoG-eGFP) über Nacht mit Doxycyclin induziert, am folgenden Tag mithilfe des Fluoreszenzmikroskops auf Fluoreszenz kontrolliert und hypoton lysiert. Das Lysat

---

wurde wiederum in eine zytosolische und eine membranöse Fraktion geteilt. Die Antikörper wurden in der gleichen Konzentration verwendet.

Nur der Klon SMB-eGFP zeigte im Westernblot eine Bande bei ca. 25 kD:

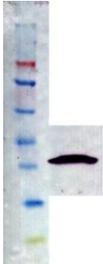


Abbildung 28: Westernblot von eGFP aus Trypanosomen (ca. 25 kDa).

Diese Bande entspricht wiederum dem literarischen Wert von eGFP. Der Klon SMB-EndoG-eGFP zeigte im Westernblot mittels AP und mittels Horseradish peroxidase keine Bande (*Data not shown*).

### **3.4 Quantitative Charakterisierung der induzierten Apoptose mithilfe der Durchflusszytometrie**

Für alle Versuche wurden die SMB-Zellen und der Klon SMB-EndoG-eGFP bei einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen mit  $\text{PGD}_2$  und Staurosporin inkubiert. Nach 6 bzw. 24 h wurden die Zellen für die jeweilige Messung gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen (siehe Kap. 2.2.6).

### 3.4.1 Ausschluss von Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid

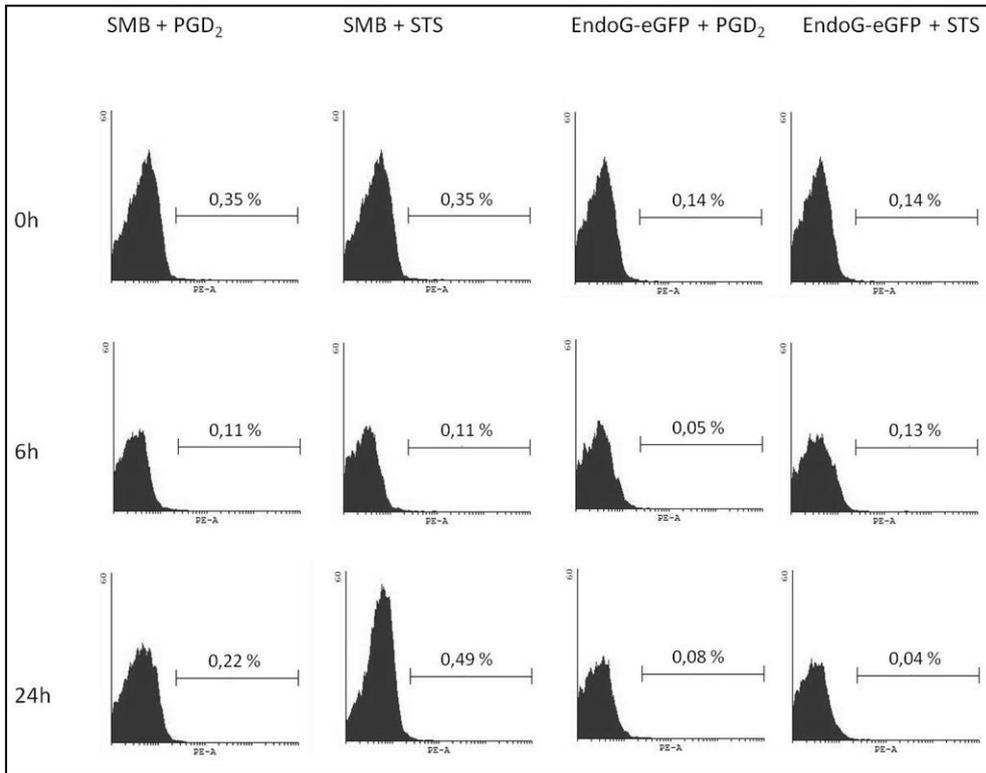


Abbildung 29: Ausschluss Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid.

Die Kontrollzellen beider Zelllinien zeigten nach der Färbung mit Propidiumiodid nur 0,35 % bzw. 0,14 % der Zellen mit erhöhter Fluoreszenz im roten Kanal. Auch nach Inkubation mit PGD<sub>2</sub> und Staurosporin zeigten beide Zelllinien den gleich niedrigen prozentualen Anteil an erhöhter Fluoreszenz.

### 3.4.2 Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der DNA Degradation

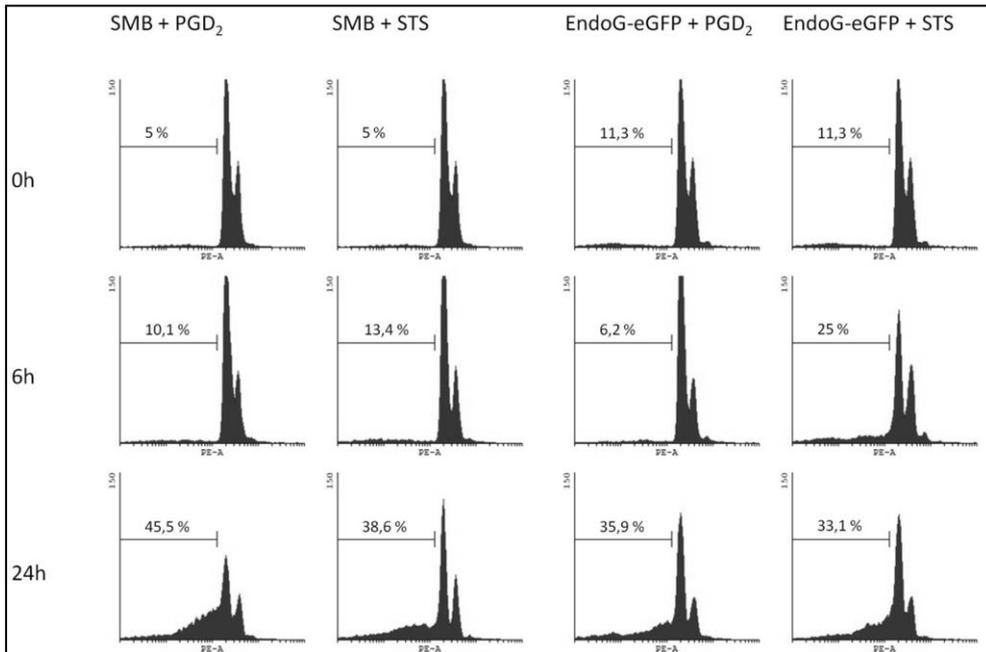


Abbildung 30: Messung des Zellzyklus durch Aufschluss mit Digitonin und Färbung mit Propidiumiodid.

Unter Färbung mit Digitonin und Propidiumiodid zeigten SMB-Zellen vor der Inkubation von Apoptose 5,0 %, der Klon SMB-EndoG-eGFP 11,3 % DNA-Degradation. Nach 6 h Inkubation mit PGD<sub>2</sub> zeigten 10,1 % der SMB-Zellen und 6,2 % des Klons SMB-EndoG-eGFP DNA-Degradation. Nach 24 h PGD<sub>2</sub> zeigten 45,5 % bzw. 35,9 % DNA-Degradation. Nach 6 h Inkubation mit Staurosporin zeigten 13,4 % bzw. 25,0 % und nach 24 h 38,6 % bzw. 33,1 % DNA-Degradation.

### 3.4.3 Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der Phosphatidylserinexposition

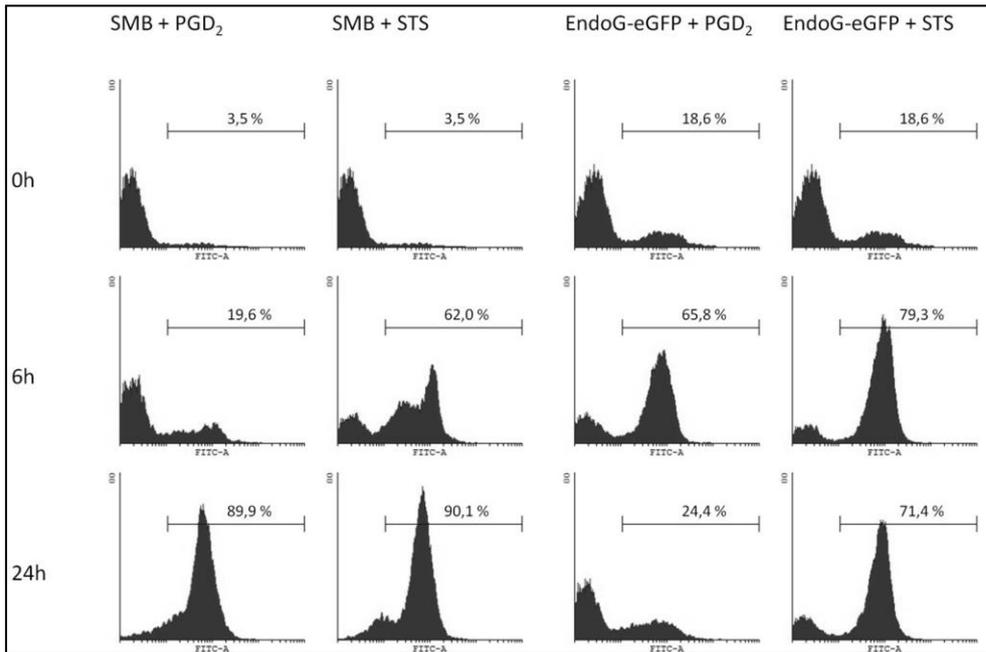


Abbildung 31: Messung der Phosphatidylserinexposition durch Färbung mit Annexin A5.

Unter Färbung mit Annexin A5 zeigten SMB-Zellen vor der Inkubation von Apoptose 3,5 % und der Klon SMB-EndoG-eGFP 18,6 % Phosphatidylserinexposition. Nach 6 h Inkubation mit PGD<sub>2</sub> zeigten 19,6 % der SMB-Zellen und 65,8 % des Klons SMB-EndoG-eGFP Phosphatidylserinexposition. Nach 24 h PGD<sub>2</sub> zeigten 89,9 % bzw. 24,4 % Phosphatidylserinexposition. Nach 6 h Inkubation mit Staurosporin zeigten 62,0 % bzw. 79,3 % und nach 24 h 90,1 % bzw. 71,4 % Phosphatidylserinexposition.

### 3.4.4 Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe der ROS

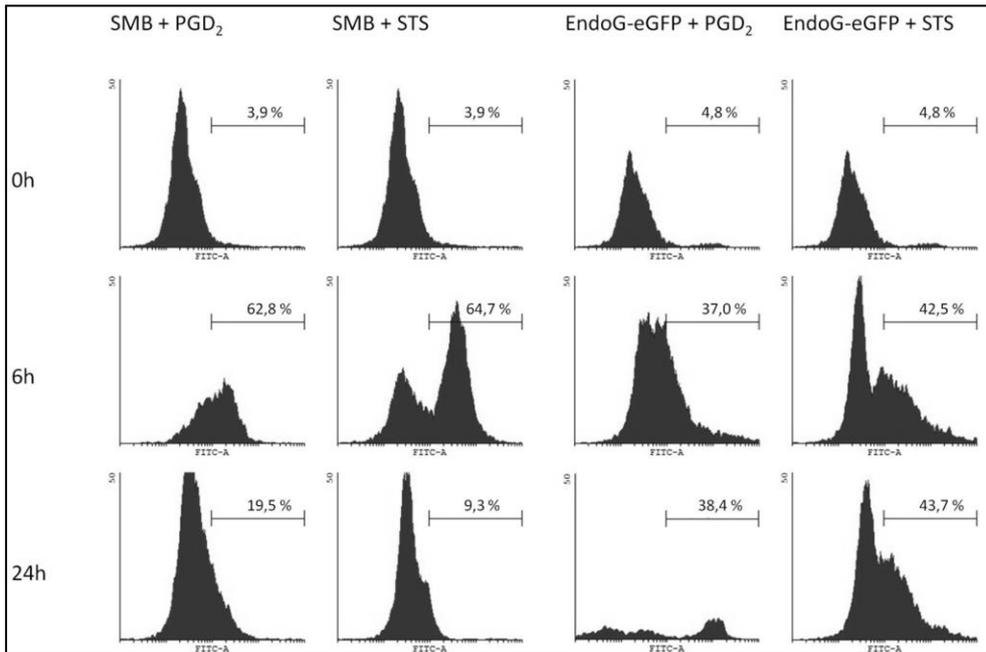


Abbildung 32: Messung der ROS durch Färbung mit DCFH.

Unter Färbung mit DCFH hatten vor der Inkubation 3,9 % der SMB-Zellen und 4,8 % des Klons SMB-EndoG-eGFP eine erhöhte Fluoreszenz. Nach 6 h Inkubation mit PGD<sub>2</sub> zeigten 62,8 % der SMB-Zellen und 37,0 % des Klons SMB-EndoG-eGFP eine erhöhte Fluoreszenz. Nach 24 h PGD<sub>2</sub> zeigten 19,5 % bzw. 38,4 % eine erhöhte Fluoreszenz. Nach 6 h Inkubation mit Staurosporin zeigten 64,7 % bzw. 42,5 % und nach 24 h 9,3 % bzw. 43,7 % eine erhöhte Fluoreszenz.

### 3.4.5 Quantitative Analyse der Apoptose mithilfe des mitochondrialen Potentials

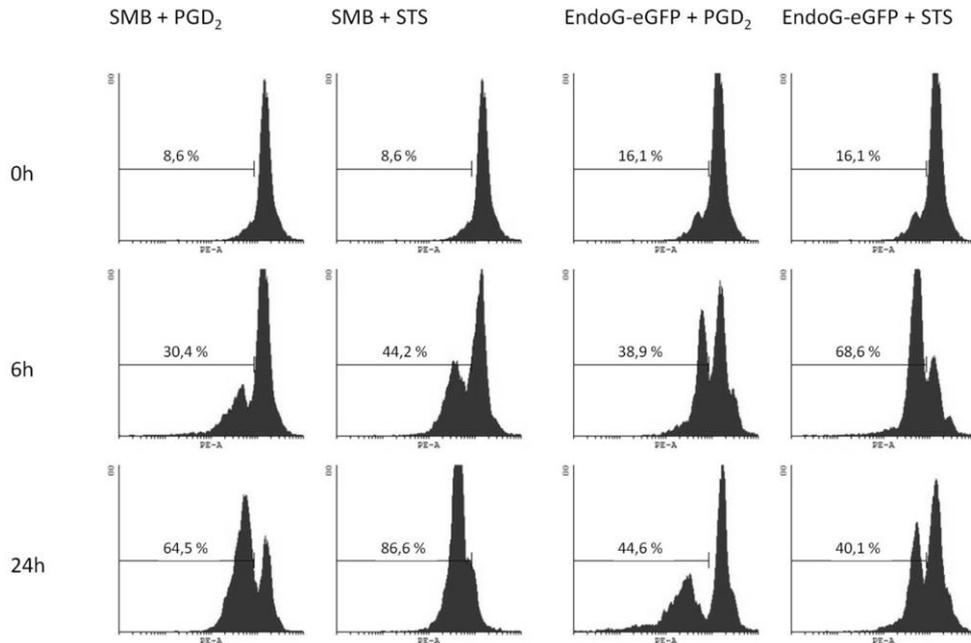


Abbildung 33: Messung des mitochondrialen Potentials durch Färbung mit TMRE.

SMB-Zellen zeigten vor der Inkubation ein intaktes mitochondriales Potential. 8,6 % der Zellen zeigten eine erniedrigte Fluoreszenz (TMRE positiv). Beim Klon SMB-EndoG-eGFP waren vor der Inkubation 16,1 % der Zellen TMRE positiv. Nach 6 h Inkubation mit PGD<sub>2</sub> waren 30,4 % der SMB-Zellen und 38,9 % des Klons SMB-EndoG-eGFP TMRE positiv. Nach 24 h PGD<sub>2</sub> waren 64,5 % bzw. 44,6 % TMRE positiv. Nach 6 h Inkubation mit Staurosporin waren 44,2 % bzw. 68,6 % und nach 24 h 86,6 % bzw. 40,1 % TMRE positiv.

### 3.5 Proliferationsassay des Klons SMB-EndoG-eGFP im Vergleich mit SMB-Zellen

Von Beginn an war zu beobachten, dass der Klon SMB-EndoG-eGFP langsamer wächst. Deshalb wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dafür wurden SMB-Zellen und der Klon SMB-EndoG-eGFP in die exponentielle Wachstumsphase gebracht. Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^5$  eingestellt. Eine Hälfte der Zellkulturen (SMB und SMB-EndoG-eGFP) wurde mit Doxycyclin (10 µg/ml) induziert. Die 4 Kulturen wurden ca. alle 8 h doppelt ausgezählt.

Folgendes Schema zeigt die Zelldichte in 1/ml aller vier Kulturen in Abhängigkeit von der Zeit in h:

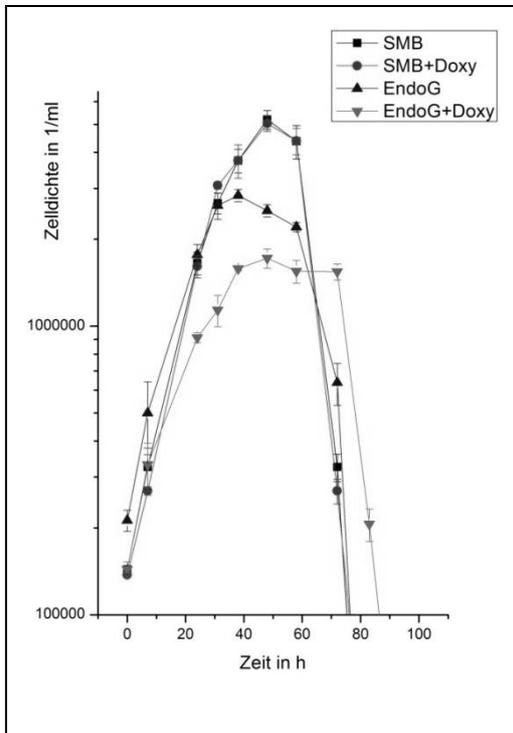


Abbildung 34: Wachstumskurve von SMB und SMB-EndoG-eGFP.

SMB-Zellen erreichten nach ca. 50 h Doxycyclin-unabhängig ihre maximale Zelldichte bei ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Der Klon SMB-EndoG-eGFP erreichte seine maximale Zelldichte nach ca. 40 h. Die Zelldichte betrug bei den nicht induzierten Zellen  $3 \times 10^6$  Zellen/ml und bei den mit Doxycyclin induzierten Zellen  $1,7 \times 10^6$  Zellen/ml.

Im Zeitraum zwischen 7 - 24 h, also bei einer Zelldichte zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1,6 \times 10^6$  wurde von einem exponentiellen Wachstum ausgegangen. Daher wurde die Verdopplungszeit nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{(24h - 7h) * \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{Zelldichte (zur Zeit 24h)}}{\text{Zelldichte (zur Zeit 7h)}}\right)}$$

Die SMB-Zellen haben ohne Doxycyclin eine Verdopplungszeit von ca. 7,2 h. Mit Doxycyclin haben die SMB-Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 6,6 h. Der Klon

---

SMB-EndoG-eGFP hat ohne Doxycyclin eine Verdopplungszeit von ca. 9,6 h und mit Doxycyclin eine Verdopplungszeit von ca. 11,8 h.

### **3.6 Charakterisierung der Lokalisation von EndoG-eGFP in transformierten Trypanosomen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.6.1 Lokalisation des eGFP-Klons und des EndoG-eGFP-Klons**

Zur Kontrolle der Expression von eGFP und EndoG-eGFP wurden die Klone SMB-eGFP und SMB-EndoG-eGFP in der exponentiellen Wachstumsphase mit Doxycyclin (10 µg/ml) über 8 h induziert und mit dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

Erste Bilder des Klons SMB-eGFP zeigten, dass sich eGFP im ganzen Zytosol anreichert. Im folgenden Bild sieht man Trypanosomen unter Überlagerung von Durchlicht und grünem Kanal:

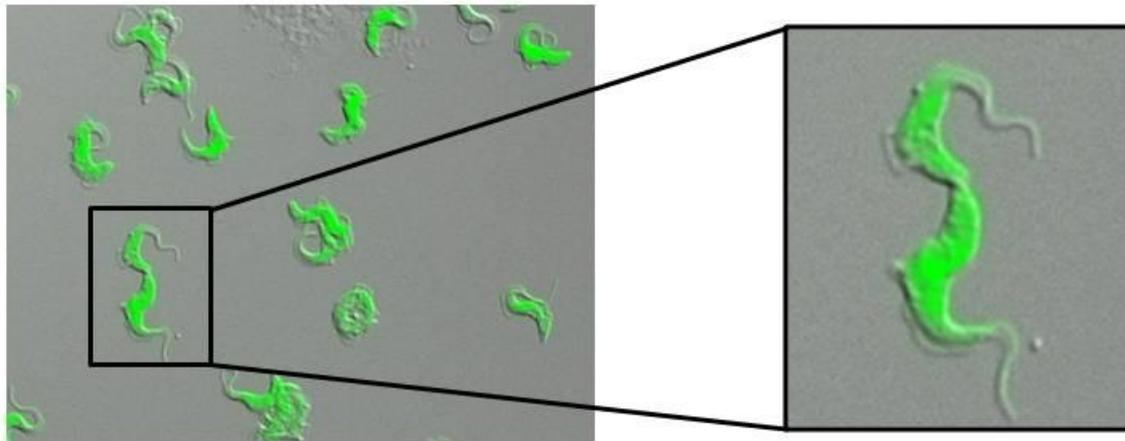


Abbildung 35: Erstes Übersichtsbild des Klons SMB-eGFP. Überlagerung von Durchlicht und grünem Kanal.

Man sieht eine homogene Fluoreszenz der Trypanosomen. eGFP wird an freien Ribosomen im Zytosol translatiert und verteilt sich im gesamten Zytosol.

---

Im nachfolgenden Bild sieht man den Klon SMB-EndoG-eGFP. Auch hier besteht das Bild aus einer Überlagerung von Durchlicht und grünem Kanal:

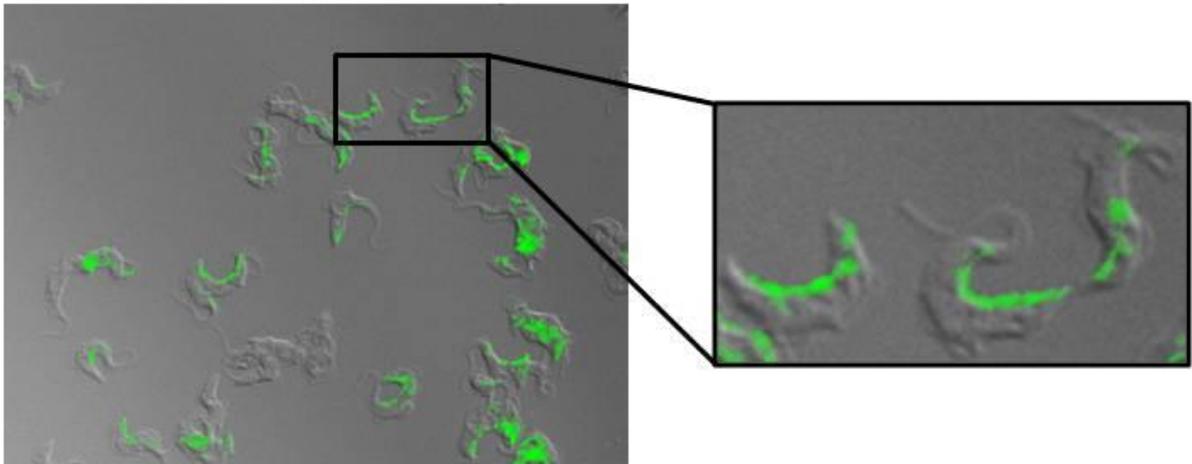


Abbildung 36: Erstes Übersichtsbild des Klons SMB-EndoG-eGFP. Überlagerung von Durchlicht und grünem Kanal.

Zu erkennen ist, dass nur noch ein schmaler Streifen gegenüber dem Flagellum grün fluoresziert. Das Fusionsprotein *T.b.* EndoG-eGFP verteilt sich also nicht mehr im ganzen Zytosol der Zelle. Die Verteilung in einem schmalen dünnen Streifen gegenüber dem Flagellum entspricht sehr wahrscheinlich einer Verteilung im Mitochondrium. Um diese Lokalisation nachzuweisen, wurde in einem weiteren Versuch zusätzlich das Mitochondrium mit rotfluoreszierendem Mitotracker angefärbt.

### 3.6.2 Kolokalisation von EndoG-eGFP mit Mitotracker in Trypanosomen

Mit einer SMB-Kultur wurde die Konzentration von Mitotracker bestimmt, bei der das Mitochondrium gut im roten Kanal sichtbar war. Die Konzentration wurde so niedrig gewählt (50 nM), dass die Fluoreszenz nicht in den grünen Kanal strahlt. Folgende Bilder zeigen mit Mitotracker angefärbte Trypanosomen des Klons SMB-EndoG-eGFP in der exponentiellen Wachstumsphase.

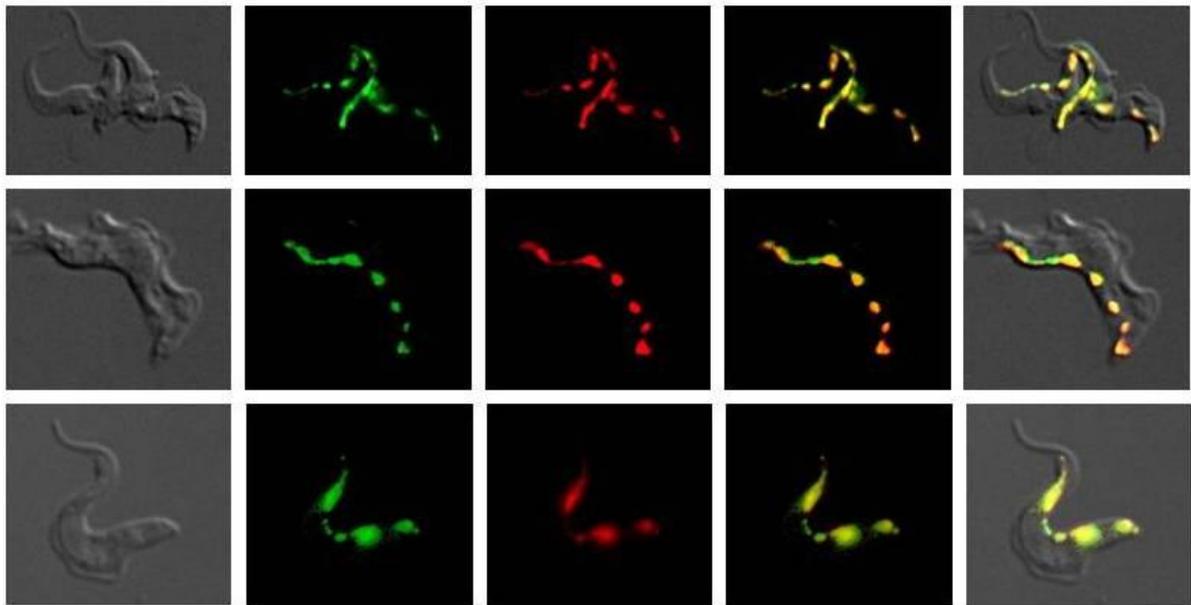


Abbildung 37: Kolokalisation von *T.b.* EndoG-eGFP mit Mitotracker. Von links nach rechts: Durchlicht; grüner Kanal (eGFP); roter Kanal (Mitotracker); Überlagerung von grünem und rotem Kanal; Überlagerung von Durchlicht, grünem und rotem Kanal.

Man kann sehr gut erkennen, dass sich die Fluoreszenz im grünen Kanal fast mit der im roten Kanal deckt. Diese fluoreszenzmikroskopischen Bilder bestärken die Vermutung, dass sich *T.b.* EndoG-eGFP im Mitochondrium anreichert. Das Zytosol und der Zellkern zeigen keine Fluoreszenz. Folglich befindet sich *T.b.* EndoG-eGFP nur im Mitochondrium. Im Gegensatz zu Abbildung 36 ist das Mitochondrium in diesen Bildern nicht als durchgehendes Organell sichtbar. Da das Mitochondrium ein längliches Organell ist, welches dreidimensional im Raum liegt, ist das Mitochondrium durch die starke Vergrößerung (100-fach) teilweise aus der fokussierten Ebene des Mikroskops geraten und somit an diesen Stellen nicht mehr zu sehen.

### 3.6.3 Lokalisation von *T.b.* EndoG-eGFP in transformierten Trypanosomen im frühen Stadium der Apoptose, induziert mit PGD<sub>2</sub>

Mit einer SMB-Kultur wurde die Konzentration von DAPI bestimmt, bei der der Kern und Kinetoplast gut im blauen Kanal sichtbar war. Die Konzentration wurde so niedrig gewählt, dass die Fluoreszenz nicht in den grünen Kanal strahlt. Trypanosomen des Klon SMB-EndoG-eGFP wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit PGD<sub>2</sub> inkubiert. Nun sollte während der induzierten Apoptose untersucht werden, wie sich *T.b.* EndoG-eGFP innerhalb der Zelle verteilt. Teilweise wurden die Zellen zusätzlich

---

mit Mitotracker inkubiert. Die Zellen wurden auf den Objektträger gegeben und mit DAPI gefärbt. Folgende Bilder zeigen Trypanosomen in der frühen Phase der Apoptose:

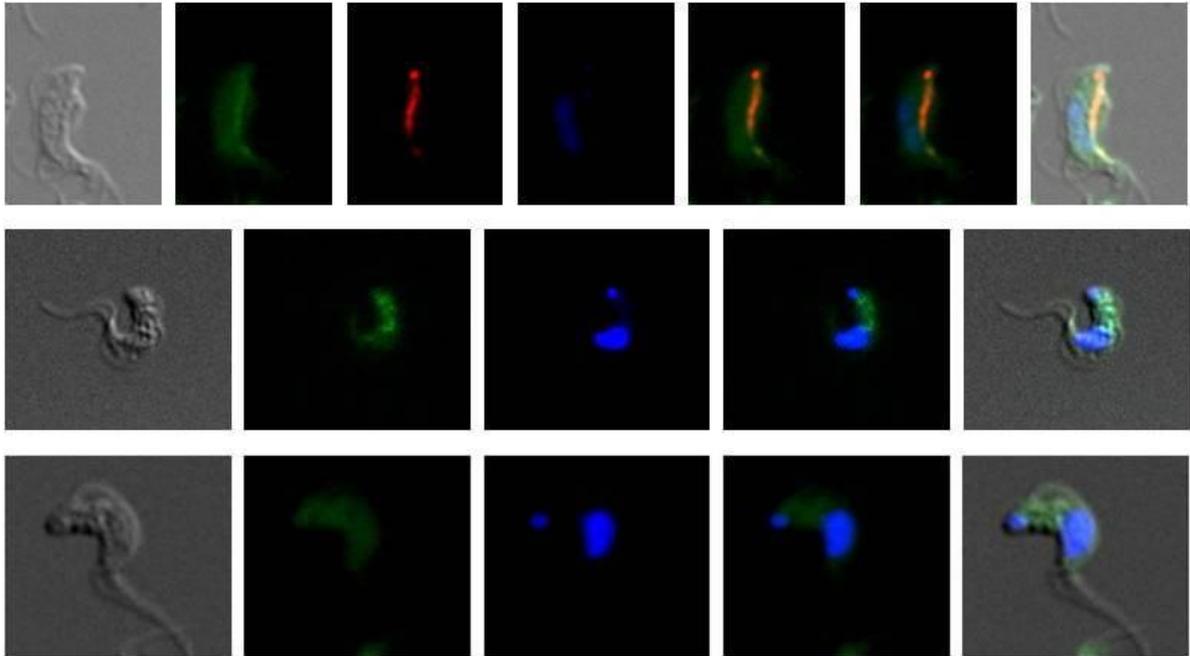


Abbildung 38: Lokalisation von *T.b.* EndoG-eGFP im frühen Abschnitt der Apoptose.

Oben von links nach rechts: Durchlicht; grüner Kanal (eGFP); roter Kanal (Mitotracker); blauer Kanal (DAPI) und jeweils deren Überlagerungen.

Mitte und Unten von links nach rechts: Durchlicht; grüner Kanal (eGFP); blauer Kanal (DAPI) und jeweils deren Überlagerungen.

Im ersten Bild ist sehr gut zu erkennen, dass sich Mitotracker noch immer im Mitochondrium anreichert. Jedoch fluoresziert die komplette Zelle grün. *T.b.* EndoG-eGFP hat also das Mitochondrium verlassen und sich im Zytosol verteilt. In mittleren und unteren Bild sind der Kern und der Kinetoplast im blauen Kanal sehr gut zu erkennen. Auch hier hat sich *T.b.* EndoG-eGFP in der Zelle verteilt. In der Region des Zellkerns sieht man im grünen Kanal keine verstärkte Fluoreszenz.

---

### 3.6.4 Lokalisation von *T.b.* EndoG-eGFP in transformierten Trypanosomen 20 h nach Induktion der Apoptose mit Staurosporin

20 h nach Induktion mit Staurosporin wurden die gleichen Trypanosomen fixiert, mit DAPI gefärbt und eingedeckelt. Folgende Bilder zeigen die Trypanosomen in der späten Phase der Apoptose:

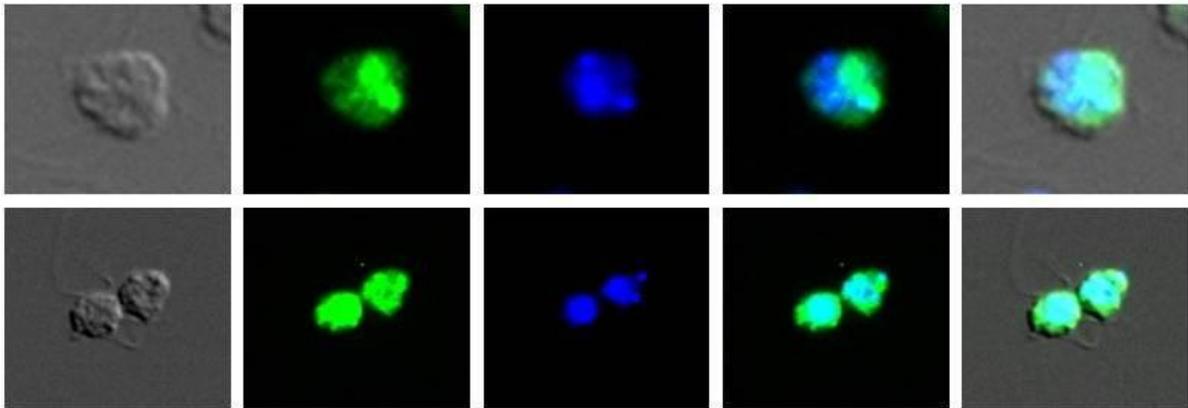


Abbildung 39: Lokalisation von *T.b.* EndoG-eGFP im späten Abschnitt der Apoptose. Von links nach rechts: Durchlicht; grüner Kanal (eGFP); blauer Kanal (DAPI); Überlagerung von grünem und blauem Kanal; Überlagerung von Durchlicht, grünem und blauem Kanal.

Man sieht zunächst, dass die Trypanosomen nicht mehr ihre charakteristische Form besitzen. In diesem Stadium sind sie nur noch runde Zellkörper. Ihre Zellstruktur haben sie fast völlig verloren. Man sieht noch ganz dezent die Flagellen neben den Zellen. Im blauen Kanal kann man noch eine Differenzierung zwischen Zellkern und Kinetoplast erahnen. Im roten Kanal ist keine definierte Struktur des Mitochondriums mehr zu erkennen (*Data not shown*). Es fällt schwierig zu erkennen, ob sich *T.b.* EndoG-eGFP im Zellkern anreichert. Im oberen Bild zeigt die Zelle noch einen eindeutigen Unterschied im grünen und blauen Kanal, also keine Kollokalisierung. Im unteren Bild sind die Zellen schon so geschrumpft, dass sie nur noch einen schmalen zytosolischen Rahmen um den Zellkern herum haben und sich dadurch grüne und blaue Fluoreszenz fast decken.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Generation der Fusionssequenz EndoG-eGFP im pCO57-Vektor

Zunächst wurde *T.b.* EndoG und eGFP separat amplifiziert. Beide Konstrukte wurden über eine Linker-PCR verknüpft. Das erhaltene Fusionskonstrukt wurde in den Vektor pLEW100vHyg kloniert. Die mithilfe dieses Konstrukts transformierten Trypanosomen zeigten im Fluoreszenzmikroskop keine Fluoreszenz. Somit wurde auf ein anderes System umgestiegen. Der pCO57 Vektor enthält *downstream* der MCS ein Linkerpeptid, welches das klonierte Konstrukt mit der im Vektor enthaltenen Sequenz von eGFP verbindet.

*T.b.* EndoG wurde mittels PCR und den Primern EndoG *sense* und EndoG *antisense* amplifiziert. Die Primer wurden anhand der Sequenz des Stammes *Tb927.8.4040* mit dem Programm *Primer3* entworfen. Das *TA-Cloning-Kit* ermöglichte eine einfache Subligation des amplifizierten *T.b.* EndoGs in den pCR2.1-Vektor.

Die Sequenzierung lieferte die in Kap. 3.1.2.3 beschriebenen Mutationen. Die Mutationen an den Positionen 476 und 637 sind auf den Stamm *Tb927.8.4040* zurückzuführen, da die Basen 476 und 637 verglichen mit dem Stamm *Tb427.08.4040* identisch sind. Somit kann man davon ausgehen, dass diese beiden Mutationen stabile Mutationen sind und dass *T.b.* EndoG mit diesen Mutationen weiterhin funktioniert. Die Mutation an der Stelle 1184 von Valin nach Leucin ändert die dreidimensionale Struktur von *T.b.* EndoG wahrscheinlich nicht stark, da beide Aminosäuren unpolar und hydrophob sind. Der einzig relevante Austausch ist an der Stelle 602 Arginin (basisch) statt Glutamin (polar/neutral). Da zunächst aber nur die Lokalisation von *T.b.* EndoG analysiert werden soll und die mitochondriale Erkennungssequenz ohne Mutation erhalten ist, wurde mit diesem Ergebnis weiter verfahren.

*T.b.* EndoG wurde durch die Restriktionsenzyme HindIII und PvuII aus dem pCR2.1 Vektor herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde das Plasmid pCO57 in der MCS mit den gleichen Enzymen geöffnet. Die Ligation von *T.b.* EndoG in den pCO57-Vektor erwies sich als schwierig. Die Ligation wurde mehrmals mit unterschiedlichen Zeiten, Konzentrationen und Verhältnissen wiederholt, war bei einem 3:1 Ansatz und 200 µg Vektor erfolgreich und lieferte zwei positive Klone. Der Restriktionsverdau und eine

---

Kontroll-PCR bestätigten, dass das Konstrukt korrekt in den pCO57-Vektor eingebaut wurde.

#### **4.2 Transformation des naiven und des *T.b.* EndoG-pCO57 Vektors in Trypanosomen**

Für die Transformation in Trypanosomen musste das Plasmid zunächst über NotI linearisiert werden. NotI schneidet in der ribosomalen RNA Sequenz des Plasmids, welche homolog zu ribosomaler RNA im Genom von Trypanosomen ist. Im zweiten Schritt musste das linearisierte Plasmid mithilfe der Elektroporation in die Zellen eingebracht werden. Aufgrund der Ergebnisse vorheriger Arbeiten wurden 10 µg DNA pro Elektroporation verwendet. Für die Selektion wurde Phleomycin verwendet. Phleomycin wirkt gegen Pro- und Eukaryonten und wird daher gerne als Selektionsstoff eingesetzt. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, vermutet wird eine Interaktion mit der DNA des Genoms ([http://www.invivogen.com/PDF/Zeoicin\\_solution\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/Zeoicin_solution_TDS.pdf)). Das Resistenzgen besteht aus einem Protein, welches Phleomycin spezifisch bindet und dieses damit unschädlich macht. Die verwendete Phleomycinkonzentration wurde variiert. Eine Konzentration von 0,125 µg/ml erzielte bei der Elektroporation eine Transformationseffizienz von ca. 5 %.

Die Zellen wurden, wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben, vorbereitet und im Elektroporator gepulst. Nach der Elektroporation waren noch ca. 25 % der Zellen am Leben. Die Zellen erhielten eine Erholungsphase von 6 h. Danach wurde Phleomycin zur Selektion dazugegeben. Nach ca. 2 Tagen waren im Lichtmikroskop keine Zellen mehr zu sehen. Zellen, welche das Konstrukt nicht eingebaut hatten, waren nicht in der Lage Phleomycin zu binden und starben. Durch diese Selektion mit Phleomycin überlebten zunächst nur vereinzelte resistente Zellen. Damit diese Zellen wieder zu einer Kultur heranwachsen konnten, wurde das HMI-9 Medium, welches klonales Wachstum ermöglicht, verwendet.

Nach 3 (SMB-eGFP) bzw. 4 (SMB-EndoG-eGFP) Tagen konnte man vereinzelte Zellen sehen. Die Wells mit den transgenen Zellen waren nach weiteren 2 (SMB-eGFP) bzw. 3 (SMB-EndoG-eGFP) Tagen bei einer Konzentration von  $10^5$  -  $10^6$  Zellen/ml.

---

### 4.3 Charakterisierung der Transkription und Translation mittels RNA und Protein-Nachweis

Die PCR der trypanosomalen und in cDNA umgeschriebenen mRNA zeigte Banden von eGFP und *T.b.* EndoG-eGFP. Die PCR der noch nicht umgeschriebenen mRNA zeigte keine Banden. Da die DNA-abhängige Polymerase nur DNA und nicht mRNA als *Template* nutzen kann und in der Kontroll-PCR keine Bande entstanden ist, folgt daraus, dass die isolierte mRNA nicht durch DNA aus dem Zellkern verunreinigt war. Damit ist klar, dass nur die mRNA als *Template* für die PCR gedient haben kann. Somit konnte gezeigt werden, dass *T.b.* EndoG-eGFP bzw. eGFP transkribiert werden.

Desweiteren wurden der naive und der *T.b.* EndoG-pCO57 Vektor in Rosetta-Zellen transformiert und die jeweiligen Proteine heterolog exprimiert. Die Bakterien fluoreszierten im Fluoreszenzmikroskop. Die Westernblots aus der zytosolischen Fraktion des Zelllysats zeigten auf der Höhe des Proteins eGFP (ca. 25 kD) sowie des Fusionsprotein *T.b.* EndoG-eGFP (ca. 80 kD) Banden. Das bedeutet, dass die verwendeten Konstrukte in *E. coli* nicht nur transkribiert sondern auch translatiert werden.

Zusätzlich wurden die beiden trypanosomalen Klone SMB-eGFP und SMB-EndoG-eGFP über Nacht mit Doxycyclin induziert, im Fluoreszenzmikroskop auf Fluoreszenz kontrolliert und hypoton lysiert. Nur der Westernblot des Klons SMB-eGFP zeigte in der löslichen Fraktion des Zelllysats das Protein eGFP mit einer Bande bei ca. 25 kD.

Es wurde auf unterschiedlichen Methoden versucht einen positiven Blot des Fusionsproteins *T.b.* EndoG-eGFP des Klons SMB-EndoG-eGFP zu bekommen. Um die Mitochondrienmembran zu zerstören, wurden die Zelltrümmer zusätzlich zur hypotonen Lyse mit Ultraschall beschallt. Desweiteren wurde versucht die Zellen über Detergenzien wie z.B. Triton X-100 aufzuschließen. Dabei wurde jeweils die *Critical micelle concentration* (CMC) verwendet. Auch wurde versucht die fünffache Proteinkonzentration für die SDS-Page zu verwenden. Jedoch zeigten alle Blots mittels AP oder Horseradish peroxidase keine Banden.

In den Bakterien sieht man bei den Westernblots, dass *T.b.* EndoG-eGFP weniger stark exprimiert wird als eGFP. Bakterien haben keine Mitochondrien, *T.b.* EndoG-eGFP

---

kann sich also im ganzen Zytosol anreichern. Trotzdem zeigt *T.b.* EndoG-eGFP bei gleichem Vektor und Organismus eine geringere Expression. Vermutlich wird *T.b.* EndoG, da es für die Bakterien toxisch ist, herunterreguliert. In Trypanosomen wird *T.b.* EndoG-eGFP ins Mitochondrium transloziert. *T.b.* EndoG-eGFP hat also nur ein kleines Kompartiment zur Verfügung, in dem es sich anreichern kann. Da *T.b.* EndoG-eGFP im Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist, muss man davon ausgehen, dass *T.b.* EndoG-eGFP exprimiert wird. Vermutlich ist die Konzentration von *T.b.* EndoG-eGFP in Trypanosomen jedoch unter der Nachweisgrenze des Westernblots.

#### **4.4 Charakterisierung der Apoptose mithilfe der Durchflusszytometrie**

Durch die Messung mit Propidiumiodid konnte im Durchflusszytometer ausgeschlossen werden, dass sich die Zellen in einem nekrotischen Prozess befinden.

Unbehandelte Zellen des Klons SMB-EndoG-eGFP zeigten mehr Phosphatidylserinexposition als SMB-Zellen (18,6 % gegenüber 3,5 %). In der frühen Phase der Apoptose (6 h) zeigten beide Klone eine signifikant erhöhte Phosphatidylserinexposition. Wobei der Klon SMB-EndoG-eGFP nach 6 h im Vergleich zu den SMB-Zellen vermehrte und nach 24 h geringere Phosphatidylserinexposition zeigte.

DNA-Degradation: Unbehandelte Zellen des Klons SMB-EndoG-eGFP zeigten im Vergleich mit SMB-Zellen etwas mehr DNA-Degradation (11,3 % gegenüber 5,0 %). Im Verlauf der Apoptose zeigten beide Zelllinien erst nach 24 h eine signifikant erhöhte DNA-Degradation.

ROS: Die Kontrollzellen beider Zelllinien zeigten 3,9 % bzw. 4,8 % der Zellen mit erhöhter Fluoreszenz im grünen Kanal. Schon nach 6 h zeigten beide Zelllinien eine erhöhte Fluoreszenz verglichen mit den naiven Zellen. Prozentual zeigten die SMB-Zellen nach 6 h sogar einen höheren Anstieg der ROS. Nach 24 h hatte der Klon SMB-EndoG-eGFP eine höhere ROS.

TMRE: Unbehandelte Zellen des Klons SMB-EndoG-eGFP zeigten im Vergleich mit SMB-Zellen schon einen geringen Verlust des mitochondrialen Potentials (16,1 % statt 8,6 %). Nach Induktion von Apoptose zeigten beide Zelllinien einen weiteren Verlust

---

des mitochondrialen Potentials, wobei der Effekt beim Klon SMB-EndoG-eGFP etwas stärker ausfiel.

Figarella et al. konnte zusätzlich zeigen, dass die Mitochondrien von Trypanosomen im Transmissionselektronenmikroskop bei Induktion von Apoptose anschwellen. Außerdem zeigten PGD<sub>2</sub> induzierte Zellen keine Zeichen von Autophagie (K. Figarella et al., 2005).

Zusammenfassend zeigt sich, dass beide Zelllinien durch Inkubation mit PGD<sub>2</sub> und Staurosporin apoptotische Merkmale aufweisen. Dabei zeigt der Klon SMB-EndoG-eGFP im Vergleich zu SMB-Zellen vermehrte Apoptosemarker.

#### **4.5 Wachstumseigenschaften mithilfe des Proliferationsassay**

Der Proliferationsassay zeigt, dass der Klon SMB-EndoG-eGFP langsamer wächst. Dabei verlängerte sich die Verdopplungszeit gegenüber SMB-Zellen von ca. 7,2 h auf 9,6 h.

Die Verdopplungszeit von SMB-Zellen bei ca. 7 h erscheint zunächst sehr niedrig. Normalerweise haben SMB-Zellen eine Verdopplungszeit von 8 - 9 h. Für die Verkürzung ist das verwendete HMI-9 Medium verantwortlich. In HMI-9 Medium wachsen Zellen durch den Wachstumsfördernden Zusatz „*Serum plus*“ schneller.

Obwohl mit einem induzierbaren System gearbeitet wurde, erhöhte sich die Verdopplungszeit des nicht induzierten Klons SMB-EndoG-eGFP gegenüber den SMB-Zellen. Somit kann man davon ausgehen, dass die durch die Transformationen entstandenen Zellen „*leaky*“ sind. „*Leaky*“ bedeutet, dass *T.b.* EndoG-eGFP exprimiert wird ohne dass Doxycyclin dazugegeben wurde. Im Fluoreszenzmikroskop bestätigte sich dies: Nicht induzierte Trypanosomen zeigten eine geringe Fluoreszenz.

Wurden die Zellen mit Doxycyclin induziert, blieb die Verdopplungszeit bei SMB-Zellen gleich. Doxycyclin wirkt sich also nicht auf das Wachstum von Trypanosomen aus. Die Verdopplungszeit des Klons SMB-EndoG-eGFP verlängerte sich von 9,6 auf 11,8 h. Zum einen bremst die Synthese von *T.b.* EndoG-eGFP natürlich die Synthese anderer Proteine und damit das Wachstum. Zum anderen ist die erhöhte Konzentration von *T.b.* EndoG-eGFP wachstumshemmend.

---

Die maximale Zelldichte bei SMB-Zellen betrug nach ca. 50 h  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Der Klon SMB-EndoG-eGFP erreichte eine maximale Zelldichte nach ca. 40 h. Nicht induziert betrug diese  $1,7 \times 10^6$  Zellen/ml und induziert  $3 \times 10^5$  Zellen/ml. Die Tatsache, dass der Klon SMB-EndoG-eGFP nicht induziert und induziert nach der gleichen Zeit seine maximale jedoch unterschiedlich hohe Zelldichte erreicht, zeigt, dass *T.b.* EndoG selbst nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit verringert sondern auch die maximale Zelldichte verringert. Nach dem Erreichen ihrer maximalen Zelldichte starben mit Doxzyclin induzierte und nicht induzierte Zellen des Klons SMB-EndoG-eGFP gleich schnell ab.

#### **4.6 Lokalisation mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie**

Die grüne Fluoreszenz von *T.b.* EndoG-eGFP deckt sich beim naiven Klon SMB-EndoG-eGFP fast genau mit der roten Fluoreszenz von Mitotracker. Wegen dieser Kolo-kalisation kann man davon ausgehen, dass sich *T.b.* EndoG-eGFP im Mitochondrium befindet. Das Zytoplasma und der Zellkern sind frei von *T.b.* EndoG-eGFP. Dies entspricht der Theorie, dass *T.b.* EndoG im Kern transkribiert, im Zytoplasma translatiert und durch die N-terminale mitochondriale Erkennungssequenz in das Mitochondrium transportiert wird. Die mitochondriale Erkennungssequenz mit einer Länge von 55 Aminosäuren wird bei der Translokation ins Mitochondrium abgespalten.

Durch PGD<sub>2</sub> wurde bei Trypanosomen Apoptose ausgelöst. Prostaglandine werden *in vivo* von Trypanosomen selbst produziert. Vermutlich um die eigene Zelldichte zu regulieren und um das Immunsystem des Wirts zu beeinträchtigen und dabei zu stören (K Figarella et al., 2005). Durch diese Induktion mit PGD<sub>2</sub> verlässt *T.b.* EndoG im frühen Stadium (ca. 6 h) das Mitochondrium. Im grünen Kanal fluoresziert das Zytoplasma der ganzen Zelle. Mitotracker färbt noch immer spezifisch das Mitochondrium. Man muss also davon ausgehen, dass das Mitochondrium noch intakt ist, *T.b.* EndoG sowie andere apoptotische Stoffe haben es aber schon verlassen. In der frühen Apoptose transloziert *T.b.* EndoG-eGFP nicht in den Zellkern, sondern zeigt eine homogene Verteilung in der Zelle und befindet sich somit vorwiegend im Zytoplasma der Zelle.

In der späten Phase der Apoptose (ca. 24 h) zeigt sich die weiter fortschreitende Degradierung der Trypanosomen. Sie verlieren ihre Gestalt und werden rundlich. Das Mitochondrium löst sich auf, der Zellkern ist nicht mehr gut vom Kinetoplasten zu

---

unterscheiden und das Zytosol schrumpft. Aufgrund der Fluoreszenzbilder ist nicht auszuschließen, dass sich *T.b.* EndoG-eGFP in den Zellkern verlagert hat, um dort genomische DNA zu verdauen.

Es gibt viele Beispiele, bei denen EndoG in den Zellkern verlagert wird. So wird EndoG in der Maus zunächst aus dem Mitochondrium in das Zytosol freigesetzt, transloziert in den Kern und generiert Oligonucleosomale DNA-Fragmentierung. Dieser Vorgang ist dabei Caspasen unabhängig (Li et al., 2001). In menschlichen Endothelzellen wird EndoG bei Seneszens vom Mitochondrium in den Zellkern verlagert (Diener, Neuhaus, Koziel, Micutkova, & Jansen-Durr, 2010). Auch transloziert leishmaniellies EndoG bei Induktion von Apoptose durch Edelfosin oder Baicalein vom Mitochondrium in den Zellkern und bildet DNA-Degradierungskomplexe mit LdFEN-1 and LdTatD (BoseDasgupta et al., 2008; Rico et al., 2009). Gannavaram beschreibt in prozyklischen und Blutform-Trypanosomen eine 30- bis 40-prozentige Übereinstimmung zwischen DAPI-Färbung und einer Antikörperfärbung von *T.b.* TatD, welches Komplexe mit *T.b.* EndoG bildet. Deshalb geht er von einer spezifischen Translokation von *T.b.* EndoG in den Zellkern aus (S. Gannavaram & Debrabant, 2012).

In den gezeigten Bildern dieser Arbeit wäre eine prozentual berechnete Übereinstimmung ähnlicher Höhe möglich. Die Verteilung von *T.b.* EndoG-eGFP in der Zelle und die Morphologie der Zellen lassen mich aber eher davon ausgehen, dass *T.b.* EndoG-eGFP nicht spezifisch in den Zellkern transloziert sondern sich hauptsächlich im Zytosol um den Zellkern herum und eventuell unspezifisch im Zellkern befindet.

Gerschenson et al. findet 95 % des isolierten *T.b.* EndoG im Mitochondrium, geringe Mengen davon auch im Kern. Dabei ist jedoch kein Unterschied dieser beiden Enzyme zu beobachten (Gerschenson et al., 1995). Der nachgewiesene Betrag der nukleären Endonuklease ist vermutlich auf eine Verunreinigung bei der Isolierung zurückzuführen (Meng, Fraser, Ireland, Feller, & Ziegler, 1998). Auch ist nicht bekannt, durch welchen Mechanismus trypanosomales EndoG in den Zellkern transloziert (S. Gannavaram & Debrabant, 2012). Schaut man sich die Sequenz von *T.b.* EndoG an, findet man eine Kernlokalisationssequenz (RKKH) zwischen der 31. und 34. Aminosäure. Da man davon ausgehen muss, dass die ersten 55 Aminosäuren abgespalten werden, wenn

---

*T.b.* EndoG in das Mitochondrium verlagert wird, kann diese Sequenz nicht mehr als Kernlokalisationssequenz dienen.

Experimentell muss man beachten, dass der eGFP-tag wegen seiner Größe einen Durchtritt durch die Kernpore verhindern könnte. Auch ist eine Funktionsstörung durch die Mutation von *T.b.* EndoG (602: Arginin statt Glutamin) nicht auszuschließen. Falls man nicht von einer Veränderung der Funktion und Eigenschaft von *T.b.* EndoG durch den experimentellen Aufbau ausgeht, muss *T.b.* EndoG eine andere proapoptische Rolle spielen als genomische DNA zu verdauen.

In Mäusezellen kann man beobachten, dass EndoG nach Induktion von Apoptose das Mitochondrium verlässt und in den Zellkern verlagert wird. Dabei ist es jedoch nicht klar, welche Funktion EndoG einnimmt. Li beschreibt eine nukleosomale Degradation durch EndoG (Li et al., 2001). Widlak dagegen misst einen Verdau von DNA durch humanes EndoG, aktiviert durch Exonucleasen und DNaseI (P. Widlak, L. Y. Li, X. Wang, & W. T. Garrard, 2001b).

Da EndoG zu der Familie der unspezifischen DNA/RNA Nukleasen gehört, könnte der Verdau von RNA eine weitere Eigenschaft von EndoG während der Apoptose sein. Dies würde als Folge einen Abbruch der Proteinbiosynthese bedingen (Widlak et al., 2001b). Da EndoG selbst nicht in der Lage ist die genomische DNA komplett zu verdauen, könnte EndoG auch eine aktivierende Rolle auf andere Effektorproteine bei der Degradation haben (van Loo et al., 2001).

---

## 5 Zusammenfassung

Human african Trypanosomiasis (HAT) wurde schon vor mehr als 100 Jahren das erste Mal beschrieben. Leider ist es den Ärzten und Wissenschaftlern bis heute nicht gelungen für alle Krankheitsstadien der Erkrankung Therapien ohne inakzeptable Nebenwirkungen zu entwickeln. Es ist weiterhin fraglich, ob das Ziel der Eradikation des Erregers bzw. der Tsetsefliege in nächster Zeit umsetzbar ist.

Die Zelldichteregulation mit dem Wechsel der Oberflächenantigene ist einer der zentralen Punkte, warum HAT nicht gut behandelbar ist. Diese Eigenschaft entwickelte sich vermutlich durch einen Vorteil während der Evolution. Es erscheint logisch, dass Trypanosomen eine bessere Chance zu überleben haben, wenn sie ihren Wirt nicht überbevölkern und damit umbringen, sondern ihre Zelldichte selber kontrollieren. Trypanosomen entkommen mittels Heranwachsen und Absterben klonaler Populationen dem Immunsystem; die Wahrscheinlichkeit erhöht sich wieder von einer Fliege aufgenommen und verbreitet zu werden.

Innerhalb der Zelldichteregulation spielt die Apoptose eine sehr wichtige Rolle. Viele Schlüsselenzyme der Apoptose sind in Trypanosomen nicht vorhanden. Da trypanosomales EndoG (Endonuklease G) ca. 30 % homolog übereinstimmend zum EndoG von Säugern ist und EndoG ein apoptotisches Protein ist, bietet es sich sehr gut an, um Vorgänge der Apoptose in Trypanosomen zu erforschen.

Im Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit ist es gelungen trypanosomales EndoG zu klonieren. Die Expression des *T.b.* EndoG-eGFP-Fusionproteins wurde in Blutform-Trypanosomen auf RNA-Ebene bestätigt. Ein Westernblot aus *Escherichia coli* zeigte die Expression des Fusionsproteins auf Proteinebene. In Trypanosomen zeigte sich, dass eine Überexpression von trypanosomalem EndoG das Zellwachstum hemmt. Über die Fluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass *T.b.* EndoG-eGFP nach der Translation ins Mitochondrium transportiert wird und sich dort anreichert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass *T.b.* EndoG-eGFP während der Apoptose das Mitochondrium verlässt und sich im Zytosol verteilt. Es konnte nicht gezeigt werden, dass *T.b.* EndoG-eGFP in den Zellkern transloziert. Somit hat *T.b.* EndoG während der Apoptose wohl nicht die Eigenschaft genomische DNA zu verdauen.

---

Diese Arbeit trägt zur weiteren Aufklärung der Apoptose von Trypanosomen bei. *T.b.* EndoG muss während der Apoptose eher eine aktivierende Rolle auf andere Nukleasen und Proteasen haben, mit denen es bekannterweise Komplexe bildet. Weitere Experimente bezüglich der Funktion von *T.b.* EndoG und anderer apoptotischer trypanosomaler Proteine sind für das Verständnis der Apoptose bei Trypanosomen nötig.

Um herauszufinden, wie Trypanosomen ihre Zelldichte regulieren, wären Versuche bezüglich der Zelldichteregulation von Trypanosomen interessant. Die Frage nach dem genauen Wirkmechanismus von Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) gehört ebenso dazu, sowie die Frage nach den Mechanismen der DNA- und Proteindegradation während der Apoptose und die Suche nach zusätzlichen Faktoren, welche die Zelldichte der Trypanosomen beeinflussen.

Bis heute fällt es schwer Medikamente zu entwickeln, die trypanozid sind, wenige Nebenwirkungen haben und gleichzeitig gut gewebebegängig sind. Ein besseres Verständnis über die Zelldichteregulation könnte dazu beitragen neue Substanzen zu entwickeln, welche genau diese Bedingungen an ein gutes Medikament erfüllen.

---

## 6 Abkürzungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis:

AIF	Apoptose inducing Factor
ATG	Autophagie Related Proteins
BF	Blutform
BSA	Bovine Serum Albumin
CMC	Critical Micelle Concentration
DED	Death Effector Domain
DFF	DNA-Fragmentation Faktor
EndoG	Endonuclease G
FCS	Fetal Calf Serum
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAT	Human African Trypanosomiasis – Tropische Schlafkrankheit
MEM	Minimal Essential Medium
MiTat	Molteno Institut Trypanozoon Antigenic Type
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG	Prostaglandine
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
SIF	Stumpy Inducing Factor
T.b.	Trypanosoma brucei
TBS	Tris Buffered Saline
TDB	Trypanosome Dilution Buffer
TLF	Trypanolytischer Faktor
TOR	Target of Rapamycin
VSG	Variant Surface Glycoprotein
WHO	World Health Organisation

---

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tsetsefliegen-Gürtel in Afrika.....	1
Abbildung 2: Fallzahlen und Menge der gescreenten Personen von 1940 – 2000.....	4
Abbildung 3: Morphologische Übersicht eines Trypanosoms .....	5
Abbildung 4: Lokalisation des Kinetoplasten .....	6
Abbildung 5: Energiestoffwechsel der Blutform .....	9
Abbildung 6: Redoxmetabolismus über Trypanothion .....	10
Abbildung 7: Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	12
Abbildung 8: Verteilung von <i>T.b. gambiense</i> und <i>T.b. rhodesiense</i> .....	14
Abbildung 9: Diagnostische Maßnahmen, <i>T.b. rhodesiense</i> .....	16
Abbildung 10: Medikamente zur Behandlung von HAT .....	17
Abbildung 11: Ausführlichste Aufzeichnung der Parasitämiekurve beim infizierten Menschen.....	21
Abbildung 12: Apoptotische Signalwege .....	24
Abbildung 13: Autophagie .....	26
Abbildung 14: Multiples Alignment von Endonuklease G .....	30
Abbildung 15: Subklonierungsvektor pCR2.1 und Expressionsvektor pCO57. ....	41
Abbildung 16: Gene-Ruler 1kb DNA-Ladder. ....	67
Abbildung 17: <i>Polymerasechainreaction</i> (PCR) des <i>T.b. EndoG</i> Gens.....	68
Abbildung 18: “ <i>Quick and Dirty</i> “-PCR der Subligation. ....	69
Abbildung 19: Sequenzvergleich des amplifizierten <i>T.b. EndoG</i> mit <i>Tb927.8.4040</i> . ....	70
Abbildung 20: Gelelektrophorese des Verdaus von pCR2.1.....	71
Abbildung 21: Gelelektrophorese des Verdaus von pCO57. ....	72
Abbildung 22: Gelelektrophorese der <i>Colony</i> -PCR. ....	72
Abbildung 23: Testverdau pCO57 mit <i>T.b. EndoG</i> .....	73
Abbildung 24: Gelelektrophorese der mit NotI linearisierten Vektoren. ....	74
Abbildung 25: PCR Nachweis der mRNA aus Trypanosomen.....	76
Abbildung 26: PAGERuler, Prestained Protein Ladder. ....	77
Abbildung 27: Westernblot aus Rosettazellen ( <i>E. coli</i> ): Links eGFP (ca. 25 kDa) und rechts <i>T.b. EndoG</i> -eGFP (ca. 80 kDa). ....	77
Abbildung 28: Westernblot von eGFP aus Trypanosomen (ca. 25 kDa). ....	78

---

Abbildung 29: Ausschluss Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid.....	79
Abbildung 30: Messung des Zellzyklus durch Aufschluss mit Digitonin und Färbung mit Propidiumiodid.....	80
Abbildung 31: Messung der Phosphatidylserinexposition durch Färbung mit Annexin A5.....	81
Abbildung 32: Messung der ROS durch Färbung mit DCFH. ....	82
Abbildung 33: Messung des mitochondrialen Potentials durch Färbung mit TMRE. ....	83
Abbildung 34: Wachstumskurve von SMB und SMB-EndoG-eGFP. ....	84
Abbildung 35: Erstes Übersichtsbild des Klons SMB-eGFP. ....	85
Abbildung 36: Erstes Übersichtsbild des Klons SMB-EndoG-eGFP. ....	86
Abbildung 37: Koloalisation von <i>T.b.</i> EndoG-eGFP mit Mitotracker. ....	87
Abbildung 38: Lokalisation von <i>T.b.</i> EndoG-eGFP im frühen Abschnitt der Apoptose. ....	88
Abbildung 39: Lokalisation von <i>T.b.</i> EndoG-eGFP im späten Abschnitt der Apoptose. ....	89

---

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Art <i>Trypanosoma brucei</i> .....	5
Tabelle 2: Verwendete Bakterien.....	33
Tabelle 3: Geräte allgemein.....	33
Tabelle 4: Geräte Zelllabor.....	34
Tabelle 5: Mikroskopische Geräte.....	35
Tabelle 6: Geräte für die Fluoreszenzmikroskopie.....	35
Tabelle 7: Geräte für die Molekularbiologie.....	35
Tabelle 8: Geräte für die Proteinbiochemie.....	35
Tabelle 9: Gerät für die Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.....	36
Tabelle 11: Verwendete Marker.....	38
Tabelle 12: Verwendete durchflusszytometrische Marker.....	38
Tabelle 13: Verwendete Enzyme.....	39
Tabelle 14: Verwendete Restriktionsenzyme.....	39
Tabelle 15: Verwendete Antibiotika.....	39
Tabelle 16: Verwendete Antikörper.....	40
Tabelle 17: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	40
Tabelle 18: Zusammensetzung des MEM.....	41
Tabelle 19: Zusammensetzung der Aminosäuren.....	42
Tabelle 20: Zusammensetzung des Grundmediums.....	42
Tabelle 21: Zusammensetzung des Blutform-Mediums.....	43
Tabelle 22: Zusammensetzung des IMDM.....	44
Tabelle 23: Zusammensetzung des HMI-9 Medium.....	44
Tabelle 24: Zusammensetzung des HMI-9 Medium (2).....	45
Tabelle 25: Zusammensetzung des Cytomix.....	45
Tabelle 26: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	46
Tabelle 27: Zusammensetzung des SOB-Mediums.....	46
Tabelle 28: Zusammensetzung des SOC-Mediums.....	46
Tabelle 29: Zusammensetzung PBS.....	47
Tabelle 30: Zusammensetzung TBS.....	47
Tabelle 31: Zusammensetzung TDB.....	47

---

Tabelle 32: Zusammensetzung des Einfriermediums.....	48
Tabelle 33: Zusammensetzung des Proteaseinhibitor-Mix. ....	48
Tabelle 34: Zusammensetzung TAE. ....	48
Tabelle 35: Zusammensetzung TSS. ....	48
Tabelle 36: Zusammensetzung des Laufpuffers.....	49
Tabelle 37: Zusammensetzung des SDS-Gels.....	49
Tabelle 38: Zusammensetzung des Transferpuffers.....	49
Tabelle 39: Zusammensetzung des Blockierpuffers.....	50
Tabelle 40: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	50
Tabelle 41: Zusammensetzung des AP-Puffers.....	50
Tabelle 42: Zusammensetzung der alkalischen Phosphatase. ....	50
Tabelle 43: Zusammensetzung der Stammlösungen der Antibiotika. ....	51
Tabelle 44: Zusammensetzung der Stammlösungen der Antibiotika zur Induktion. ....	51
Tabelle 45: Stammlösungen für die Immunfluoreszenz.....	51
Tabelle 46: Stammlösungen für die Durchflusszytometrie. ....	51
Tabelle 47: Primer <i>T.b.</i> EndoG.....	52
Tabelle 48: Primer eGFP. ....	52
Tabelle 49: Verbrauchsmaterialien.....	52
Tabelle 50: Verwendete Kits. ....	53
Tabelle 51: Verwendete Software. ....	54
Tabelle 52: Zusammensetzung der reversen Transkription.....	61
Tabelle 53: Proteinbestimmung nach Bradford.....	62
Tabelle 54: Zusammensetzung der Subligation.....	68
Tabelle 55: Nomenklatur des Klons SMB-eGFP. ....	74
Tabelle 56: Nomenklatur des Klons SMB-EndoG-eGFP.....	75
Tabelle 57: Zusammensetzung der Nachweis-PCR. ....	75

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J. P., . . . 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), 3016-3030.
- Bakker, B. M., Mensonides, F. I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P. A., & Westerhoff, H. V. (2000). Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(5), 2087-2092. doi: 10.1073/pnas.030539197
- Bakker, B. M., Westerhoff, H. V., Opperdoes, F. R., & Michels, P. A. (2000). Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol*, *106*(1), 1-10.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiases. *Lancet*, *362*(9394), 1469-1480. doi: S0140-6736(03)14694-6 [pii]
- Barth, T., Bruges, G., Meiwes, A., Mogk, S., Mudogo, C. N., & Duszenko, M. (2014). Staurosporine-Induced Cell Death in *Trypanosoma brucei* and the Role of Endonuclease G during Apoptosis. *Open Journal of Apoptosis*, *Vol. 3, Number 2*. doi: 10.4236/ojapo.2014.32003
- Black, S. J., Sendashonga, C. N., O'Brien, C., Borowy, N. K., Naessens, M., Webster, P., & Murray, M. (1985). Regulation of parasitaemia in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Curr Top Microbiol Immunol*, *117*, 93-118.
- Borst, P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem*, *55*, 701-732. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.003413
- BoseDasgupta, S., Das, B. B., Sengupta, S., Ganguly, A., Roy, A., Dey, S., . . . 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), 1629-1640. doi: 10.1038/cdd.2008.85
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., & Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, *22*(53), 8608-8618. doi: 10.1038/sj.onc.1207108
- Bruce, D. (1895). Preliminary Report on Tsetse Fly Disease or Nagana in Zululand. *Durban: Bennet & Davis*.

- 
- Castellani, A. (1903). Some Observations on the Morphology of the Trypanosoma Found in Sleeping Sickness. *British medical journal*, 1(2216), 1431-1432.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7), 2172--2175.
- Clarkson, A. B., Bienen, E. J., Pollakis, G., & Grady, R. W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite Trypanosoma brucei brucei is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J Biol Chem*, 264(30), 17770--17776.
- Cote, J., & Ruiz-Carrillo, A. (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science*, 261(5122), 765-769.
- Cox, F. (2004). History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infectious disease clinics of North America*, 18(2), 231.
- 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.
- Cross, G. A., & Manning, J. C. (1973). Cultivation of Trypanosoma brucei spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology*, 67(3), 315-331.
- Cross, G. A., Wirtz, L. E., & Navarro, M. (1998). Regulation of vsg expression site transcription and switching in Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, 91(1), 77-91.
- Cummings, O. W., King, T. C., Holden, J. A., & Low, R. L. (1987). Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, 262(5), 2005-2015.
- De Raadt, P. (2005). The History of sleeping sickness.
- Delgado, M., Anderson, P., Garcia-Salcedo, J. A., Caro, M., & Gonzalez-Rey, E. (2009). Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell death and differentiation*, 16(3), 406-416. doi: 10.1038/cdd.2008.161
- Dey, R., & Datta, S. C. (1994). Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase. *Biochem J*, 301 ( Pt 2), 317-319.
- Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J., & Crespo, J. L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy*, 4(7), 851-865.
- Diener, T., Neuhaus, M., Koziel, R., Micutkova, L., & Jansen-Durr, P. (2010). Role of endonuclease G in senescence-associated cell death of human endothelial cells. *Exp Gerontol*, 45(7-8), 638-644. doi: 10.1016/j.exger.2010.03.002

- 
- Duszenko, M., Ferguson, M. A., Lamont, G. S., Rifkin, M. R., & Cross, G. A. (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *The Journal of experimental medicine*, *162*(4), 1256-1263.
- Duszenko, M., Muhlstadt, K., & Broder, A. (1992). Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol*, *50*(2), 269-273.
- Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, *130*(3373), 432-437.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, *391*(6662), 43-50. doi: 10.1038/34112
- Engstler, M., & Boshart, M. (2004). Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, *18*(22), 2798-2811. doi: 10.1101/gad.323404
- Fairlamb, A. H. (2003). Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology*, *19*(11), 488-494.
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., & Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, *227*(4693), 1485--1487.
- Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*, *46*, 695--729.
- Ferguson, M. A., & Cross, G. A. (1984). Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem*, *259*(5), 3011-3015.
- Field, M. C., & Boothroyd, J. C. (1996). Sequence divergence in a family of variant surface glycoprotein genes from trypanosomes: coding region hypervariability and downstream recombinogenic repeats. *Journal of molecular evolution*, *42*(5), 500-511.
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L., Kubata, B. K., Lauber, K., Madeo, F., . . . Duszenko, M. (2005). Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ*, *12*(4), 335-346. doi: 10.1038/sj.cdd.4401564
- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L., Kubata, B. K., Lauber, K., Madeo, F., . . . Duszenko, M. (2005). Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ*, *12*(4), 335--346.

- 
- Fingar, D. C., & Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, *23*(18), 3151-3171. doi: 10.1038/sj.onc.1207542
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, *73*(4), 1907-1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
- Fraser, M. J., & Cohen, H. (1983). Intracellular localization of *Neurospora crassa* endonuclease and its putative precursor. *Journal of bacteriology*, *154*(1), 460-470.
- Gannavaram, S., & Debrabant, A. (2012). Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, *83*(5), 926-935. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07978.x
- Gannavaram, S., Vedvyas, C., & Debrabant, A. (2008). Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 1), 99-109.
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., N'Guessan, P., . . . Buscher, P. (2000). Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health*, *5*(11), 786-793.
- Gerschenson, M., Houmiel, K. L., & Low, R. L. (1995). Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res*, *23*(1), 88-97.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, *305*(5684), 626-629. doi: 10.1126/science.1099320
- Hannaert, V., & Michels, P. (1994). Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastida. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, *26*(2), 205-212.
- Hart, D. T., Misset, O., Edwards, S. W., & Opperdoes, F. R. (1984). A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, *12*(1), 25-35.
- Hide, G. (1999). History of sleeping sickness in East Africa. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(1), 112.
- Hotti, A., Jarvinen, K., Siivola, P., & Holtta, E. (2000). Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene*, *19*(19), 2354-2362. doi: 10.1038/sj.onc.1203567
- Ikeda, S., & Ozaki, K. (1997). Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum

- 
- (II). *Biochemical and biophysical research communications*, 235(2), 291-294.  
doi: 10.1006/bbrc.1997.6786
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4(2), 139-163.
- Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W. T., & Widlak, P. (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, 10(4), 821-830. doi: 10.1007/s10495-005-0410-9
- Kalinski, A., Takamatsu, H., & Laskowski, M., Sr. (1980). An endonuclease activity of chicken erythrocyte nuclei and mononucleosomes. *J Biol Chem*, 255(21), 10542-10545.
- Kennedy, P. G. (2004). Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of clinical investigation*, 113(4), 496-504. doi: 10.1172/JCI21052
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Kleine, F. (1909). Positive Infektionsversuche mit Trypanosoma brucei durch Glossina palpalis.
- Kleine, F. (1943). Mit Robert Koch in Afrika und in der Heimat. *Medical Microbiology and Immunology*, 125(3), 265-286.
- Koerner, T., De Raadt, P., & Maudlin, I. (1995). The 1901 uganda sleeping sickness epidemic revisited: a case of mistaken identity? *Parasitol Today*, 11(8), 303-306.
- Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ*, 9(4), 394-404. doi: 10.1038/sj/cdd/4400991
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150
- Kroemer, G., & Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nature medicine*, 11(7), 725-730. doi: 10.1038/nm1263
- Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., . . . Hayaishi, O. (2000). Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in Trypanosoma brucei. *The Journal of experimental medicine*, 192(9), 1327-1338.

- 
- Kubata, B. K., Duszenko, M., Kabututu, Z., Rawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., . . . Hayaishi, O. (2000). Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med*, *192*(9), 1327--1338.
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., & Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, *22*(56), 8961-8982. doi: 10.1038/sj.onc.1207230
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., . . . Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, *384*(6607), 368-372. doi: 10.1038/384368a0
- LaCount, D. J., Gruszynski, A. E., Grandgenett, P. M., Bangs, J. D., & Donelson, J. E. (2003). Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. *J Biol Chem*, *278*(27), 24658-24664. doi: 10.1074/jbc.M301451200
- Lee, N., Gannavaram, S., Selvapandiyan, A., & Debrabant, A. (2007). Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell*, *6*(10), 1745-1757. doi: 10.1128/EC.00123-07
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, *412*(6842), 95-99. doi: 10.1038/35083620
- Liu, Q. A., & Hengartner, M. O. (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *887*, 92-104.
- Low, R. L. (2003). Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion*, *2*(4), 225-236. doi: 10.1016/S1567-7249(02)00104-6
- Low, R. L., & Gerschenson, M. (2002). Endonuclease G isolation and assays. *Methods Mol Biol*, *197*, 331-349. doi: 10.1385/1-59259-284-8:331
- Lucke, S., Xu, G. L., Palfi, Z., Cross, M., Bellofatto, V., & Bindereif, A. (1996). Spliced leader RNA of trypanosomes: in vivo mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for trans splicing and cap4 formation. *EMBO J*, *15*(16), 4380-4391.
- Lukes, J., Guilbride, D. L., Votypka, J., Zikova, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*, *1*(4), 495-502.
- MacGregor, P., & Matthews, K. R. (2010). New discoveries in the transmission biology of sleeping sickness parasites: applying the basics. *J Mol Med (Berl)*, *88*(9), 865-871. doi: 10.1007/s00109-010-0637-y

- 
- Mackey, Z. B., O'Brien, T. C., Greenbaum, D. C., Blank, R. B., & McKerrow, J. H. (2004). A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, 279(46), 48426--48433.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 741--752.
- Mamani-Matsuda, M., Rambert, J., Malvy, D., Lejoly-Boisseau, H., Daulouede, S., Thiolat, D., . . . Mossalayi, M. D. (2004). Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 924-929.
- Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 118(Pt 2), 283-290. doi: 118/2/283 [pii]
- Matthews, K. R., Ellis, J. R., & Paterou, A. (2004). Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol*, 20(1), 40-47. doi: S1471492203002927 [pii]
- Matthews, K. R., Sherwin, T., & Gull, K. (1995). Mitochondrial genome repositioning during the differentiation of the African trypanosome between life cycle forms is microtubule mediated. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 6), 2231-2239.
- McCarthy, J. V. (2003). Apoptosis and development. *Essays Biochem*, 39, 11-24.
- McCulloch, R. (2004). Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol*, 20(3), 117-121. doi: 10.1016/j.pt.2003.12.004
- Meng, X. W., Fraser, M. J., Ireland, C. M., Feller, J. M., & Ziegler, J. B. (1998). An investigation of a possible role for mitochondrial nuclease in apoptosis. *Apoptosis*, 3(6), 395-405.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Carrington, M., & Field, M. C. (2002). The kinetoplast endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol*, 18(11), 491--496.
- Morosoli, R., & Lusena, C. V. (1980). An endonuclease from yeast mitochondrial fractions. *European journal of biochemistry / FEBS*, 110(2), 431-437.
- Morrison, L. J., Marcello, L., & McCulloch, R. (2009). Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cellular Microbiology*, 11(12), 1724-1734.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(7), 458-467. doi: 10.1038/nrm2708
- Nilsen, T. W. (1992). Trans-splicing in protozoa and helminths. *Infect Agents Dis*, 1(4), 212-218.

- 
- Nilsen, T. W. (1993). Trans-splicing of nematode premessenger RNA. *Annu Rev Microbiol*, 47, 413-440. doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.002213
- Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R., & Huffnagle, G. B. (2003). Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 517-533.
- Overath, P., & Engstler, M. (2004). Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol*, 53(3), 735-744. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x
- Parks, W. A., Couper, C. L., & Low, R. L. (1990). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine enhance the activity of the mammalian mitochondrial endonuclease in vitro. *J Biol Chem*, 265(6), 3436-3439.
- Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular microbiology*, 53(3), 717-724.
- Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., & Kessler, P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 115(1), 19--28.
- Pentreath, V. W., Rees, K., Owolabi, O. A., Philip, K. A., & Doua, F. (1990). The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), 795-799.
- Peter, M. E., Heufelder, A. E., & Hengartner, M. O. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 12736-12737.
- Raught, B., Gingras, A. C., & Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 7037-7044. doi: 10.1073/pnas.121145898
- Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B., & Boshart, M. (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol Biochem Parasitol*, 90(1), 269-280.
- Rico, E., Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno, D., Clos, J., Gago, F., . . . Jimenez-Ruiz, A. (2009). *Leishmania infantum* expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus. *Molecular and biochemical parasitology*, 163(1), 28-38. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.09.007
- Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H., & Gull, K. (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol*, 128(6), 1163-1172.
- Rodgers, J., Jones, A., Gibaud, S., Bradley, B., McCabe, C., Barrett, M. P., . . . Kennedy, P. G. (2011). Melarsoprol cyclodextrin inclusion complexes as

- 
- promising oral candidates for the treatment of human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1308. doi: 10.1371/journal.pntd.0001308
- Roditi, I., Schwarz, H., Pearson, T. W., Beecroft, R. P., Liu, M. K., Richardson, J. P., . . . et al. (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, 108(2), 737-746.
- Rogers, D. J., Hay, S. I., & Packer, M. J. (1996). Predicting the distribution of tsetse flies in West Africa using temporal Fourier processed meteorological satellite data. *Ann Trop Med Parasitol*, 90(3), 225-241.
- Ross, R., & Thomson, D. (1910). A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: regular periodical increase of the parasites disclosed. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 82(557), 411-415.
- Ruiz-Carrillo, A., & Renaud, J. (1987). Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J*, 6(2), 401-407.
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784-788. doi: 10.1038/35037722
- Sbicego, S., Vassella, E., Kurath, U., Blum, B., & Roditi, I. (1999). The use of transgenic *Trypanosoma brucei* to identify compounds inducing the differentiation of bloodstream forms to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol*, 104(2), 311-322.
- Schafer, P., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Cymerman, I. A., Bujnicki, J. M., Ruiz-Carrillo, A., . . . Meiss, G. (2004). Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *Journal of molecular biology*, 338(2), 217-228. doi: 10.1016/j.jmb.2004.02.069
- Schlegel, R. A., & Williamson, P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*, 8(6), 551-563. doi: 10.1038/sj.cdd.4400817
- Schlitzer, M. (2009). Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im letzten Jahrhundert entwickelt. *Pharmazie in unserer Zeit*, 38(6), 552-558.
- Schofield, C. J., & Maudlin, I. (2001). Trypanosomiasis control. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 614-619.
- Schultzberg, M., Ambatsis, M., Samuelsson, E., Kristensson, K., & Van Meirvenne, N. (1988). Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia. *Journal of neuroscience research*, 21(1), 56-61.

- 
- Searle, J., Collins, D. J., Harmon, B., & Kerr, J. F. (1973). The spontaneous occurrence of apoptosis in squamous carcinomas of the uterine cervix. *Pathology*, 5(2), 163-169.
- Shimizu, I. (2012). Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects. *Chapter 6: Cellular Signaling Pathways in Alcoholic Liver Disease*.
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995. doi: 10.1126/science.1099993
- Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyó, D., . . . Cross, G. A. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes & development*, 23(9), 1063-1076. doi: 10.1101/gad.1790409
- Simarro, P., Jannin, J., & Cattand, P. (2008). Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next?. *PLoS medicine*, 5(2).
- Simpson, A., Stevens, J., & Lukes, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*, 22(4), 168-174.
- Simpson, L., Aphasizhev, R., Gao, G., & Kang, X. (2004). Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA*, 10(2), 159--170.
- Speiser, D. E., Lees, R. K., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., & MacDonald, H. R. (1989). Positive and negative selection of T cell receptor V beta domains controlled by distinct cell populations in the thymus. *J Exp Med*, 170(6), 2165-2170.
- Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2), 299-306.
- Stephens, J., & Fantham, H. (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*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 83(561), 28-33.
- Steverding, D. (2008). The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors*, 1, 3.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., . . . Kroemer, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 192(4), 571-580.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., . . . Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446. doi: 10.1038/17135

- 
- Tait, A., Babiker, E. A., & Le Ray, D. (1984). Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. I. Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology*, 89 ( Pt 2), 311-326.
- Taute, M. (1911). Experimentelle Studien über die Beziehungen der *Glossina morsitans* zur Schlafkrankheit. *Medical Microbiology and Immunology*, 69(1), 553-558.
- Torri, A. F., & Hajduk, S. L. (1988). Posttranscriptional regulation of cytochrome c expression during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, 8(11), 4625-4633.
- Tyler, K. M., Higgs, P. G., Matthews, K. R., & Gull, K. (2001). Limitation of *Trypanosoma brucei* parasitaemia results from density-dependent parasite differentiation and parasite killing by the host immune response. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 268(1482), 2235-2243. doi: 10.1098/rspb.2001.1794
- Valentin, G. (1841). *Ueber ein Entozoon im Blute von Salmo fario*.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., . . . Vandenabeele, P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, 8(12), 1136-1142. doi: 10.1038/sj.cdd.4400944
- van Zandbergen, G., Luder, C. G., Heussler, V., & Duszenko, M. (2010). Programmed cell death in unicellular parasites: a prerequisite for sustained infection? *Trends Parasitol*. doi: S1471-4922(10)00118-2 [pii]
- Varecha, M., Potesilova, M., Matula, P., & Kozubek, M. (2012). Endonuclease G interacts with histone H2B and DNA topoisomerase II alpha during apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 363(1-2), 301-307. doi: 10.1007/s11010-011-1182-x
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., & Boshart, M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci*, 110 ( Pt 21), 2661-2671.
- Vaughan, S. (2010). Assembly of the flagellum and its role in cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol*, 13(4), 453-458. doi: 10.1016/j.mib.2010.05.006
- Vickerman, K. (1970). Localization of Variable Antigens in the Surface Coat of *Trypanosoma brucei* using Ferritin Conjugated Antibody. *Nature*.
- Virchow, R. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*.
- Wang, C. C. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 93-127. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.000521

- 
- Wastling, S. L., & Welburn, S. C. (2011). Diagnosis of human sleeping sickness: sense and sensitivity. *Trends in parasitology*, 27(9), 394-402. doi: 10.1016/j.pt.2011.04.005
- Welburn, S. C., Macleod, E., Figarella, K., & Duzensko, M. (2006). Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology*, 132 Suppl, S7-S18. doi: S0031182006000825 [pii]
- Wheeler, R. J. (2010). The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in parasitology*, 26(9), 457-464.
- WHO. (2012). African trypanosomiasis (sleeping sickness). Retrieved 22.02., 2012, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/index.html>
- Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X., & Garrard, W. T. (2001a). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48404.
- Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X., & Garrard, W. T. (2001b). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem*, 276(51), 48404-48409. doi: 10.1074/jbc.M108461200
- Winkle, S. (2003). Zur Geschichte der Trypanosomiasen. from <http://www.collasius.org/WINKLE/04-HTML/trypanosomiasen.htm#%2852%29>
- Winkle, S. (2005). Geißel der Menschheit. Kulturgeschichte der Seuchen.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & 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.
- Woo, P. T. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica*, 27(4), 384-386.
- Woolley, D., Gadelha, C., & Gull, K. (2006). Evidence for a sliding-resistance at the tip of the trypanosome flagellum. *Cell motility and the cytoskeleton*, 63(12), 741-746. doi: 10.1002/cm.20159
- Worthen, C., Jensen, B. C., & Parsons, M. (2010). Diverse effects on mitochondrial and nuclear functions elicited by drugs and genetic knockdowns in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5), e678. doi: 10.1371/journal.pntd.0000678
- Yoon, S. M., Song, H. N., Yang, J. H., Lim, M. Y., Chung, Y. J., Ryu, S. E., & Woo, E. J. (2009). Purification, crystallization and data collection of the apoptotic nuclease endonuclease G. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 65(Pt 5), 504-507. doi: 10.1107/S1744309109013335

- 
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, *12 Suppl 2*, 1542-1552. doi: 10.1038/sj.cdd.4401765
- Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *313*(2), 453-458.
- Young, R., Taylor, J. E., Kurioka, A., Becker, M., Louis, E. J., & Rudenko, G. (2008). Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC genomics*, *9*, 385. doi: 10.1186/1471-2164-9-385
- Zamze, S. E., Ferguson, M. A., Collins, R., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1988). Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *European journal of biochemistry / FEBS*, *176*(3), 527-534.
- Zucker, B., Hanusch, J., & Bauer, G. (1997). Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. *Cell Death Differ*, *4*(5), 388-395. doi: 10.1038/sj.cdd.4400258

---

## 8 Anhang

### 8.1 Veröffentlichungen

1.) Staurosporin-Induced Cell Death in *Trypanosoma brucei* and the Role of Endonuclease G during Apoptosis. *Open Journal of Apoptosis*. Torsten Barth, Gustavo Bruges, Andreas Meiwes, Stefan Mogk und Michael Duszenko, 2014.

2.) Drug development against sleeping sickness: old wine in new bottles? *Current Medicinal Chemistry*. Jasmin Stein, Stefan Mogk, Celestin N. Mudogo, B. Philip Sommer, Melina Scholze, Andreas Meiwes, Matthias Huber, Agnes Gray und Michael Duszenko, 2014.

3.) Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. *PLoS One*. Stefan Mogk, Andreas Meiwes, Svetlana Shtopel, Ulrich Schraermeyer, Michael Lazarus, Bruno Kubata, Hartwig Wolburg und Michael Duszenko, 2014.

---

## 8.2 Authentizitätserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorgelegte Arbeit mit dem folgenden Titel „Herstellung von *T.b.* EndonukleaseG-eGFP exprimierenden Trypanosomen zur Untersuchung der Funktion von *T.b.* EndonukleaseG während der Apoptose in der Blutform von *Trypanosoma brucei brucei*“ selbstständig, ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen, insbesondere dem Internet, entnommen sind, sind als solche eindeutig und wiederauffindbar kenntlich gemacht. Alle diese Quellen sind vollständig und abschließend in einem Literaturverzeichnis angegeben. Die vorliegende Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht.