

Vera Monika Anna Seidel

Dr. med.

**Klonierung, Überexpression und phänotypische Analyse der
Dithiol-Glutaredoxine in Afrikanischen Trypanosomen
sowie Untersuchung
Ihrer Rolle im Glutathionstoffwechsel der Parasiten**

Promotionsfach: Biochemie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. R. Luise Krauth-Siegel

Trypanosoma brucei, der Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, besitzt zwei Dithiol-Glutaredoxine (Grx1 und Grx2). In dieser Arbeit wurde die Rolle von Grx1 und Grx2 im Thiolstoffwechsel des Parasiten untersucht. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte die zytosolische Lokalisation von Grx1 gezeigt werden. Die *grx1* und *grx2* Gene wurden in den pHD1700-Vektor kloniert, der die Tetracyclin-induzierbare ektopische Expression des jeweiligen Proteins mit C-terminalem Myc₂-Tag erlaubt. Eine mindestens 5- bis 10-fache Überexpression von Grx1 bzw. eine mindestens 3-fache Überexpression von Grx2 gegenüber dem authentischen Protein zeigte keine Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Parasiten. Ebenso hatte die Überexpression des einen Glutaredoxins keinen Einfluss auf den zellulären Proteinspiegel des anderen. Überexpression des Grx1 in Blutstromform-Parasiten veränderte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht die Sensitivität der Trypanosomen gegenüber exogenem H₂O₂ oder Menadion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vivo* Detektion von Protein-Glutathionylierungen mittels biotinyliertem Glutathionethylester (BioGEE) für Trypanosomen etabliert. Erste Versuche deuten auf eine Stress- und zeitabhängige Glutathionylierung von Proteinen in prozyklischen *T. brucei* hin. Da Glutaredoxine die (De)glutathionylierung von Proteinen katalysieren, wurden BSA und *T. brucei* 2-Cys-Peroxiredoxin durch Behandlung mit GSH und Diamid glutathionyliert und als Substrate eingesetzt. Gegenüber beiden Modellsubstraten hatte Grx1 eine 12- bis 18-fach höhere katalytische Effizienz als Grx2. Dabei zeigten beide Glutaredoxine vergleichbare k_{cat} -Werte aber sehr unterschiedliche K_{m} -Werte. Tryparedoxin, eine weitere Oxidoreduktase der Parasiten, hatte um zwei bzw. drei Größenordnungen geringere Aktivität. Die Deglutathionylierung von Proteinen wird daher als eine für Dithiol-Glutaredoxine spezifische Funktion in *T. brucei* angesehen.