**INAUGURAL-DISSERTATION**

**Zur**
**Erlangung der Doktorwürde**
**der**
**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**
**der**
**Ruprecht-Karls-Universität**
**Heidelberg**

**vorgelegt von**
**Diplom-Biologin Elise Solange Ngazoa**
**aus Jaunde**
**2003**

**Untersuchung der eisenabhängigen Regulation des trypanosomalen Transferrinrezeptors in *Trypanosoma brucei brucei***

**und**

**Biochemische Charakterisierung einer *T.brucei*-NMP-Kinase**

**Gutachter:** **Prof. Dr. Michael Lanzer**
**Prof. Dr. Christine Clayton**

## Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Lanzer für die Übernahme des Referats.

Herrn PD. Dr. Steverding danke ich für das Vertrauen bei der Vergabe des interessanten Themas, seine stetige Bereitschaft, die gute wissenschaftliche und kompetente Betreuung und die Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg danke ich für ihre Bereitschaft, mich Experimente in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu lassen, und für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe. Dies war mir eine große Hilfe.

Herrn Dr. Stephan Rahlfs, Frau Dr. Angelika Irmler, Frau Dr. Rimma Iozef, Herrn PD. Dr. Michael Kann und Herrn Dr. Mostafa Kabiri möchte ich für die Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und die fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Bei Julia Bolt-Ulschmid, Marcel Deponte, Monique Akoachere, Sabine Urig, Christine Nickel, Petra Harwaldt, Elisabeth Fischer, Beate Hecker, Marina Fischer, Doris Heinke, Annette Briesemeister, Ulrike Burkhard-Zahrt, Angela Bechthold, Tanja Breidbach, Antje Fischer und Daniela Schnörr möchte ich mich bedanken für die freundliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeiter des Tropeninstituts Heidelberg und des IFZ-Gießen bedanke ich mich für die nette Atmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank an diejenigen, die mit großer Geduld und liebevoller Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Meiner Familie**

INHALTSVERZEICHNIS

**1. EINLEITUNG ..... 10**

**1.1. Die Schlafkrankheit ..... 11**

**1.2. Der Lebenszyklus von *T. brucei* ..... 13**

**1.3. Organisation des *T. brucei*-Genoms ..... 15**

**1.4. Blutstrom-Expressionsstellen (B-ES) ..... 16**

**1.5. Antigenvariation in *T. brucei* ..... 19**

**1.6. Transkription in *T. brucei* ..... 19**

**1.7. Rolle von UTR-Sequenzen bei der Genregulation ..... 21**

**1.8. Der Transferrinrezeptor von *T. brucei* ..... 22**

**1.9. Eisenabhängige Regulation des Transferrinrezeptors ..... 26**

**1.10. Adenylatkinasen ..... 28**

**1.11. Ziele der Arbeit ..... 31**

**2. MATERIAL UND METHODEN ..... 32**

**2.1. Material ..... 32**

**2.1.1. Reagenzien ..... 32**

**2.1.2. Puffer und Lösungen ..... 36**

2.1.2.1. Lösungen für die Elektrophorese ..... 36

**2.1.2.1.1. Lösungen für die DNA- und RNA-Elektrophorese ..... 36**

**2.1.2.1.2. Lösungen für die Protein-Elektrophorese ..... 37**

2.1.2.2. Lösungen für die Herstellung von *T. brucei* Zell-Lysaten ..... 39

**2.1.3. Zellkulturen ..... 41**

2.1.3.1. Bakterienkultur ..... 41

**2.1.3.1.1. Bakterienstämme ..... 41**

**2.1.3.1.2. Medien für die Bakterienkultur ..... 41**
2.1.3.2. Trypanosomenkultur ..... 43
**2.1.3.2.1. Trypanosomen ..... 43**
**2.1.3.2.2. Medien für die Trypanosomenkultur ..... 43**

**2.2. Methoden ..... 44**
**2.2.1. Zellkulturtechniken ..... 44**
2.2.1.1. Trypanosomenkulturtechniken ..... 44
**2.2.1.1.1. Kultivierung von Trypanosomen ..... 44**
**2.2.1.1.2. Bestimmung der Zellzahl ..... 44**
**2.2.1.1.3. Lagerung von Trypanosomen ..... 45**
**2.2.1.1.4. Transfektion von Bluttrypanosomen ..... 45**
2.2.1.2. Bakterienkulturtechniken ..... 46
**2.2.1.2.1. Lagerung von Bakterienkulturen ..... 46**
**2.2.1.2.2. Herstellung von kompetenten Zellen ..... 46**
**2.2.1.2.3. Transformation von Bakterien ..... 47**
**2.2.2. Molekularbiologische Methoden ..... 47**
2.2.2.1. Präparation von Nukleinsäuren ..... 47
**2.2.2.1.1. Minipräparation ..... 47**
**2.2.2.1.2. Midipräparation ..... 48**
**2.2.2.1.3. Isolierung von genomischer DNA aus Bluttrypanosomen ..... 48**
**2.2.2.1.4. Phenol-Chloroform-Extraktion ..... 49**
**2.2.2.1.5. Ethanol-Fällung von DNA ..... 49**
**2.2.2.1.6. Reinigung der PCR-Produkte ..... 49**
**2.2.2.1.7. Isolierung von RNA aus Bluttrypanosomen ..... 50**
**2.2.2.1.8. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren ..... 50**
2.2.2.2. PCR-Methoden ..... 50
**2.2.2.2.1. Amplifikation von DNA mittels PCR ..... 50**
**2.2.2.2.2 Herstellung von cDNA mittels RT-PCR ..... 51**
**2.2.2.2.3. PCR-Mutagenese ..... 51**
2.2.2.3. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA ..... 52
2.2.2.4. Klonierung von DNA-Fragmenten ..... 52
**2.2.2.4.1. Modifizierung der Enden verdauter DNA-Fragmente ..... 52**
**2.2.2.4.2. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren ..... 53**
2.2.2.5. DNA-Elektrophorese ..... 54

2.2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel ..... 54
**2.2.3. Proteinchemische Methoden ..... 55**
2.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration ..... 55
2.2.3.2. Konzentrierung von Proteinlösungen ..... 55
2.2.3.3. Herstellung von Zelllysaten aus Bluttrypanosomen ..... 56
2.2.3.4. Reinigung des Transferrinrezeptors aus Bluttrypanosomen ..... 56
2.2.3.5. Aufreinigung einer rekombinanten *T. brucei* NMP-Kinase ..... 57
2.2.3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..... 57
**2.2.4. Immunologische Methoden ..... 58**
2.2.4.1. Immunoblot ..... 58
2.2.4.2. Aufreinigung von Antikörpern ..... 58
**2.2.5. Enzymologische Methoden ..... 60**
2.2.5.1. Adenylatkinase-Enzymtest ..... 60
2.2.5.2. Optimierung des Adenylatkinase-Enzymtests ..... 62
2.2.5.3. Bestimmung der Substratspezifität der rekombinaten *T. brucei*-NMP-Kinase 62
2.2.5.4. Bestimmung der $K_m$-Werte der rekombinaten *T. brucei*-NMP-Kinase ..... 62
2.2.5.5. Hemmung der Aktivität der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase ..... 63
**2.2.6. Proteinkristallographische Methoden ..... 63**

**3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION ..... 64**

**3.1. Untersuchungen zur Rolle der 5'-nichttranslatierten Region der *ESAG6/7* mRNA bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors in *T. brucei* ..... 64**
**3.1.1. Herstellung und Analyse von *T. brucei Δesag6::NPT*-Zellen ..... 66**
3.1.1.1. Der Transfektionsvektor pHD599 ..... 66
3.1.1.2. Herstellung von *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 68
3.1.1.3. Analyse der *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 69
**3.1.1.3.1. Nachweis der Integration des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 69**
**3.1.1.3.2. Reinigung des Transferrinrezeptors aus *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 71**
**3.1.1.3.3. Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Zellwachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 72**
**3.1.1.3.4. Nachweis der Expression der Neomycin-Phosphotransferase in *Δesag6::NPT*-Zellen ..... 73**

**3.1.1.3.5. Sensitivität der *Δesag6::NPT*-Zellen gegenüber Neomycin ..... 74**

**3.1.1.3.6. Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen 75**

**3.1.1.3.7. Eisenabhängige Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δesag6::NPT*-Zellen..... 77**

**3.1.2. Herstellung und Analyse von *T. brucei Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.. 79**

3.1.2.1. Herstellung des Transfektionsvektors pNE-1..... 79

3.1.2.2. Herstellung von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen..... 81

3.1.2.3. Analyse der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen..... 81

**3.1.2.3.1. Reinigung des Transferrinrezeptors aus *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen..... 82**

**3.1.2.3.2. Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Zellwachstum der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen ..... 83**

**3.1.2.3.3. Nachweis der Expression der Neomycin-Phosphotransferase in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen ..... 84**

**3.1.2.3.4. Sensitivität der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen gegenüber Neomycin 85**

**3.1.2.3.5. Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen..... 86**

**3.1.2.3.6. Eisenabhängige Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen ..... 87**

**3.1.3. Diskussion der Ergebnisse..... 89**

**3.2. Biochemische Charakterisierung einer *T. brucei*-Nukleosidmonophosphat-Kinase94**

3.2.1. Reinigung der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase..... 94

3.2.2. Produktion von Antikörpern gegen die rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase 96

3.2.3. Funktionelle Untersuchungen der *T. brucei*-NMP-Kinase ..... 97

**3.2.3.1. Abhängigkeit der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase von der Salzkonzentration..... 97**

**3.2.3.2. Abhängigkeit der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase vom pH-Wert 99**

**3.2.3.3. Substratspezifität der *T. brucei*-NMP-Kinase..... 100**

**3.2.3.4. Bestimmung der $K_m$- und $V_{max}$-Werte an der *T. brucei*-NMP-Kinase 102**

**3.2.3.5. Hemmung der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase ..... 104**

3.2.4. Vorkommen der NMP-Kinase im Lebenszyklus von *T. brucei*..... 106

3.2.5. Kristallisationsversuche mit der *T. brucei*-NMP-Kinase..... 108

**3.2.6. Diskussion der Ergebnisse..... 109**

**4. ZUSAMMENFASSUNG..... 112**

**4.1. Die Rolle der *ESAG6/7* 5'-UTR bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors in *T. brucei*..... 112**

**4.2. Charakterisierung einer NMP-Kinase in *T. brucei* mit ungewöhnlichem Substratspektrum ..... 112**

**5. LITERATURVERZEICHNIS..... 114**

**6. ABKÜRZUNGEN ..... 131**

**7. VERÖFFENTLICHUNGEN ..... 134**

**7.1. Artikel..... 134**

**7.2. Abstracts..... 134**

# 1. EINLEITUNG

Trypanosomen gehören zusammen mit Leishmanien zur Gruppe der Kinetoplastida. Trypanosomen parasitieren sowohl in Pflanzen als auch in Invertebraten und fast allen Vertebraten. Zu den bedeutendsten Vertretern der Trypanosomen gehören die Erreger der Schlafkrankheit beim Menschen und der Nagana-Seuche bei Haus- und Wildtieren in Afrika sowie die Erreger der Chagas-Krankheit in Südamerika. Während die afrikanischen Trypanosomen mit Ausnahme von *Trypanosoma evansi* nur über Tsetsefliegen (*Glossina* sp.) übertragen werden, werden die südamerikanischen Trypanosomen über Raubwanzen verbreitet. Tsetsefliegen kommen zwischen dem 10. Breitengrad ober- und unterhalb des Äquators in Afrika vor. Mehr als 500 Millionen Menschen leben in dem Verbreitungsgebiet der Tsetsefliegen, das einer Fläche von den USA, Indien und Westeuropa zusammen entspricht. Die durch Trypanosomen in Afrika verursachten ökonomischen Schäden für die Landwirtschaft belaufen sich auf über 1,3 Milliarden US$ pro Jahr (Kristjanson *et al.*, 1999).
Die Weltorganisation für Gesundheit (WHO) schätzt, dass sich ca. 100.000 Menschen jährlich im Sudan, Kongo, Uganda und Angola mit afrikanischen Trypanosomen infizieren, wobei die aktuellen Zahlen aufgrund fehlender oder nichtausreichender medizinischer Versorgung und politischer Instabilität der Regionen nicht bekannt sind (WHO, 1996). Insgesamt sind 36 Länder in Afrika von Trypanosomen betroffen (Abb.1).
Es gibt mehrere Arten afrikanischer Trypanosomen. Die humanpathogene Art ist *Trypanosoma brucei* mit drei morphologisch identischen Unterarten. Zu den drei Unterarten gehören *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense*, die Erreger der ostafrikanischen und westafrikanischen Schlafkrankeit beim Menschen, und *T. brucei brucei*, der Erreger der Nagana-Seuche bei Wild- und Haustieren. *Trypanosoma congolense* und *Trypanosoma vivax* sind weitere Erreger der Nagana-Seuche. Wildtiere zeigen keine Krankheitssymptome, bilden jedoch ein bedeutsames Erregerreservoir für Haustiere.
*T. b. brucei* ist apathogen für den Menschen, da im humanen Serum zwei cytotoxische Faktoren vorkommen, die eine lytische Aktivität gegenüber *T. b. brucei* aufweisen (Hager & Hadjuk, 1997). Hierbei handelt es sich um die trypanolytischen Faktoren TLF1 und TLF2, die mit dem Lipoprotein hoher Dichte (LDL) assoziiert sind und eine Lyse von *T. b. brucei* bewirken (Tomlinson *et al*., 1997, 1998). Es ist unklar, wie der Lyse-Mechanismus abläuft, wobei unterschiedliche Lysemechanismen für TLF1 und TLF2 diskutiert werden (Raper *et al.*, 1996; Muranjan *et al.*, 1998).

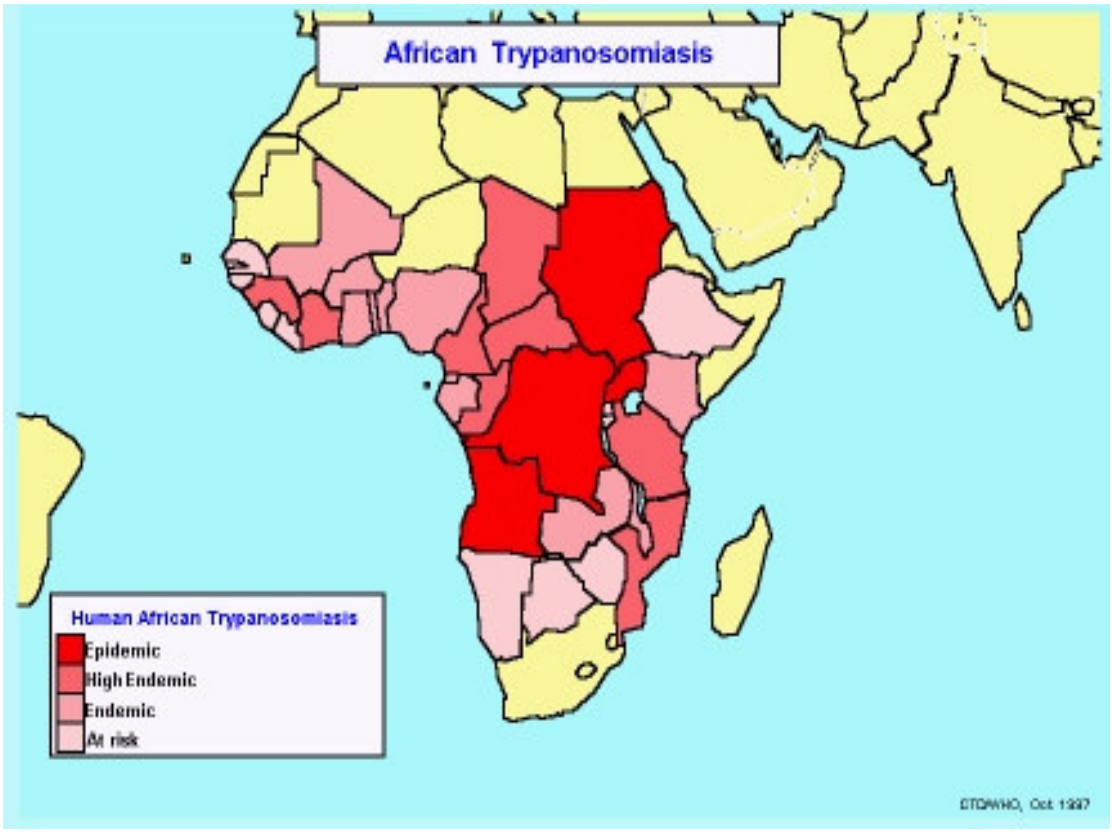



**Abb. 1: Verteilung der humanen afrikanischen Trypanosomiase (WHO, 1997).** Die am stärksten betroffenen Länder sind rot dargestellt. Dreiviertel des afrikanischen Kontinents ist Verbreitungsgebiet der Trypanosomen.

### 1.1. Die Schlafkrankheit

Die afrikanische Schlafkrankheit ist eine bösartige Erkrankung und führt unbehandelt immer zum Tod. Der Verlauf der Krankheit ist durch drei Phasen gekennzeichnet. Zunächst bildet sich an der Inokulationsstelle eine schmerzhafte, entzündliche Primärläsion, die man als Trypanosomenschlanker bezeichnet. Dies ist die erste Phase der Krankheit, die sogenannte kutan-mesenchymale Phase. Nach zwei bis drei Wochen dringen die Parasiten in die Blut- und Lymphbahnen ein. Diese zweite Phase oder Blutphase zeichnet sich durch das Auftreten generalisierter Symptome wie unregelmäßiges Fieber und Tachykardie sowie Lymphknotenschwellungen mit vergrößerten Nackenlymphdrüsen als ein typische Merkmal für diese Krankheit aus. Nach Monaten (ostafrikanische Form der Schlafkrankheit) bzw.

Jahren (westafrikanische Form der Schlafkrankheit) befallen die Trypanosomen das Zentralnervensystem, wodurch der Beginn der dritten Phase oder auch der Liquorphase gekennzeichnet ist. Der Eintritt der Trypanosomen ins Gehirn ist mit einer akuten Meningitis assoziiert, in deren Folge sich die klinischen Symptome wie anhaltende Kopfschmerzen, Somnolenz, Apathie, Anorexie und Kachexie einstellen. Ohne Behandlung endet diese Phase mit dem Tod.

Für die Chemotherapie der afrikanischen Trypanosomiasis des Menschen stehen zur Zeit nur vier Medikamente zur Verfügung (Kuzoe *et al.*, 1993; Croft, 1997; WHO, 1998). Hierzu gehören das Suramin und das Pentamidin, die nur während der zweiten Phase erfolgreich eingesetzt werden können. Demgegenüber wirkt das Melarsoprol auch gegen Liquortrypanosomen. Diese Wirkung beruht auf der im Gegensatz zu Suramin und Pentamidin hohen Lipidlöslichkeit des Melarsoprols, was dessen Diffusion ins zentrale Nervensystem erleichtert (Keiser & Burri, 2000). Seit 1990 wird DL-α-Difluoromethylornithin (DFMO), ein Suizid-Inhibitor der Ornithin-Decarboxylase verwendet, ein Enzym das die Umwandlung von Ornithin zu Putrescin als ersten Reaktionsschritt bei der *de novo*- Biosynthese von Polyaminen katalysiert (Pépin & Milord, 1994; Kuzoe, 1993). DMFO ist sowohl gegen Bluttrypanosomen als auch gegen Liquortrypanosomen wirksam. Polyamine sind bei Eukaryonten an verschiedenen zellulären Funktionen wie Zellwachstum, DNA-Replikation und Proteinbiosynthese beteiligt (Poulin *et al.*, 1992; Tabor & Tabor, 1984; Balasundaram *et al.*, 1994; Mutomba *et al.*, 1999).

Die Diagnose der Schlafkrankheit erfolgt zumeist durch den Nachweis der Parasiten im Blut oder in den befallenen Lymphknoten. Ein sensitiver Nachweis von Parasiten im Blut ist die Mikrohämatokrit-Zentrifugation durch eine DEAE-52-Anionen-Austausch-Säule, bei der die Erythrozyten selektiv an die Säulenmatrix binden und die Trypanosomen im Durchlauf mikroskopisch nachgewiesen werden können. Zur Serodiagnose wird der sogenannte *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (C.A.T.T.) eingesetzt (Magnus *et al.*, 1978, 2002). Trotz der hohen Sensitivität der Serodiagnose können nicht alle serologisch positiven Fälle auch parasitologisch bestätigt werden. Eine Trypanosomen-Infektion kann auch durch den Nachweis der Parasiten–DNA mittels der Polymerasekettenreaktion und Primern gegen konservierte Gensequenzen diagnostiziert werden (Kanmogne *et al.*, 1996; Morlais *et al.*,1998; Kabiri *et al.*, 1999; Penchenier *et al.*, 2000; Kyambadde *et al.*, 2000). Ungeachtet all dieser Methoden wurde bislang noch keine sensitive Diagnosetechnik für alle afrikanischen Trypanosomen-Infektionen entwickelt.

## 1.2. Der Lebenszyklus von *T. brucei*

Die Trypanosomen werden bei der Blutmahlzeit einer infizierten Tsetsefliege in den Säugetierwirt übertragen. Zunächst wandern die Parasiten über Zwischenräume in die Lymph- und Blutbahnen, und von dort später ins Zentralnervensystem. Bluttrypanosomen vermehren sich im Säugetierwirt in der *long slender*-Form. Mit zunehmender Zelldichte differenzieren sich die Bluttrypanosomen in die sich nicht-teilende *short stumpy*-Form. Die *short stumpy*-Parasiten sind präadaptiert für die Übertragung in die Tsetsefliege, wo sie sich im Mitteldarm in die teilungsaktive prozyklische Form umwandeln. Diese Umwandlung ist sowohl mit morphologischen Veränderungen, z. B. der Vergrößerung des Mitochondriums, als auch mit biochemischen Veränderungen, z. B. mitochondrialer ATP-Gewinn, verbunden (Clayton & Michels, 1996; Matthews, 1999). Die prozyklischen Parasiten wandern in die Speicheldrüse der Fliege , wo sie sich in die epimastigote Form differenzieren. Die epimastigoten Parasiten teilen sich weiter und differenzieren sich in die sich nicht-teilende, metazyklische Form, die wieder für den Säugetierwirt infektiös ist (Abb. 2). Während die Zelloberfläche der procyclischen und epimastigoten Trypanosomen mit dem *procyclic acidic repeat protein* (PARP) oder Procyclin bedeckt ist, besitzen metazyklische Parasiten und Blutformen das *variant surface glycoprotein* (VSG) (Cross, 1996) auf ihrer Zelloberfläche. Beide Oberflächenproteine sind C-terminal mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker modifiziert, mit dem die Proteine in der Plasmamembran verankert sind.

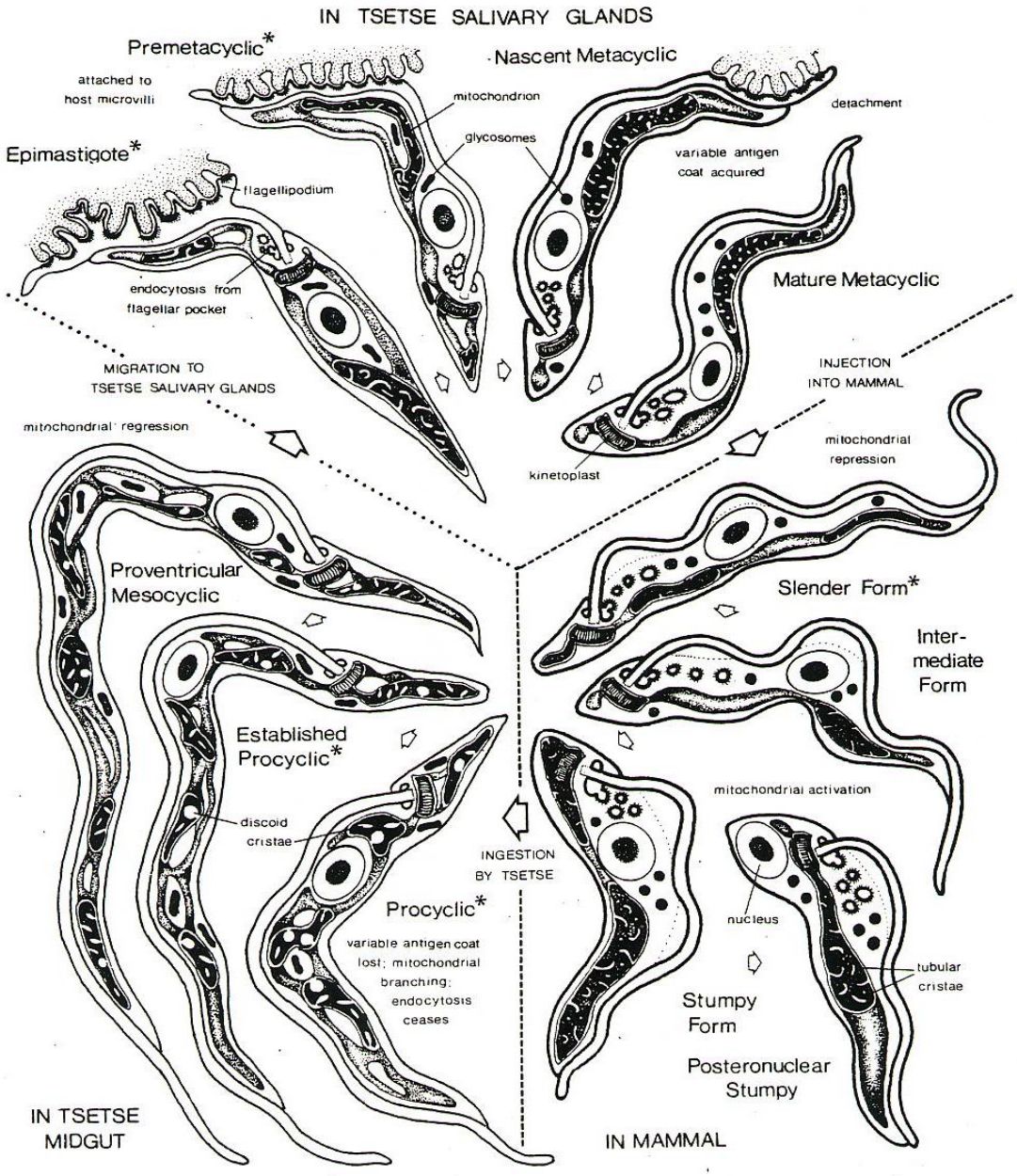



**Abb. 2: Lebenszyklus der afrikanischen Trypanosomen (Vikerman, 1985).** Einzeleinheiten sind im Text erklärt.

### 1.3. Organisation des *T. brucei*-Genoms

*Trypanosoma brucei* besitzt ein diploides Genom von 3,7 × $10^7$ Basenpaaren mit wahrscheinlich ca. 12.000 Genen. Etwa 50% der genomischen DNA-Sequenzen bei *T. brucei* sind kodierende Sequenzen ohne Introns, mit der Ausnahme des tRNA(Tyr)-Gens, das ein Intron von 11 Nukleotiden enthält (Schneider *et al.*, 1994). Nach Auftrennung in der Puls Feld Gel Elektrophorese (PFGE) können drei Klassen von Chromosomen differenziert werden (van der Ploeg *et al.*, 1984). Die Megabasenchromosomen umfassen 11 Chromosomenpaare (I-XI) mit einer Größe von 1–6 Megabasen. Daneben existiert eine variable Anzahl von intermediären Chromosomen mit einer Größe von 200-900 kb, und ungefähr 100 lineare Minichromosomen mit einer Größe von ca. 50-150 kb (van der Ploeg *et al.*, 1984; Gibson *et al.*, 1985).

Die 11 homologen Megabasenchromosomen enthalten alle aktiven Gene mit Ausnahme der *VSG*-Gene und der Expressionsstellen-assoziierten Gene (*ESAG*). Puls Feld Gel Elektrophorese mit anschließender Southern-Blot-Analyse von mehr als 500 cDNAs zur Kartierung einzelner Gene und zur Identifizierung von chromosomalen Homologien zeigten einen enormen Polymorphismus der Megabasenchromosomen mit einem Unterschied von mehr als 4 Megabasen bei den *T. brucei* Stämmen TREU 927/4 und STIB 247L (Turner *et al.*, 1997; Melville *et al.*, 1998; Melville *et al.*, 1999). Diese Unterschiede können durch (i) Umorganisationen in den *VSG*-Genen und Expressionsstellen, (ii) durch Ausweitung oder Verringerung von INGI und RIME (ribosomal inserted mobile elements) Retrotransposonen, von *Housekeeping* Genen, von subtelomeren/telomeren Wiederholungssequenzen oder von Wiederholungssequenzen, und (iii) durch unbekannte Sequenz-Veränderung erklärt werden (Hasan *et al.*, 1984; Murphy *et al.*, 1987; El-Sayed *et al.*, 2000).

Die intermediären Chromosomen unterscheiden sich eindeutig von den anderen Chromosomen, da sie nicht die 177 bp-Wiederholungssequenz, aber *VSG*-Expressionsstellen besitzen, und wahrscheinlich als Reservoir für Expressionsstellen für die *VSG*-Gene dienen (Rudenko *et al.*, 1998; Lips *et al.*, 1993).

Minichromosomen sind linear und enthalten die typische, eukaryotische, telomere Wiederholungssequenz $(TTAGG)_n$. Etwa 90% der gesamten Sequenzen der Minichromosomen sind 177 bp-Wiederholungssequenzen. Andere Minichromosom-spezifische Wiederholungssequenzen sind auch die 74 bp GC-reichen und 155 bp AT-reiche Sequenzen (Weiden *et al.*, 1991), deren Funktion noch unbekannt ist (Sloof *et al.*, 1983).

Einige Minichromosomen enthalten potentielle inaktive *VSG*-Expressionsstellen (Ersfeld *et al.*, 1999).

Trypanosomen gehören wie die Leishmanien zu der Gruppe der Kinetoplastida, deren Mitglieder durch das Vorhandensein eines Kinetoplasten charakterisiert sind. Hierbei handelt es sich um die mitochondriale DNA, die im einzigen Mitochondrium in Form eines Netzwerkes aus tausenden von zirkulären DNA-Molekülen (kDNA) vorliegt. Es gibt zwei Klassen von kDNA-Molekülen: große Ringe oder *Maxicircles* (20-50 kb) und kleine Ringe oder *Minicircles* (0,65-2,5 kb). Die *Maxicircles* enthalten Kryptogene für einige mitochondriale Proteine und Gene für rRNAs, und liegen in ca. 20-50 Kopien in der Zelle vor (Stuart & Feagin, 1992). Die *Minicircles* tragen die Informationen für die sogenannten guide RNAs (gRNAs) und kommen in einer Anzahl von 5.000-10.000 vor. Diese sind für die posttranskriptionelle Bearbeitung der mitochondrialen Transkripte erforderlich, welches eine weitere molekularbiologische Besonderheit der Trypanosomen darstellt. Dieses RNA-Editing ist ein bizarrer Mechanismus, bei dem Uridyl-Reste in mitochondriale Transkripte eingefügt oder entfernt werden. Für diese Prozesse werden die gRNAs benötigt, die sich über Basenpaarungen an die zu editierende Stelle anlagern und als Vorlage für die Insertionen oder Deletionen dienen (Stuart *et al.*, 1997). Die gRNAs sind ca. 55-70 Nukleotide groß und enthalten einen nichtkodierenden Oligouridylschwanz. Insgesamt kodiert jeder *Minicircle* für vier gRNAs (Blum *et al.*, 1990; Pollard & Hajduk, 1991; Hadjuk *et al.*, 1993).

### 1.4. Blutstrom-Expressionsstellen (B-ES)

Die Antat 1.3 Blutstrom-Expressionsstelle (B-ES) des linken Telomers des Chromosoms Ia wurde vollstängig sequenziert. Sie besteht aus einer polycistronischen Transkriptionseinheit von 45-60 kb (Pays *et al.*, 1989; Revelard *et al.*, 1990). Eine B-ES besitzt einen Promotor, der wahrscheinlich von der RNA-Polymerase I erkannt wird, zehn Expressionsstellen-assozierte Gene (*ESAG*s) und am Telomerende ein *VSG*-Gen (Abb. 3).

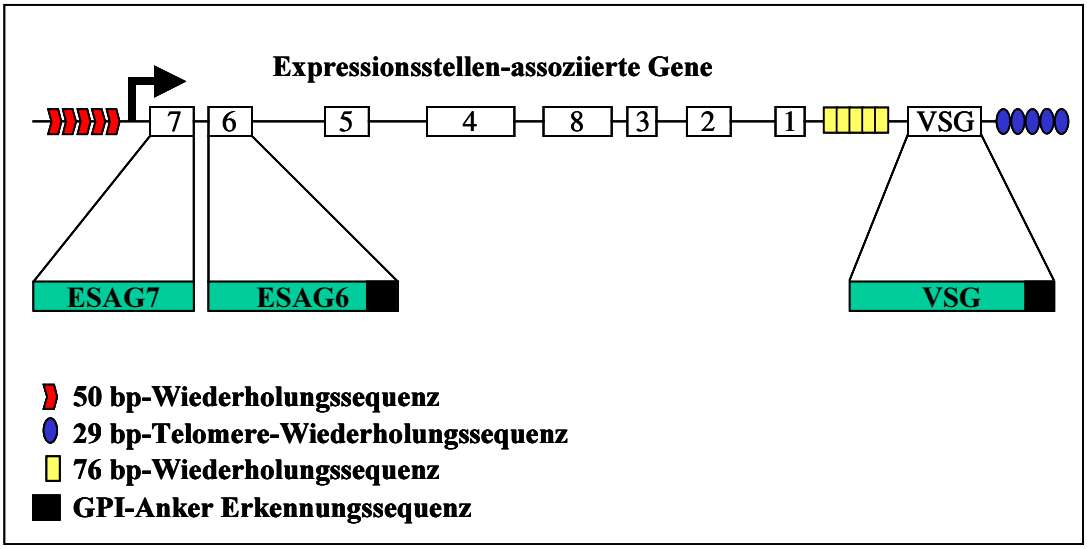



**Abb. 3: Aufbau einer *VSG*-Expressionsstelle (verändert nach Pays & Nolan, 1998).**
Zur polycistronischen Transkriptionseinheit gehören die 8 Expressionsstellen-assoziierten Gene und das am Telomerende gelegene *VSG*-Gen. Alle Gene stehen unter der Kontrolle eines Promotors (gekennzeichnet durch einen schwarzen Pfeil). Wiederholungssequenzen sind in gelb, blau oder rot dargestellt.

Das Genom eines jeden Trypanosoms enthält ca. 1000 unterschiedliche *VSG*-Gene, aber zu einer gegebenen Zeit wird nur das *VSG*-Gen der aktiven Expressionsstelle exprimiert. Während *ESAG6* und *ESAG7* große Ähnlichkeiten aufweisen, sind die anderen Expressionsstellen-assoziierten Gene sehr unterschiedlich. *ESAG6* und *ESAG7* kodieren für den trypanosomalen Transferrinrezeptor (Ligtenberg *et al.*, 1994; Chaudhri *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 1994; Steverding *et al.*, 1994, 1995). *ESAG4* kodiert für eine Adenylatcyclase, die über die Oberfläche des Flagellums verteilt ist, und *ESAG8* für ein Protein, das im Nukleolus vorkommt und eine DNA-Bindedomäne enthält. Die Funktion von *ESAG5* ist unbekannt. Die Nukleotidsequenzen von *ESAG1*, *ESAG2* und *ESAG3* lassen auf Proteine schließen, die entweder einen GPI-Anker oder eine Transmembrandomäne enthalten (Vanhamme & Pays, 1995; Paindavoine *et al*., 1992; Hoek *et al*., 2000). Die meisten *VSG*-Gene befinden sich in internen chromosomalen Bereichen und nicht in einer der 20 Expressionsstellen.

Neben den Blutform-Expressionsstellen gibt es auch 15-20 metacyclische Expressionsstellen (M-ES), die nur in infektiösen, metacyclischen Trypanosomen aktiv sind (Lenardo *et al.*,

1986). Die M-ES liegen am Telomerende von Chromosomen und enthalten einen RNA-Polymerase I-Promotor (Alarcon *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1991, 1993). In vielen Aspekten unterscheidet sich die M-ES von der B-ES: sie stellt eine monocistronische Transktiptionseinheit (ca. 3-5 kb) dar, und ist durch das vollständige oder teilweise Fehlen der 50 bp- und 76 bp-Wiederholungssequenzen und der Expressionsstellen-assoziierten Gene charakterisiert (Barry *et al.*, 1998; Pedram & Donelson, 1999; Alarcon *et al.*, 1999). Das rechte Telomer des Chromosoms Ia (Abb. 4) ist mit einer M-ES assoziiert (El-Sayed *et al.*, 2000).

Frühere Forschungsergebnisse deuten auf eine Kontrolle der B-ES auf drei Ebenen: (i) durch DNA-Rearrangement innerhalb der verschiedenen Wiederholungssequenzen in Promotornähe (Zomerdijk *et al.*, 1990, 1991; Horn & Cross, 1997a; Rudenko *et al.*, 1998), (ii) durch Telomer-Inaktivierung (Aparicio & Gottschling 1994), oder (iii) durch DNA-Modifikation (Bernards *et al.*, 1984).

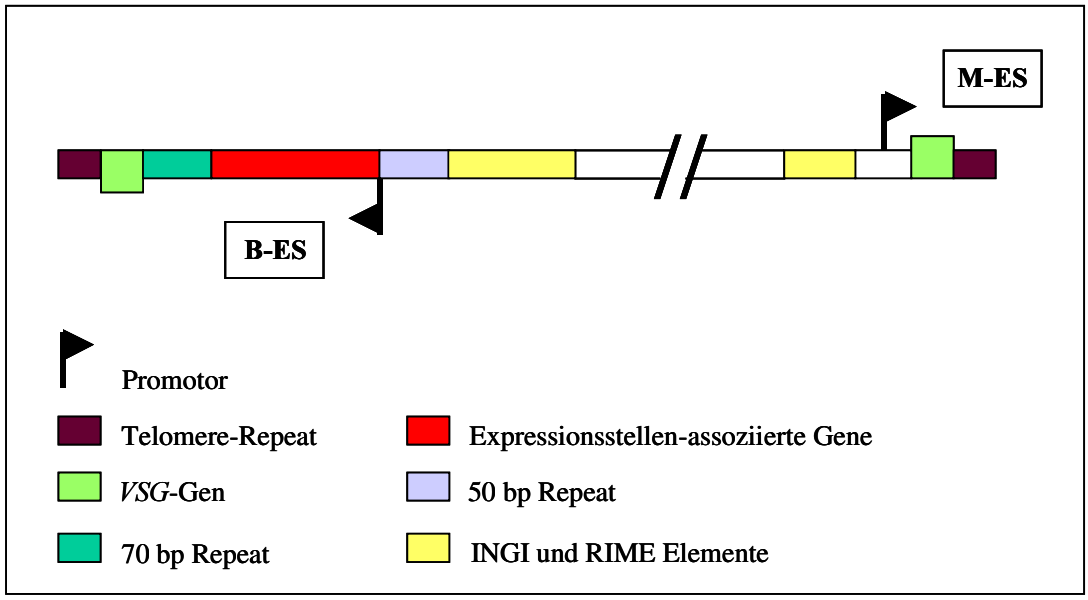



**Abb. 4: Struktur und Organisation des 1,15 Mb Chromosoms Ia von *T. brucei* (verändert nach El-Sayed *et al.*, 2000).** Die linke telomere Expressionsstelle für Blutform *VSG*-Gene (B-ES) ist 45-60 kb groß und enthält Wiederholungssequenzen und Expressionsstellen-assoziierte Gene, während die rechte telomere Expressionsstelle für metacyclische *VSG*-Gene (M-ES) 3-5 kb lang ist (Melville, 1997; Melville *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2000).

## 1.5. Antigenvariation in *T. brucei*

Wenn *T. brucei* in die Blutbahn gelangt, sind die Parasiten dem Immunsystem des Wirbeltierwirtes ausgesetzt. Als Antwort auf die Immunantwort des Wirtes wechseln die Trypanosomen ständig ihr Oberflächenglykoprotein (VSG). Dieser Mechanismus ist als Antigenvariation bekannt (Cross, 1996; Cross *et al.*, 1998). Die Antigenvariation ist verbreitet bei vielen Parasiten z. B. bei Borrelia spp., Plasmodien oder Babesien. Dabei handelt es sich meistens um Oberflägeantigene mit einer Wechselrate von $10^{-4}$ bis $10^{-2}$ (Roberts *et al.,* 1992; Allred *et al*., 1994; Wang *et al*., 1999; Barbour & Restrepo, 2000).

Die Bluttrypanosomen sind in der Lage innerhalb von nur 5-10 h ihren VSG-Mantel zu wechseln (Rudenko *et al.*, 1998). Durch den ständigen Wechsel des VSG-Mantels entziehen sich die Trypanosomen der Immunantwort ihres Wirtes. Zu Beginn einer Infektion bildet das Immunsystem des Wirtes Antikörper gegen das VSG-Molekül der eingedrungenen Parasiten. Nach wenigen Tagen werden die meisten Trypanosomen lysiert, aber einige Trypanosomen synthetisieren ein neues VSG-Molekül und überleben. Der Wirtsorganismus antwortet mit der Bildung neuer Antikörper gegen den zweiten Parasitenklon, die wiederum die meisten Trypanosomen eliminieren. Es überleben aber wieder einige Parasiten, die ein drittes VSG-Protein exprimieren. Dieser Wechsel von Antigenen kann sich bis zu 1000-mal wiederholen und führt schließlich zur Erschöpfung des Wirtes. Wie bereits oben erwähnt, enthält das Genom von *T. brucei* ca. 1000 verschiedene *VSG*-Gene, aber nur das *VSG*-Gen der aktiven Expressionsstelle wird exprimiert. Über zwei Wege können Bluttrypanosomen den Wechsel der *VSG*-Expression steuern: (i) durch Ersatz des *VSG*-Gens der aktiven Expressionsstelle durch ein anderes *VSG*-Gen und (ii) durch Inaktivierung der aktiven Expressionsstelle und Aktivierung einer anderen, inaktiven Expressionsstelle (Borst & Ulbert, 2001).

## 1.6. Transkription in *T. brucei*

Anders als die meisten Eukaryoten verwenden Trypanosomen die RNA-Polymerase I für die Transkription der mRNA und der rRNA. Es gibt verschiedene Promotoren mit ähnlichen Sequenzen für die RNA-Polymerase I in *T. brucei*, den B-ES Promotor, den M-ES Promoter und den EP/GPEET-Promotor (Kim & Donelson, 1997; Vanhamme & Pays, 1995). Die RNA-Polymerase II ist verantwortlich für die Transkription der *spliced-leader* RNA (Gilinger

& Bellofatto, 2001). Ferner besitzen die Trypanosomen eine RNA-Polymerase III für die Transkription von tRNAs und anderen kleinen snRNA (Nakaar *et al.*, 1997; Horn, 2001).
Die Trypanosomatiden haben die Besonderheit, dass einzelne Gene in Transkriptionseinheiten zusammengefasst sind und als polycistronische prä-mRNA transkribiert werden (Borst, 1986). In diesen Trankriptionseinheiten liegen funktionsgleiche oder verwandte Gene in Clustern vor und sind durch kurze, nicht kodierende Sequenzen voneinander getrennt. Das Fehlen von Introns in den Trypanosomatiden ist eine weitere Besonderheit dieser Organismengruppe. Über zwei spezielle Mechanismen, das Trans-Spleißen und die 3'-Spaltungs-Polyadenylierung, werden die polycistronischen prä-mRNAs in einzelne monocistronische mRNAs zerlegt. Durch das Trans-Spleißen wird am 5'-Ende des reifen Transkripts eine 39 bp lange *spliced leader*-Sequenz (SL oder Miniexon) und am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz angehängt (Laird, 1989; Agabian, 1990; van der Ploeg, 1992). Als Spleiß-Donorsequenz dient dabei das Dinukleotid GU, das sich in der Miniexon-Sequenz befindet. Das Dinukleotid AG am 5'-Ende der prä-mRNA dient als Spleiß-Akzeptorsequenz (Huang & Van der Ploeg, 1991). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, bei denen das Trans-Spleißen das Ergebnis von einigen Mutationen ist, ist dieser Prozess bei Trypanosomen obligatorisch für die Reifung jeder mRNA (Laird, 1989; van der Ploeg, 1992). Das Trans-Spleißen findet vermutlich kotranskriptionell statt, da man nur geringe Mengen an nicht-prozessierten Vorläufer-mRNAs detektieren kann (Ullu & Tschudi, 1993). Die Polyadenylierung erfolgt in Eukaryoten an mehreren möglichen Polyadenylierungsstellen, von denen einige stark bevorzugt werden. Ein spezifischer Faktor bindet an das Polyadenylierungssignal AAUAAA, das sich im Abstand von 15-25 Nukleotiden vor der Polyadenylierungsstelle befindet (Wickens, 1990). Im Gegensatz dazu fehlt bei Trypanosomen ein solches Polyadenylierungssignal. Stattdessen wird die Polyadenylierungsstelle von einer stromabwärts des kodierenden Transkripts gelegenen pyrimidinreichen Region bestimmt (LeBowitz *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994). Diese pyrimdinreiche Region dient gleichzeitig in der prä-mRNA als Signal für das Trans-Spleißen des stromabwärts gelegenen Transkripts. Polyadenylierung und Trans-Spleißen sind vermutlich gekoppelt und werden in der Zelle von der gleichen Maschinerie ausgeführt (Clayton, 1992; LeBowitz *et al.*, 1993; Ullu *et al.*, 1993). Bei Trypanosomen ist die Regulation der VSG-Transkription aufgrund ihrer Bedeutung für die Antigenvariation am besten untersucht. Die Transkription der Gene für die meisten Oberflächen-Proteine (VSG in der Blutform und EP/GPEET (Procycline) in der Insektenform) unterscheidet sich von der Transkription andere Gene.

*VSG*- und *Procyclin*-Gene werden durch die RNA-Polymerase I transkribiert (Lee & van der Ploeg, 1997), die bei anderen Eukaryoten für die Transkription der rRNA zuständig ist. Darüber hinaus ist die Expression der *VSG*-Gene noch von anderen zellulären Komponenten in der Blutform abhängig. So scheinen bestimmte Chromatin-Komponenten die Zugänglichkeit des DNA-Templates für Transkriptions- und Elongationsfaktoren zu beeinflussen (Qi *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 1999; Rudenko *et al.*, 1994; Horn, 2001). Bei der Inaktivierung der VSG-Expression in der Insekten-Form spielt vermutlich eine besondere Nukleotid-Glykosylierung (β-Glykosyl-Hydroxymethyluracil oder Base J) eine Rolle (Gommers-Ampt *et al.*, 1993; van Leeuwen *et al.*, 2000). Diese Basenmodifikation wurde in der 50 bp Telomer-Wiederholungssequenz in inaktiven B-ES, aber nicht in der aktiver B-ES und auch nicht in der Insekten-Form gefunden (van Leeuwen *et al.*, 1997, 1998 ).

### 1.7. Rolle von UTR-Sequenzen bei der Genregulation

Häufig weisen Gene in *T. brucei*, die in der gleichen polycistronischen Transkriptionseinheit lokalisiert sind und deren Expression somit vom gleichen Promotor kontrolliert wird, eine stadienspezifische Regulation auf. Aus einer polycistronischen prä-mRNA gehen oft unterschiedliche Mengen an individuellen mRNAs hervor. Neben dem Trans-Spleißen und der Polyadenylierung kann auch die RNA-Stabilität und der RNA-Transport reguliert sein. Zudem können Kinetoplastida ihre Genexpression posttranskriptionell über die Translation regulieren.

Positive Elemente in der nichttranslatierten Region (UTR) sind für die Stabilität der mRNA und die Translation von Genen verantwortlich, negative Elemente fungieren als Translationsrepressoren. Bei vielen Organismen wurden solche regulatorischen Motive identifiziert. Binden regulatorische Proteine an solche Elemente, wird gewöhnlich die Stabilität der mRNA erhöht (Dandekar & Sharma, 1998). Eine bekannte, phylogenetisch konservierte regulatorische Sequenz ist die ca. 30 Nukleotide lange Haarnadelstruktur mit dem Motiv 5'-CAGUGN-3', die als *Iron Responsive Element* (IRE) in der 3'-UTR der humanen Transferrinrezeptor-mRNA und in der 5'-UTR der Ferritin-mRNA, der Aconitase-mRNA von Schwein und Rind und der Succinat-Dehydrogenase-mRNA von *Drosophila* vorkommt (Dankebar & Sharma, 1998).

In Trypanosomen spielen Motive innerhalb der 3'-UTR einer mRNA eine bedeutende Rolle bei der Genregulation (Jefferies *et al.*, 1991; Hehl *et al.*, 1994; Berberof *et al.*, 1995; Hotz *et*

*al.*, 1995). So weist die 3´-UTR der Procyclin-mRNA zwei Haarnadelstrukturen auf (26-mer und 16-mer), deren Deletion die Regulation des Procyclins beeinflusst (Furger *et al.*, 1997). Andererseits konnten Zomerdijk *et al.* (1990) mit Hilfe der transienten Transfektion zeigen, dass die 5'-UTR eine Rolle bei der Kontrolle der *VSG*-Expression spielt.

### 1.8. Der Transferrinrezeptor von *T. brucei*

Bluttrypanosomen benötigen wie alle Lebewesen Eisen zu ihrer Vermehrung. Da $Fe^{3+}$-Ionen bei neutralem pH-Wert unlöslich sind, kommt für die Bluttrypanosomen nur das Transferrin des Wirtes als Quelle für Eisen in Frage, und folglich ist Transferrin ein essentieller Wachstumsfaktor für die Blutparasiten (Schell *et al.*, 1991; Steverding, 1998). Transferrin ist ein in der Leber synthetisiertes Serum-Glykoprotein von 80 kDa und fungiert als primäres Transportprotein von Nicht-Hämeisen. Die Bluttrypanosomen nehmen das Transferrin über Endozytose mit Hilfe eines speziellen Rezeptors auf (Coppens *et al.*, 1987). Der trypanosomale Transferrinrezeptor ist ein heterodimerer Proteinkomplex, der sich hinsichtlich Primärstruktur, Organisation der Untereinheiten und der Membranverankerung vom humanen Transferrinrezeptor unterscheidet (Salmon *et al.*, 1994; Ligtenberg *et al.*, 1994; Steverding *et al.*, 1994, 1995). Die beiden Untereinheiten des trypanosomalen Transferrinrezeptors werden von zwei Expressionsstellen-assoziierten Genen, *ESAG6* und *ESAG7*, kodiert. Wie die *VSG*-Gene werden *ESAG6* und *ESAG7* nur in der Blutform der Trypanosomen exprimiert. Die Aminosäuresequenzen von ESAG6 und ESAG7 weisen 60 – 70% Ähnlichkeiten zur N-terminalen Domäme des VSG auf (Salmon *et al.*, 1997). Beide Proteine besitzen eine N-terminale ER-Signalsequenz und sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 85% homolog. Nichthomologe Sequenzbereiche befinden sich in den C-terminalen Regionen der Proteine. Im Gegensatz zum humanen Transferrinrezeptor kommt der trypanosomale Transferrinrezeptor nur in sehr geringer Zahl (3000 Rezeptormoleküle/Zelle) in Bluttrypanosomen vor (Steverding *et al.*, 1994, 1995). Mittels heterologer Expression wurde gezeigt, dass der Transferrinrezeptor seinen Liganden nur nach Dimerisierung der beiden Proteinmonomere binden kann (Chaudhri *et al.*, 1994; Ligtenberg *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 1994). Für die Bindung eines Transferrinmoleküls (Steverding *et al.*, 1995) sind die Aminosäuren 209-213 und 223-237 innerhalb der C-terminalen Domänen von ESAG6 und ESAG7 verantwortlich (Salmon *et al.*, 1997). Tab. 1 vergleicht die wichtigsten Merkmale der Transferrinrezeptoren von *T. brucei* und humanen Zellen (Omary & Trowbridge 1981b;

Newman *et al.*, 1982; Trowbridge *et al.*, 1984) und Abb. 5 zeigt die mutmaßliche Struktur von ESAG6 und ESAG7 (Steverding, 2000).

**Tabelle 1: Die wichtigsten Merkmale des trypanosomalen und humanen Transferrinrezeptors.**

| **Merkmale** | **trypanosomaler TfR** | **humaner TfR** |
|---|---|---|
| Expressionstelle | *VSG*-Lokus | Chromosom 7 |
| Organisation der Untereinheiten | Heterodimer<br>ESAG6: 50-60 kDa<br>ESAG7: 40-42 kDa | Homodimer<br>jedes Monomer 95 kDa |
| postranskriptionelle Modifikation | ESAG6: 2-5 N-Glykane<br>ESAG7: 2-3 N-Glykane | Glykosylierung<br>Acylierung<br>Phosphorylierung |
| Membranverankerung | mittels GPI-Anker am C-Terminus von ESAG6 | jedes Monomer mit einer Transmembrandomäne |
| Ligand/Rezeptor Stöchiometrie | 1 Transferrin pro Rezeptor | 1 Transferrin pro Monomer |

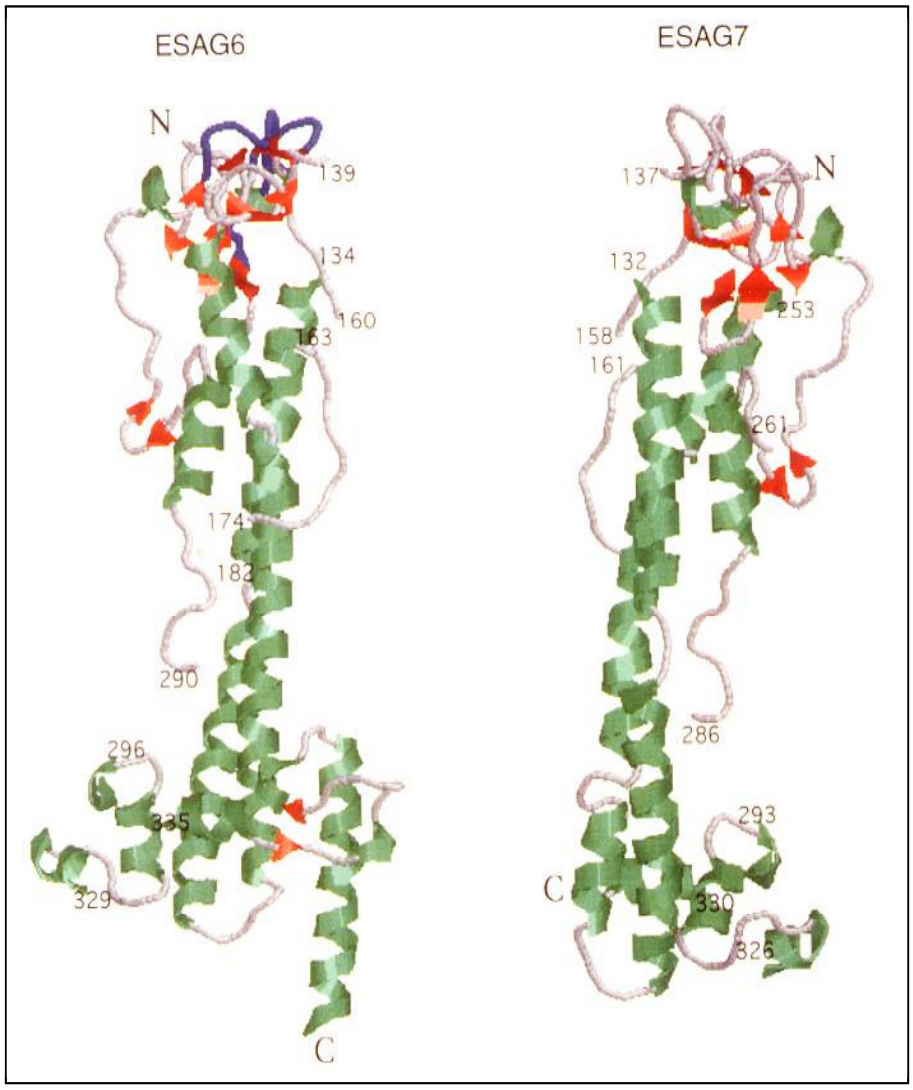



**Abb. 5: Mutmaßliche Struktur der beiden Untereinheiten ESAG6 und ESAG7 des Transferrinrezeptors von *T. brucei* (Steverding, 2000).**
Aus der bekannten dreidimensional Struktur der N-terminalen Domäne des VSG-Moleküls MITat1.2 (Blum *et al.*, 1993) wurde die mutmaßliche Struktur von ESAG6 und ESAG7 durch Homologieberechnung mit dem Programm Inside 2 (Jacobs *et al.*, 1998) ermittelt. Freie Enden sind durch Nummern der entsprechenden Aminosäuren gekennzeichnet. Die $NH_2$- und COOH-Termini sind mit N und C gekennzeichnet. α-Helices sind in grün, β-Faltblätter in rot und Oberflächeschleifen in grau dargestellt. Die an der Transferrinbindung beteiligten Bereiche sind blau markiert. Es handelt sich um die Aminosäurereste 205-215 und 223-238 (Salmon *et al.*, 1997).

Die zelluläre Aufnahme von Transferrin erfolgt bei den Bluttrypanosomen in der Flagellartasche, einer Einstülpung der Plasmamembran und dem einzigen Bereich der Zelloberfläche, wo Endo- und Exozytoseprozesse stattfinden (Balber *et al.*, 1990; Webster & Russel, 1993; Landfear & Ignatushchenko, 2001). Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Bluttrypanosomen zeigten, dass der Transferrinrezeptor überwiegend im Lumen der Flagellartasche vorkommt und nur in geringer Menge in der Flagellartaschemembran und in intrazellulären Vesikeln (Steverding *et al.*, 1994). Das Transferrin wird in der Flagellartasche von seinem Rezeptor gebunden (Abb. 6). Anschließend wird der Ligand-Rezeptor-Komplex in das Endosom transportiert. Der niedrige pH-Wert bewirkt die Freisetzung des Eisens aus dem Transferrin (Princiotto & Zapolski, 1975; Lestas, 1976). Aufgrund der niedrigen Affinität des Transferrinrezeptors für eisenfreies Transferrin (Apotransferrin) dissoziiert der Ligand-Rezeptor-Komplex (Maier & Steverding, 1996). Während das Transferrin ins Lysosom befördert und dort proteolytisch abgebaut wird (Grab *et al.*, 1992; Steverding *et al.*, 1995), wird der Transferrinrezeptor vermutlich wieder zurück zur Flagellartasche transportiert (Steverding *et al.*, 1995; Steverding, 2000; Kabiri & Steverding, 2000). Während das Eisen in der Zelle verbleibt, werden die Abbauprodukte des Transferrins ans Medium abgegeben (Steverding *et al.*, 1995). Damit unterscheidet sich die Transferrinaufnahme der Trypanosomen vom Transferrinzyklus der Säugetierzellen (Klausner *et al.*, 1983), ähnelt aber der Internalisierung von Lipoproteinen geringer Dichte und Asialoglykoproteinen durch humane Zellen (Goldstein *et al.*, 1975; Bridges *et al.*, 1982). Die Effizienz der Transferrinaufnahme des trypanosomalen Transferrinrezeptors ist geringer als die des humanen Transferrinrezeptors. Im Vergleich zum humanen Transferrinrezeptor, der 18 Transferrinmoleküle pro Stunde und Rezeptor aufnimmt (Iacopetta *et al.*, 1982), transportiert der trypanosomale Transferrinrezeptor ca. 4,5 Transferrinmoleküle pro Stunde und Rezeptor (Steverding, 2000).

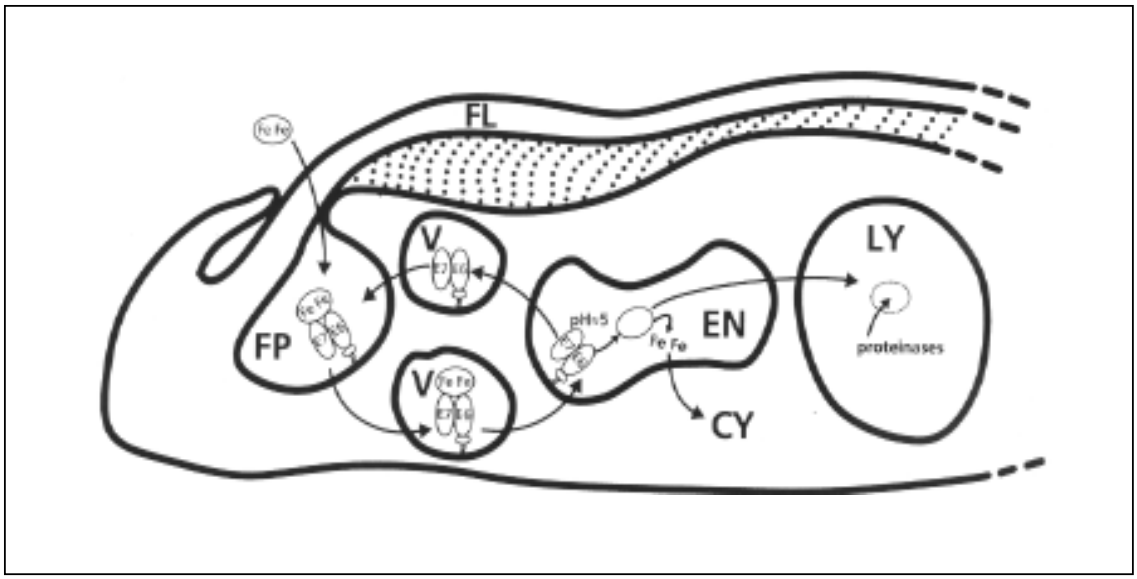



**Abb. 6: Transferrinaufnahme in Bluttrypanosomen (Steverding, 2000).** Einzelheiten siehe Text. FP: Flagellartasche; FL: Flagellum; EN: Endosom; CY: Cytoplasma; V: Endo-und Exozytosevesikel; LY: Lysosom; Ellipsoid mit Eisen: Holotransferrin (eisenbeladenes Transferrin).

### 1.9. Eisenabhängige Regulation des Transferrinrezeptors

Wie der humane Transferrinrezeptor wird auch der trypanosomale Transferrinrezeptor eisenabhängig reguliert. So ist die Rate der Transferrinaufnahme und die Menge des Transferrinrezeptors in Bluttrypanosomen bei Eisenmangel dreifach erhöht (Fast *et al.*, 1999). Auch eine Erhöhung der *ESAG6*-mRNA Menge bei Eisenmangel konnte beobachtet werden (Fast *et al.*, 1999). Die gleichen Effekte wurden auch bei den Rinderserum adaptierten Bluttrypanosomen beobachtet, wenn diese in Schwein- oder Pferdeserum kultiviert wurden (Fast *et al.*, 1999). Die Erhöhung der Expression des Transferrinrezeptors wurde nach Zugabe von Rindertransferrin wieder aufgehoben (Fast *et al.*, 1999). Da aber die Menge der *VSG*-mRNA bei Eisenmangel unbeeinflusst blieb, lässt dies auf eine posttranskriptionelle Regulation des Transferrinrezeptors schließen (Fast *et al.*, 1999). Da unter bestimmten Bedingungen niedrig-affine Transferrine einen Eisenmangel bei Bluttrypanosomen auslösen können (Gerrits *et al.*, 2002), scheint die physiologische Rolle der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors ein Anpassungsmechanismus zu sein.

Im humanen System ist die Regulation des Transferrinrezeptors weitgehend aufgeklärt. Da Eisen eine essentielle zelluläre Komponente ist, aber auch toxische Reaktionen auslösen kann, ist die Regulation von Eisenproteine von großer bedeutung für die Zelle. (Hentze, 1995; Hentze & Kühn, 1996; Rouault & Klausner, 1997; Eisenstein, 2000; Rouault, 2000). Bei Eisenmangel binden *Iron Regulatory Proteins* (IRPs) an Haarnadelstrukturen innerhalb der 3'-UTR der Transferrinrezeptor-mRNA (Casey *et al.*, 1989; Horowitz & Harford, 1992). Bei diesen Haarnadelstrukturen handelt es sich um phylogenetisch konservierte Sequenzen von ca. 30 Nukleotiden, die als *Iron Responsive Elements* (IREs) bekannt sind. Im Fall der humanen Transferrinrezeptor-mRNA kommen fünf IRE-Sequenzen in der 3'-UTR vor (Abb. 7). Durch die Bindung von IRPs an die IREs wird das Transkript stabilisiert und vor dem Abbau durch Endonuklease geschützt, was zu einer erhöhten Translationsrate führt (Müllner *et al.*, 1989).

Bei den IRPs handelt es sich um Aconitasen und verwandte Proteine (Hentze *et al.*, 1996; Eisenstein, 2000; Rouault , 2000; Aisen *et al.*, 2001).

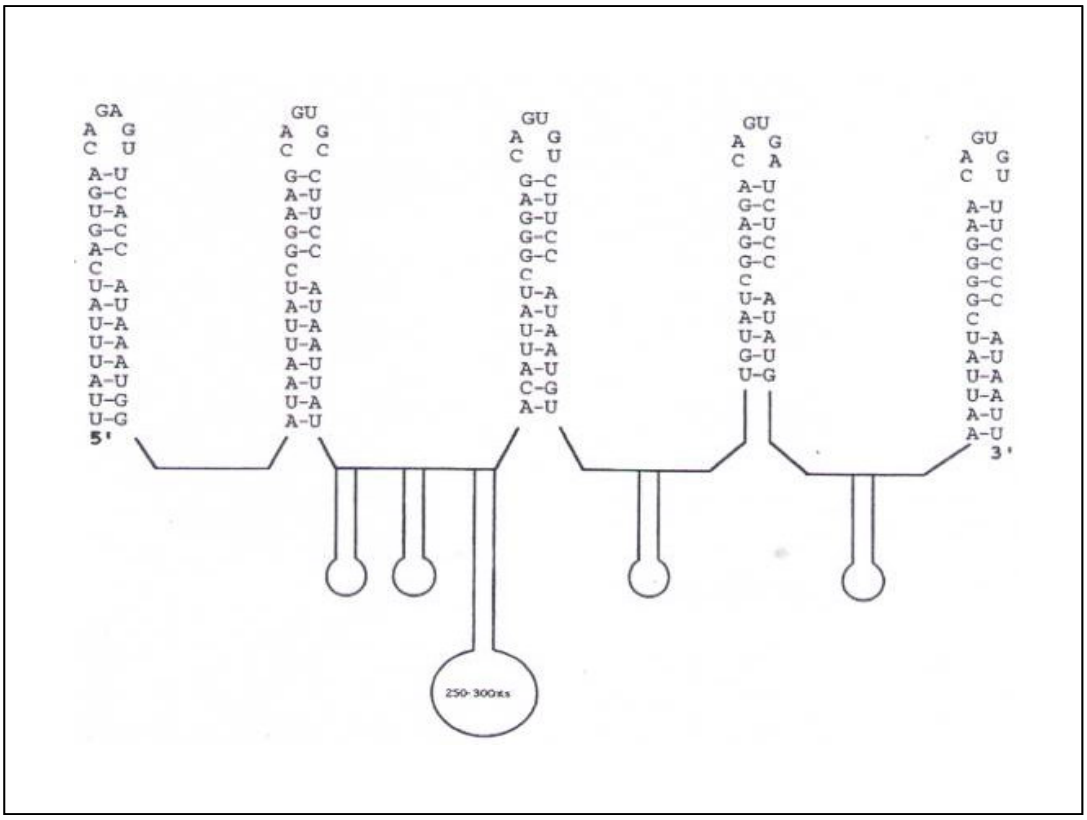



**Abb. 7: Iron Responsive Elements (IREs) in der 3'-UTR der humanen Transferrinrezeptor-mRNA (Müllner & Kühn, 1988).** Die 5 Haarnadelstrukturen (*stem-loops*) mit konservierten Sequenzen sind in der Nukleotidesequenz dargestellt, während andere Sequenzabschnitte durch Linien repräsentiert sind.

## 1.10. Adenylatkinasen

Nukleosidmonophosphat-Kinasen (NMP-Kinasen) gehören zu einer Familie von ubiquitären Enzymen, die den reversiblen Transfer einer Phosphatgruppe von einem Nukleosidtriphosphat auf ein Nukleosidmonophosphat katalysieren, und sind deshalb wichtige Bindeglieder zwischen dem Energie- und Biosynthesemetabolismus. Aufgrund der Diskriminierung zwischen verschiedenen Nukleosidmonophosphaten sind die einzelnen NMP-Kinasen in Adenylat-, Cytidylat-, Thymidylat- und Uridylat-Kinasen unterteilt worden. Unter den NMP-Kinasen sind die Adenylatkinasen am besten charakterisiert. Bei den Adenylatkinasen (auch ATP/GTP:AMP-Phosphotransferase genannt) handelt es sich um monomere ubiquitäre Enzyme, die die Reaktion NTP + AMP ↔ NDP + ADP katalysieren (Noda, 1973; Atkinson, 1977).

Diese Reaktion ist eine reversible Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf das Nukleosidmonophosphat und benötigt $Mg^{2+}$ als essentiellen Cofaktor. Es handelt sich hierbei um einen Phosphoryltransfer mit Konformationsumkehr der übertragenen γ-Phosphatgruppe, wobei das $Mg^{2+}$ wahrscheinlich zur Erhöhung der Elektrophilie der Abgangsgruppe und zur Stabilisierung des Übergangszustandes beiträgt. Die wichtigste Rolle der Adenylatkinasen in der Zelle ist die Regulation des Gleichgewichts zwischen ATP und ADP. Im Stoffwechsel der Zelle übt ATP eine wichtige Funktion als Energieträger und bei der Synthese von Nukleinsäuren aus. Adenylatkinasen kommen in besonders großen Mengen in Geweben mit hohem Energie-Umsatz vor, was zum Energie-Transfer der β- und γ-Phosphatgruppe beiträgt und ATP-abhängige, zelluläre Prozesse reguliert (Zeleznikar *et al.*, 1990; Dzeja & Terzic, 1998; Dzeja *et al.*, 1998, 1999). Allgemein spielen NMP-Kinasen eine zentrale Rolle bei der *de novo* Synthese von NMPs und dNMPs.

Die Adenylatkinasen von *Escherichia coli* und von Hefen wurden bisher am besten charakterisiert (Müller & Schulz, 1992, 1998). In Wirbeltieren findet man verschiedene Adenylatkinasen im Cytosol (Adenylatkinase 1, AK1), im mitochondrialen Zwischenraum (Adenylatkinase 2, AK2) und in der mitochondrialen Matrix (Adenylatkinase 3, AK3) (Khoo & Russell, 1972; Tomasselli & Noda, 1979; Noma *et al.*, 1998, 2000). Weiterhin wurden zwei Adenylatkinase-Isoformen (AK4 und AK5) beim Menschen identifiziert (Yoneda *et al.*, 1998; van Rompay *et al.*, 1999). Adenylatkinase 5 wurde im Cytosol von Hirngewebe lokalisiert und besitzt sowohl ATP:AMP- als auch GTP:AMP-Phosphotransferase-Aktivität (van Rompay *et al.*, 1999). Die verschiedenen Adenylatkinasen unterscheiden sich in ihrer Größe (20-25 kDa) und durch eine Insertionssequenz von etwa 30 Aminosäuren im C-terminalen

Bereich (LID-Region), welche in der dreidimensionalen Struktur als viersträngiges β-Faltblatt hervortritt (Diederichs & Schluz, 1991; Fukami-Kobayashi *et al.*, 1996). Im N-terminalen Bereich befindet sich der P-Loop mit dem konservierten Motiv GXGXXGKTT als ATP-Bindungsstelle. Dieses Sequenzmotiv ist essentiell für die Interaktion zwischen einem Phosphat des Donornukleosids und dem Enzym und liegt in der Mitte der NMP-Bindungstasche, einem an hydrophoben Aminosäuren reichen Sequenzabschnitt mit auffällig zahlreichen, konservierten Argininen.

Zu der kurzen Enzym-Variante gehören die AK1, die bevorzugt AMP als Phosphoryl-Akzeptor verwendet und im Cytosol von Vertebraten vorkommt, und die UMP/CMP-Kinasen, die bevorzugt UMP und CMP als Nukleosidmonophosphat-Substrate benutzen. Zu der großen Enzym-Variante gehören die AK2 und die AK3, die GTP vor ATP bevorzugen (Nakazawa *et al.*, 1990) und pflanzliche Adenylatkinasen.

Anhand der Kristallstuktur der Adenylatkinase aus Hefe und *E. coli* konnte die Substratbindungsstelle identifiziert werden. Mit dem Bisubstratinhibitor Diadenosinpentaphosphat ($AP_5A$) konnten die Nukleosidbindungsregionen nachgewiesen, aber nicht die Bindungsorte von ATP und AMP unterscheiden werden (Müller & Schulz, 1998, 1992). Durch Bindung von AMP an Rinder-AK3 und GMP an Guanylatkinase konnte schließlich die NMP-Bindungsstelle identifiziert werden (Diederichs & Schulz,1990; Berry *et al.*, 1994, 1990; Stehle & Schulz, 1990). Darüber hinaus konnten mit Hilfe von substratgebundener Adenylatkinase aus *E. coli* (Abb. 8) umfangreiche Domänenbewegungen analog der Hexokinase gemessen werden (Bennett & Steitz, 1980). Bei Substratbindung verändert die Adenylatkinase ihre Konformation vom offenen Zustand in den geschlossenen Zustand. Mit Hilfe von $AP_5A$ konnte gezeigt werden, dass die LID-Domäne infolge einer Scherbewegung der benachbarten α-Helices der NMP-Bindungsdomäne in einer Schanierbewegung das Akzeptorsubstrat bedeckt. Auf diese Weise erreicht das Enzym die geschlossene, katalytisch aktive Konformation (Deusicke *et al.*, 1986; Schulz *et al.*, 1990; Berry *et al.*, 1994). Dieser als *Induced Fit* bezeichnete Mechanismus und ihre Rolle als Phosphotransferase prädestiniert die Adenylatkinase als Modell zur Erforschung von Struktur und Dynamik eines Enzyms.

In den Kinetoplastida (Trypanosomen) kommen Adenylatkinasen im Glycosom und vermutlich auch in anderen Zellkompartimenten vor (McLaughin, 1985).

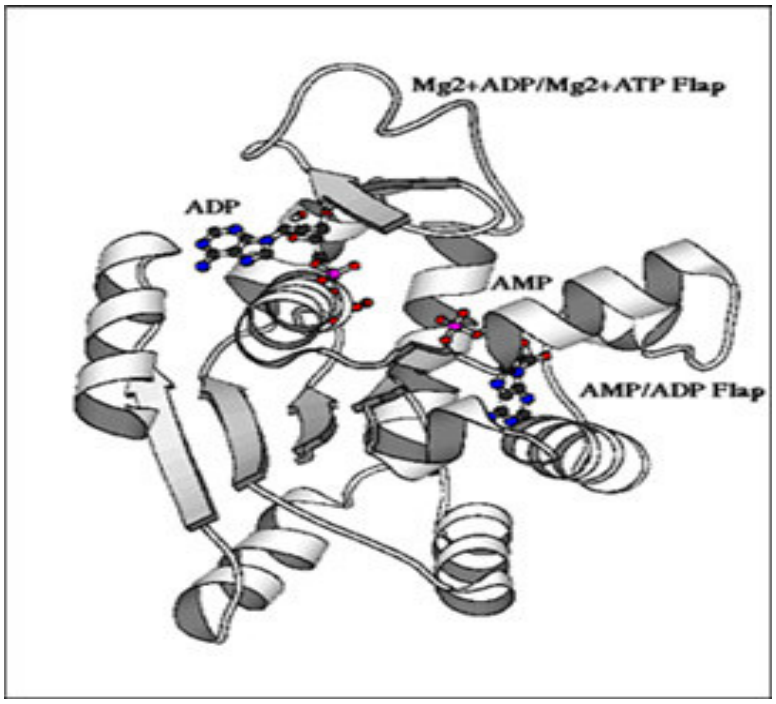



**Abb. 8: Modell der geschlossenen Konformation der *E. coli*-Adenylatkinase im Komplex mit AMP und AMPPNP (Berry *et al.*, 1994).**

## 1.11. Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Sekundärstrukturen in der 5'-UTR von *ESAG6* und *ESAG7* als IREs für die eisenabhängige Regulation der Expression des Transferrinrezeptors in Bluttrypanoosmen dienen. Dazu sollte zunächst das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen als Reportergen ausgetauscht und dessen Expression bei Eisenmangel bestimmt werden. Anschließend sollte ein Teil der 5'-UTR deletiert werden. Wenn die 5'-UTR als IRE fungiert, dann sollte im Gegensatz zu den Ausgangszellen das Reportergen in den Deletionsmutanten nicht eisenabhängig reguliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Untersuchungen zur Aktivität und Substratspezifität sowie Kristallisationsversuche einer klonierten *T. brucei*-NMP-Kinase durchgeführt werden. Anhand der Substratspezifität sollte eine Klassizifierung der *T. brucei*-NMP-Kinase vorgenommen werden.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Material

### 2.1.1. Reagenzien

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.**

| **Chemikalie** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Acrylamidlösung | Biorad |
| Adenosin | Sigma |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Merck |
| Ammonium-Eisen-Citrat | Sigma |
| Ampicillin | Sigma |
| Bacto-Agar | Difco |
| Bacto-Trypton | Difco |
| Desferoxamin | Sigma |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck |
| EMEM-Medium | Biowhittaker |
| Ethylenglykol-bis-2-(aminomethyl)-tetracetat (EGTA) | Roth |
| Ethidiumbromid | Sigma |
| Transepoxysuccinyl-L-Leucylamido (4-guanidino)butane (E64) | Sigma |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Seromed |
| Glutamin (100X) | Biowhittaker |
| Glycerin | Roth |
| Hefe-Extrakt | Difco |
| 2-[4-(2-Hydroxy)-1-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES) | Roth |
| Hypoxanthin | Sigma |
| Isopropylthiogalactosid (IPTG) | Roth |
| Mercaptoethanol | Sigma |
| Milchpulver | Biorad |
| Na-Pyruvat | Merck |
| Nichtessentielle Aminosäuren(100X) (NEAA) | Biowhittaker |
| Neomycin (G418) | Calbiochem |
| Pepstatin | Sigma |
| Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) | Sigma |
| Proteinase K | Roth |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Roth |
| RNase I | Qiagen |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Merck |
| T4-DNA-Ligase | Pharmacia |
| T4-Kinase | Pharmacia |
| Taq-Polymerase | Böhringer |

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.**

| **Chemikalie** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Taq-Polymerase–Reaktionspuffer (10X) | Böhringer |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma |
| p-Tosyl-L-Lysinchlormethylketone (TLCK) | Sigma |
| Thymidin | Sigma |
| Tricine | Sigma |
| Tris-EDTA | Merck |
| Tween 20 | Merck |

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen Merck, Sigma und Roth.

**Tabelle 3: Verwendete Antibiotika.**

| **Antibiotikum** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Ampicillin (100mg/ml) | Sigma |
| Neomycin (G418) (50 mg/ml) | Calbiochem |
| Penicillin/Streptomycin (100X) | Biowhittaker |
| Tetracyclin (10 mg/ml) | Sigma |

**Tabelle 4: Verwendete Enzyme.**

| **Enzym** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Restriktionsenzyme | Biolabs, Promega oder MBI Fermentas |
| Taq-Polymerase | Promega oder Eppendorf |
| Pfu-Polymerase | Promega oder Stratagene |
| Ligase | Biolabs oder Biozym |
| Phosphatase | Promega |
| T4-Kinase | Promega |

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper.**

| **Antikörper** | Bezugsquelle |
|---|---|
| anti-NPTII Kaninchen Antikörper | Biozol oder Biomol |
| anti-TbAK Kaninchen Antikörper | Eurogentec |
| anti-TbTfR Kanninchen Antikörper | Steverding *et al*., (1994) |
| Anti-VSG-Kanninchen Antikörper | Dr. D. Steverding |
| anti-Kaninchen Ziege-HRP Antikörper | Santa Cruz |

**Tabelle 6: Verwendete Marker.**

| **Marker** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Cruz Marker | Santa Cruz |
| Multicolored Marker | Invitrogen |
| Coomassie-Marker | Sigma |
| 1 kb Ladder | Biolabs oder MBI Fermentas |
| 100 bp Ladder | Boehringer, MBI Fermentas |
| DNA-Marker IV | Boehringer |
| RNA-Marker II | Boehringer |
| DIG-RNA-Marker | Boehringer |

**Tabelle 7: Verwendete Kits.**

| **Kit** | Bezugsquelle |
|---|---|
| Plasmid-Extraktions-Kit | Qiagen |
| RNA-Extraktions-Kit | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen |
| DNA-Extraktions-Kit | Qiagen |
| QIAquick PCR-Purification Kit | Qiagen |
| Bradford-Kit | Biorad |
| DIG-Labelling-Kit | Boehringer-Manheim |
| ECL-Kit | Amersham |
| Entwickler | Agfa |
| Fill-In-Kit | Stratagene |
| Fixierer | Agfa |
| Hyperfilm-ECL | Amersham |
| Kristallisations-Kit | Hampton |
| Ligationskit | Biozym |
| Ready to Go Ligase | Amersham |
| Ready zo Go PCR | Amersham |
| BCA-Kit | Pierce |
| Ready to Go RT-PCR | Amersham |

**Tabelle 8: Verwendete Vektoren.**

| **Vektor** | Bezugsquelle |
|---|---|
| pHD599 | Prof. Clayton, ZMBH Heidelberg |
| pHD597 | Prof. Clayton, ZMBH Heidelberg |
| pUT352 | Cayla |
| PCBM.NEO | Dr. Andrews, Uni Heidelberg |
| pQE30 | Qiagen |

**Tabelle 9: Verwendete wichtige Oligonukleotidprimer.**

| **Primer** | Sequenz |
|---|---|
| NeoF<br>NeoR | 5´-GGC CAA GCT TGG ATG GAT TGC CAC GC-3´<br>5´-TTC AGA ATT CCT GCA GCC CGG GGA T-3´ |
| UT1R<br>UT2F | 5´-CCG CTT CGT TAC TGA AAA AAA T-3´<br>5´-AAA GTG ATA TCT AGA ACT AGA TAC C-3´ |
| ActF<br>ActR | 5´-ACA CAA CGT GCT ACT GAC TGA GGC-3´<br>5´-GCA CTG TTC GTC ATC TCT TCG TCG-3´ |

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von den Firmen Interactiva und MWG-Biotech synthetisiert.

### 2.1.2. Puffer und Lösungen

#### 2.1.2.1. Lösungen für die Elektrophorese

##### 2.1.2.1.1. Lösungen für die DNA- und RNA-Elektrophorese

**50X TAE:**

2 M Tris
50 mM EDTA
pH 7,5 mit Essigsäure

**10X TBE:**

1 M Tris
1 M Borsäure
20 mM EDTA
pH 8,0 mit Essigsäure

**DNA-Probenpuffer:**

0,1% Bromphenolblau
1 mM Tris
60% Saccharose
pH 8,3 mit HCl

**10X MEA:**

20 mM MOPS
5 mM Na-Acetat
1 mM EDTA
pH 8,0 mit HCl

**RNA-Denaturierungspuffer:**

65% Formamid
20% Formaldehyd
13% 10X MEA

**RNA-Probenpuffer:**

50% Glycerin
1 mM EDTA
0.4% Bromphenolblau

**TE-Puffer:**

10 mM Tris
1 mM EDAT
ph 8,0 mit HCl

#### 2.1.2.1.2. Lösungen für die Protein-Elektrophorese

**10X Elektrophoresepuffer:**

| | |
|---|---|
| 25 mM | Tris |
| 192 mM | Glycin |
| 0,1% | SDS |

**4X Probenpuffer:**

| | |
|---|---|
| 0,25 mM | Tris |
| 8% | SDS |
| 40% | Glycerin |
| 0,0045% | Bromphenolblau |
| 100 mM | D,L-Dithiothreitol |
| pH 6,8 | mit HCl |

**4X Trenngelpuffer:**

| | |
|---|---|
| 1,5 mM | Tris |
| 0,4% | SDS |
| pH 8,8 | mit HCl |

**12%iges Trenngel:**

| | |
|---|---|
| 1,25 ml | 4X Trenngelpuffer |
| 1,95 ml | 30% Acrylamid |
| 1,3 ml | $H_2O$ |
| 25 µl | 10% APS |
| 2,5 µl | TEMED |

**4X Sammelgelpuffer:**

| | |
|---|---|
| 0,5 M | Tris |
| 0,4% | SDS |
| pH 6,8 | mit HCl |

**4%iges Sammelgel:**

| | |
|---|---|
| 0,75 ml | 4X Sammelgelpuffer |
| 0,528 ml | 30% Acrylamid |
| 1,72 ml | $H_2O$ |
| 27 µl | 10% APS |
| 9 µl | TEMED |

**Coomassie-Färbelösung:**

| | |
|---|---|
| 0,5% | Coomassie Brillant Blue R250 |
| 10% | Essigsäure |
| 30% | 2-Propanol |

**Coomassie-Entfärberlösung:**

| | |
|---|---|
| 7,5% | Essigsäure |
| 5% | Ethanol |

**Western-Blotting:**

| | | |
|---|---|---|
| Anodenpuffer I: | 300 mM | Tris |
| Anodenpuffer II: | 25 mM | Tris |
| Kathodenpuffer: | 40 mM | 6-Aminohexansäure |

**10X TBS-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 100 mM | Tris |
| 1,5 M | NaCl |
| pH 8,0 | mit HCl |

**TBST-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 0,05% | Tween 20 |
| 100 ml | 10X TBS-Puffer |
| ad 1000 ml | mit $H_2O$ |

**Blockierungspuffer:**

| | |
|---|---|
| 5% | Milchpulver |
| in | TBST-Puffer |

**Inkubationspuffer:**

| | |
|---|---|
| 5% | Pferdeserum |
| 0,1% | Milchpulver |
| in | TBST-Puffer |

**Ponceau-Färbelösung:**

| | |
|---|---|
| 1% | Ponceau S |
| 1% | Essigsäure |

**Ponceau-Entfärber-Lösung:**

| | |
|---|---|
| 1% | Essigsäure |

**Stripping-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 100 mM | β-Mercaptoethanol |
| 2% | SDS |
| 62,5 mM | NaCl |

**5X Ultraschall-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 6,97 mM | $NaH_2PO_4$ |
| 43,02 mM | $NaHPO_4$ |
| 300 mM | NaCl |

### 2.1.2.2. Lösungen für die Herstellung von *T. brucei* Zell-Lysaten

**SB-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 3 mM | $KH_2PO_4$ |
| 60 mM | $Na_2HPO_4$ |
| 45 mM | NaCl |
| 50 mM | Glucose |

**Lyse-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 50 mM | HEPES |
| 2,5 mM | EDTA |
| 2 mM | EGTA |
| pH 7,0 | mit NaOH |

**Protease-Inhibitoren:**

| | |
|---|---|
| 100 mM | TLCK in $H_2O$ |
| 200 mM | PMSF in Isopropanol |
| 10 mM | Leupeptin in $H_2O$ |
| 1 mg/ml | E64 in $H_2O$ |
| 1 mg/ml | Pepstatin in $H_2O$ |

**10X PBS-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 136 mM | NaCl |
| 37,7 mM | KCl |
| 4,9 mM | $Na_2HPO_4$ |
| 71,6 mM | $KH_2PO_4$ |

### 2.1.2.3. Puffer für die Nukleinsäurepräparation

**Puffer P1:**

| | |
|---|---|
| 50 mM | Tris |
| 10 mM | EDTA |
| 100 mg/ml | RNase A |
| pH 8,0 | mit HCl |

**Puffer P2:**

| | |
|---|---|
| 200 mM | NaOH |
| 1% | SDS |

**Puffer P3:**

| | |
|---|---|
| 3,0 M | K-Acetat |
| pH 5,5 | mit Essigsäure |

**Puffer QC:**

| | |
|---|---|
| 1 M | NaCl |
| 50 mM | MOPS |
| 15% | Isopropanol |
| pH 7,0 | mit NaOH |

**Puffer QBT:**

| | |
|---|---|
| 750 mM | NaCl |
| 50 mM | MOPS |
| 15% | Isopropanol |
| 0,15% | Triton X-100 |
| pH 7,0 | mit NaOH |

**Puffer QF:**

| | |
|---|---|
| 1,25 mM | NaCl |
| 50 mM | Tris |
| 15% | Isopropanol |
| pH 8,5 | mit HCl |

**TE-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 10 mM | Tris |
| 1 mM | EDTA |
| pH 7,5 | mit HCl |

**10X STE-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 1 M | NaCl |
| 200 mM | Tris |
| 100 mM | EDTA |
| pH 7,5 | mit HCl |

**EA-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 0,5 ml | 1 M Tris, pH 8,0 mit HCl |
| 12,5 ml | 1 M NaCl |
| 0,25 ml | 100% NP-40 |
| 36,7 ml | $H_2O$ |

**EB-Puffer:**

| | |
|---|---|
| 0,5 ml | 1 M Tris, pH 8,0 mit HCl |
| 0,5 ml | 1 M NaCl |
| 2,5 ml | 0,2 M EDTA |
| 2,5 ml | 10% SDS |
| 46 ml | $H_2O$ |

### 2.1.3. Zellkulturen

#### 2.1.3.1. Bakterienkultur

##### 2.1.3.1.1. Bakterienstämme

| | |
|---|---|
| *E. coli* DH 5α, Bezugsquelle: | Prof. C. Clayton, |
| | Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg |
| *E. coli* XL1-Blue, Bezugsquelle: | Prof. K. Becker-Brandenburg, |
| | Universität Gießen |

##### 2.1.3.1.2. Medien für die Bakterienkultur

**LB-Medium:**

| | |
|---|---|
| 10 g | Pepton |
| 5 g | Hefe-Extrakt |
| 10 g | NaCl |
| ad 1000 ml | mit $H_2O$ |

**LB-AMP-Medium:**

| | |
|---|---|
| 70 mg/ml | Ampicillin in LB-Medium |

**LB-Agar:**

| | |
|---|---|
| 100 mg/ml | Ampicillin |
| 1,5% | Bacto-Agar |
| in | LB-Medium |

**SOB-Medium:**

| | |
|---|---|
| 20 g | Trypton |
| 5 g | Hefe-Extrakt |
| 590 mg | NaCl |
| 190 mg | KCl |
| pH 7,0 | mit NaOH |
| ad 1000 | ml $H_2O$ |

**Einfriermedium:**

| | |
|---|---|
| 15% | Glycerin |
| in | LB-AMP-Medium |

**SOC-Medium:**

| | |
|---|---|
| 10 mM | $MgSO_4$ |
| 20 mM | Glucose |
| in | SOB-Medium |
| pH 7,0 | mit NaOH |
| | steril filtrieren |

**$CaCl_2$-Lösung:**

| | |
|---|---|
| 50 mM | $CaCl_2$ |
| 10% | Glycerin |

### 2.1.3.2. Trypanosomenkultur

#### 2.1.3.2.1. Trypanosomen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Trypanosomen handelt es sich um kultur-adaptierte, monomorphe Blutformen der *T. brucei brucei* Zelllinie TC221 (Hirumi *et al.*, 1980).

#### 2.1.3.2.2. Medien für die Trypanosomenkultur

**Basis Baltz-Medium:**

| | |
|---|---|
| 3 g | HEPES |
| 0,5 g | Glucose-Monohydrat |
| 0,11 g | Na-Pyruvat |
| 0,007 g | Hypoxanthin |
| 0,002 g | Thymidin |
| 0,0107 g | Adenosin |
| 0,0141 g | Bathocuproinsulfonat |
| in | 50 ml EMEM-Medium lösen |
| pH | mit NaOH auf 7,5 einstellen |
| | steril zu den restlichen 450 ml EMEM geben |
| 5 ml | 100X NEAA zugeben |

**Komplettes Baltz-Medium:**

| | |
|---|---|
| 40 ml | Basis Baltz-Medium |
| 0,4 ml | 0,14% β-Mercaptoethanol |
| 0,4 ml | 100X Penicillin/Streptomycin-Lösung |
| 8 ml | hitze-inaktiviertes FCS |
| | steril filtrieren |

**0,14% β-Mercaptoethanol:**

| | |
|---|---|
| 14,2 µl | β-Mercaptoethanol |
| 10 ml | $H_2O$ |
| | steril filtrieren |

**Einfriermedium:**

| | |
|---|---|
| 90% | komplettes Baltz-Medium |
| 10% | Glycerin oder DMSO |
| | steril filtrieren |

**Elektroporationspuffer:**

| | |
|---|---|
| 2 mM | EGTA |
| 120 mM | KCl |
| 0,15 mM | $CaCl_2$ |
| 10 mM | $K_2HPO_4/KH_2PO_4$, pH 7,6 |
| 25 mM | HEPES |
| 5 mM | $MgCl_2$ |
| 0,5% | Glucose |
| 1 mM | Hypoxanthin |
| 100 mg/ml | BSA (Fraktion V, entfettet) |
| | steril filtrieren und bei 4°C lagern |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkulturtechniken

#### 2.2.1.1. Trypanosomenkulturtechniken

##### 2.2.1.1.1. Kultivierung von Trypanosomen

Monomorphe Bluttrypanosomen des Stammes TC221 wurden in Baltz-Medium (Baltz *et al.*, 1985) mit 16,7% FCS bei 37°C und 5% $CO_2$ kultiviert. Unter diesen Bedingungen verzehnfachen sich die Zellen etwa alle 24 Stunden. Bei Erreichen einer Zelldichte von $1 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Kulturen 1:100 verdünnt.

##### 2.2.1.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Diese ist in 25 Quadrate eingeteilt, die ihrerseits jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Nachdem die Zählkammer mit einem Deckglas bedeckt wurde, wurden zweimal 10 µl Kultur hineinpipettiert. Unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung wurde die Zahl der lebenden Trypanosomen in den 16 Quadraten bestimmt. Das Ergebnis mit $10^4$ multipliziert ergab dann die Zellzahl/ml der Kultur.

#### 2.2.1.1.3. Lagerung von Trypanosomen

Gut gewachsene Trypanosomenkulturen ($1 – 2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert ($1 \times 10^6$ Zellen/ml) und 1 ml ($10^6$ Zellen) in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden über Nacht bei –80°C langsam eingefroren und am nächsten Tag im flüssigen Stickstoff gelagert.

#### 2.2.1.1.4. Transfektion von Bluttrypanosomen

Die Transfektion von Bluttrypanosomen ermöglicht die Integration von DNA-Fragmenten durch homologe Rekombination ins Genom. Das zu transfektierende DNA-Fragment muss an einer Stelle spaltbar sein, die dem Intergrationslokus homolog ist (Jefferies *et al.*, 1983; Laban *et al.*, 1990; Li & Gottesdiener, 1996). Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Plasmide wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Xho*I gespalten, gereinigt, steril getrocknet und in sterilem Wasser zu einer Konzentration von 2 µg/µl gelöst. Bluttrypanosomen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($2 – 3 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 1 ml Elektroporationspuffer resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurde in 0,4 ml Elektroporationspuffer zu einer Dichte von $1{,}75 \times 10^7$ Zellen resuspendiert und in Elektroporationsküvetten pipettiert. Linearisierte DNA-Plasmide (20 µg) wurden mit den Zellen gemischt und es wurde sofort bei 1,6 – 2,5 kV und 24 Ω elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in 20 ml komplettem Baltz-Medium resuspendiert, auf 4 Kulturflaschen verteilt und bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Selektion mit 25 µg/ml Neomycin in komplettem Baltz-Medium in einer 24-Loch-Kulturplatte. Die nach 7 – 14 Tagen ausgewachsenen Klone wurden kultiviert und charakterisiert.

### 2.2.1.2. Bakterienkulturtechniken

#### 2.2.1.2.1. Lagerung von Bakterienkulturen

Logarithmisch gewachsene *E. coli*-Zellen ($OD_{600}$ ~1) wurden bei 4°C für 15 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen (500 µl) wurden in Kryoröhrchen pipettiert und bei –80°C gelagert.

#### 2.2.1.2.2. Herstellung von kompetenten Zellen

**Elektrokompetente Zellen (*E. coli*-DH 5α):** Zellen aus einer tiefgefrorene Glycerinkultur wurden zunächst auf eine LB-AMP-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml LB-AMP-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C und 230 rpm als Vorkultur geschüttelt bis eine leichte Trübung zu erkennen war. Die Vorkultur wurde mit 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 230 rpm in einem 2,5 l Kolben bis zu einer $OD_{550}$ von etwa 0,6 geschüttelt. Danach wurde die Kultur auf Eis für 10 min inkubiert und bei 4°C für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert, mit Wasser auf 250 – 500 ml verdünnt und zweimal bei 4°C für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 ml 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, in kleinen Mengen (50 – 100 µl) aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

**Chemisch-kompetente Zellen (*E. coli*-XL1-Blue):** Nach einem Reinigungsausstrich einer Glycerinkultur auf einer LB-Tetracyclin-Platte wurde eine Einzelkolonie mit 3 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Danach wurden mit 1 ml dieser Vorkultur 50 ml LB- Medium mit 20 µg/ml Tetracyclin angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600}$ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 4°C für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, in 20 ml steriler Lösung A (50 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 4°C für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, in 2,8 ml steriler Lösung B (100 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in 50 – 100 µl Aliquots portioniert. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

#### 2.2.1.2.3. Transformation von Bakterien

**Elektrokompetente Zellen:** Zu 50 µl elektrokompetenten Zellen (*E. coli* DH 5α) wurden 2 – 5 µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (1ng/µl) zugegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit einem Stromstoß von 1,8 kV. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC- oder LB-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**Chemisch-kompetente Zellen:** Die bei –80°C gelagerten kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden innerhalb von 20 min auf Eis aufgetaut. Zu 50 – 100 µl kompetenten Zellen wurden 2 – 5 µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (1ng/µl) pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte für 90 s bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis heruntergekühlt, mit 1 ml SOC- oder LB-Medium verdünnt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 500 µl der Zellen auf LB-AMP-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1. Präparation von Nukleinsäuren

##### 2.2.2.1.1. Minipräparation

Zunächst wurden 5 ml LB-AMP-Medium mit einer Einzelkolonie transfizierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die anschließende Plasmidreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Dazu wurden 2 – 3 ml der Übernachtkultur für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dann wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben und 4 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf eine Qiagen-Säule gegeben und 30 s bei 11000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer des Plasmid-Extraktions-Kits

gewaschen und mit 50 µl sterilem Wasser für 30 s bei 11000 rpm eluiert. Reinigung und Ausbeute wurden durch die Messung der Nukleinsäurekonzentration bestimmt.

#### 2.2.2.1.2. Midipräparation

Die Midipräparation diente zur Isolierung größerer Plasmidmengen. Die Zellen der Übernachtkultur (25 ml) wurden für 15 min bei 6000 rpm zentrifugiert und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Puffer P2 zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 4 ml Puffer P3 zugegeben, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 4°C für 30 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Inzwischen wurde die Säule (Qiagen Tip 100) mit 5 ml Puffer QBT äquilibriert. Der klare Überstand wurde auf die Säule pipettiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und mit 5 ml Puffer QF eluiert, wobei der Durchlauf mit 3,5 ml Isopropanol gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde bei 4°C für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 2 ml 70%igem kaltem Ethanol aufgenommen und bei 4°C für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Sediment getrocknet und in 100 µl TE-Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen.

#### 2.2.2.1.3. Isolierung von genomischer DNA aus Bluttrypanosomen

Bluttrypanosomen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($1 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei Raumtemperatur für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1,2 ml komplettem Baltz-Medium resuspendiert. Dann wurden 400 µl der Zellsuspension mit 53,2 µl Proteinase K (15 mg/ml) und 400 µl Puffer AL des DNA-Extraktions-Kits versetzt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol wurde die Lösung kurz zentrifugiert und auf eine Silika-Qiagen-Säule gegeben. Die Säule wurde bei Raumtemperatur für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und mit 500 µl Puffer AW2 des DNA-Extraktions-Kits für 2 min bei 13000 rpm gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 100 µl sterilem Wasser oder AE-Puffer des DNA-Extraktions-Kits eluiert. Die DNA-Lösung wurde eingefroren und ihre Konzentration bestimmt.

#### 2.2.2.1.4. Phenol-Chloroform-Extraktion

Ein Volumenteil DNA-Lösung wurde mit einem Volumenteil Phenol-Chloroform-Lösung für 2 min gemischt. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit bei Raumtemperatur wurde die obere Phase abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es wurden zwei Volumenteile 100%iges Ethanol zugegeben und für 1 h bei –20°C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70%igem kaltem Ethanol zweimal gewaschen. Zum Schluss wurde die DNA in 20 – 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

#### 2.2.2.1.5. Ethanol-Fällung von DNA

Zur weiteren Reinigung von DNA wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Zu der DNA-Lösung wurden 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Volumenteile 100%iges Ethanol gegeben und für 1 h bei –70°C inkubiert. Danach wurde bei 4°C für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

#### 2.2.2.1.6. Reinigung der PCR-Produkte

Die Methode basiert auf der Isolierung von DNA mittels der Anionenaustausch-Chromatographie der Firma Qiagen. Zu 50 µl PCR-Reaktionsansatz wurden 250 µl Puffer PB des Qiaquick PCR-Purification Kits pipettiert und die Mischung wurde auf eine Qiagen-Minisäule gegeben. Dann wurde bei Raumtemperatur für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Es wurde einmal mit 500 µl Puffer PE des Qiaquick PCR Purification Kits für 30 s bei 13000 rpm gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 10 – 25 µl sterilem Wasser oder TE-Puffer durch Zentrifugation. Die DNA wurde sofort weiter verwendet oder bei –20°C gelagert.

#### 2.2.2.1.7. Isolierung von RNA aus Bluttrypanosomen

Bluttrypanosomen ($1 \times 10^8$ Zellen) der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($1 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 700 µl Lyse-Puffer RLT des RNA-Extraktions-Kits aufgenommen und mehrmals resuspendiert. Anschließend wurde die gleiche Menge 70%iges Ethanol zum Homogenat gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Lösung auf eine kleine Qiagen-Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei Raumtemperatur für 17 s bei 10000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 500 µl Puffer RW1 des RNA-Extraktions-Kits bei Raumtemperatur für 15 s bei 10000 rpm gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl DEPC-Wasser bei Raumtemperatur für 15 s bei 10000 rpm. Die RNA wurde für die RT-PCR direkt verwendet oder bei –80°C eingefroren.

#### 2.2.2.1.8. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Oligonukleotiden, dsDNA, ssDNA und RNA wurde die OD bei 260 nm ermittelt. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung 1:10 verdünnt, 7 µl der Verdünnung wurden in eine Mikroküvette pipettiert und direkt im GENQuant-Photometer (Pharmacia) gemessen. Dabei entspricht eine $OD_{260}$ von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml, 40 µg RNA/ml bzw. 20 – 30 µg Oligonukleotide/ml.

### 2.2.2.2. PCR-Methoden

#### 2.2.2.2.1. Amplifikation von DNA mittels PCR

Zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten mittels PCR wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl die Matrizen-DNA (1–50 ng Plasmid-DNA bzw. 0,5–2 µg genomische DNA), 5 µl Taq-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10X), 5 µl 2 mM dNTP-Mix, je 1-2 µl der beiden Primer (10 pmol), 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und steriles $H_2O$ gemischt und kurz zentrifugiert. Die PCR wurde in einem Eppendorf-PCR-Gerät unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Zunächst wurde die DNA für 5 min bei 94°C

aufgeschmolzen. Es folgten 35 Zyklen, in denen das Aufschmelzen der DNA (1 min, 94°C), das Hybridisieren der Primer (1 min, variable Temperatur) und die Polymerisation (1,5 min, 72°C) wiederholt wurden. Im Anschluss an den letzten Zyklus erfolgte eine 7-minütige Polymerisation bei 72°C. Die Auswertung erfolgte nach Agarose-Elektrophorese mit jeweils 5 – 15 µl Reaktionsansatz.

#### 2.2.2.2.2 Herstellung von cDNA mittels RT-PCR

Die RT-PCR ist eine zweistufige Reaktion und ermöglicht die effiziente Einzelstrang-cDNA-Synthese ausgehend von RNA mit Hilfe der rekombinanten Moloney-Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (M-MuLV-RT). Für diese reverse Transkription werden zwei Primer verwendet. Der $pdT_{12-18}(N)$ Primer bindet nur am Anfang des Poly(A)-Schwanzes der mRNA und nicht an internen A-reichen Regionen, wodurch unvollständige Transkripte verhindert werden. Der zweite Primer ist ein zufälliges Nonamer ($pdN_6$) und wird als Joker verwendet. Die einzelsträngige cDNA kann anschließend direkt in die PCR-Amplifikation mit Gen-spezifischen Primern eingesetzt werden.
Für die Durchführung der RT-PCR wurden 20 ng Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl verdünnt und für 5 min bei 70°C denaturiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gestellt und 5 µl der Gen-spezifischen Primer sowie eine RT-PCR-Perle (Pharmacia) zugegeben. Die reverse Trankription erfolgte bei 42°C für 25 min. Nach einer Inkubation auf Eis für 1 min wurde die PCR durchgeführt. Die Bedingungen waren wie folgt: initiale Denaturierung für 5 min bei 94°C, dann 30 Zyklen Denaturierung für 1 min bei 94°C, Hybridisierung der Primer für 1 min bei 65°C und Polymerisation für 1,5 min bei 72°C, gefolgt von einer Endpolymerisation für 7 min bei 72°C.

#### 2.2.2.2.3. PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese ist eine Variante der normalen PCR und dient zur Deletion von Sequenzbereichen in doppelsträngigen DNA-Matrizen. Sie basiert auf der Neusynthese des Konstrukts mit glatten Enden und aufgrund gegenläufigen Primer der PCR wird der Bereich zwischen den 5´-Enden beider Primer deletiert. Mit Hilfe der Ligasereaktion entsteht schließlich ein doppelsträngiges Konstrukt mit einer Deletion innerhalb der Sequenz.

#### 2.2.2.3. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Die Hydrolyse von Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen des Typs II. Diese Enzyme erkennen eine spezifische Palindromsequenz von 4 – 6 bp Länge im DNA-Doppelstrang und spalten Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Erkennungssequenz, wobei an der Schnittstelle jeweils 5'-phosphorylierte und 3'OH Enden entstehen. Jede Restriktionshydrolyse von DNA wurde mit dem gewünschten Enzym im entsprechenden Reaktionspuffer und bei der empfohlenen Temperatur durchgeführt. Für Kontrollrestriktionen wurden 2 – 4 U pro µg DNA und für präparative Ansätze ein Überschuss von 4 – 5 U pro µg DNA eingesetzt. Die Restriktion wurde in einem Volumen von 20 – 40 µl durchgeführt. Nach der Hydrolyse wurde die gespalte DNA in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

#### 2.2.2.4. Klonierung von DNA-Fragmenten

##### 2.2.2.4.1. Modifizierung der Enden verdauter DNA-Fragmente

Die nach der Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen gespalten DNA-Fragmente weisen oft unterschiedliche Enden auf, was für die Ligation fatale Folgen haben kann. Um die Ligation solcher DNA-Fragmente zu ermöglichen, müssen diese entsprechend modifiziert werden. Mit Hilfe von DNA-Polymerasen, die gleichzeitig eine 5'>3'-Polymeraseaktivität und eine 3'>5'-Exonukleaseaktivität besitzen, wurden solche Modifikationen durchgeführt.

**Auffüllen von 5'-Überhangsenden (Fill-in):** Ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI erzeugt das 5'-Überhangsende TTAA. Um ein glattes Ende zu erzeugen wurde dieses 5'-Überhangsende mit Hilfe der Klenow-Polymerase und Desoxynukleotiden aufgefüllt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Stratagene). Zu 1,5 µg DNA wurden 2,5 µl 10X Fill-in-Puffer des Fill-In-Kits, je 1 µl 10 mM dTTP und dATP sowie 2 µl Klenow-Polymerase (5 U/µl) gegeben, und es wurde mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Reaktionsgemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Minimierung von DNA-Verlusten bei der weiteren Analyse wurde das Reaktionsgemisch mit 475 µl STE-Puffer (1X) aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA mit Phenol-Chloroform-Lösung extrahiert.

**Insert-Phosphorylierung:** Zu den zu klonierenden PCR-Produkten wurden 2,5 µl Ligase-Puffer (10X), 2,5 µl 10 mM ATP, 0,5 µl T4-Kinase pipettiert und es wurde mit sterilem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Danach wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 65°C, um die T4-Kinase zu denaturieren. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

**Dephosphorylierung von Vektor-Fragmenten:** Um die Religation von DNA-Fragmenten nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen bei der Ligation zu verhindern, wurden die terminalen Phosphatgruppen von Vektor-Fragmenten mit der intestinalen Phosphatase vom Kalb abgespalten. Zu 5 µl Reaktionsansatz mit 0,1 ng Vektor wurden 0,5 µl intestinale Phosphatase vom Kalb (57 U/µl) pipettiert, und es wurde mit sterilem Wasser auf 15 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließlich wurde das Reaktionsgemisch auf eine Microcon-Säule (Millipore) gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule bei Raumtemperatur für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde direkt weiter verarbeitet oder bei –20°C gelagert.

#### 2.2.2.4.2. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

**Methode 1:** Zu 0,2 pmol Vektor wurden 0,6 pmol Insert, 0,75 µl 10 mM ATP, 0,5 µl Ligase 1,5 µl 10X Ligasepuffer des Ligationskits pipettiert und es wurde mit sterilem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Für jede Ligation wurde eine negative Kontrolle ohne Insert mit Vektor mitgeführt, um die spontane Religation des Vektors auszuschließen.

**Methode 2:** Zu einer Ready to Go Ligase-Perle (Amersham) wurden 0,2 pmol Vektor und 0,6 pmol Insert pipettiert, es wurde mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und gut gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, kurz zentrifugiert, und dann 1 – 3 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

### 2.2.2.5. DNA-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA in der Agarosegel–Elektrophorese wurde ein Teil DNA-haltige Lösung mit fünf Teilen DNA-Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese des Agarosegels (1 – 2%) erfolgte für 1 h bei 100 V mit 1X TAE-Puffer als Laufpuffer. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (90 ng/ml) für 10 min gefärbt, unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert.

### 2.2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

**Methode 1:** Nach der Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels wurde die betreffende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Es wurden 3 Volumenteile QG-Puffer des QIAquick Gel Extraction Kits zugegeben und für 10 – 15 min bei 50°C inkubiert. Dann wurde ein Volumenteil Isopropanol hinzugegeben, die Lösung sofort auf die Glasmilch-Qiagen-Säule pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 750 µl Puffer PE des QIAquick Gel Extraction Kits erfolgte die Elution der Nukleinsäuren mit 10 – 50 µl Wasser oder TE-Puffer bei Raumtemperatur durch kurzes Zentrifugieren.

**Methode 2:** Diese Methode wurde von Sambrock *et al.* (1989) beschrieben und verringert die DNA-Verluste, wie sie normalerweise bei der Reinigung mittels Ionenaustausch- oder Glasmilchsäulen auftreten. Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde in einen zuvor gekochten Dialyse-Schlauch mit sterilem 1X TAE-Puffer gegeben. Anschließend wurde der Dialyse-Schlauch in eine Elektrophoresekammer gelegt und die DNA aus der Agarosematrix bei 80 V für 10 min extrahiert. Danach wurde die Lösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde in 10 – 50 µl Wasser aufgenommen.

### 2.2.3. Proteinchemische Methoden

#### 2.2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

**BCA-Methode:** Diese Methode leitet sich von der Biuret-Reaktion ab, bei der Peptidbindungen, Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin unter alkalischen Bedingungen $Cu^{2+}$ zu $Cu^{1+}$ reduzieren. Kupfer(I)-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen Komplex, der Licht der Wellenlänge 562 nm absorbiert und so photometrisch gemessen werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Pierce). Zunächst wurde eine Arbeitslösung hergestellt, indem die beiden Reagenzlösungen A und B im Verhältnis 1:50 gemischt wurden. Zu 50 µl Proteinlösung wurde 1 ml der Arbeitslösung gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Mit Rinderserumalbumin (0,1 – 0,9 mg Protein/ml) wurde eine Eichgerade erstellt. Die Absorption wurde bei 562 nm gemessen und gegen den Nullwert abgeglichen, der nur mit Puffer bestimmt wurde. Die Messungen wurden in Polystyrolküvetten mit einem Beckmann DU 6000 Spektralphotometer durchgeführt.

**Bradford-Methode:** Die Bradford-Methode basiert auf der Bestimmung der blauen Färbung, die beim Mischen von Proteinen mit Coomassie Brillant Blue R-250 entsteht. Dabei ist die blaue Färbung proportional zur Proteinmenge in einer Probe. Durch Bestimmung der Absorption bei 595 nm und durch den Vergleich mit einer Eichgeraden wird die Proteinmenge ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers (BIORAD).

**$OD_{280}$ Methode:** Zur Abschätzung der Proteinmenge wurde die OD bei 280 nm bestimmt. Diese Methode beruht auf der Absorption von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Es wurde näherungsweise angenommen, dass ein $OD_{280}$ von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entspricht.

#### 2.2.3.2. Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Zentrifugen-Filtereinheiten (Centricon). Durch schonendes Zentrifugieren wird das niedermolekulare Lösungsmittel durch die Membran hindurch getrieben, während die großen Proteinmoleküle diese nicht passieren

können. Konzentrierung und Umpuffern können parallel mit diesen Zentrifugen-Filtereinheiten durchgeführt werden. Die konzentrierte Proteinlösung wurde aus der Zentrifugen-Filtereinheiten pipettiert, die Proteinmenge bestimmt und für weitere Versuche verwendet.

#### 2.2.3.3. Herstellung von Zelllysaten aus Bluttrypanosomen

Bluttrypanosomen wurden bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet wurde in 2 ml SB-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden $5 \times 10^7$ Zellen mit SB-Medium auf 1 ml verdünnt und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lyse-Puffer aufgenommen und Protease-Inhibitoren (200 µM TLCK, 400 µM PMSF, 10 µM Leupeptin, 2 µM E64, 1 µM Pepstatin) wurden hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde kurz gemischt und für 4 h auf Eis inkubiert. Danach wurden 100 µl 10%iges SDS zugegeben. Zum Schluss wurden 100 µl Zelllysate mit 300 µl 4X Probenpuffer verdünnt und für 3 min bei 95°C gekocht.

#### 2.2.3.4. Reinigung des Transferrinrezeptors aus Bluttrypanosomen

Bluttrypanosomen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml SB-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden $1 \times 10^8$ Zellen mit SB-Medium auf 1 ml verdünnt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µl 20%igem Triton X-100 und Protease-Inhibitoren (200 µM TLCK, 400 µM PMSF, 10 µM Leupeptin, 2 µM E64, 1 µM Pepstatin) für 1 h auf Eis. Danach wurde das Zelllysat fünfmal für 5 min mit Ultraschall behandelt, wobei zwischendurch gemixt wurde. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 1 h bei 114.000 *g* (Beckman L8-70, 70.1 Ti-Rotor, 40000 rpm). Zum Überstand wurden 60 µl Rinder-Holotransferrin-Sepharose-Perlen gegeben und für 5 h bei 4°C rotiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die Sepharose-Perlen mit 1 ml PBS, 0,2% Triton X-100 fünfmal gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschritten jedesmal für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Zum Schluss wurden die Sepharose-Perlen in 100 µl 1X Probenpuffer für 5 min gekocht.

### 2.2.3.5. Aufreinigung einer rekombinanten *T. brucei* NMP-Kinase

Die Aufreinigung einer *T. brucei*-NMP-Kinase mit einer N-terminalen $His_6$-Sequenz aus transformierten *E. coli* Zellen erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule. Dieses Reinigungsverfahren basiert auf der Interaktion der 6 Histidinreste mit $Ni^{2+}$-Ionen, die an der NTA–Matrix gebunden sind. Gebundene Proteine können mit Imidazol in steigender Konzentration eluiert werden.

Eine 250 ml Übernachtkultur der transformierten *E. coli* Zellen wurde mit 1 l LB-AMP-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Beim Erreichen einer $OD_{550}$ von 0,5 wurden die Zellen mit 60 µg/ml IPTG für 5 h bei 37°C induziert oder über Nacht geschüttelt. Danach wurde die Kultur für 15 min bei 6000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml 1X Ultraschall-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von DNaseI (0,01 mg/ml), Lysozym (0,2 mg/ml) und Protease-Inhibitoren (10 µM PMSF, 150 nM Pepstatin, 40 nM Cystatin) wurde die Zellsuspension auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und bei 4°C für 30 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit 1X Ultraschall-Puffer erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit zunehmender Konzentration an Imidazol. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt, die in der SDS-PAGE auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins untersucht wurden.

### 2.2.3.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) wurden pro Bahn bis zu 100 ng gereinigte Proteine bzw. bis zu 20 µg Zelllysat aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Biorad-Apparatur bei 200 V für 45 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder in Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt und anschließend mit mehrmaligem Wechsel in Coomassie-Entfärberlösung wieder entfärbt oder direkt für die Immunoblot-Analyse verwendet.

### 2.2.4. Immunologische Methoden

#### 2.2.4.1. Immunoblot

Immunoblots wurden nach der Semidry-Methode durchgeführt. Dazu wurden die SDS-Gele zunächst in Kathodenpuffer äquilibriert. Zum Aufbau des Semidry-Blots wurden 5 in Kathodenpuffer getränkte Whatmann-Papiere aufeinander gestapelt, dann wurde das Gel darauf gelegt, anschließend die mit Methanol benetzte und in Anodenpuffer II getränkte PVDF-Membran und zuletzt 2 in Anodenpuffer II und 3 in Anodenpuffer I getränkte Whatmann-Papiere. Der Transfer der Proteine erfolgte mit Graphitelektroden für 55 min bei 41 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran zur reversiblen Färbung der Proteine in 0,1%iger Ponceau-Lösung für 1 min inkubiert und mit 1%iger Essigsäure entfärbt. Es folgten weitere Waschschritte mit Wasser zur Entfernung der Ponceau-Lösung und der Essigsäure und die Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen mit Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper verdünnt in 10 ml Inkubationspuffer (1:1000) unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper verdünnt in 10 ml Inkubationspuffer (1:5000) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Immunfärbung mit einem ECL-Kit im Dunkelraum durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Detektionslösung 1 mit 25 µl Detektionslösung 2 gemischt. Diese Lösung wurde auf die Membran pipettiert, die auf einer Plastikfolie lag. Nachdem die Membran in die Plastikfolie eingepackt worden war, wurde ein Röntgenfilm für 20 s bis 10 min aufgelegt. Die Expositionszeit war abhängig von der Stärke des Signals.

#### 2.2.4.2. Aufreinigung von Antikörpern

Zur Eliminierung von Kreuzreaktionen wurden Antikörper affinitätsgereinigt. Dazu wurden zunächst 50 µg Antigen in einem präparativen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde mit 0,1%iger Ponceau-Lösung gefärbt, mit 1%iger Essigsäure entfärbt und die betreffenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zerschnipselt. Die Membranschnipsel wurden in 2 ml PBS/5% Milchpulver-Lösung für 1 h

bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit 2 ml PBS gewaschen. Es wurden 50 – 200 µl Antiserum verdünnt in 1,5 ml PBS/5 % Milchpulver-Lösung zugegeben und 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit 1 ml 0,1 M Glycin, pH 2,5 für 5 min unter Schütteln im Kühlraum eluiert. Danach wurde die Lösung abpipettiert und mit 100 µl 1 M Tris, pH 8,0, 1 mg/ml BSA neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wurde entweder für die Immunoblot-Analyse als gereinigter Antikörper direkt eingesetzt oder bei –20°C gelagert. Die Membranstückchen wurden gewaschen und in 2 ml PBS/0,1% $NaN_3$ im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.5. Enzymologische Methoden

#### 2.2.5.1. Adenylatkinase-Enzymtest

Die Bestimmung des Enzymgehalts einer Lösung kann durch Messung der Enzymaktivität erfolgen. Dabei wird der vom Enzym katalysierte Substratumsatz pro Zeiteinheit ermittelt. Die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen (25°C, pH-Optimum, Substratsättigung) den Umsatz von 1 µmol Substrat pro min katalysiert, ist definitionsgemäß eine internationale Einheit oder Unit (1 U).

Der Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der Adenylatkinase ist ein gekoppelter Test, bei dem letztlich die Oxidation von NADH gemessen wird (siehe Reaktionsgleichungen 1 – 3). Das durch die Katalyse der Adenylatkinase (AK) gebildete ADP kann zur Bildung von Pyruvat (Pyr) aus Phosphoenolpyruvat (PEP) unter Wirkung der Pyruvatkinase (PK) verwendet werden. Mit Hilfe des gebildeten Pyruvats und der Lactat-Dehydrogenase (LDH) kann schließlich unter Bildung von Lactat (Lac) NADH zu $NAD^+$ oxidiert werden. Letztendlich wird die Absorptionsabnahme von NADH bei 340 nm gemessen, die proportional zur Bildung von ADP durch die Adenylatkinase ist.

(1) $$ATP + AMP \xleftrightarrow{\textbf{AK}} 2\ ADP$$

(2) $$ADP + PEP \xrightarrow{\textbf{PK}} Pyr + ATP$$

(3) $$Pyr + NADH + H^+ \xleftrightarrow{\textbf{LDH}} Lac + NAD^+$$

Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz angewendet, das die Abhängigkeit der Absorption A von der Konzentration c, der absorbierenden Schichtdicke d und des substanz- und wellenlängenspezifischen millimolaren Absorptionskoeffizienten ε beschreibt. Somit ergibt sich die Volumenaktivität einer Adenylatkinase-Lösung aus der Absorptionsänderung ΔA pro Zeiteinheit t unter Berücksichtigung des Testvolumens V, des eingesetzten Volumens der Enzymlösung $V_i$ und des Vorverdünnungsfaktors F nach folgender Gleichung:

(4) **Volumenaktivität = $\Delta A \times V \times F/\{\varepsilon \times d \times t \times V_i\}$ [U/ml]**

Die Durchführung des Enzymtests erfolgte unter den in Tabelle 10 aufgeführten Bedingungen. Als Standardpuffer wurde 100 mM Triethanolamin, pH 7,6 (mit HCl), 90 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von AMP gestartet und es wurde für 1 – 2 min gemessen.

**Tabelle 10: Pipettierschema für den enzymatisch-optischen Adenylatkinase-Enzymtest (Berghäuser, 1975).**

| Reagenz | Konzentration der Stammlösung | Konzentration im Test | Eingesetzte Menge im Test (pro 1 ml) |
|---|---|---|---|
| Puffer | - | - | 920 – x µl |
| NADH | 10 mM | 200 µM | 20 µl |
| PEP | 20 mM | 400 µM | 20 µl |
| ATP | 80 mM | 800 µM | 10 µl |
| AMP | 100 mM | 2,3 mM | 23 µl |
| LDH | 5000 U/ml | 10 U/ml | 2 µl |
| PK | 2000 U/ml | 10 U/ml | 5 µl |
| AK | - | - | 1 – 10 µl (= x µl) |

#### 2.2.5.2. Optimierung des Adenylatkinase-Enzymtests

Zur Bestimmung der optimalen Messbedingungen für die rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase wurde die Enzymaktivität in zwei verschiedenen Pufferssytemen gemessen. Beim ersten Puffersystem handelte es sich um 100 mM Triethanolamin, beim zweiten um 100 mM Tricin. Beide Puffersysteme enthielten noch 1,4 mM $MgCl_2$ und 60 – 310 mM KCl. Gleichzeitig wurden verschiedene pH-Werte (5,0 – 8,5) der Puffer getestet.

#### 2.2.5.3. Bestimmung der Substratspezifität der rekombinaten *T. brucei*-NMP-Kinase

NMP-Kinasen können außer AMP und ATP auch andere Nukleosidmonophosphate wie CMP, IMP, GMP und UMP und andere Nukleosidtriphosphate wie CTP, ITP, GTP und UTP umsetzen. Zur Bestimmung der Substratspezifität der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase wurde die Enzymaktivität unter Standardmessbedingungen (Raumtemperatur, Puffer: 100 mM Triethanolamin, 90 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, pH 7,6) mit 0,8 mM NTP/ATP und 2,3 mM AMP/NMP bei einer Enzymkonzentration von 1,26 μM bestimmt.

#### 2.2.5.4. Bestimmung der $K_m$-Werte der rekombinaten *T. brucei*-NMP-Kinase

Da NTP und NMP Substrate für NMP-Kinasen sind, wurden für beide Substrate $K_m$-Werte für die rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase bestimmt. Bei der Durchführung der $K_m$-Wert-Bestimmung wurde die Konzentration des einen Substrats variiert während die des anderen Substrats konstant gehalten wurde. Als Messpuffer wurde 100 mM Triethanolamin, pH 7,6 verwendet. Die $K_m$-Werte wurden mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots ermittelt.

#### 2.2.5.5. Hemmung der Aktivität der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase

Zur Hemmung der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde der Nukleosidmonophosphat-Kinase Inhibitor Diadenosinpentaphosphat ($AP_5A$) verwendet. Zur Bestimmung der Hemmung wurde die Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase in Gegenwart unterschiedlicher Mengen $AP_5A$ bestimmt. Aus den gewonnenen Daten wurde der $IC_{50}$-Wert ermittelt. Der $IC_{50}$-Wert ist die Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymaktivität 50% der normalen Aktivität der Kontrolle beträgt.

### 2.2.6. Proteinkristallographische Methoden

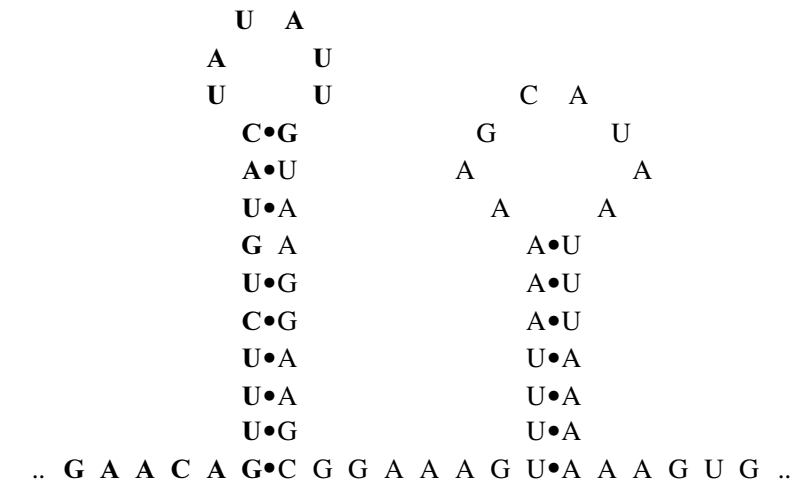
Zur Kristallisation von Proteinen sind einige Parameter entscheidend wie z. B. das Erreichen des Übersättigungszustandes. Die Kristallisation geschieht im allgemeinen unter schonendem Entzug der Hydrathülle durch Zugabe eines Fällungsmittels. Als Fällungsmitteln können Polyethylenglykole (PEGs) verschiedener Molekulargewichtsklassen, Salze und organische Lösungsmittel verwendet werden. Die Kristallisation von Proteinen erfolgt nach dem Dampfdiffusionsprinzip in der sogennanten *Hanging-Drop*-Methode, bei der auf einem Deckglas die Proteinlösung mit dem Fällungsmittel gemischt (z.B. 2 µl + 2 µl) und hängend gegen ein Reservoir höherer Fällungsmittelkonzentration (z.B. 200 µl $H_2O$ + 600 µl Fällungmittel) äquilibriert wird. Für die Kristallisationsversuche mit der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase wurde ein kommerzieller Kristallisations-Kit verwendet. Nach Wochen konnten Proteinkristalle mikroskopisch nachgewiesen werden.

# 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

## 3.1. Untersuchungen zur Rolle der 5'-nichttranslatierten Region der *ESAG6/7* mRNA bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors in *T. brucei*

Blutformen von *T. brucei* versorgen sich mit Eisen, indem sie das Serumprotein Transferrin ihres Wirtes durch rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen (Coppens *et al.*, 1987; Schell *et al.*, 1991; Steverding, 1998). In der Flagellartasche, der einzige Bereich der Zelloberfläche der Trypanosomen auf dem Endo- und Exozytoseprozesse stattfinden (Balber, 1990; Webster & Russell, 1993; Overath *et al.*, 1994), wird das Transferrin vom trypanosomalen Transferrinrezeptor gebunden (Steverding, 2000). Der trypanosomale Transferrinrezeptor ist ein heterodimerer Proteinkomplex, der von zwei Expressionsstellen-assoziierten Genen, *ESAG6* und *ESAG7*, kodiert wird (Chaudhri *et al.*, 1994; Ligtenberg *et al.*, 1994; Salmon *et al.*, 1994; Steverding *et al.*, 1994, 1995). Die beiden Gene liegen stromaufwärts des variablen Oberflächenglykoproteingens (*VSG*) in einer polycistronischen Transkriptionseinheit (Cully *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1987; Kooter *et al.*, 1987; Pays *et al.*, 1989). Unter Eisenmangel ist die Transferrinaufnahmerate und die Menge an Transferrinrezeptor in Blutformen von *T. brucei* um den Faktor 3 erhöht (Fast *et al.*, 1999). In diesem Teil der Arbeit sollte die Rolle der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors unter Verwendung eines Reporter-Gens untersucht werden. Die 5'-UTRs von *ESAG6* und *ESAG7* besitzen eine ähnliche *stem-loop*-Struktur (Abb. 9). Um zu überprüfen, ob diese *stem-loop*-Struktur eine Funktion als *iron responsive element* in der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors hat, sollte das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen (*NPT*) durch homologe Rekombination ausgetauscht werden.

**A: *ESAG6* 5'-UTR**




**B: *ESAG7 5´*-UTR**

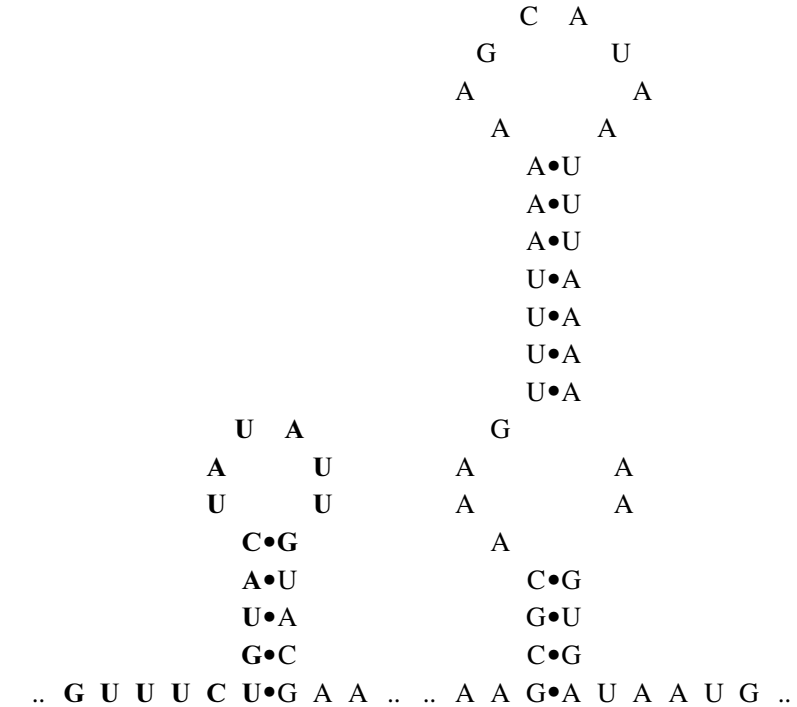



**Abb. 9: Sekundärstrukturen der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der *ESAG6*-(A) und *ESAG7*- (B) mRNA.** Nukleotide der *mini-exon*-Sequenz sind fett wiedergegeben.

### 3.1.1. Herstellung und Analyse von *T. brucei Δesag6::NPT*-Zellen

#### 3.1.1.1. Der Transfektionsvektor pHD599

Zur Herstellung der *T. brucei Δesag6::NPT* Blutform-Mutanten (*Δesag6::NPT*-Zellen) sollte das Plasmid pHD599 (Ansorge *et al.*, 1999) verwendet werden. Dieses Plasmid enthält das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens (*NPT*), das Zellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 (Neomycin) verleiht. Darüber hinaus wird das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen von zwei Sequenzen flankiert, die homolog zu der 5´-UTR (257 bp) und der 3´-UTR (564 bp) des *ESAG6* sind. Nach Transformation von *E. coli*-Zellen und Selektion der Bakterien mit Ampicillin wurde das Plasmid isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Ausgehend von der Restriktionskarte wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hin*dIII und *Xho*I gespalten. Nach der Agarosegelelektrophorese erhielt man die erwarteten DNA-Fragmente erhalten (Abb. 10). Der Verdau mit *Hin*dIII sollte zwei Fragmente von 254 bp und 4473 bp liefern (Abb. 10, Bahn 3). Allerdings konnte das 254 bp-Fragment nicht dargestellt werden, da ein 1%iges Agarosegel verwendet wurde. Beim gleichzeitigen Verdau mit *Eco*RI und *Eco*RV erhielt man die erwarteten Fragmente von 1000 bp und 3700 bp erhalten (Abb. 10, Bahn 4). Die Hydrolyse mit *Bam*HI und *Xho*I lieferte die erwarteten Fragmente von 576 bp und 4150 bp (Abb. 10, Bahn 5). Die Restriktionsanalyse bestätigt somit die Korrektheit des Plasmids pHD599.

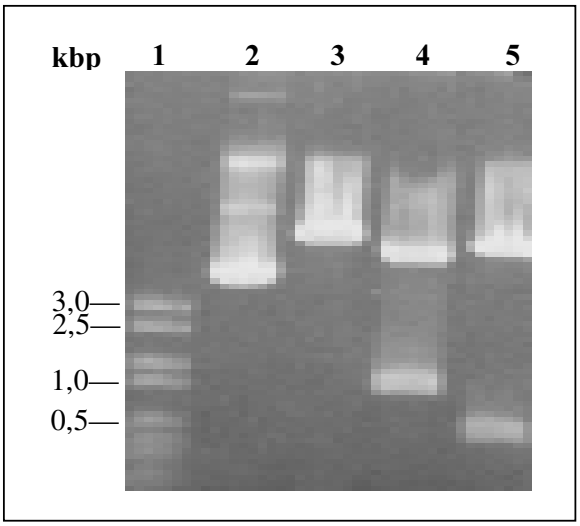



**Abb. 10: Restriktionsanalyse zur Kontrolle des Plasmids pHD599**. Bahn 1, DNA-Marker; Bahn 2, unverdautes pHD599 Plasmid; Bahn 3, pHD599 gespalten mit *Hin*dIII; Bahn 4, pHD599 mit gespalten *Eco*RI und *Eco*RV; Bahn 5, pHD599 gespalten mit *Bam*HI und *Xho*I.

### 3.1.1.2. Herstellung von *Δesag6::NPT*-Zellen

Zur Herstellung von *Δesag6::NPT*-Zellen sollten das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle durch homologe Rekombination unter Verwendung des *Sac*I-*Xho*I-Fragments des Plasmids pHD599 gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen ausgetauscht werden (Abb. 11). Nach Elektroporation von TC221 Bluttrypanosomen mit 20 µg linearisiertem *Sac*I-*Xho*I-Fragment (1850 bp) erfolgte nach 24 h die Selektion mit 25 µg/ml Neomycin (Li & Gottesdiener, 1996). Weniger als 10% der Zellen überlebten die Transfektion. Folglich war die Ausbeute an rekombinanten Zellen entsprechend gering. Positive Klone wurden erst nach 7 Tagen Inkubation selektiert. Zur weiteren Analyse der Klone wurden die Zellen in frischem Medium mit 25 µg/ml Neomycin bis zur Zelldichte von $1 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert.

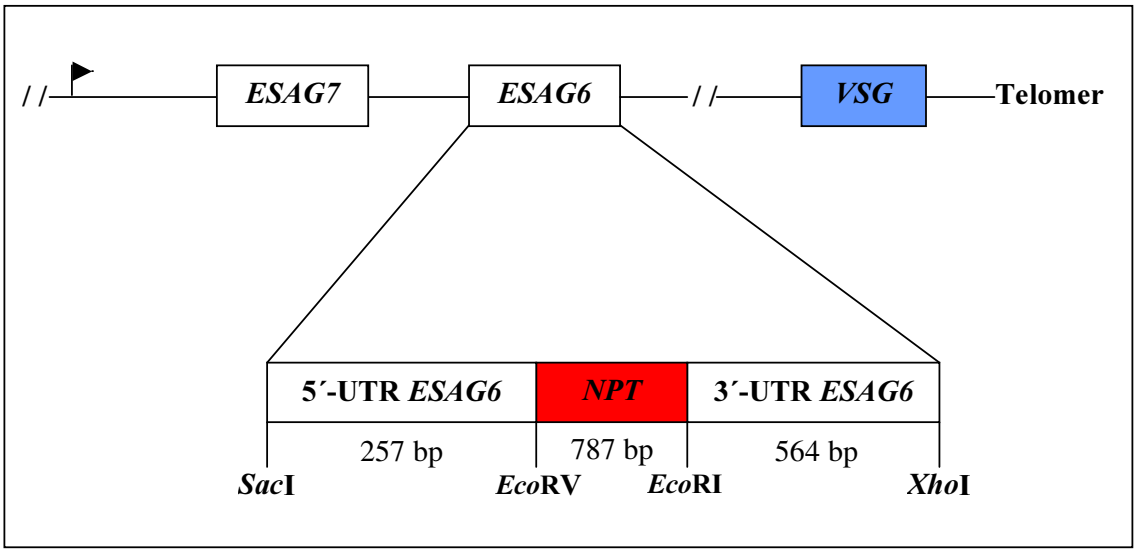



**Abb. 11: Struktur einer Expressionsstelle (oben) und schematische Darstellung des *Sac*I-*Xho*I-Fragmentes des Plasmids pHD599 zur Deletion des *ESAG6* durch homologe Rekombination.**

#### 3.1.1.3. Analyse der *Δesag6::NPT*-Zellen

Zu den ersten Untersuchungen der *Δesag6::NPT*-Zellen gehörte der Nachweis der Integration des *Sac*I-*Xho*I-Fragmentes in das Genom der Zellen. Um zu zeigen, dass auch tatsächlich das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle deletiert worden war, musste die Synthese des Transferrinrezeptors bestimmt werden. Da die Deletion des *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben könnte war es auch notwendig, zunächst das Wachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen im Vergleich zu TC221 Wildtyp-Zellen zu untersuchen. Schlussendlich war aber die Untersuchung zur eisenabhängigen Regulation der Neomycin-Phosphotransferase entscheidend.

##### 3.1.1.3.1. Nachweis der Integration des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δesag6::NPT*-Zellen

Zum Nachweis der Integration des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in das Genom von *Δesag6::NPT*-Zellen wurde eine PCR mit genomischer DNA und spezifischen *NPT*-Primern durchgeführt (Abb. 12). Als Kontrollen dienten pHD599 Plasmid-DNA und genomische DNA aus TC221 Wildtyp-Zellen. Ein PCR-Produkt von der erwarteten Größe von 787 bp wurde mit der DNA der *Δesag6::NPT*-Zellen (Abb 12, Bahnen 1 – 3) und mit der Plasmid-DNA (Abb. 12, Bahn 4) erhalten, aber nicht mit der DNA aus TC221 Wildtyp-Zellen (Abb. 12, Bahn 5). Dieses Ergebnis zeigt die erfolgreiche Integration des *Sac*I-*Xho*I-Fragmentes in das Genom von *Δesag6::NPT*-Zellen.

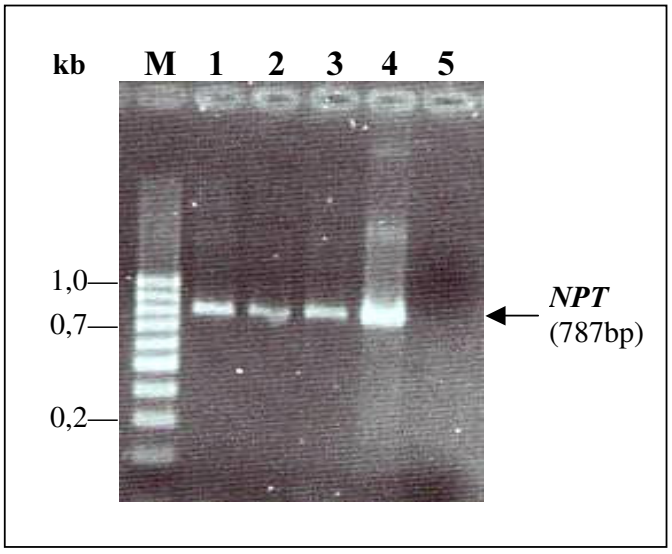



**Abb. 12: PCR-Analyse zum Einbau des *Neomycin-Phosphotransferase* (*NPT*)-Gens im Genom von *Δesag6::NPT*-Zellen.** Bahn M: DNA-Marker; Bahnen 1 – 3: PCR-Produkt mit genomischer DNA aus drei verschiedenen *Δesag6::NPT*-Zellen; Bahn 4: PCR-Produkt mit pHD599 (*NTP*-beherbergendes Plasmid); Bahn 5: PCR-Produkt mit genomischer DNA aus TC221 Wildtyp-Zellen.

### 3.1.1.3.2. Reinigung des Transferrinrezeptors aus *Δesag6::NPT*-Zellen

Um zu überprüfen, ob in den *Δesag6::NPT*-Zellen das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle deletiert worden war, sollte die Menge an Transferrinrezeptor in den Zellen bestimmt werden. Da nur der heterodimere ESAG6-ESAG7-Komplex Transferrin bindet, sollte aus den *Δesag6::NPT*-Zellen weniger Transferrinrezeptor mit Hilfe von Transferrin-Sepharose zu reinigen sein als aus TC221 Wildtyp-Zellen. Nach Isolierung des Transferrinrezeptors aus Zelllysaten, wurde die Menge an ESAG6 und ESAG7 im Western-Blot überprüft (Abb 13). Im Vergleich zu den TC221 Wildtyp-Zellen, enthielten die *Δesag6::NPT*-Zellen deutlich weniger ESAG6 und ESAG7. Die restliche Menge an Transferrinrezeptor ist auf eine schwache Transkription stiller Expressionsstellen zurückzuführen (Ansorge *et al.*, 1999). Zusammen mit dem obigen Ergebnis zeigt dieser Befund, dass das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle in den *Δesag6::NPT*-Zellen gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen ausgetauscht worden ist.

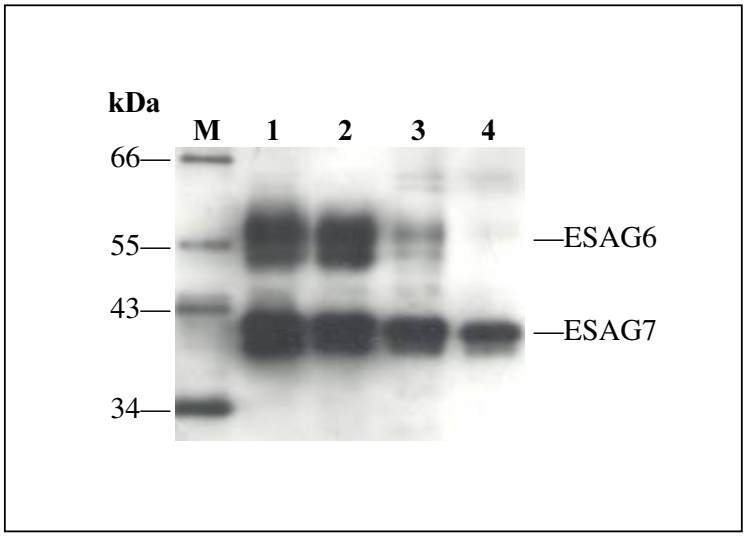



**Abb. 13: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Deletion von *ESAG6* in *Δesag6::NPT*-Zellen.** Mit Hilfe von Transferrin-Sepharose wurde der Transferrinrezeptor aus jeweils $1 \times 10^8$ Wildtyp-Zellen (Bahnen 1 und 2) und *Δesag6::NPT*-Zellen (Bahnen 3 und 4) gereinigt und im Western-Blot mit anti-ESAG6/7 Antikörpern nachgewiesen. Bahn M: Protein-Marker; Bahnen 1 und 3: $1 \times 10^6$ Zelläquivalente; Bahnen 2 und 4: $5 \times 10^5$ Zelläquivalente.

### 3.1.1.3.3. Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Zellwachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen

TC221 Bluttrypansomen vermehren sich innerhalb von 24 h um das Zehnfache. Um zu untersuchen, ob die Deletion von *ESAG6* eine Auswirkung auf das Wachstum von Bluttrypanosomen hatte, wurden *Δesag6::NPT*-Zellen und TC221 Wildtyp-Zellen für 3 Tage kultiviert und deren Zelldichte regelmäßig bestimmt. Während die TC221 Wildtyp-Zellen sich nach 24 h verzehnfacht hatten und nach 48 h eine Zelldichte von $1 \times 10^6$ Zellen/ml erreichten, zeigten die *Δesag6::NPT*-Zellen ein langsameres Wachstum und erreichten eine Zelldichte von $1 \times 10^6$ Zellen/ml erst nach 72 h Kultivierung (Abb. 14). Dieses Ergebnis steht in Überstimmung mit früheren Befunden (Ansorge *et al.*, 1999; Kabiri & Steverding, 2000), wonach eine Deletion des *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle keine grundsätzlich, nachteilige Auswirkung auf die Vitalität von Bluttrypanosomen hat.

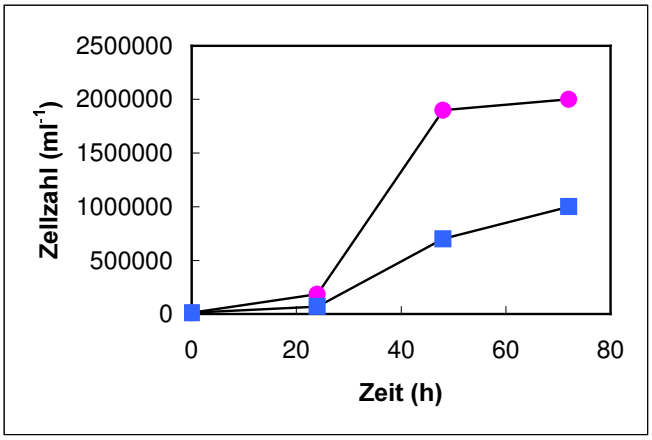



**Abb. 14: Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Wachstum von *Δesag6::NPT*-Zellen.** Trypanosomen wurden zu einer Dichte von $1 \times 10^4$ Zellen/ml in Medium eingesät und zu den angegebenen Zeiten wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Blaue Quadrate, *Δesag6::NPT*-Zellen; rosa Kreise, TC221 Wildtyp-Zellen.

### 3.1.1.3.4. Nachweis der Expression der Neomycin-Phosphotransferase in *Δesag6::NPT*-Zellen

Als Nächstes wurde untersucht, ob das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen in den *Δesag6::NPT*-Zellen exprimiert wurde. Dazu wurde ein Lysat der Zellen nach Trennung in der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase analysiert (Abb. 15). Der Antikörper erkannte nur eine Proteinbande mit der Größe von etwa 32 kDa. Diese Größe entspricht ziemlich genau der Größe der Neomycin-Phosphotransferase. In Zelllysaten von TC221 Wildtyp-Zellen wurde dagegen vom Antikörper keine Proteinbande erkannt (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die *Δesag6::NPT*-Zellen die Neomycin-Phosphotransferase exprimieren.

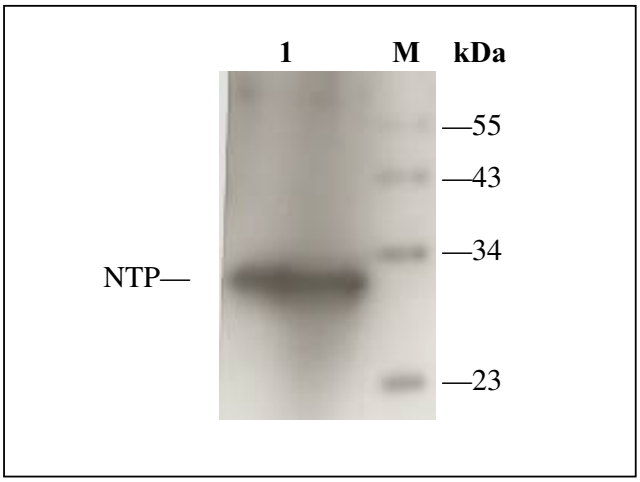



**Abb. 15: Western-Blot–Analyse zur Expression der Neomycin-Phosphotransferase (NPT) in *Δesag6::NPT*-Zellen.** Bahn M: Protein-Marker; Bahn 1: Lysat von $5 \times 10^5$ *Δesag6::NPT*-Zellen. Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase analysiert.

### 3.1.1.3.5. Sensitivität der *Δesag6::NPT*-Zellen gegenüber Neomycin

Die Selektion der *Δesag6::NPT*-Zellen erfolgte mit G418 (Neomycin). Nur Zellen, die das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen integriert hatten, konnten im Selektionsmedium überleben. Die Neomycinresistenz beruht auf der Phosphorylierung des Antibiotikums durch die Neomycin-Phosphotransferase, wodurch G418 seine Wirkung verliert. Mit zunehmender Antibiotikum-Konzentration kann das Enzym nicht mehr alle Neomycin-Moleküle phosphorylieren und die toxische Wirkung von G418 tritt zu Tage. Um die Sensitivität der *Δesag6::NPT*-Zellen gegenüber dem Antibiotikum G418 zu ermitteln, wurde das Wachstum der Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Neomycin bestimmt und der $ED_{50}$-Wert (die Konzentration, bei der das Wachstum um 50% im Vergleich zur Kontrolle ohne Antibiotikum reduziert ist) ermittelt. Mit steigender Neomycin-Konzentration wurde das Wachstum der Zellen zunehmend inhibiert (Abb. 16). Der $ED_{50}$-Wert lag bei 30 µg/ml. Um die toxische Wirkung des Neomycins so gering wie möglich zu halten, aber dennoch einen genügend hohen Selektionsdruck zu haben, wurden die *Δesag6::NPT*-Zellen für weitere Experimente mit 25 µg/ml G418 kultiviert.

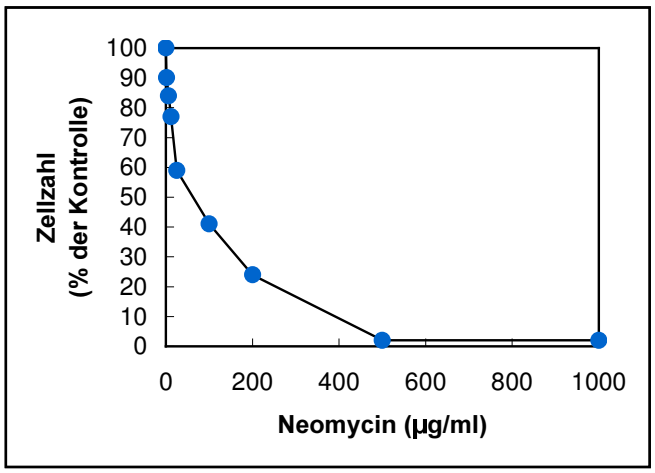



**Abb. 16: Einfluss der Neomycin-Konzentration auf das Wachstum von *Δesag6::NPT*-Zellen.** Die Zellen wurden zu einer Dichte von $1 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium mit unterschiedlichen Mengen an Neomycin eingesät und nach 24 h wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### 3.1.1.3.6. Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen

Da die Untersuchungen zur Rolle der 5'-UTR bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptor unter Eisenmangel zu erfolgen mussten, sollte zunächst der Einfluss des Eisenchelators Deferoxamin auf das Wachstum der *Δesag6::NPT*-Zellen ermittelt werden. Es ist gezeigt worden, dass Deferoxamin den Sauerstoffverbrauch und die DNA-Synthese bei Bluttrypanosomen hemmt (Breidbach *et al.*, 2002). Die Wirkung des Deferoxamins beruht vermutlich darauf, dass der Chelator freie Eisen-Ionen in der Zelle bindet und nicht die Eisen-Ionen des Transferrins komplexiert. Bluttrypanosomen sind im Vergleich zu Säugetierzellen zehnmal empfindlicher gegenüber Deferoxamin. Der $ED_{50}$-Wert liegt bei 2,9 µM, und die minimale inhibitorische Konzentration bei 15 µM (Breidbach *et al.*, 2002).
Zur Überprüfung, ob Deferoxamin toxisch für *Δesag6::NPT*-Zellen ist, wurden die Zellen mit 25 µM Chelator in Medium ohne Neomycin für 24 h inkubiert (Abb. 17). Während in Abwesenheit von Deferoxamin sich die Zellen vermehrten, teilten sich die Zellen in Gegenwart des Eisenchelators nicht und begannen nach 24 h abzusterben. Das Experiment zeigt, dass Deferoxamin einen deutlichen Effekt auf *Δesag6::NPT*-Zellen hat und nach einer gewissen Zeit (24 h) toxisch wirkt. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche die *Δesag6::NPT*-Zellen nur 20 h mit 25 µM Deferoxamin inkubiert, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten.

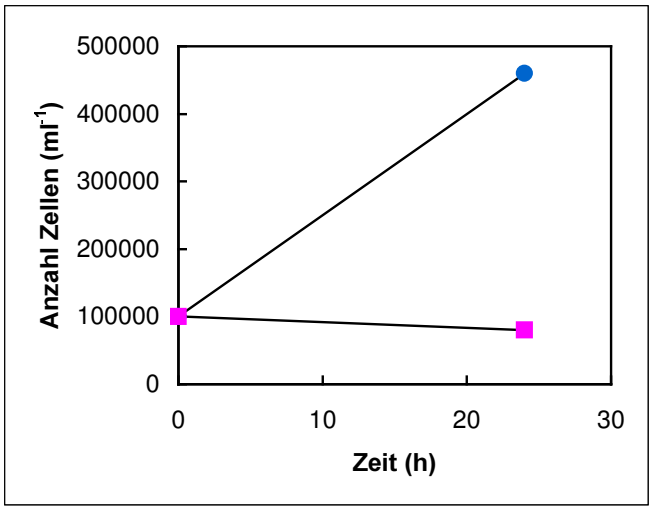



**Abb. 17: Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum von *Δesag6::NPT*-Zellen**. Die Zellen wurde zu einer Dichte von $1 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium ohne Neomycin mit 25 µM Deferoxamin (rosa Quadrate) oder ohne Deferoxamin (blaue Kreise) eingesät. Nach 24 h Inkubation wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### 3.1.1.3.7. Eisenabhängige Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δesag6::NPT*-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens mit der 5'-UTR und der 3'-UTR des *ESAG6* in *Δesag6::NPT*-Zellen eisenabhängig reguliert wird, wurden die Zellen mit dem Eisenchelator Deferoxamin (25 μM) für 20 h inkubiert. Kontroll-Kulturen wurden ohne Deferoxamin, mit eisengesättigtem Chelator und mit Ammoniumeisencitrat inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Western-Blot mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase analysiert (Abb. 18). In den Zellen der Kontroll-Kulturen wurde für die Neomycin-Phosphotransferase-Bande die gleiche Intensität festgestellt (Abb. 18, Bahnen 1, 3 und 4). Im Gegensatz dazu zeigte die Neomycin-Phosphotransferase-Bande der Zellen, die mit Deferoxamin inkubiert worden war, eine deutlich stärkere Intensität (Abb. 18, Bahn 2). Dieses Ergebnis deutet auf eine erhöhte Menge der Neomycin-Phosphotransferase bzw. auf eine erhöhte Transkription des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δesag6::NPT*-Zellen unter Eisenmangel hin. Ob hierfür die flankierende 5'-UTR des *ESAG6* verantwortlich ist, sollte durch eine Deletion in der *ESAG6* 5'-UTR *stem-loop*-Struktur untersucht werden.

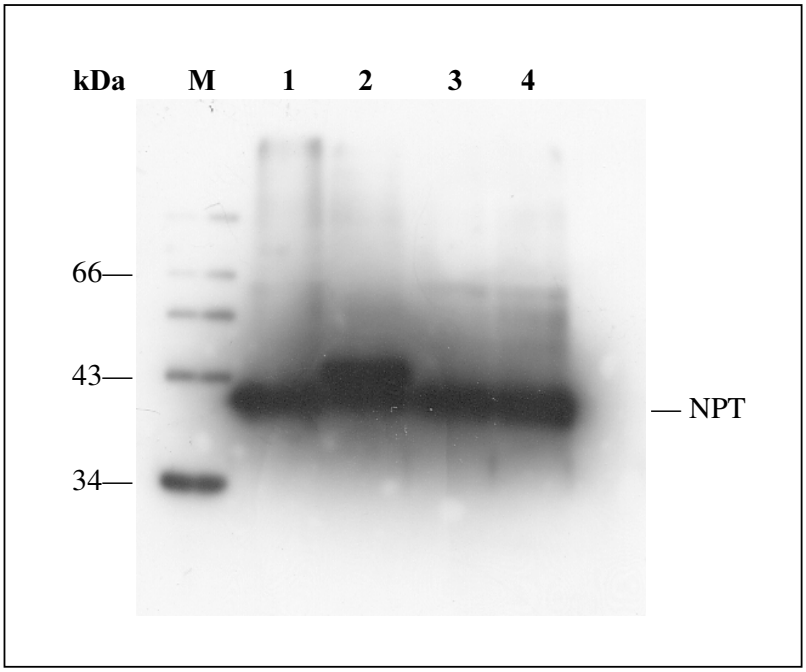



**Abb. 18: Western-Blot-Analyse zur eisenabhängigen Regulation der Neomycin-Phosphotransferase (NPT) in *Δesag6::NPT*-Zellen.** Die Zellen wurden zu einer Dichte von $5 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium allein (Bahn 1), in Medium mit 25 µM Deferoxamin (Bahn 2), in Medium mit 25 µM eisengesättigtem Deferoxamin, und in Medium mit 25 µM Ammoniumeisencitrat (Bahn 4) für 20 h inkubiert, anschließend lysiert und im Western-Blot mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase untersucht. Pro Bahn wurden $5 \times 10^5$ Zelläquivalente aufgetragen.

### 3.1.2. Herstellung und Analyse von *T. brucei Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Zur weiteren Überprüfung, ob es sich bei der 5'-UTR der *ESAG6*-mRNA tatsächlich um ein *iron responsive element* handelt, sollte ein Teil der *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen flankierenden *ESAG6* 5'-UTR deletiert werden. Da der erste *stem-loop* die Spleißstelle enthält und zusammen mit der *mini-exon*-Sequenz gebildet wird (Abb. 19B), sollte ein Sequenzabschnitt aus dem zweiten *stem-loop* deletiert werden.

#### 3.1.2.1. Herstellung des Transfektionsvektors pNE-1

Ausgehend vom Plasmid pHD599 sollte ein neuer Transfektionsvektor mit einer Deletion im zweiten *stem-loop* der *ESAG6* 5' UTR hergestellt werden (Abb. 19B). Dazu wurde zunächst das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Sac*I verdaut und die dabei entstandenen Fragmente (4460 bp und 257 bp, s. Abb. 11) isoliert. Danach wurde das 257 bp große DNA-Fragment mit *Dra*I verdaut, wodurch ein DNA-Stück von 14 Nukleotiden entfernt wurde (Abb 19A). Dieses DNA-Stück entspricht im Wesentlichen dem zweiten *stem-loop* der *ESAG6* 5'UTR (Abb. 19A). Anschließend wurde das *Dra*I-verdaute Fragment gereinigt und in einer Ligationsreaktion mit dem 4460 bp *Sac*I-*Eco*RV-Fragment wieder zu einem vollständigen Plasmid zusammengefügt. Das neue Plasmid wurde als pNE-1 bezeichnet. Zum Schluss wurden *E. coli*-XL1-Blue-Zellen mit dem Plasmid transfiziert, um genügend Plasmid für weitere Analysen produzieren zu können. Da die deletierte Sequenz nur 14 Nukleotide lang war, konnte die Deletion durch Restriktionsanalyse nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde durch Sequenzanalyse die Deletion der 14 Nukleotide im Plasmid pNE-1 überprüft und bestätigt.

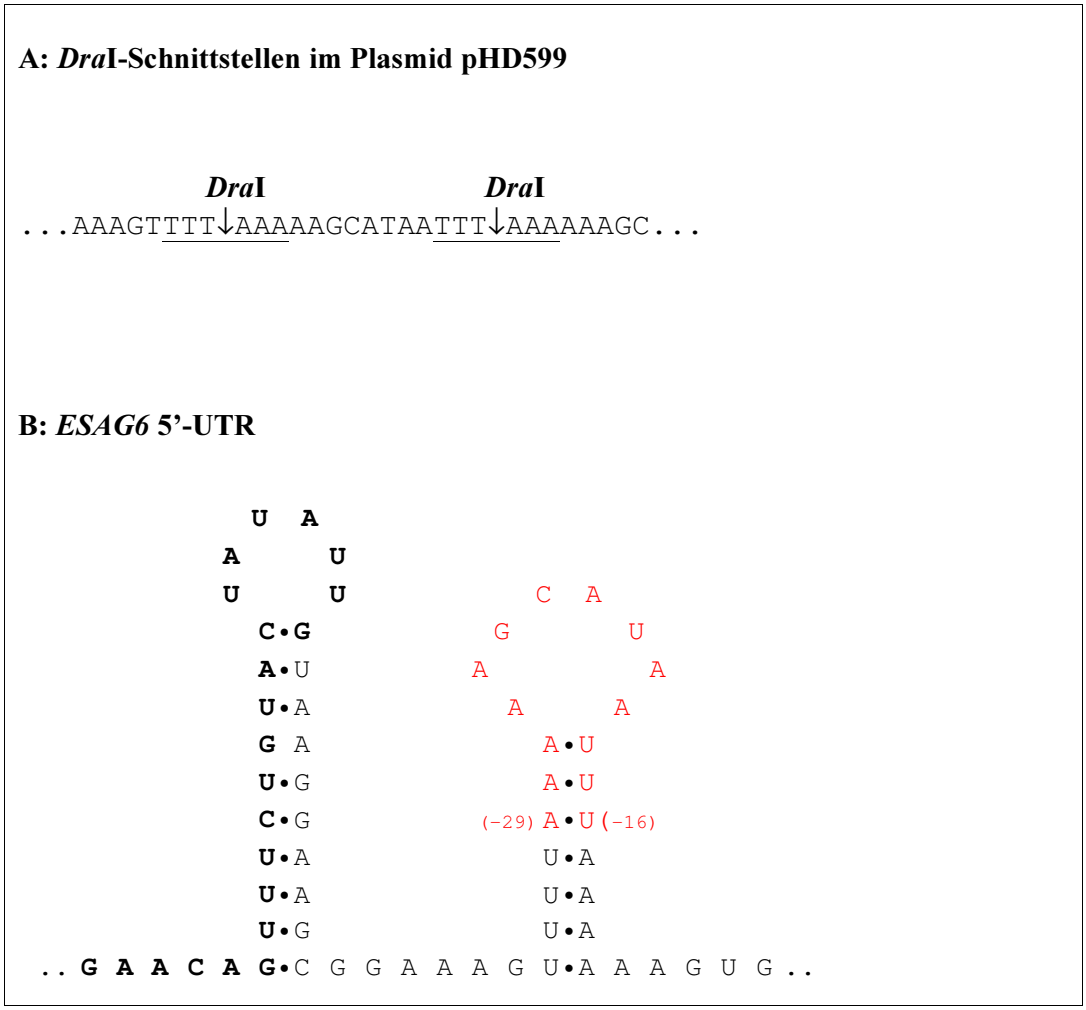



**Abb. 19: Sequenzausschnitt des Plasmids pHD599 mit den zwei *Dra*I-Schnittstellen (A) und Sekundärstrukturen der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der *ESAG6*-mRNA (B).** Die *Dra*I-Erkennungssequenz ist unterstrichen und die Schnittstelle durch einen Pfeil markiert. Die 14 Nukleotide, die deletiert werden sollten, sind rot hervorgehoben. Nukleotide der *mini-exon*-Sequenz sind fett wiedergegeben.

#### 3.1.2.2. Herstellung von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Wie schon bei der Herstellung der *Δesag6::NPT*-Zellen, wurden zur Herstellung von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen TC221 Bluttrypanosomen mit 20 µg linearisiertem *Sac*I-*Xho*I-Fragment des pNE-1 Plasmids durch Elektroporation transfektiert. Nach 24 h Kultivierung erfolgte die Selektion mit 25 µg/ml Neomycin. Nach einer Woche wuchsen drei Klone, die zur weiteren Analyse in komplettem Baltz-Medium mit 25 µg/ml Neomycin kultiviert wurden.

#### 3.1.2.3. Analyse der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Zur Analyse der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen gehörten Untersuchungen zur Deletion des *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle durch das *Sac*I-*Xho*I-Fragment, zum Einfluss der Deletion des *ESAG6* auf das Wachstumsverhalten der Zellen und zur Sensitivität gegenüber Neomycin. Entscheidend war aber wieder die Untersuchung zur eisenabhängigen Regulation der Neomycin-Phosphotransferase.

### 3.1.2.3.1. Reinigung des Transferrinrezeptors aus *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Zur Überprüfung, ob in den *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle deletiert worden war, wurde die Menge an Transferrinrezeptor in den Zellen bestimmt. Dazu wurde aus Zelllysat der Rezeptor mittels Transferrin-Sepharose isoliert und im Western-Blot mit Antikörpern gegen den heterodimeren ESAG6-ESAG7-Komplex untersucht (Abb 20).

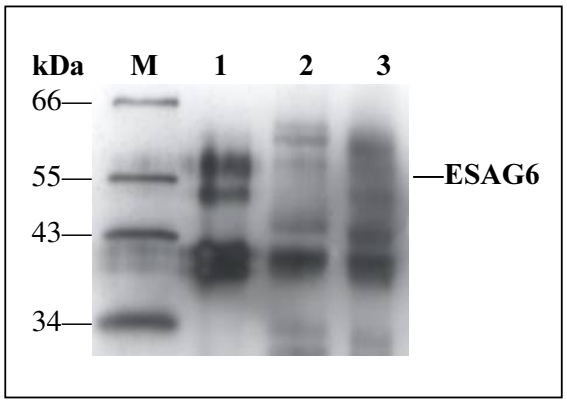



**Abb. 20: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Deletion von *ESAG6* in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.** Mit Hilfe von Transferrin-Sepharose wurde der Transferrinrezeptor aus jeweils $8 \times 10^7$ Wildtyp-Zellen (Bahn 1), *Δesag6::NPT*-Zellen (Bahn 2) und *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen gereinigt und im Western-Blot mit anti-ESAG6/7 Antikörpern nachgewiesen. Bahn M: Protein-Marker; Bahnen 1 – 3: $1 \times 10^6$ Zelläquivalente.

Im Vergleich zu TC221 Wildtyp-Zellen war die Menge an Transferrinrezeptor in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen deutlich reduziert und etwa vergleichbar mit der Menge in *Δesag6::NPT*-Zellen (s. 3.1.1.3.2.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass wie schon bei den *Δesag6::NPT*-Zellen auch in den *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle durch homologe Rekombination gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen ausgetauscht wurde. Die restliche Menge an Transferrinrezeptor ist auf eine schwache Transkription stiller Expressionsstellen zurückzuführen (Ansorge *et al.*, 1999).

### 3.1.2.3.2. Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Zellwachstum der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Deletion von *ESAG6* wiederum einen Einfluss auf das Wachstum der Bluttrypanosomen hatte. Wie schon bei den *Δesag6::NPT*-Zellen war auch das Wachstum der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen verlangsamt. Im Vergleich zu TC221 Wildtyp-Zellen, erreichten die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen eine Zelldichte von $1 \times 10^6$ Zellen/ml erst nach 72 h Kultivierung (Abb. 21), zeigten aber damit das gleiche Wachstumsverhalten wie die *Δesag6::NPT*-Zellen (s. 3.1.1.3.3.).

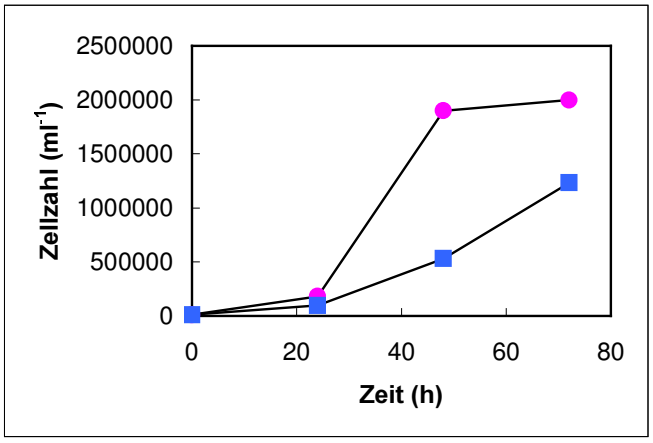



**Abb. 21: Auswirkung der *ESAG6*-Deletion auf das Wachstum von Δ*(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.** Trypanosomen wurden zu einer Dichte von $1 \times 10^4$ Zellen/ml in Medium eingesät und zu den angegebenen Zeiten wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Blaue Quadrate, *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen; rosa Kreise, TC221 Wildtyp-Zellen.

### 3.1.2.3.3. Nachweis der Expression der Neomycin-Phosphotransferase in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Wie für die *Δesag6::NPT*-Zellen wurde daraufhin untersucht, ob die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen ebenfalls das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen exprimieren. Im Western-Blot mit Zelllysat von drei verschiedenen *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zell-Klonen erkannte der Neomycin-Phosphotransferase-Antikörper jeweils nur eine Proteinbande mit einer Größe von etwa 32 kDa (Abb. 22). Diese Größe entspricht ziemlich genau der Größe der Neomycin-Phosphotransferase. Dieses Ergebnis bestätigt, dass auch die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen die Neomycin-Phosphotransferase exprimieren.

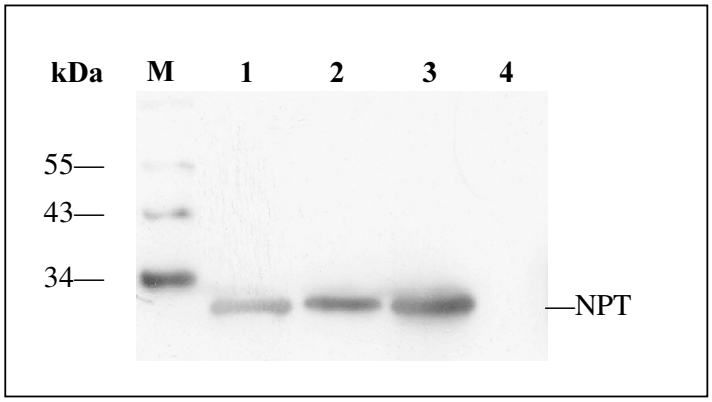



**Abb. 22: Western-Blot–Analyse zur Expression der Neomycin-Phosphotransferase (NPT) in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.** Bahn M: Protein-Marker; Bahnen 1 – 3: Lysate von drei verschiedenen *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zell-Klonen; Bahn 4: Lysat von TC221 Wildtyp-Zellen. Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase analysiert. Pro Bahn wurden $5 \times 10^5$ Zelläquivalente aufgetragen.

### 3.1.2.3.4. Sensitivität der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen gegenüber Neomycin

Da auch die Selektion der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen mit G418 (Neomycin) erfolgte, sollte ebenfalls deren Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum der Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Neomycin bestimmt und der $ED_{50}$-Wert ermittelt. Mit steigender Neomycin-Konzentration wurde das Wachstum der Zellen zunehmend inhibiert (Abb. 23). Der $ED_{50}$-Wert lag bei 58 µg/ml und war damit fast doppelt so hoch wie der für die *Δesag6::NPT*-Zellen (s. 3.1.1.3.5.). Um die toxische Wirkung des Neomycins so gering wie möglich zu halten, aber dennoch einen genügend hohen Selektionsdruck zu haben, wurden die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen für die weiteren Experimente ebenfalls mit 25 µg/ml G418 kultiviert.

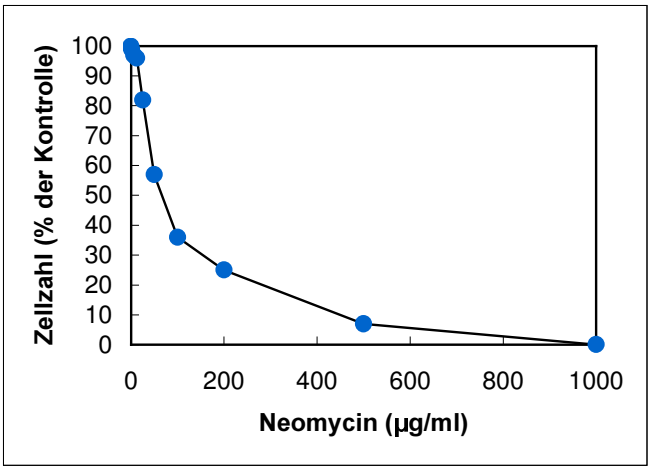



**Abb. 23: Einfluss der Neomycin-Konzentration auf das Wachstum von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen**. Die Zellen wurden zu einer Dichte von $1 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium mit unterschiedlichen Mengen an Neomycin eingesät und nach 24 h wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.1.2.3.5. Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum der *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Um zu überprüfen, ob Deferoxamin einen ähnlichen Einfluss auf das Wachstum von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen hat wie auf *Δesag6::NPT*-Zellen (s. 3.1.1.3.6.), wurden die Zellen mit 25 µM Chelator in Medium ohne Neomycin für 24 h inkubiert (Abb. 24). Während die Zellen sich in Abwesenheit des Eisenchelators vermehrten, teilten sie sich in Gegenwart von Deferoxamin nicht und begannen nach 24 h abzusterben. Das Experiment zeigt, dass Deferoxamin auch einen deutlichen Effekt auf *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen hat und nach einer gewissen Zeit (24 h) toxisch wirkt. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen nur 20 h mit 25 µM Deferoxamin inkubiert, um das Überleben der Zellen zu garantieren.

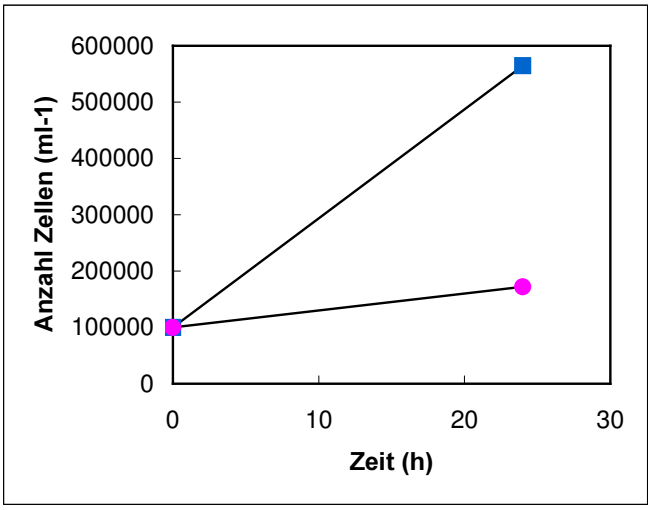



**Abb. 24: Einfluss von Deferoxamin auf das Wachstum von *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.** Die Zellen wurden zu einer Dichte von $1 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium ohne Neomycin mit 25 µM Deferoxamin (rosa Quadrate) oder ohne Deferoxamin (blaue Kreise) eingesät. Nach 24 h Inkubation wurde die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.1.2.3.6. Eisenabhängige Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen

Im Abschnitt 3.1.1.3.7. ist gezeigt worden, dass das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen in *Δesag6::NPT*-Zellen eisenabhängig reguliert wird, was mit früheren Ergebnissen für die eisenabhängige Regulation des Transferrinrezeptors im Einklang steht (Fast *et al.,* 1999). Wenn die *stem-loop*-Strukturen innerhalb der 5'-UTR von *ESAG6* eine Rolle bei der eisenabhängigen Regulation des Rezeptors spielen, so sollte das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen in den *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen, bei denen der zweite *stem-loop* der dem *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen flankierenden *ESAG6* 5'UTR deletiert worden war, nicht mehr eisenabhängig reguliert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen mit dem Eisenchelator Deferoxamin (25 μM) für 20 h inkubiert. Kontroll-Kulturen wurden ohne Deferoxamin, mit eisengesättigtem Chelator und mit Ammoniumeisencitrat inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und im Western-Blot mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase analysiert (Abb. 25). In allen vier Inkubationsansätzen wurde für die Neomycin-Phosphotransferase-Bande die gleiche Intensität festgestellt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Menge an Neomycin-Phosphotransferase bzw. die Trankription des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen unter Eisenmangel nicht erhöht ist. Es scheint also, dass der zweite *stem-loop* der *ESAG6* 5'-UTR für die eisenabhängige Regulation der Expression des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in den *Δesag6::NPT*-Zellen und folglich für die die eisenabhängige Regulation der Expression des Transferrinrezeptors verantwortlich ist.

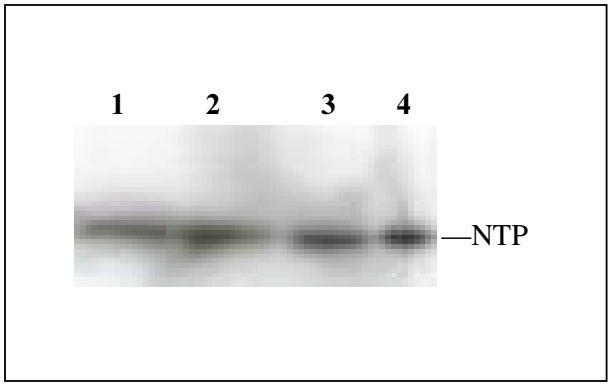



**Abb. 25: Western-Blot-Analyse zur eisenabhängigen Regulation der Neomycin-Phosphotransferase (NPT) in *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen.** Die Zellen wurden zu einer Dichte von $5 \times 10^5$ Zellen/ml in Medium allein (Bahn 1), in Medium mit 25 µM Deferoxamin (Bahn 2), in Medium mit 25 µM eisengesättigtem Deferoxamin, und in Medium mit 25 µM Ammoniumeisencitrat (Bahn 4) für 20 h inkubiert, anschließend lysiert und im Western-Blot mit Antikörpern gegen die Neomycin-Phosphotransferase untersucht. Pro Bahn sind $5 \times 10^5$ Zelläquivalente aufgetragen.

### 3.1.3. Diskussion der Ergebnisse

Die Regulation der Eisenhomöostase ist für Zellen und Organismen nicht nur wichtig zur Befriedigung des metabolischen Bedarfs an Eisen, sondern auch zur Minimierung der toxischen Wirkung von Eisen. Daher unterliegen Proteine und Enzyme des Eisenstoffwechsels einer strengen Regulation. Analog dem Transferrinrezeptor der Säugetierzelle können auch die Bluttrypanosomen ihren Transferrinrezeptor eisenabhängig regulieren (Fast *et al.*, 1999). Bei der Regulation des trypanosomalen Transferrinrezeptors scheint es sich um einen posttranskriptionalen Mechanismus zu handeln, denn die Expression des *VSG*-Gens, das sich zusammen mit den Genen für den Transferrinrezeptor in einer von einem Promotor kontrollierten Transkriptioneinheit befindet, wird nicht eisenabhängig reguliert (Fast *et al.*, 1999). Der Mechanismus der posttranskriptionalen Regulation des Transferrinrezeptors in Trypanosomen ist aber völlig verschieden vom IRE/IRP-Mechanismus des Transferrinrezeptors der Säugetierzelle (Hentze, 1995; Hentze & Kühn, 1996; Rouault & Klausner, 1997; Fast *et al.*, 1999). Weder eine IRP-1 verwandte, cytoplasmatische Aconitase ist an der Regulation des Transferrinrezeptors in *T. brucei* beteiligt, noch entsprechende IREs sind in der 3'-UTR der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA gefunden worden (Fast *et al.*, 1999). Daher sollte hier versucht werden, die für die eisenabhängige Expression des trypanosomalen Transferrinrezeptors verantwortlichen, regulatorischen Elemente in den UTR der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA mit Hilfe eines Reportergens zu identifizieren.

Zur Herstellung stabiler Transfektanten wurde, die sowohl bei *T. brucei*-Blutformen als auch bei *T. brucei*-Insektenformen etablierte, homologe Rekombination eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Gentransfer mittels linearer DNA-Sequenzen mit Sequenzabschnitten, die identisch zu genomischen DNA-Bereichen sind (Li & Gottesdiener, 1996). Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen wurde bei *T. brucei* bislang nichts über nicht-homologe DNA-Rekombination berichtet.

Bei der Analyse der Sekundärstrukturen der 5'-UTR der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA wurden zwei sehr ähnliche *stem-loop*-Strukturen identifiziert, bei denen es sich um regulatorische Elemente handeln könnte. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden daher zwei *ESAG6*-Knockout-Mutanten erzeugt, bei denen das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen (*NPT*) ausgetauscht worden war. In der einen Zelllinie war das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen am 5'-Ende von einer intakten *ESAG6* 5'-UTR

flankiert (*Δesag6::NPT*-Zellen), während in der anderen Zelllinie das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen am 5'-Ende von einer *ESAG6* 5'-UTR mit einer Deletion im zweiten *stem-loop* flankiert wurde (*Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen).

Beide Zelllinien exprimierten die Neomycin-Phosphotransferase, zeigten aber im Vergleich zu TC221 Wild-Typ-Zellen ein reduziertes Wachstum. Western-Blot-Analyse zur Menge des Transferrinrezeptors bestätigten, dass die Integration des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in die aktive Expressionsstelle in beiden Zelllinien stattgefunden hatte. Es wäre auch möglich gewesen, dass das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen sich in eine der stillen Expressionsstellen integriert, da im Genom von *T. brucei* etwa 20 Expressionsstellen vorkommen (Cully *et al.*, 1985; Zomerdijk *et al.*, 1990). Da aber nur eine Expressionsstelle aktiv ist (Cross, 1990; Chaves *et al.*, 1999) und die Zellen mit Neomycin selektiert wurden, sollten nur solche Zellen überlebt haben, bei denen das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen ausgetauscht worden war. Denn nur dann wird das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen transkribiert und kann eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum vermitteln. Die Deletion des *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle ist aber nicht letal, da die stillen Expressionsstellen nicht vollständig abgeschaltet sind (Alarcon *et al.*, 1999; Vanhamme *et al.*, 2000) und die Transfektanten eine geringe Menge an Transferrinrezeptor synthetisieren, die für das Überleben der Deletionsmutanten ausreicht (Ansorge *et al.*, 1999).

Wurden die *Δesag6::NPT*-Zellen einem Eisenmangel ausgesetzt, indem sie mit dem Eisenchelator Deferoxamin inkubiert wurden, so wurde eine Hochregulation der Neomycin-Phosphotransferase beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei den *Δ(-16/-29)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen unter Eisenmangel keine Hochregulation der Neomycin-Phosphotransferase festgestellt. Ebenso wurde keine erhöhte Menge an Neomycin-Phosphotransferase beobachtet, wenn die Zellen der beiden Knockout-Klone mit eisengesättigtem Chelator oder in Medium ohne Chelator inkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die eisenabhängige Regulation des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens von regulatorischen Sequenzabschnitten innerhalb der *ESAG6* 5'-UTR kontrolliert wurde. Folglich kann geschlossen werden, dass auch die eisenabhängige Regulation des Transferrinrezeptors in der Blutstromform von *T. brucei* von diesen regulatorischen Elementen in der *ESAG6* und *ESAG7* 5'-UTR kontrolliert werden.

Dass die eisenabhängige Regulation des trypanosomalen Transferrinrezeptors durch regulatorische Elemente in der UTR kontrolliert wird, ist nicht so sehr überraschend. Denn die Genregulation bei Trypanosomen erfolgt überwiegend posttranskriptionell (Vanhamme &

Pays, 1995; Graham, 1995; Clayton & Hotz, 1996). Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass in Trypanosomen die Protein-kodierenden Gene in großen polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert sind (Clayton, 1992; Pays, 1993). So sind auch die Gene des trypanosomalen Transferrinrezeptors mit dem *VSG*-Gen und weiteren Expressionsstellen-assoziierten Genen in einer Transkriptionseinheit zusammengefasst (Pays *et al.*, 1989). Diese Transkriptionseinheiten liefern zunächst eine polycistronische prä-RNA. Die Reifung in individuelle mRNA-Moleküle erfolgt durch einen koordinierten Prozess des Trans-Spleißens und der Polyadenylierung (Lee & Van der Ploeg, 1997). Die Signale für diesen Reifungsprozess befinden sich ebenfalls in den UTRs. Ferner spielen die UTRs eine wichtige Rolle für die Stabilität und die Translationsaktivität einer mRNA. Bei Trypanosomen wurden bislang regulatorische Sequenzen ausschließlich in der 3'-UTR gefunden. So wird die Expression der Gene für die Zelloberflächenproteine VSG und Procyclin durch Sequenzen in der 3'-UTR reguliert (Jefferies *et al.*, 1993; Hehl & Roditi, 1994; Berberof *et al.*, 1995; Hotz *et al.*, 1995, 1997). Die Beschreibung regulatorischerer Elemente in der 5'-UTR ist somit neu.

Im Gegensatz zum trypanosomalen Transferrinrezeptor, der anscheinend über Elemente in der 5'-UTR der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA eisenabhängig reguliert wird, wird der humane Transferrinrezeptor über Elemente in der 3'-UTR der Rezeptor-mRNA eisenabhängig kontrolliert (Abb. 26). Hierbei handelt es sich um fünf konservierte *stem-loop*-Strukturen (Haarnadelstrukturen), die als *iron-responsive elements* (IREs) bezeichnet werden. Bei niedriger, intrazellulärer Eisenkonzentration binden *iron regulatory proteins* (IRPs) an die IREs der Rezeptor-mRNA (Casey *et al.*, 1989; Horowitz & Harford, 1992). Dadurch wird die Stabilität der Rezeptor-mRNA erhöht, was zu einer gesteigerten Expression des Transferrinrezeptors führt (Müllner *et al.*, 1989). Wenn die Eisenkonzentration in der Zelle hoch ist, binden die IRPs Eisen und verlieren damit ihre Affinität zu den IREs. Dies hat zur Folge, dass die ungeschützte Rezeptor-mRNA durch Endonukleasen abgebaut wird (Binder *et al.*, 1994). Die eisenabhängige Regulation des trypanosomalen Transferrinzeptors sollte nach einem ähnlichem Mechanismus ablaufen (s. Abb. 26). In Säugetieren sind zwei *iron regulatory proteins*, IRP-1 und IRP-2, identifiziert worden. IRP-1 ist eine cytoplasmatische Aconitate mit zwei Funktionen. Wenn die Eisenkonzentration in der Zelle hoch ist, hat dieses Protein Eisen inkorporiert und zeigt Aconitase-Aktivität (Haile *et al.*, 1992). Wenn die intrazelluläre Eisenkonzentration niedrig ist, gibt das Protein Eisen ab und zeigt Bindungsaffinität für die spezifischen RNA-Strukturen der IRE (Haile *et al.*, 1992).

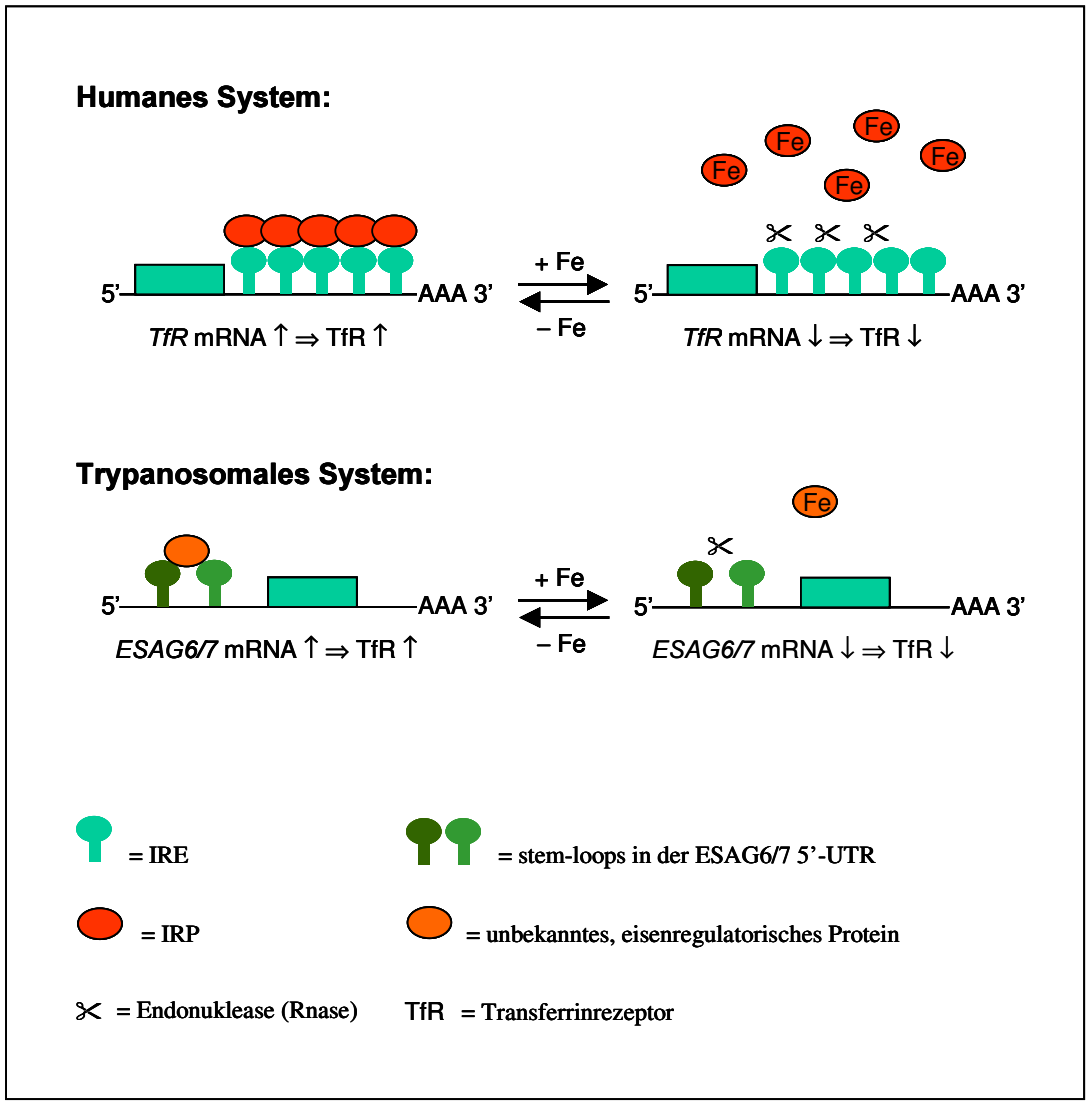



**Abb. 26. Modell zum Mechanismus der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors in humanen Zellen und Trypanosomen**. Einzelheiten siehe Text**.**

Bei niedriger, intrazellulärer Eisenkonzentration sollten eisenregulatorische Proteine an die eisenregulatorischen Elemente in der 5'-UTR der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA binden, wodurch die Stabilität der Transkripte erhöht werden sollte. Als Konsequenz sollte unter Eisenmangel die Menge an *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA in Trypanosomen erhöht sein. Tatsächlich wurde auch in Eisenchelator-behandelten Trypanosomen eine dreifach erhöhte Menge an *ESAG6*-mRNA gefunden (Fast *et al.,* 1999). Schlussendlich sollten die stabilisierte

*ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA zu einer gesteigerten Expression des Transferrinrezeptors in Trypanosomen unter Eisenmangel führen.
Als Eisensensor fungiert ein labiles Eisen-Schwefel-Cluster im katalytischen Zentrum des Proteins (Haile *et al.*, 1992). Das dem IRP-1 verwandte IRP-2 besitzt keine Aconitase-Aktivität und wird unter Eisensättigung schnell abgebaut (Guo *et al.*, 1995; Iwai *et al.*, 1998).

In Trypanosomen ist eine IRP-1 verwandte, cytoplasmatische Aconitase beschrieben worden (Saas *et al.*, 2000), die aber keine Rolle bei der eisenabhängigen Regulation des trypanosomalen Transferrinrezeptors spielt (Fast *et al.*, 1999). Da es keine Hinweise auf weitere IRP-verwandte Gene im Genom von *T. brucei* gibt, muss es anderen Proteine mit einer eisenregulatorischen Funktion in Trypanosomen geben. Die Existenz solcher eisenregulatorischen Proteine in *T. brucei* bleibt allerdings nachzuweisen.

## 3.2. Biochemische Charakterisierung einer *T. brucei*-Nukleosidmonophosphat-Kinase

Nukleosidmonophosphat-Kinasen (NMP-Kinasen) gehören zu einer Familie von ubiquitären Enzymen, die den reversiblen Transfer einer Phosphat-Gruppe von einem Nukleosidtriphosphat auf ein Nukleosidmonophosphat katalysieren. Aufgrund der Diskriminierung zwischen verschiedenen Nukleosidmonophosphaten sind die einzelnen NMP-Kinasen in Adenylat-, Cytidylat-, Thymidylat- und Uridylat-Kinasen unterteilt worden.
Bei Trypanosomen ist wenig über NMP-Kinasen bekannt. Mittels 3'-RACE-PCR wurde eine NMP-Kinase aus *T. brucei* kloniert (Kabiri & Steverding, unveröffentlichte Ergebnisse; GenBank® Zugangsnummer AF497801). Zur Überexpression wurde das *T. brucei-NMP-Kinase*-Gen in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Das erhaltene Konstrukt (pQE/*NMPK*) kodiert für die *T. brucei*-NMP-Kinase mit einer zusätzlichen 11 Aminosäure langen, 6 Histidinreste enthaltenen Sequenz (His-*tag*) am N-Terminus des Enzyms. Der pQE/*TbNMP*-Vektor wurde durch Elektroporation in kompetente *E. coli*-$XL_1$-Blue Zellen eingebracht (Kabiri & Steverding, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit stand ein heterologes Expressionssystem zur Verfügung, um die Substratspezifität und die kinetischen Eigenschaften dieser *T. brucei*-NMP-Kinase zu charakterisieren.

### 3.2.1. Reinigung der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase

Nach Induktion der mit dem Vektor pQE/*TbNMPK* transformierten *E. coli*-Zellen mit 60 µg/ml IPTG wurden die Bakterien geerntet und lysiert. Die Aufreinigung der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule. Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine mit zunehmender Imidazol-Konzentration eluiert und die gesammelten Fraktionen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 27). Der Großteil der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase eluierte bei einer Imidazol-Konzentration von 50 mM. In den proteinhaltigen Fraktionen war nur eine Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 25 kDa nachzuweisen. Das apparente Molekulargewicht stimmt sehr gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 23793 Da für das rekombinante Enzym mit dem His-*tag* überein.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt, mit Centricon Zentrifugen-Filtereinheiten gegen Standardpuffer (100 mM Triethanolamin, pH 7,6 (mit HCl), 90 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$) umgepuffert und zu einer Proteinkonzentration von 10 – 20 mg/ml aufkonzentriert.

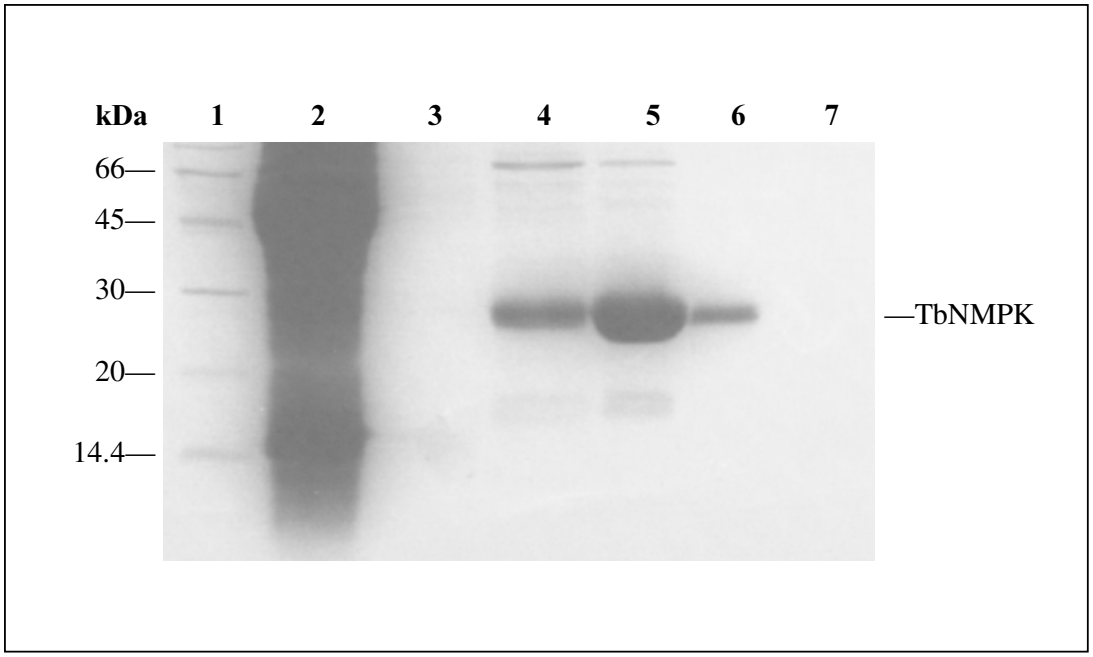



**Abb. 27: Reinigung der rekombinaten *T. brucei*-NMP-Kinase (TbNMPK) aus *E. coli*-Zelllysat.** Die NMP-Kinase wurde ausgehend vom Vektor pQE/NMP in *E. coli*-Zellen (1 Literkultur) exprimiert und affinitätschromatographisch mit einer Ni-NTA-Säule gereinigt. Die gebundene Proteine wurden mit steigender Imidazol-Konzentration eluiert und es wurden 6 ml-Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden 10 µl der Fraktionen in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert und die aufgetrennten Proteine mit Commassie Brilliant Blue angefärbt. Bahn 1: Protein-Marker; Bahn 2: Durchlauf des Zentrifugationsüberstandes der transformierten *E. coli*-Zellen; Bahn 3: Waschfraktion; Bahn 4: Elution mit 30 mM Imidazol; Bahn 5: Elution mit 50 mM Imidazol; Spur 6: Elution mit 75 mM Imidazol; Spur 7: Elution mit 100 mM Imidazol.

### 3.2.2. Produktion von Antikörpern gegen die rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase

Gereinigte, rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase wurde zur Herstellung von Antikörpern verwendet. Die Produktion der Antikörper erfolgte in Kaninchen durch die Firma Eurogentec (Belgien). Das Antiserum zeigte eine starke Reaktion mit dem rekombinanten Enzym in der Western-Blot-Analyse (Abb. 28). Neben einer Hauptbande bei 25 kDa war noch eine schwache Nebenbande bei 34 kDa zu beobachten. Die Kreuzreaktivität mit der 34 kDa-Proteinbande konnte durch Affinitätsreinigung des Antiserums eliminiert werden (s. 2.2.4.2.).

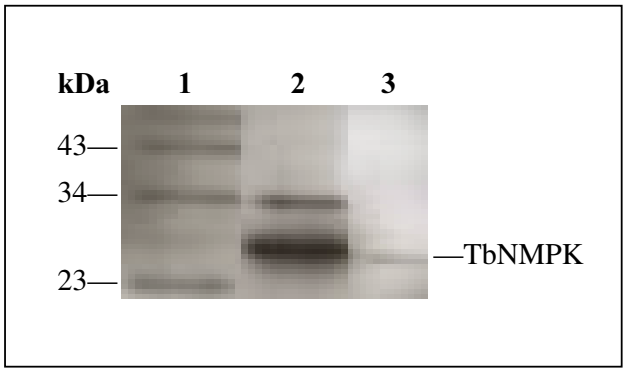



**Abb. 28: Western-Blot-Analyse der rekombinanten *T. brucei*-NMP-Kinase (TbNMPK).** Gereinigte *T. brucei*-NMP-Kinase wurde in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert, auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und mit Antikörpern (1:500 Verdünnung) gegen das rekombinante Enzym untersucht. Bahn 1: Protein-Marker; Bahn 2: 225 ng Protein; Bahn 3: 0,225 ng Protein.

### 3.2.3. Funktionelle Untersuchungen der *T. brucei*-NMP-Kinase

Die Enzymaktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde an Hand der Hinreaktion (NMP + ATP ↔ NDP + ADP) mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests bestimmt. Dieser Enzymtest beinhaltet die Kopplung der NMP-Kinase-Reaktionen mit der Pyruvatkinase- und der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion (Berghäuser, 1975). Dabei setzt die Pyruvatkinase das gebildete ADP mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat um, das dann die Lactat-Dehydrogenase mit Hilfe von NADH zu Lactat reduziert. Die Oxidation des NADH ist proportional zur Bildung des ADP durch die NMP-Kinase und wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt.
Mit den Substraten AMP und ATP betrug die spezifische Aktivität frisch gereinigter, rekombinanter *T. brucei*-NMP-Kinase bis zu 80 U/mg. Die Aktivität des Enzyms nahm während der Lagerung bei 4°C deutlich ab.

#### 3.2.3.1. Abhängigkeit der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase von der Salzkonzentration

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivität der NMP-Kinasen von der Salzkonzentration abhängig ist. Aus diesem Grund sollte die Salzabhängigkeit der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase näher untersucht werden.
Die Salzabhängigkeit der Aktivität frisch gereinigter *T. brucei*-NMP-Kinase wurde mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (50, 100, 200 und 300 mM) in zwei verschiedenen Puffer-Systemen mit ATP und AMP als Substraten bestimmt. Bei den Puffersystemen handelte es sich um Triethanolamin-Puffer (100 mM Triethanolamin, pH 8,0 (mit HCl), 1,4 mM $MgCl_2$) und Tricin-Puffer (50 mM Tricin, pH 8,0 (mit HCl), 1,4 mM $MgCl_2$), die häufig als Puffer für die Bestimmung der Enzymaktivität von NMP-Kinasen verwendet werden. Unabhängig vom verwendeten Puffersystem hat die *T. brucei*-NMP-Kinase eine etwa dreifach höhere Enzymaktivität in Puffer mit 100 mM KCl als in Puffer mit 50 mM KCl (Abb. 30). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration hatte keine weitere Zunahme der Aktivität zur Folge. Im Folgenden wurde die Enzymaktivität in Puffern mit 100 mM KCl gemessen.

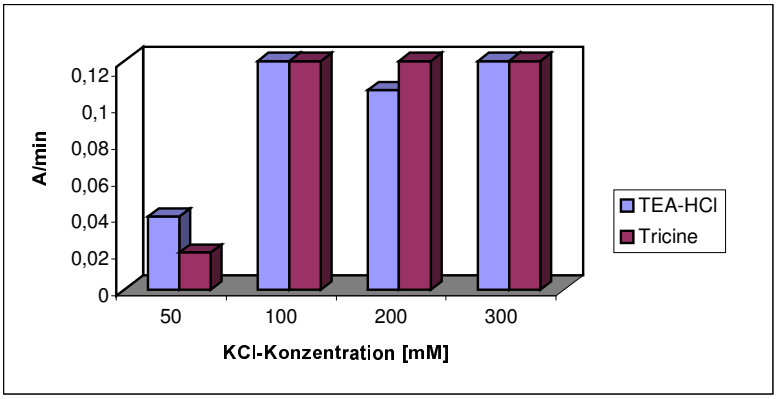



**Abb. 29: Abhängigkeit der Enzymaktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase von der KCl-Konzentration.** Die Enzymaktivität gereinigter, rekombinanter *T. brucei*-NMP-Kinase (12,5 µg/ml) wurde in Triethanolamin-Puffer (blaue Säulen) und in Tricin-Puffer (rote Säulen) mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen bestimmt.

### 3.2.3.2. Abhängigkeit der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase vom pH-Wert

Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde in Triethanolamin- und Tricin-Puffer bestimmt (Abb. 30). In Triethanolamin-Puffer hatte das Enzym sein pH-Optimum bei 7,0 – 7,5 und in Tricin-Puffer bei 7,5 – 8,5. Damit liegt das pH-Optimum der *T. brucei*-NMP-Kinase im Bereich des pH-Optimums von Adenylatkinasen (Hefe-AK: 7,8; *E. coli*-AK: 7,0; humane AK1: 8,0) aber nicht im Bereich der humanen Adenylatkinase 3 (humane AK3: 11,5) (Tomasselli & Noda., 1979; Ito *et al.*, 1983).
Für die folgenden Analysen wurde die Enzymaktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase in Triethanolamin-Puffer, pH 7,6 mit 100 mM KCl und 1,5 mM $MgCl_2$ gemessen.

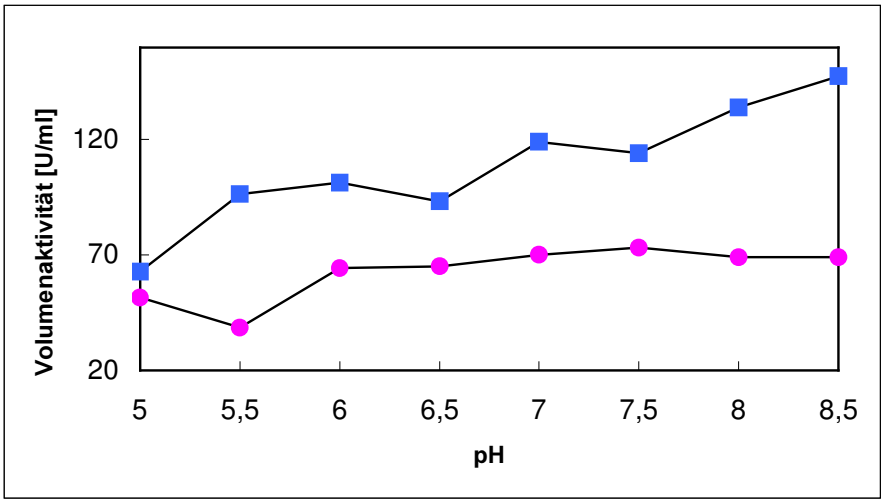



**Abb. 30: Abhängigkeit der Enzymaktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase vom pH-Wert.** Die Enzymaktivität gereinigter, rekombinanter *T. brucei*-NMP-Kinase (12,5 µg/ml) wurde in Triethanolamin-Puffer (rosa Kreise) und in Tricin-Puffer (blaue Quadrate) bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt.

### 3.2.3.3. Substratspezifität der *T. brucei*-NMP-Kinase

NMP-Kinasen übertragen eine Phosphat-Gruppe von einem Nukleosidtriphosphat auf ein Nukleosidmonophosphat. Die Bevorzugung bzw. Diskriminierung von AMP als Phosphatakzeptor gegenüber anderen Nukleosidmonophosphaten wie CMP und UMP ermöglicht eine weitere Klassifizierung der NMP-Kinasen. Als Adenylatkinasen (NTP:AMP-Phosphotransferasen) bezeichnet man NMP-Kinasen die bevorzugt AMP als Phosphatakzeptor verwenden. Andere NMP-Kinasen wie die Uridylatkinasen oder Cytidylatkinasen dagegen bevorzugen andere Nukleosidmonophosphate. Neben ATP verwenden NMP-Kinasen auch andere Nukleosidtriphosphate. Zum Beispiel bevorzugt die humane Adenylatkinase 3 (AK3), die im Mitochondrium vorkommt, GTP gegenüber ATP als Nukleosidtriphosphat-Substrat. Zur besseren Klassifizierung der *T. brucei*-NMP-Kinase sollte die Substratspezifität mit Hilfe verschiedener NTP/NMP-Kombinationen bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Substratspezifität der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde die Aktivität des gereinigten, rekombinanten Enzyms mit AMP, CMP, UMP, GMP und IMP (jeweils bei einer Konzentration von 2,3 mM) bei konstanter ATP-Konzentration (0,8 mM) gemessen (Tabelle 11). Während die spezifische Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase mit CMP 58,4 U/mg betrug, zeigte das Enzym mit AMP eine Aktivität von nur 25,9 U/mg. Somit betrug die spezifische Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase mit AMP nur 44% der Aktivität mit CMP. Mit UMP wurde eine geringe Aktivität festgestellt, mit GMP und IMP dagegen zeigte das Enzym keine messbare Aktivität (Tabelle 11). Bei konstanter AMP-Konzentration (2,3 mM) zeigte die *T. brucei*-NMP-Kinase eine Aktivität mit allen Nukleosidtriphosphaten (jeweils bei einer Konzentration von 0,8 mM), obgleich ATP das bevorzugte Substrat war (Tabelle 11). Die Aktivität mit CTP, UTP, GTP und ITP betrug nur 3 – 7% der Aktivität mit ATP. Aufgrund der Substratspezifität kann die *T. brucei*-NMP-Kinase als eine CMP-Kinase mit einer ungewöhnlich hohen Affinität für AMP betrachtet werden.

**Tabelle 11: Substratspezifität der *T. brucei*-NMP-Kinase.** Die Substrat-Konzentrationen waren 2,3 mM NMP und 0,8 mM NTP.

| Substrate | spezifische Aktivität [U/mg] | relative Aktivität [%] |
|---|---|---|
| AMP/ATP | 25,90 | 100,0 |
| CMP/ATP | 58,40 | 25,0 |
| UMP/ATP | 1,90 | 7,3 |
| GMP/ATP | 0,04 | 0,2 |
| IMP/ATP | 0,07 | 0,3 |
| AMP/CTP | 0,70 | 2,7 |
| AMP/UTP | 1,00 | 3,9 |
| AMP/GTP | 1,50 | 5,8 |
| AMP/ITP | 1,70 | 6,6 |

### 3.2.3.4. Bestimmung der $K_m$- und $V_{max}$-Werte an der *T. brucei*-NMP-Kinase

Zur Charakterisierung von Enzymen gehört die Bestimmung der kinetischen Parameter $K_m$ und $V_{max}$. Der $K_m$-Wert, oder die Michaelis-Menten-Konstante ist die Substratkonzentration, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt. Der $V_{max}$-Wert ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms unter Substratsättigung. Zur Bestimmung des $K_m$-Wertes an der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen. Da NMP-Kinasen zwei Substrate umsetzen, wurde bei der Messung die Konzentration des einen Substrates konstant gehalten, während die Konzentration des anderen Substrates variiert wurde. Der $K_m$-Wert wurde mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots ermittelt.

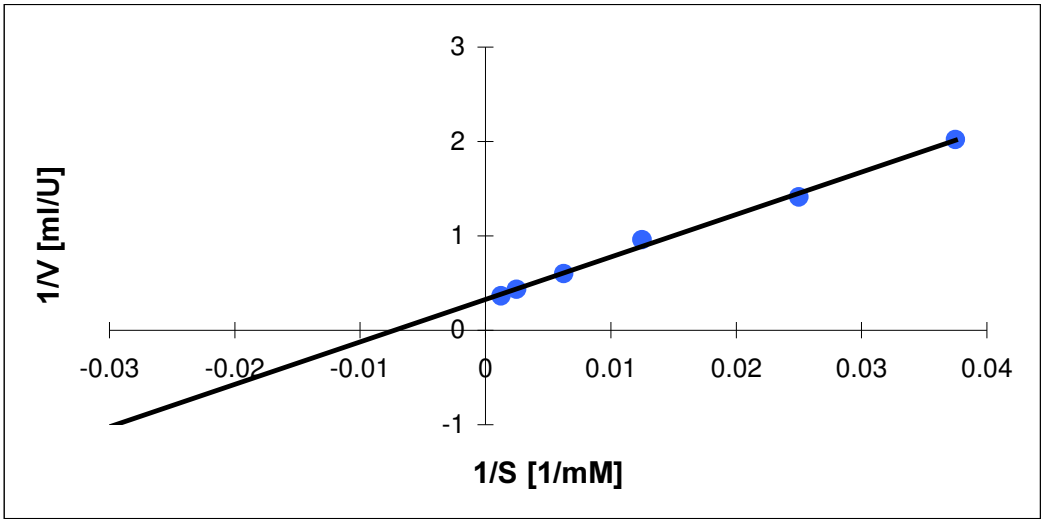



**Abb. 31: Lineweaver-Burk-Plot zur $K_m$-Bestimmung an der *T. brucei*-NMP-Kinase für ATP.** Die Enzymaktivität wurde mit 10 mM AMP und unterschiedlichen ATP-Konzentrationen gemessen.

Mit 10 mM AMP zeigte die *T. brucei*-NMP-Kinase einen $K_m$-Wert von 0,14 mM für ATP und der berechnete $V_{max}$-Wert lag bei 63 U/mg (Abb. 31). Mit 0,14 mM ATP zeigte das Enzym einen niedriger $K_m$-Wert für CMP (0,19 mM) als für AMP (3,2 mM) (Abb. 32). Dies

bedeutet, dass die *T. brucei*-NMP-Kinase eine höhere Affinität für CMP als für AMP hat. Dieses Ergebnis steht voll im Einklang mit den Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms, die CMP als das besseres Substrat identifiziert hatten (s. Tabelle 11). Die $V_{max}$-Werte für CMP und AMP ließen sich auf der Basis der $K_m$-Werte abschätzen und lagen für die Kombination CMP/ATP bei 88 U/mg und für die Kombination AMP/ATP bei 77 U/mg. Allerdings wurde die maximale Umsatzgeschwindigkeit mit CMP schon bei niedrigeren Substratkonzentrationen erreicht.

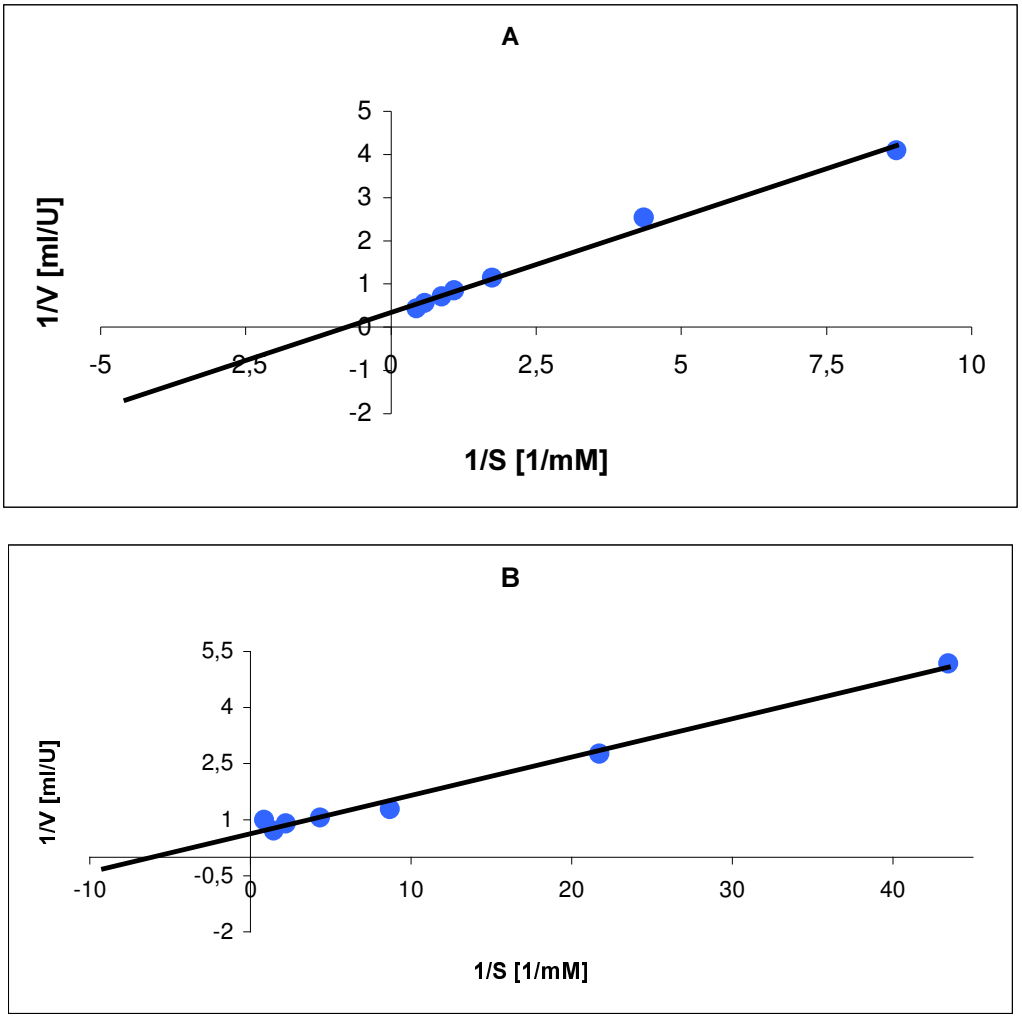



**Abb. 32: Lineweaver-Burk-Plots zur Km-Bestimmung an der *T. brucei*-NMP-Kinase für AMP (A) und CMP (B).** Die Enzymaktivität wurde mit 0,14 mM ATP und unterschiedlichen Nukleosidmonophosphat-Konzentrationen gemessen.

### 3.2.3.5. Hemmung der Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase

Diadenosinpentaphosphat ($AP_5A$) und Derivate gehören zu den klassischen Inhibitoren von NMP-Kinasen und anderen Nukleosid-abhängigen Enzymen. Diese Inhibitoren kommen auch in menschlichen Pankreas- und Herz-Zellen vor und werden als Stress-Signal-Moleküle oder Alarmone bezeichnet (Varshavsky, 1983; Lee *et al.*, 1983; Johnstone & Farr, 1991; Jovanovic & Terzic, 1995). Aufgrund der Strukturanalogie mit Nukleosidmonophosphaten und Nukleosidtriphosphaten hemmt $AP_5A$ kompetitiv NMP-Kinasen. Die Inhibierung der Adenylatkinasen durch Diadenosinpentaphosphat ist gut charakterisiert worden. $AP_5A$ ist ein Bisubstratanalogon, das als Nukleosidmonophosphat und als Nukleosidtriphosphat von Adenylatkinasen erkannt wird. Es besteht aus zwei über 5'-Phosphatgruppen verbundenen Adenosinresten und wird somit gleichzeitig von beiden Substratbindungsstellen der Adenylatkinase gebunden. Als Folge kann das Enzym seine Substrate nicht mehr binden (Abele & Schulz, 1995). Mit einer Inhibitorkonstante von $K_i$ = 30 nM erwies sich $AP_5A$ als einer der stärkste kompetitive Inhibitor der AK1 (Lienhard & Secemski, 1973; Byeon *et al.*, 1993).

Auch die Aktivität der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde durch $AP_5A$ inhibiert (Abb. 33). Mit steigender $AP_5A$-Konzentration wurde die Aktivität des Enzyms zunehmend gehemmt. Mit 50 µM $AP_5A$ zeigte das Enzym eine Restaktivität von nur 8%. Der $IC_{50}$-Wert, diejenige Konzentration des Inhibitors, die eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt, betrug etwa 4 µM. Dieses Ergebnis zeigt, dass wie andere NMP-Kinasen auch die *T. brucei*-NMP-Kinase durch den klassischen Inhibitor $AP_5A$ kompetitiv gehemmt wird.

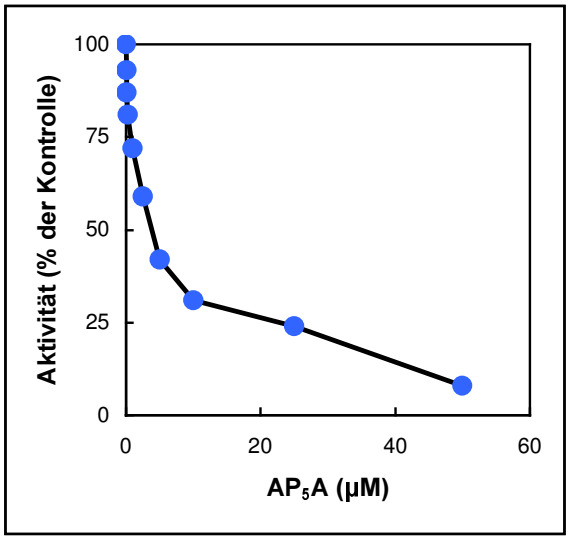



**Abb. 33: Inhibierung der *T. brucei*-NMP-Kinase durch Diadenosinpentaphosphat.** Gereinigte, rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase (0,3 µM) wurde mit 0 – 50 µM Diadenosinpentaphosphat ($AP_5A$) für 5 min inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität mit 0,8 mM ATP und 2,3 mM AMP bestimmt. Die Aktivität ist als relative Aktivität (%) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt.

### 3.2.4. Vorkommen der NMP-Kinase im Lebenszyklus von *T. brucei*

*Trypanosoma brucei* hat einen komplexen Lebenszyklus, in dessen Verlauf der Parasit zwischen Lebensstadien im Säugetierwirt und Insektenvektor, und zwischen sich teilenden und nicht-teilenden Formen wechselt (Vickerman, 1985). Im Blut und in der Lymphflüssigkeit des Säugetierwirtes kommen die Trypanosomen als schlanke, sich teilende Blutformen (*long slender*-Form) vor, die sich mit zunehmender Parasitämie in gedrungene, sich nicht-teilende Blutformen (*short stumpy*-Form) differenzieren. Diese Differenzierung ist verbunden mit einer Verkürzung des Flagellums, einer Vergrößerung des Mitochondriums und der Expression einiger Enzyme des Krebs-Zyklus und der Atmungskette. Die *short stumpy*- Formen sind für den Übergang in den Insektenvektor präadaptiert, wenn sie bei der Blutmahlzeit der Tsetsefliege aufgenommen werden. Nach Aufnahme in die Fliege differenzieren sich die *short stumpy*-Formen zur procyclischen Insektenformen. Diese Transformation ist mit weiteren morphologischen und metabolischen Veränderungen verbunden, wie z. B. dem Wechsel der Oberflächenantigene vom VSG zum Procyclin und des Energie-Metabolismus von der Glukolyse zur oxidativen Phosphorylierung. Aufgrund der Komplexität des Lebenszyklus von *T. brucei* sollte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern das Vorkommen der NMP-Kinase in verschiedenen Lebensstadien untersucht werden.

In allen untersuchten Lebensstadien, in kultur-adaptierten, schlanken und gedrungenen Blutformen sowie in prozyklischen Insektenformen, konnte eine Proteinbande von 24 kDa mit Antikörpern gegen die *T. brucei*-NMP-Kinase detektiert werden (Abb. 34). Dabei scheint es, dass die NMP-Kinase in den sich im Zellarrest befindlichen gedrungenen Blutformen herunterreguliert war. Die Homogenität der einzelnen Parasitenpopulationen wurde mit Antikörpern gegen stadienspezifische Proteine bestätigt (Daten nicht gezeigt, siehe Breidbach *et al.*, 2000).

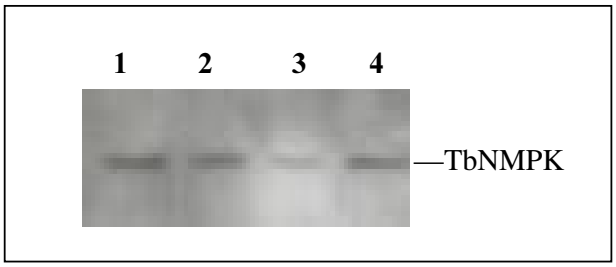



**Abb. 34: Western-Blot-Analyse zum Vorkommen der NMP-Kinase (TbNMPK) in verschiedenen Lebensstadien von *T. brucei*.** Parasiten verschiedener Lebensstadien wurden lysiert, 20 µg Protein in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und mit aufgereinigten Antikörpern (1:100) gegen *T. brucei*-NMP-Kinase untersucht. Bahn 1: kultur-adaptierte Blutform; Bahn 2: sich teilende, schlanke Blutform; Bahn 3: sich nicht-teilende, gedrungene Blutform; Bahn 4: sich teilende, procyclische Insektenform.

### 3.2.5. Kristallisationsversuche mit der *T. brucei*-NMP-Kinase

Zur Aufklärung der atomaren Struktur von Molekülen wird die Röntgenkristallographie eingesetzt. Mit dieser Methode wurde u. a. die Struktur biologischer Moleküle wie DNA-Doppelhelix und Hämoglobin aufgeklärt (Watson & Crick, 1953; Kendrew, 1961). Auch die Kristallstrukturen einiger Adenylatkinasen sind bereits bekannt, wie die der AK1 vom Schwein und der AK3 von Rind, Hefe und *E. coli* (Dreusicke *et al.*, 1988; Diederichs & Schulz, 1991; Abele & Schulz, 1995).

Die Kristallisationsversuche mit der *T. brucei*-NMP-Kinase wurden in Gegenwart von Substrat durchgeführt. Es wurden 16 µg gereinigtes, rekombinantes Enzym mit 4 mM ATP in 2 µl mit 2 µl Präzipans gemischt und als hängender Tropfen gegen 800 µl Reservoir (600 µl Puffer + 200 µl bidestilliertem Wasser) inkubiert. Nach ca. zwei Wochen wuchsen kleine Kristalle bei den Inkubationsansätzen mit dem Puffer 34 (2,0 M Natriumformiat, 0,1 M Natriumacetat, pH 4,6) und dem Puffer 48 (2,0 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5) heran. Allerdings waren die Kristalle zu klein, so dass sie röntgenkristallographisch nicht untersucht werden konnten.

### 3.2.6. Diskussion der Ergebnisse

NMP-Kinasen sind essentiell für das Wachstum von Einzellern wie Hefe und von Bakterien wie *E. coli* (Cronan & Godson, 1972; Konrad, 1993) und kommen in zahlreichen Isoformen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. In der Säugetierzelle kommen z. B. Adenylatkinasen im Cytosol (AK1), im Zwischenraum der Mitochondrien (AK2) und in der mitochondrialen Matrix (AK3) vor (Noda, 1973; Khoo & Russell, 1972; Tomasselli & Noda, 1980, Nakazawa *et al.,* 1990). Darüber hinaus wurden weitere Adenylatkinasen, AK4 und AK5, bei Säugern charakterisiert (Yoneda *et al.*, 1998). Allgemein übertragen NMP-Kinasen eine Phosphatgruppe von einem Nukleosidtriphosphat auf ein Nukleosidmonophosphat, was zur Bildung von Nukleosiddiphosphaten führt. Aufgrund der Diskriminierung der NMP-Kinase zwischen den verschiedenen Nukleosidmonophosphaten lassen sich die NMP-Kinasen in Adenylat-, Cytidylat-, Thymidylat- und Uridylat-Kinase unterteilen, wobei die Adenylatkinasen zu den am besten charakterisierten NMP-Kinasen gehören. Über NMP-Kinasen bei Trypanosomen ist bisher wenig bekannt.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte NMP-Kinase von *T. brucei* besteht aus 200 Aminosäuren (Abb. 35) und gehört demnach zur Klasse der kurzen NMP-Kinasen. Der Vergleich mit anderen NMP-Kinasen zeigte eine 40%ige Ähnlichkeit mit Adenylatkinasen und ein 60%ige Ähnlichkeit mit Uridylatkinasen. Darüber hinaus wurden zahlreiche konservierte und für die NMP-Kinase charakteristische Reste in der Sequenz gefunden. Das GxPGxGxGKGTQ-Motiv als charakteristisches Merkmal für ATP-Bindungsproteine erstreckt sich von Aminosäurerest G14 bis V23. Zwei Aspartatreste, die wichtig für die Koordination von $Mg^{2+}$ sind, wurden als die Reste D40 und D92 identifiziert. Es wurden weitere Reste in der *T. brucei*-NMP-Kinase Sequenz entdeckt, die in dieser Proteinfamilie konserviert sind, aber deren Funktion noch unbekannt ist. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren G39, R43, G93, P95, R127, G137, R138, D140, D141 und R149. Die Reste A38, L42, I66, V67, T72 und F94 sind konservierte Aminosäuren, die charakteristisch für Uridylatkinasen sind. Der Asparaginrest, der eine kritische Rolle in der Diskriminierung von UMP und CMP gegenüber AMP spielt (Scheffzek *et al.*, 1996) und in Uridylatkinasen von Schwein, *Dictyostelium discoideum* und *Entamoeba histolytica* konserviert ist (Sanchez & Müller, 1998), ist in der *T. brucei*-NMP-Kinase durch einen Glutaminrest (Q90) ausgetauscht. An der entsprechenden Position besitzen Adenylatkinasen ebenfalls einen Glutaminrest, aber auch die Uridylatkinase von *Saccharromyces cerevisiae* (Q111), eine CMP/UMP-Kinase, die

ein breiteres Substratspektrum hat und neben UMP und CMP auch AMP umsetzt (Müller-Dickmann & Schulz, 1994; Schricker *et al.*, 1992). Auf Grund der Sequenzanalyse ist zu vermuten, dass es sich bei der *T. brucei*-NMP-Kinase wohl um eine Uridylatkinase (CMP/UMP-Kinase) und nicht um eine Adenylatkinase handelt.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | MTSTEKPKVF | FVL**GGPGSGK** | **GTV**CARLVEE | FGYTHF*SAGD* | 40 |
| 41 | *LLRQASRDKT* | *TEVAQKISQI* | *LV*EGGIVPSE | LTVALLKNAL | 80 |
| 81 | NTHPSPRGYV | IDGFPRKMDQ | MFMFEEDIVP | AKAILFFDCT | 120 |
| 121 | EETMEARLIG | RASSGSGRDD | DNIETIRRRF | RTNAEQCVPV | 160 |
| 161 | VEHYKKQGRL | YTVDGNRSRE | EVYADVNKIF | LKEGEELLKK | 200 |

**Abb. 35: Aminosäuresequenz der *T. brucei*-NMP-Kinase**. Fett, ATP-Bindungsmotiv; kursiv, NMP-Bindungsdomäne; rot, Aspartatreste für die Koordination von $Mg^{2+}$; rosa, konservierte Reste charakteristisch für die NMP-Kinase-Familie; blau, konservierte Reste charakteristisch für Uridylatkinasen; grün, Glutaminrest 90.

Zur besseren Klassifizierung der *T. brucei*-NMP-Kinase wurde die Substratspezifität bestimmt. Diese Untersuchungen wurden mit gereinigtem, rekombinant in *E. coli*-Zellen exprimiertem Enzym durchgeführt. Da das Enzym am N-Terminus einen His-*tag* besaß, konnte die *T. brucei*-NMP-Kinase in einem Arbeitsschritt durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden. Das gereinigte Enzym ergab in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine Bande von 25 kDa, was mit dem theoretischen Molekulargewicht von 23793 Da für die rekombinante *T. brucei*-NMP-Kinase sehr gut übereinstimmte.

Die Substratspezifität der *T. brucei*-NMP-Kinase zeigt ein ungewöhliches Spektrum. Neben CMP und UMP wurde auch AMP vom Enzym umgesetzt. Allerdings war CMP das bevorzugte Substrat, gefolgt von AMP und UMP. Bestätigt wurde die Substratspezifität durch kinetische Untersuchungen. Der $K_m$-Wert für AMP war etwa 17-fach größer als der für CMP. Dies zeigt, dass die *T. brucei*-NMP-Kinase eine höhere Affinität zu CMP als zu AMP hat. Als Phosphatdonator verwendete das Enzym alle Nukleosidtriphosphate, wobei ATP das deutlich bevorzugte Substrat war. Die Bestimmung der Substratspezifität bestätigt die Ergebnisse der Sequenzanalyse, dass es sich bei der *T. brucei*-NMP-Kinase um eine CMP/UMP-Kinase mit einer zusätzlichen Affinität für AMP handelt. Die ausgeprägte Affinität für AMP ist

vermutlich damit zu erklären, dass die *T. brucei*-NMP-Kinase an der Position 90 einen Glutaminrest besitzt und nicht einen Asparaginrest wie andere Uridylatkinasen. Dieser Asparaginrest scheint eine wichtige Rolle in der Diskriminierung von CMP und UMP gegenüber AMP zu spielen (Scheffzek *et al.*, 1996). Interessanterweise hat auch die URA6-Kinase von *S. cerevisiae*, eine Uridylatkinase mit einem breiten Substratspektrum, ebenfalls an der entsprechenden Position einen Glutaminrest (Müller-Dickmann & Schulz, 1994; Schricker *et al.*, 1992).

Eine weitere Besonderheit der *T. brucei*-NMP-Kinase ist die Sensitivität gegenüber dem klassischen Adenylatkinase Hemmstoff Diadenosinpentaphosphat ($AP_5A$; Feldhau *et al.*, 1975). Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor, der als Strukturanalogon gleichzeitig an beide Nukleosidphosphat-Bindungsstellen bindet. Im Gegensatz dazu sind klassische Uridylatkinasen, die nur eine sehr geringe Aktivität für AMP besitzen, unempfindlich gegenüber Diadenosinpentaphosphat (Sanchez & Müller, 1998). Dieses Ergebnis ziegt einmal mehr, dass es sich bei der untersuchten *T. brucei*-NMP-Kinase um eine ungewöhliche Nukleosidmonophosphat-Kinase handelt. In Anbetracht der Substratspezifität und der Sensitivität gegenüber $AP_5A$ wäre die *T. brucei*-NMP-Kinase wohl eher als eine CMP/AMP-Kinase zu klassifizieren.

Die *T. brucei*-NMP-Kinase kam in allen untersuchten Lebensstadien des Parasiten vor. Allerdings war das Enzym in den sich im Zellarrest befindlichen *short stumpy*-Formen herunterreguliert. Man könnte daher vermuten, dass die physiologische Rolle der *T. brucei*-NMP-Kinase im Pyrimidinstoffwechsel des Parasiten zu finden ist, speziell in der Synthese von CTP für die DNA. Diese Vermutung wird noch dadurch unterstützt, dass der CTP-Pool der Trypanosomen sehr klein ist und nur etwa 1% des gesamten NTP-Pools ausmacht (Hofer *et al.*, 1998, 2001). Auf ein einzelnes Trypanosom bezogen ergibt dies eine intrazelluläre CTP-Konzentration von 26 μM, was zehnmal niedriger ist als in Säugetierzellen (Hofer *et al.*, 1998). Allerdings kann *T. brucei* CTP nur *de novo* von UTP ausgehend synthetisieren und nicht von Cytosin oder Cytidin (Hofer *et al.*, 2001). Ferner zeigten RNA-Interferenz-Experimente, dass die hier untersuchte *T. brucei*-NMP-Kinase nicht essentiell für das Überleben oder Wachstum des Parasiten ist (M. Ginger (University of Manchester), persönliche Mitteilung). Somit ist die physiologische Rolle dieser ungewöhnlichen *T. brucei*-NMP-Kinase noch nicht geklärt.

# 4. ZUSAMMENFASSUNG

## 4.1. Die Rolle der *ESAG6/7* 5'-UTR bei der eisenabhängigen Regulation des Transferrinrezeptors in *T. brucei*

Der trypanosomale Transferrinrezeptor unterscheidet sich hinsichtlich Struktur und Organisation vom humanen Transferrinrezeptor und ist ein Heterodimer bestehend aus den zwei Expressionsstellen-assoziierten Genprodukten ESAG6 und ESAG7. Wie der humane Transferrinrezeptor so wird auch der trypanosomale Transferrinrezeptor eisenabhängig reguliert. Allerdings ist der Mechanismus der eisenabhängigen Regulation des trypanosomalen Transferrinrezeptors völlig verschieden vom IRE/IRP-Mechanismus des humanen Transferrinrezeptors. Bei der Strukturanalyse der *ESAG6*- und *ESAG7*-mRNA wurden sehr ähnliche Haarnadelstrukturen innerhalb der 5'-UTR der beiden mRNA-Moleküle identifiziert. Zur Untersuchung, ob es sich hierbei um eisenregulatorische Elemente handeln könnte, wurden *ESAG6*-Deletionsmutanten mit intakter und partiell deletierter *ESAG6* 5'-UTR (von Nukleotid -29 bis Nukleotid -16) hergestellt. Dabei wurde das *ESAG6* der aktiven Expressionsstelle gegen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen (*NTP*) durch homologe Rekombination ausgetauscht. Während in den *Δesag6::NPT*-Zellen das *Neomycin-Phosphotransferase*-Gen eisenabhängig reguliert wurde, war die eisenabhängige Regulation des *Neomycin-Phosphotransferase*-Gens in den *Δ(-29/-16)5'-utr Δesag6::NPT*-Zellen aufgehoben. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei den Haarnadelstrukturen innerhalb der *ESAG6/7* 5'-UTR um Elemente handelt, die die eisenabhängige Expression des Transferrinrezeptors in *T. brucei* regulieren.

## 4.2. Charakterisierung einer NMP-Kinase in *T. brucei* mit ungewöhnlichem Substratspektrum

Nukleosidmonophosphat (NMP)-Kinasen gehören zu den Phosphotransferasen und werden nach ihrer Substratspezifität bezüglich des Phosphorylgruppenakzeptors klassifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bereits klonierte *T. brucei*-NMP-Kinase hinsichtlich der Substratspezifität, der kinetischen Eigenschaften und des Vorkommens im Lebenzyklus des Parasiten untersucht. Das Enzym zeigte eine ungewöhnliche Substratspezifität und setzte neben CMP und UMP auch AMP um. Das bevorzugte Substrat war jedoch CMP, gefolgt von AMP und UMP mit relativen Aktivitäten von 44% bzw. 3% im Vergleich zu CMP. $K_m$-Werte

von 0,19 mM für CMP und 3,2 mM für AMP bestätigten die Substratspezifität und zeigten, dass das Enzym eine höhere Affinität zu CMP als zu AMP hat. Das Enzym erreichte mit beiden Subtraten ähnliche $V_{max}$-Werte um 80 U/mg, der allerdings mit CMP schon bei niedriger Substratkonzentration erreichte wurde. Das bevorzugte Nukleosidtriphosphat-Substrat war ATP. Eine weitere Besonderheit des Enzyms war die Sensitivität gegenüber dem spezifischen Adenylatkinase Inhibitor Diadenosinpentaphosphat. Das Enzym wurden in allen untersuchten Lebensstadien des Parasiten nachgewiesen. Aufgrund der Substratspezifität und der größeren Ähnlichkeit mit Uridylatkinase (60%) ist die untersuchte *T. brucei*-NMP-Kinase als eine CMP/UMP-Kinase mit ungewöhlich hoher Affinität für AMP zu klassifizieren.

# 5. LITERATURVERZEICHNIS


Abele, U., Schulz, G.E., 1995. High-resolution structures of adenylate kinase from yeast ligated with inhibitor AP5A, showing the pathway of phosphoryl transfer. *Protein Sci.* **4**, 1262-1271.

Agabian, N., 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* **61**, 1157-1160.

Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M., 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 940-959.

Alarcon, C.M., Jin Son, H., Hall, T., Donelson, J.E., 1994. A monocistronic transcript for a trypanosome variant surface glycoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5579-5591.

Alarcon, C.M., Pedram, M., Donelson, J.E., 1999. Leaky transcription of variant surface glycoprotein gene expression sites in bloodstream African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 16884-16893.

Allred, D.R., Cinque, R.M., Lane, T.J., Ahrens, K.P., 1994. Antigenic variation of parasite derived antigens on the surface of *Babesia bovis*-infected erytrocytes. *Infect. Immun.* **62**, 91-98.

Ansorge, I., Steverding, D., Melville, S., Hatmann, C., Clayton, C., 1999. Transcription of inactive expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptor RNAs in bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **101**, 81-94.

Aparicio, O.M., Gottschling, D.E., 1994. Overcoming telomeric silencing: a trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev.* **8**, 1133-1146.

Atkinson, D.E., 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York.

Balasundaram, D., Dinman, D.J., Wickner, R.B., Tabor, C.W., Tabor, H., 1994. Spermidine deficiency increases +1 ribosomal frameshifting efficiency and inhibits Ty1 retrotransposition in *Saccharomyces cerevisae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 172-176.

Balber, A.E., 1990. The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. *Crit. Rev. Immunol.* **10**, 177-201.

Baltz T., Baltz, D., Giroud, C., Crocket, J., 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T .rhodensiense* and *T. gambiense*. *EMBO J.* **4**, 1273-1277.

Barbour, A.G., Restrepo, B.I., 2000. Antigenic variation in Vector-borne Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 449-457.

Barry, J.D., Graha, S.V., Fotheringham, M., Graham, S.V., Kobryn, K., Wyner, B., 1998. VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem.Parasitol.* **91**, 93-105.

Bennett, W.S.Jr., Steitz, T.A., 1980. Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. Detailed comparisons of conformation and active site conformation with the native hexokinase B monomer and dimer. *J. Mol. Biol.* **140**, 211-230.

Berberof, M., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Welburn, S., Pays, E., 1995. The 3'- terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specifity to gene expression in *T. brucei*. *EMBO J.* **14**, 2925-2934.

Berghäuser, J, 1975. A reactive arginine in adenylate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **397**, 370-376.

Bernards, A., van Harten-Loosbroek, N., Borst, P., 1984. Modification of telomeric DNA in *Trypansoma brucei*: a role in antigenic variation? *Nucleic Acids Res.* **12**, 4153-4170.

Berry, M.B., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M., Philipps, G.N.Jr., 1994. The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins* **19**, 183-198.

Binder, R., Horowitz, J.A., Basilion, J.P., Koeller, D.M., Klausner, R.D., Harford, J.B., 1994. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3'-UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J.* **13**, 1969-1980.

Blum, B., Bakalara, N., Simpson, L., 1990. A model of RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide"RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* **60**, 189-198.

Blum, M.L., Down, J.A., Gurnett, A.M., Carrington, M., Turner, M.J., Wiley, D.C., 1993. A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature* **362**, 603-609.

Borst, P., Fairlamb, A.H., 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Ann. Rev. Microbiol.* **52**, 745-778.

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

Breidbach, T., Krauth-Siegel, R.L., Steverding, D., 2000. Ribonucleotide reductase is regulated via the R2 subunit during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* **473**, 212-216.

Breidbach, T., Scory, S., Krauh-Siegel, R.L., Steverding, D., 2002. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int. J. Parasitol.* **32**, 473-479.

Bridges, K., Harford, J., Ashwell, G., Klausner, R.D., 1982. Fate of receptor and ligand during endocytosis of asialoglycoproteins by isolated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 350-354.

Byeon, I.J., Yan, H., Edison, A.S., Mooberry, E.S., Abilgard, F., Markley, J.L., Tsai, M.D., 1993. Mechanism of adenylate kinase 1H, 13C, 15N NMR assignments, secondary structures and substrate binding sites. *Biochemistry* **32**, 12508-12521.

Casey, J.L., Koeller, D.M., Ramin, V.C., Klausner, R.D., Harford, J.B., 1989. Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J.* **8**, 3693-3699

Chaves, I., Rudenko, G., Dirks-Mulder, A., Cross, M., Borst, P., 1999. Control of variant surface glycoprotein genes expression-sites in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **18**, 4846-4855.

Chaudhri, M., Steverding, D., Kittelberger, D., Tjia, S., Overath, P., 1994. Expression of a glycosylphosphatidylinositol-anchored *Trypanosoma brucei* transferrin binding protein complex in insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6443-6447.

Clayton C.E., 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 217-232.

Clayton, C., Hotz, H.R., 1996. Post-transcriptional control of PARP gene expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**, 1-6.

Clayton, C.E., Michels, P., 1996. Metabolic compartimentation in African trypanosomes. *Parasitol. Today* **12**, 465-471.

Coppens, I., Opperdoes, F.R., Courtoy, P.J., Baudhuin, P., 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* **43**, 465-473.

Croft, S.L., 1997. The current status of antiparasite chemtherapy. *Parasitology* **114 (Suppl.)**, S3-S15.

Cronan, J.E., Godson, G.N., 1972. Mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive lesions in membrane phospholipid synthesis: genetic analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase mutants. *Mol. Gen. Genet.* **116**, 199-210.

Cross, G.A.M., 1990. Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 83-110.

Cross, G.A.M, 1996. Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *BioEssays* **18**, 283-291.

Cross, G.A.M., Wirtz, L.E., Navarro, M., 1998. Regulation of VSG expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 77-91.

Cully, D.F., Ip, H.S., Cross, A.M., 1985. Coordinate transcription of variant surface glycoprotein genes and an expression site associated gene family in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **42**, 173-182.

Dandekar, T., Sharma K., 1998. Regulatory RNA. Springer-Verlag, Berlin.

Diederichs, K., Schulz, G.E., 1991. The refined structure of the complex between adenylate kinase from beef heart mitochondrial matrix and its substrate AMP at 1,85 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**, 541-549.

Dreusicke, D., Schulz, G.E., 1986. The glycin-rich loop of the adenylate kinase forms a giant anion hole. *FEBS Lett.* **208**, 301-304.

Dreusicke, D., Karplus, P.A., Schulz, G.E., 1988. Refined structure of porcine cytosolic adenylate kinase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **199**, 359-371.

Dzeja, P.P., Terzic, A., 1998. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive $K^+$-channels. *FASEB J.* **12**, 523-529.

Dzeja, P.P., Zelznikar, R.J., Golberg, N.D., 1998. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol. Cell. Biochem.* **184**, 169-182.

Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., Terzic, A., 1999. Adenylate kinase-catayled phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ. Res.* **84**, 1137-1143.

Eisenstein, R.S., 2000. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* **20**, 627-662.

El-Sayed, N., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S., Donelson, J., 2000. The African trypanosome genome. *Int. J. Parasitol.* **30**, 329-345.

Ersfeld, K., Melville, S.E., Gull, K., 1999. Nuclear and Genome Organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today*, **15**, 58-63.

Fast, B., Kremp, K., Boshart, M., Steverding, D., 1999. Iron-dependent regulation of transferrin receptor expression in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* **342**, 691-696.

Feldhau, P., Fröhlich, T., Goody, R.S., Isakov, M., Schirmer, R.H., 1975. Synthetic inhibitors of adenylate kinases in the assays for ATPases and phosphokinases. *Eur. J. Biochem.* **57**, 197-204.

Fukami-Kobayashi, K., Nosaka, M., Nakazawa, A., Go, M., 1996. Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Lett.* **385**, 214-220.

Furger, A., Schürch, N., Kurath, U., Roditi, I., 1997. Elements in the 3'-untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4372-4380.

Gibson, W.C., Osinga, K.A., Michels, P.A., Borst, P., 1985. Trypanosomes of the subgenus Trypanozoon are diploiid for housekeeping genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 231-432.

Gerrits, H., Mußmann, R., Bitter, W., Kieft, R., Borst, P., 2002. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 237-247.

Gilinger, G., Bellofatto, V., 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* **29**, 108-112.

Goldstein, J.L., Brunschede, G.Y., Brown, M.S., 1975. Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concavalin A, and Triton WR 1339. *J. Biol. Chem.* **250**, 7854-7862.

Gommers-Ampt, J.H., van Leeuwen, F., de Beer, A.L., Vliegenthart, J.F.G., Dizdaroglu, M., Kovwalak, J.A., Crain, P.F., Borst, P., 1993. β-D-glycosyl-hydroxymethyluracil: a novel modified base present in the DNA of the parasitic protozoan *T. brucei*. *Cell* **75**, 1129-1136.

Grab, D.J., Wels, C.W., Shaw, M.K., Webster, P., Russo, D.C.W., 1992. Endocytosed transferrin in African trypanosomes is deivered to lysosomes and may not be recycled. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 398-404.

Graham, S.V., 1995. Mechanisms of stage-regulated gene-expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today* **11**, 217-223.

Graham, S.V., Barry, J.D., 1991. Expression site–associated genes transcribed independently of variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**, 31-41.

Graham, S.V., Matthews, K.R., Barry, J.D., 1993. *Trypanosoma brucei*: unusual expression-site associated gene homologies in a metacyclic VSG gene expression site. *Exp. Parasitol.* **76**, 96-99.

Graham, S.V., Wyner, B., Barry, J.D., 1998. Activity of a trypanosome metacyclic variant surface glycoprotein gene promoter is dependant upon life cycle stage and chromosomal context. *Mol Cell. Biol.* **18**, 1137-1146.

Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y., Leibold E.A., 1995. Iron regulates the intracellular degradation of iron regulator protein 2 by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **270**, 21645-21651.

Hager, K.M., Hajduk, S.L., 1997. Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* **385**, 823-826.

Hajduk, S.L., Harris, M.E., Pollard, V.W., 1993. RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* **7**, 54-63.

Haile, D.J., Rouault, T.A., Harford, J.B., Kennedy, M.C., Blondin, G.A., Beinert, H., Klausner, R.D., 1992. Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron-sulfer cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11735-11739.

Hasan, G., Turner, M.J., Cordingley, J.S., 1984. Complete nucleotide sequence of an unsual mobile element from *Trypanosoma brucei*. *Cell* **37**, 333-341.

Hehl, A., Roditi, I., 1994. The regulation of procyclin expression in *Trypanosoma brucei*: making or breaking the rules? *Parasitol. Today* **10**, 442-445.

Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., Roditi, R., 1994. A conserved stem-loop structure in the 3'-untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 370-374.

Hentze, M.W., 1995. Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 393-398.

Hentze, M.W., Kühn, L.C., 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8175-8182.

Hirumi, H., Hirumi, K., Doyle, J.J., Cross, G.A.M., 1980. *In vitro* cloning of animal-infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **80**, 371-382.

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

Hofer, A., Ekamen, J.T., Thelander, L., 1998. Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase studies *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 34098-34104.

Hofer, A., Steverding, D., Chabes, A., Brun, R., Thelander, L., 2001. *Trypanosoma brucei* CTP synthetase: a target for the treatment of African sleeping sickness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6412-6416.

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

Horn, D., Cross, G.A.M., 1997. Analysis of *Trypanosoma brucei* VSG expression site switching *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**, 189-201.

Horowitz, J.A., Harford, J.B., 1992. The secondary structure of the regulatory region of the transferrin receptor mRNA deduced by enzymatic clevage. *New Biol.* **4**, 330-338

Hotz, H.R., Lorentz, P., Fischer, R., Krieger, S., Clayton, C.E., 1995. Role of 3'-UTRs in the regulation of hexose transporter mRNA in *T. brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**, 1-14.

Hotz, H.R., Hartmann, C., Huober, K., Hug, M., Clayton, C., 1997. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3´-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. Nucleic Acids Res. Vol. 25, No. 15, pp. 3017, 3025.

Huang, J., van der Ploeg, L.H.T., 1991. Requirement of a play-pyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3'splice acceptor site. *EMBO J.* **10**, 3877-3885.

Iacopetta, B.J., Morgan, E.H., Yeoh, G.C.T., 1982. Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim. Biophys. Acta* **687**, 204-210.

Ito, Y., Tomassellli, A.G., Noda, L., 1983. ATP:AMP phosphotransferase from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* **105**, 85-92.

Iwai, K., Drake, S.K., Wehr, N.B., Weissman, A.M., LaVaute, T., Minato, N., Klausner, R.D., Levine, R.L., Rouault, T.A., 1998. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron-regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4924-4928.

Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E., Leippe, M., 1998. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **27**, 269-276.

Jefferies, D., Tebabi, P., Pays, E., 1991. Transient activity assays of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein gene promoter: control of gene expression at the posttranscriptional level. *Mol. Cell Biol.* **11**, 338-343.

Jefferies, D, Tebabi, P., Le Ray, D., Pays, E., 1993. The ble resistance gene as a new selectable marker for *Trypanosoma brucei*: fly transmission of stable procyclic transformants to produce antibiotic resistant bloodstream forms. *Nucleic Acids Res.* **21**, 191-195.

Johnson, P.J., Kooter, J.M., Borst, P., 1987. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* **51**, 273-281

Johnstone, D.B., Farr, S.B., 1991. AppppA binds to several proteins in *Escherichia coli*, including the heat shock and oxidative stress proteins DnaK, GroEL, E89, C45 and C40. *EMBO J.* **10**, 3897-3904.

Jovanovic, A, Terzic, A., 1995. Diadenosine-hexaphosphate is an inhibitrory ligand of myocardial ATP-sensitive $K^+$-channels. *Eur. J. Pharmacol.* **286**, R1-R2.

Kabiri, M., Steverding, D., 2000. Studies on the recycling of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei* using an inducible gene expression system. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3309-3314.

Kabiri, M., Franco, J.R., Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Sarsa, M., Steverding, D., 1999. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in serological sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop. Med. Int. Health* **4**, 658-661.

Kanmogne, G.D., Asonganyi, T., Gibson, W.C., 1996. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense*, in serologically positive but aparasitaemic sleeping-sickness suspects in Cameroon, by PCR. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **90**, 475-483.

Keiser, J., Burri, C., 2000. Physico–chemical properties of the trypanocidal drug melarsoprol. *Acta Trop.* **74**, 101-104.

Kendrew, J.C., 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* **205**, 66-111.

Khoo, J.C., Russell, P.J., 1972. Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue. *Biochem. Biophys. Acta* **268**, 98-101.

Kim, K.S., Donelson, J.E., 1997. Co-duplication of a variant surface glycoprotein gene and its promoter to an expression site in African trypanosome. *J. Biol. Chem.* **272**, 24637-24645.

Klausner, R.D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J.B., Bridges, K.R., 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2263-2266.

Konrad, M., 1993. Molecular analysis of the essentiell gene for adenylate kinase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **268**, 11326-11334.

Kooter, J.M., van der Speck, Wagter, R., d'Oliveira, C.E., van der Hoeven, F., Johnson, P.J., Borst, P.,1987. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*. *Cell* **51**, 261-172

Kristjanson, P.M., Swallow, B.M., Rowlands, G.J., Kruska, R.L., de Leeuw, P.N., 1999. Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agric. Syst.* **59**, 79-98

Kuzoe, F.A.S., 1993. Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* **54**, 153-162.

Kyambadde, J.W., Enyaru, J.C., Matovu, E., Odiit, M., Carasco, J.F., 2000. Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull. World Health Org.* **78**, 119-124.

Laban, A., Tobin, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., Wirth, D.F. 1990. Stable expression of the bacterial neor gene in *Leishmania enriettii*. *Nature* **343**, 572- 574.

Landfear, S.M., Ignatushchenko, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**, 1-17.

Laird, P.W., 1989. Trans splicing in trypanosomes – archaism or adaptation. *Trends Genet.* **5**, 204-209.

LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverly, S.M., 1993. Coupling of poly(A) site selection and trans splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* **7**, 996-1007.

Lee, P.C., Bochner, B.R., Ames, B.N., 1983. AppppA, heat shock stress, and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7496-7500.

Lee, M.G.S., van der Ploeg, L.H.T., 1997. Transcription of protein coding genes in trypanosomes by RNA Polymerase I. *Ann. Rev. Microbiol.* **51**, 463-489.

Lenardo, M.J., Esser, K.M., Moon, A.M., van der Ploeg, L.H.T., Donelson, J.E., 1986. Metacyclic variant surface glycoprotein genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *rhodensiense* are actived *in situ*, and their expression is transcriptionally regulated. *Mol. Cell Biol.* **6**, 1991-1997.

Lestas, A.N., 1976. The effect of pH upon human transferrin: selective labelling of two iron-binding sites. *Br. J. Haematol.* **32**, 341-350.

Li F., Gottesdiener, K.M., 1996. An efficient method for stable transfection of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 534-535.

Lienhard, G.E., Secemski, I.I., 1973. Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **248**, 1121-1123.

Ligtenberg, M.J.L., Bitter, W., Kieft, R., Steverding, D., Janssen, H., Calafat, J., Borst, P., 1994. Reconstitution of a surface transferin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **13**, 2565-2573.

Lips, S., Revelard, P, Pays, E., 1993. Identification of a new expression site-associated gene in the complete 30.5 kb sequence from the Antat 1.3A variant surface protein gene expression site of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**, 135-137.

Magnus, E., Vervoort, T., van Meirvenne, N., 1978. A Card-Agglutination Test with stained Trypanosomes (C.A.T.T) for serologigal diagnose of *T. b. gambiense* Trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **58**, 169-176.

Magnus, E., Lejon, V., Bayon, D., Buyse, D., Simarro, P., Verloo, D., Vervoort, T., Pansaerts, R., Büscher, P., Van Meirvenne, N., 2002. Evaluation of an EDTA version of CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* for serological screening of human blood samples. *Acta Trop.* **81**, 7-12.

Maier A., Steverding, D., 1996. Low affinity of *Trypanosoma brucei* transferrin receptor to apotransferrin at pH 5 explains fate of the ligand during endocytosis. *FEBS Lett.* **396**, 87-89.

Matthews, K.R., 1999. Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* **15**, 76-79.

Matthews, K.R., Tschudi, C., Ullu, E., 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* **8**, 491-501.

McLaughlin, J., 1985. The presence of α-glycerophosphate dehydrogenase ($NAD^+$-linked) and adenylate kinase as core and integral membrane enzymes respectively in the glycosomes of *Trypanosoma rhodesiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**, 219-230.

Melville, S.E., 1997. Genome research in African Trypanosomes: chromosome size polymorphism and its relevance to genome mapping and analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 116-120.

Melville, S.E., Leech, V., Gerrard, C.S., Tait, A., Blackwell, J.M., 1998. The molecular karoytype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the alignement of chromosome markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* **94**, 155-173.

Melville, S.E., Gerrard, C.S., Blackwell, J.M., 1999. Multiple causes of size variation in the diploid megabase chromosomes of African trypanosomes. *Chromosome Res.* **7**, 191-203.

Morlais, I., Grebaut, P., Bodo, J.M., Djoha, S., Cuny, G., 1998. Characterization of trypanosome infections by polymerase chain reaction (PCR) amplication in wild tsetse flies in Cameroon. *Parasitol.* **116,**.547-554.

Müller, C.W., Schulz, G.E., 1992. Structure of the complex between adenylate kinase from *E. coli* and the inhibitor $AP_5A$ refined at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **224**, 159-177.

Müller-Dickmann, H.J., Schulz, G.E., 1994. The structure of uridylate kinase with its substrates, showing the transition state geometry. *J. Mol. Biol.* **236**, 361-367.

Müllner, E.W., Kühn, L.C., 1988. A stem-loop in the 3'-untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* **53**, 815-825.

Müllner, E.W., Neupert, B., Kühn, L.C., 1989. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell* **58**, 373-382.

Muranjan, M., Nussenzweig, V., Tomlinson, S., 1998. Characterization of the human serum trypanosome toxin, haptoglobin-related protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 3884-3887.

Murphy, N.B., Pays, A., Tebabi, P., 1987. *Trypanosoma brucei* repeated element with unusual structural and transcriptional properties. *J. Mol. Biol.* **195**, 855-871.

Mutomba, M.C., Li, F., Gottesdiener, K.M., Wang, C.C., 1999. A *Trypanosoma brucei* bloodstream form mutant deficient in ornithine decarboxylase can protect against wild-type infection in mice. *Exp. Parasitol.* **91**, 176-184.

Nakaar, V., Günzl, A., Ullu, E., Tschudi, C., 1997. Structure of the *Trypanosoma brucei* U6snRNA gene promoter region. *Mol. Biochem. Parasitol.* **88**, 13-23.

Nakazawa, A., Yamada, M., Tanaka, H., Shahjahan, M., Tanabe, T., 1990. Gene structures of three vertebrate adenylate kinase isozymes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **344**, 495-514.

Navarro, M., Cross, G.M.A., Wirtz, E., 1999. *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein regulation involves coupled activation/inactivation and chromatin remodeling of expression-sites. *EMBO J.* **18**, 2265-2272.

Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelich, L., Greaves, M., 1982. The transferrin receptor. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 397-400.

Noda, L.H., 1973. Adenylate kinase. In: The enzymes, Vol 8A (P.D. Boyer, ed), pp. 279-305. Academic Press, New York.

Noma, T., Song, S., Yoon, Y.S., Tanaka, S., Nakazawa, A., 1998. cDNA cloning and tissue-specific expression of the gene encoding human adenylate kinase isozyme 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1395**, 34-39.

Noma, T., Murakami, R., Yamashiro, Y., Fujisawa, K., Inouye, S., Nakazawa, A., 2000. cDNA cloning and chromsomal mapping of the gene encoding adenylate kinase 2 from *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta* **1490**, 109- 114.

Omary M.B., Trowbridge, I.S., 1981. Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 12888-12892.

Overath, P., Chaudri, M., Steverding, D., Ziegelbauer, K. (1994) Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* **10**, 53-58

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

Pays, E., 1993. Genome organisation and control of gene expression in trypanosomatids. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **50**, 127-160.

Pays, E., Nolan, D.P., 1998. Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 3-36.

Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D., Steinert, M., 1989. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell* **57**, 835-845.

Pedram, M., Donelson, J.E., 1999. The anatomy and transcription of a monocistronic expresion site for a metacyclic variant surface glycoprotein gene in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **274**, 16876-16883.

Penchenier, L., Simo, G., Grebaut, P., Nkinin, S., Laveissiere, C., Herder, S., 2000. Diagnosis of human trypanosomiasis, due to *Trypanosoma brucei gambiense* in central Africa, by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Sco. Trop. Med. Hyg.* **94**, 392-394.

Pépin, J., Milord, F., 1994. The treatment of human African Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* **33**, 2-47.

Pollard, V.W., Hajduk, S.L., 1991. *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1668-1675.

Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., Pegg, A.E., 1992. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboylase by α-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *J. Biol. Chem.* **267**, 150-158.

Princiotto, J.V., Zaploski, E.J., 1975. Diffference between the two iron-binding sites of transferrin. *Nature* **255**, 87-88.

Qi, C.C., Urmenyi, T., Gottesdiener, K.M., 1996. Analysis of a hybrid PARP/VSG ES promoter in procyclic trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**, 147-159.

Raper, J., Nussenzweig, V., Tomlinson, S., 1996. The main lytic factor of *Trypanosoma brucei brucei* in normal human serum is not high density lipoprotein. *J. Exp. Med.* **183**, 1023-1029.

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

Roberts, D.J., Craig, A.G., Berendt, A.R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K., 1992. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature,* **357**, 689-692.

Rouault, T.A., 2000. The role of iron regulatrory proteins in mammalian iron homeostasis. *New Dev. Strategies* **1**, 133-144.

Rouault, T., Klausner, R., 1997. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr. Top. Cell. Regul.* **35**, 1-19.

Rudenko, G., Blundell, P.A., Taylor, M.C., Kieft, R., Borst, P., 1994. VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **13**, 5470-5482.

Rudenko, G., Chaves, I., Dirks-Mulder, A., Borst, P., 1998. Selection for activation of a new variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei* can result in deletion of the old one. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**, 2725-2734.

Rudenko, G., Cross, M., Borst, P., 1998. Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends Microbiol.* **6**, 113-116.

Saas, J., Ziegelbauer, K., von Haeseler, A., Fast, B., Boshart, M. (2000) A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol.Chem.* **275**, 2745-2755.

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

Salmon, D., Hanocq-Quertier, J., Paturiaux-Hanocq, F., Pays, A., Tebabi, P., Nolan, D.P., Michel, A., Pays, E., 1997. Characterization of the ligand-binding site of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei* demonstrates a structural relationship with the N-terminal domain of the variant surface glycoprotein. *EMBO J.* **16**, 7272-7278.

Sambrock., J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratrory Press*. Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez, L.B., Müller, M., 1998. Cloning and heterologous expression of *Entamoeba histolytica* adenylate kinase and uridylate/cytidylate kinase. *Gene* **209**, 219-228.

Scheffzek, K., Kliche, W., Wiesmüller, L., Reinstein, J., 1996. Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P1-(5'-adenosyl)P5-(5'-uridyl)pentaphosphate($UP_5A$) and $Mg^{2+}$ at 2.2 Å: implications for water-mediated specifity. *Biochemistry* **35**, 9716-9727.

Schell, D., Borowy, N.K., Overath, P., 1991. Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* **77**, 558-560.

Schneider, A., Matin, J., Agabian, N.A., 1994. A nuclear encoded tRNA of *Trypanosoma brucei* is imported into mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2317-2322.

Schulz, G.E., Müller, C.W., Diedrichs, K., 1990. Induced fit movements in adenylate kinases. *J. Mol. Biol.* **213**, 627-630.

Schriker, R., Magdolen, V., Kaniak, A., Wolf, K., 1992. The adenylate kinase family in yeast: identification of URA6 as a multicopy suppressor of deficiency in major AMP kinase. *Gene* **112**, 111-118.

Sloof, P., Menke, H.H., Caspers, M.P., Borst, P., 1983. Size fractionation of *Trypanosoma brucei* DNA: localization of the 177-bp repeat satellite DNA fraction. *Nucleic Acids Res.* **11**, 3889-3901.

Stehle, T., Schulz, G.E., 1990. Three-dimensional structure of the complex of guanylate kinase from yeast with its substrate GMP. *J. Mol. Biol.* **211**, 249-254.

Steverding, D., 1998. Bloodstream form of *Trypanosoma brucei* requires only small amounts of iron for growth. *Parasitol. Res.* **84**, 59-62.

Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A.G., Overath, P., 1994. ESAG6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin-binding protein complex. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 78-87.

Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Fuchs, H., Tauber, R., Overath, P., 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* **131**, 1173-1182.

Steverding, D., 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Int.* **48**, 191-198.

Stuart, K., Feagin, J.E., 1992. Mitochondrial DNA in kinetoplastids. *Int. Rev. Cytol.* **141**, 65-87.

Stuart, K., Allen, T.E., Heidmann, S., Seiwert, S.D., 1997. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 105-120.

Tabor, C.W., Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.

Tomasselli, A.G., Noda, L.H., 1979. Mitochondrial GTP-AMP phosphotransferase: 2. Kinetic and equilibrum dialysis studies. *Eur. J. Biochem.* **93**, 263-267.

Tomasselli, A.G., Noda, L.H., 1980. Mitochondrial ATP-AMP phosphotransferase from beef heart: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **103**, 481-491.

Tomlinson, S., Muranjan, M., Nussenzweig, V., Raper, J., 1997. Haptoglobin–related protein and apolipoprotein A1 are components of the two trypanolytic factors in human serum. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**, 117-120.

Tomlinson, S., Raper, J., 1998. Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitol. Today* **14**, 354-359.

Trowbridge, I.S., Newman, R.A., Domingo, D.L., Sauvage, C., 1984. Transferrin receptos. Structure and function. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 925-932.

Turner, C.M.R., Melville, S.E., Tait, A., 1997. A proposal for karoytype nomenclature in *T. brucei. Parasitol. Today* **13**, 5-6.

Ullu, E., Matthews, K.R., Tschudi, C., 1993. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes, rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthetized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol.* **13**, 720-725.

Van der Ploeg, L.H.T., 1984. Chromosomes rearrangements in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **39**, 213-221.

Van der Ploeg, L.H.T., 1992. RNA polymerase I-mediated protein–coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* **8**, 414-418.

Van Leeuwen, F., Wisjsman E.R., Kieft, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Borst, P., 1997. Localisation of the modified base J in telomeric VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* **11**, 3232-3241.

Van Leeuwen, F., Kieft, R., Cross, M., Borst, P., 2000. Tandemly repeated DNA is a target for the partial replacement of thymine by β-D-glycosyl-hydroxymethyluracil in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**, 133-145.

Van Rompay, A.R., Johansson, M., Karlsson, A., 1999. Identification of a novel human adenylate kinase. cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* **261**, 509-517.

Vanhamme, L., Pays, E., 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* **59**, 223-240.

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

Vanhamme, L., Pays, E., McCulloch, R., Barry, J.D., 2001. An update on antigenic variation in African trypanosomes. *Trends Parasitol.* **17**, 838-843.

Varshavsky, A., 1983. Diadenosine5'-5'''-P1,P4-tetraphosphate: a pleiotropically acting alarmone? *Cell* **34**, 711-712.

Vickerman, K., 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* **41**, 105-114.

Wang, I.N., Dykhuizen, D.E., Qiu, W., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J., 1999. Genetic diversity of osp C in a local population of *Borrelia burdorferi* sensu stricto. *Genet.* **151**, 15-30.

Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 737-738.

Webster, P., Russel, D.G., 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol. Today* **10**, 53-58.

Weiden, M., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., van der Ploeg, L.H., 1991. Chromosome structure: DNA nucleotide sequence elements of a subset of the minichromosomes of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3823-3834.

WHO 1996. Thirtheenth programme report of the UNDP/world Bank/WHO special programme for research and training in tropical diseases. pp. 124-133, Geneva, Switzerland.

WHO, 1997. Distribution of the human African trypanosomiasis. [URL: http://www.who.int/emc/disease/tryp/trypanogeo.html].

WHO, 1998. African trypanosomiasis control. Division of Control of Tropical Diseases, Geneva, Switzerland [URL: http://www.who.int/ctd/html/trypano.html].

Wickens, M., 1990. How the messanger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 277-281.

Yoneda,T., Sato, M., Maeda, M., Takagi, H., 1998. Identification of a novel adenylate kinase in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase. *Mol. Brain Res.* **62**, 187-195.

Zeleznikar, R.J., Heyman, R.A., Graff, R.M., Walseth, T.F., Dawis, S.M., Butz, E.A., 1990. Evidence for compartimentalized adenylate kinase catalysis serving as high energy phosphoryl transfer function in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **265**, 300-311.

Zomerdijk, J.C.B.M., Kieft, R., Duyndam, M., Shiels, P.G., Borst, P., 1991. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: a telomeric expression site for variant-specific surface glycoprotein genes with novel features. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1359-1368.

Zomerdijk, J.C.B.M., Oulette, M., ten Asbroek, A.L.M.A., Kieft, R., Bommer, A.M.M., Clayton, C.E., Borst, P., 1990. The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **9**, 2791-2801.

# 6. ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) |
| C | Cytosin |
| °C | Celsius Grad |
| CMP | Cytosinmonophosphat |
| CTP | Cytosintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced chemoluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis-2-(aminomethyl)-tetraessigsäure |
| ESAG | Expression site associated gene (Expressionsstelle assoziertes Gene) |
| FCS | Fetal calf serum (Fötales Kälberserum) |
| G | Guanosin |
| GMP | Guanosinmonphosphat |
| GPI | Glykosylphosphatidylinositol |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropylthiogalactosiopyranosid |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| $K_m$ | Michaelis–Menten Konstante |
| kV | Kilovolt |

| | |
|---|---|
| IMP | Inositolmonophosphat |
| ITP | Inositoltriphosphat |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertain-Medium |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| mRNA | messanger Ribonukleinsäure |
| $NAD^+$ | Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert) |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert) |
| NEAA | Nicht essentielle Aminosäure |
| ng | Nanogramm |
| NPT | Neomycin-Phosphotransferase |
| NMP | Nukleosidmonophosphat |
| NTP | Nukleosidtriphosphat |
| OD | optische Dichte |
| PARP | Procyclic acidic repetive protein |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PK | Pyruvat-Kinase |
| pmol | picomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinyldifluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase A | Ribonuklease A |
| rpm | revolation per minute (Umdrehung pro Minute) |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |

| | |
|---|---|
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-PCR |
| s | Sekunde |
| s | Siehe |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | Tetramethylendiamin |
| tRNA | transfer Ribonukleinsäure |
| U | Uracil |
| U | Unit |
| u.a | unter anderem |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UMP | Uridinmonophosphat |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UTR | unstranslatierte Region |
| V | Volt |
| $V_{max}$ | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| VSG | Variable surface glycoprotein |

# 7. VERÖFFENTLICHUNGEN

## 7.1. Artikel

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

## 7.2. Abstracts

Ngazoa, E.S., Kabiri, M., Becker K., Steverding D., 2002. Adenylate kinase of *Trypanosoma brucei*: molecular cloning, expression, and characterization. *Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology (DGP and NVP) (Lübeck-Travemünde, Germany)*, pp. 55-56.