

**Anreicherung, Isolierung und Analyse  
des Differenzierungsfaktors von  
*Trypanosoma brucei***

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Björn Buchholz**

aus Schramberg

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Prüfung:

21.06.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thilo Stehle

## Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich besonders für die Themenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die intensive und kollegiale Betreuung.

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

Claudia Meyer danke ich für die unkomplizierte Durchführung der ersten LC/MS-Messungen in der Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Kammerer. Ich danke Frau Dr. Dorothee Wistuba für die Einweisung in das LC/MS-Gerät und ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen. Ein großes *Thank you* geht an Frau Gina MacKay aus Dundee für die Messungen am ESI-TOF-MS und an Prof. Mike Ferguson für seine Bereitschaft, Messungen an seinem Institut durchzuführen. Danke auch an Herrn Dr. Hubert Kalbacher für den Versuch, das Molekül mittels MALDI-MS zu analysieren.

Ich bin der gesamten Arbeitsgruppe Duszenko dankbar für das nette und freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen wertvollen Diskussionen. Bedanken möchte ich mich bei Caroline Schönfeld für die ständige Hilfsbereitschaft in allen technischen und experimentellen Fragen, bei Gordon Eske und Matthias Huber für die Unterstützung bei den Experimenten, sowie bei Torsten Barth, Björn Bassarak, Derya Demirsal, Viola Denninger, Witta Kaiser, Rudolf Koopmann, Patrick Merkel, Stefan

Mogk, Khalid Muhammad, Raphael Rocco, Jasmin Stein und Andrea Wegner. Dankeschön auch an Dirk Walther für seine engagierte Hilfe bei den Säulenchromatographie-Versuchen.

Anke, ich danke dir für deine liebevolle Art, deine ständige Unterstützung und deine Hilfe auch in schwierigen Situationen. Du bist wundervoll!

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken. Ohne eure Unterstützung wäre eine solche Schul- und Hochschulausbildung nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	ix
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Entdeckung der afrikanischen Trypanosomen .....	1
1.2 Epidemiologie und Krankheitsbild .....	3
1.3 Bisherige Behandlungsmethoden .....	7
1.4 Biologie der Kinetoplastiden .....	12
1.4.1 Systematische Einordnung von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	12
1.4.2 Zellmorphologie .....	13
1.4.3 Biochemische Besonderheiten von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	16
1.5 Differenzierung in <i>Trypanosoma brucei</i> .....	21
1.5.1 Lebenszyklus.....	21
1.5.2 Pleomorphe und monomorphe Stämme.....	24
1.5.3 Differenzierung von <i>slender-</i> zu <i>stumpy</i> -Blutformen.....	25
1.5.4 Bekannte Differenzierungsinduktoren.....	28
1.5.5 Der Differenzierungsfaktor von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	31
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	32
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.1 Verwendete Organismen .....	34
2.1.1 Verwendete Trypanosomen.....	34
2.1.2 Versuchstiere .....	34
2.2 Materialien.....	34

---

2.2.1	Chemikalien .....	34
2.2.2	Enzyme.....	37
2.2.3	Verbrauchsmaterialien .....	37
2.2.4	Geräte .....	38
2.2.5	HPLC-Säulen.....	39
2.3	Medien, Puffer, Lösungen.....	39
2.3.1	Medien für die Zellkultur .....	39
2.3.2	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	43
2.3.3	Lösungen für die Durchflusszytometrie.....	44
2.3.4	Giemsa-Färbung .....	45
2.3.5	Elektronenmikroskopie .....	45
2.3.6	Pyruvat-Bestimmung.....	46
2.3.7	Laufmittel für die Chromatographie.....	47
2.4	Methoden.....	48
2.4.1	Sterile Zellisolierung aus infiziertem Blut und Herstellung von Stabilaten .....	48
2.4.2	Axenische Kultivierung von <i>T. brucei</i> -Blutformen aus Stabilaten.....	49
2.4.3	Sterile Isolierung und axenische Kultivierung der Trypanosomen.....	50
2.4.4	Axenische Kultivierung von pleomorphen Bluformen.....	51
2.4.5	Herstellung von konditioniertem Blutform-Medium.....	51
2.4.6	Herstellung von konditioniertem Grundmedium .....	52
2.4.7	Aufarbeitung des konditionierten Mediums .....	52
2.4.8	HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS) .....	55
2.4.9	Durchflusszytometrie .....	56
2.4.10	Giemsa-Färbung .....	57
2.4.11	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	58
2.4.12	Berechnung der elementaren Zusammensetzung.....	59

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
3.1	Effekte des konditionierten Mediums in Kultur .....	60
3.1.1	Wachstumshemmung durch konditioniertes Medium .....	60
3.1.2	Morphologische Veränderungen der Zellen während der Differenzierung .....	62
3.1.3	Hemmbarkeit der Autophagie durch Wortmannin und 3-Methyladenin.....	65
3.1.4	Induktion der <i>short stumpy</i> -Morphologie .....	66
3.1.5	Durchflusszytometrische Messungen .....	68
3.2	Aufreinigung des konditionierten Mediums .....	71
3.2.1	Anreicherung der Hemmaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	71
3.2.2	Ultrafiltration des Mediums .....	72
3.2.3	Größenausschlusschromatographie .....	73
3.2.4	HPLC .....	80
3.3	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	85
3.3.1	LC-MS.....	85
3.3.2	Messung von bekannten Differenzierungsinduktoren.....	95
3.3.3	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	96
3.3.4	ESI-TOF .....	97
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>103</b>
4.1	Effekte des konditionierten Mediums in Kultur .....	103
4.1.1	Morphologische Veränderungen der Zellen während der Differenzierung .....	103
4.1.2	Durchflusszytometrie und die Bildung von <i>stumpy</i> -Trypanosomen.....	105
4.2	Aufreinigung des konditionierten Mediums .....	108
4.2.1	Wahl des Ausgangsmaterials .....	109

---

4.2.2	Größenausschlusschromatographie .....	111
4.2.3	HPLC-Trennungen.....	112
4.2.4	Die Bedeutung von HEPES im Kulturmedium .....	113
4.3	Struktur des Differenzierungsfaktors .....	116
4.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	116
4.1.1	Analyse von Vergleichssubstanzen.....	117
4.1.2	Hochauflösende Massenspektrometrie.....	118
4.2	Ausblick.....	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>127</b>
	Literaturverzeichnis .....	131
	Curriculum vitae.....	144

## Abkürzungsverzeichnis

(k)BFM	(konditioniertes) Blutformmedium
(k)GM	(konditioniertes) Grundmedium
ACN	Acetonitril
AMP, ADP, ATP	Adenosinmonophosphat, -diphosphat, -triphosphat
AnTat	Antwerpen Trypanozoon antigenic type
AU	Arbitrary Unit
BCS	Bathocuproindisulfonat
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CGA	Citrat-Glukose-Antikoagulans
DEAE	Diethylaminoethyl
DFMO	Difluormethylornithin
DIF	Differentiation induction factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektronenspray-Ionisierung
FCS	Fetal calf serum
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILIC	Hydrophobic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
IR	Infrarot
LC	Liquid chromatography

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MEM	Minimum essential medium
MiTat	Molteno Institute Trypanozoon antigenic type
MS	Massenspektrometrie/-spektrometer
NAD(H)	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance - Kernspinresonanz
PARP	Procyclic acidic repetitive proteins
PBS	Phosphate buffered saline
pCPTcAMP	8-(4-Chlorphenolthio)-cAMP
PI	Propidiumiodid
RP	Reversed phase
SPE	Solid phase extraction
TAO	Trypanosomale Alternative Oxidase
TDB	Trypanosome dilution buffer
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
VSG	Variant surface glycoprotein
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entdeckung der afrikanischen Trypanosomen

Das Krankheitsbild einer „Schlafkrankheit“ wurde bereits im 14. Jahrhundert in Mali beschrieben [Steverding 2008]. Die ersten medizinisch genauen Berichte stammen jedoch aus dem 18. Jahrhundert. Da für die Sklavenhandelsgesellschaften der Verlust an Sklaven durch die Schlafkrankheit zum Problem geworden war, hielten diese ihre Schiffsärzte an, die Krankheit eingehend zu untersuchen. Diese Schilderungen blieben allerdings auf die Symptome beschränkt [Cox 2004].

Afrikanische Trypanosomen wurden erstmals im Jahre 1895 von David Bruce (Abbildung 1.1) beschrieben, der sie als Erreger der Nagana-Seuche bei Rindern identifizierte und auch die Tsetsefliege als Vektor beschrieb [Bruce 1895].



**Abbildung 1.1:** Sir David Bruce (1855–1931).



**Abbildung 1.2:** Ausschnitte aus den Der schottische Bakteriologe identifizierte Trypanosomen-Zeichnungen von W. Fischer *T. brucei* als Erreger der *Nagana*-Krankheit. [Fischer 1912].

Aus [Steverding 2008].

Die Gattung der Trypanosomen war bereits 1843 von Gruby eingeführt worden, der die Parasiten im Blut von Fröschen entdeckt hatte [Gruby 1843]. Der Name „Trypanosoma“ bedeutet „Bohrkörperchen“ und wurde aufgrund der korkenzieherähnlichen, länglich gewundenen Form der Zellen und ihrer Art der Fortbewegung vorgeschlagen.

Im Jahre 1902 identifizierte der englische Arzt Joseph Everett Dutton die Parasiten, die der Chirurg Robert Michael Forde einige Monate zuvor im Blut eines Patienten entdeckt hatte, als Trypanosomen. Er schlug nach dem Ort der Entdeckung, dem Fluss Gambia, die Bezeichnung *Trypanosoma gambiense* vor [Dutton 1902; Forde 1902]. Im Jahr darauf konnte Bruce schlüssige Belege für die Übertragung der Schlafkrankheit durch Tsetsefliegen liefern [Bruce 1903], allerdings ging er noch von einer mechanischen Übertragung aus. Die zyklische Übertragung in der Fliege wurde erst 1909 durch den deutschen Militärarzt Friedrich Karl Kleine entdeckt, der unter der Leitung von Robert Koch in Deutsch-Ostafrika auf Forschungsreise war [Kleine 1909]. In der Zeit dieser Schlafkrankheits-Expedition wurden zahlreiche Berichte und Experimente zur Natur der Trypanosomen und zu ihrer Infektiologie veröffentlicht (Abbildung 1.2) [Fischer 1912; Kleine und Fischer 1912].

Schließlich isolierten Stephens und Fantham aus einem Patienten, der an der Schlafkrankheit erkrankt war, den Erreger der ostafrikanischen Variante und nannten ihn *Trypanosoma rhodesiense* [Stephens und Fantham 1910].

Diese drei ursprünglich identifizierten Arten wurden 1972 zur Art *Trypanosoma brucei* zusammengefasst. Sie umfasst nun die Unterarten *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense*.

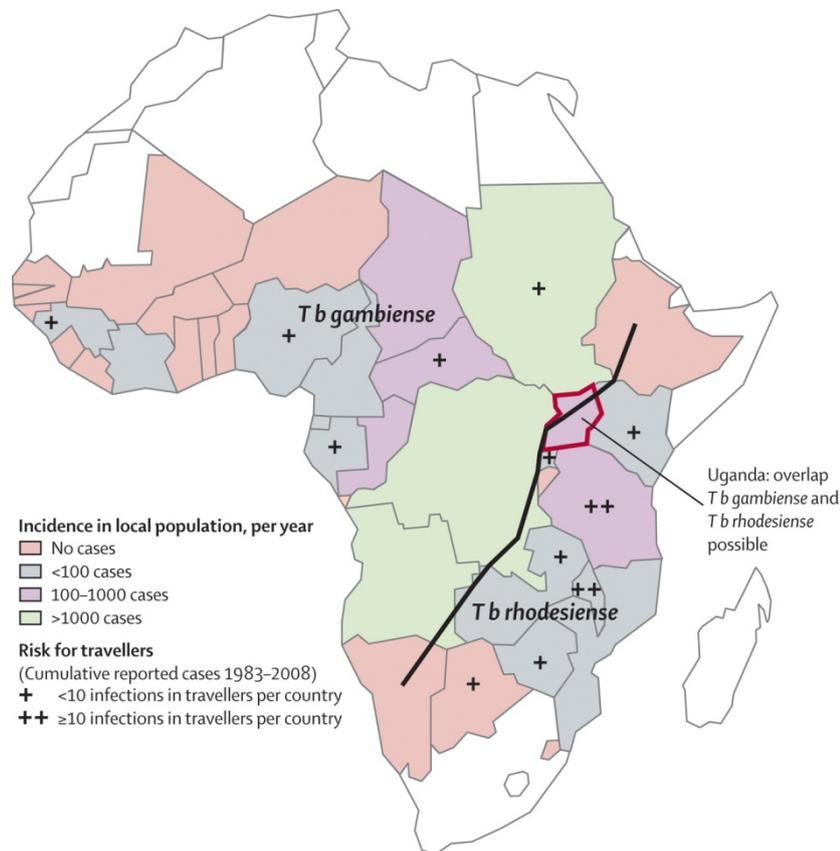
## 1.2 Epidemiologie und Krankheitsbild

Die Parasiten der *Trypanosoma brucei*-Gruppe werden durch Fliegen der Gattung *Glossina*, auch Tsetsefliege genannt, übertragen. Das Auftreten der afrikanischen Schlafkrankheit ist daher auf das Verbreitungsgebiet dieser Insekten, den sogenannten Tsetse-Gürtel, beschränkt. Dieser erstreckt sich südlich der Sahara bis an den Nordrand der Kalahari-Wüste, also etwa zwischen 14° nördlicher und 29° südlicher Breite [Pepin und Meda 2001; Barrett *et al.* 2003]. Innerhalb dieses Gürtels stellt der ostafrikanische Grabenbruch ziemlich genau die Grenze zwischen den Verbreitungsgebieten von *T. b. gambiense*, der westafrikanischen Form, und *T. b. rhodesiense* im östlichen Teil des Kontinents dar (Abbildung 1.3); lediglich in Uganda treten beide Formen auf. Die nicht humanpathogenen Erreger der Nagana-Seuche, *T. b. brucei*, kommen im gesamten Tsetse-Gürtel vor.

*Trypanosoma brucei brucei* befällt verschiedene Wildtierarten, ohne sichtbare Krankheitssymptome zu verursachen. Die vom Menschen in die endemischen Gebiete eingeführten Nutztiere, wie z.B. Rinder, erkranken jedoch nach einer Infektion an der meist letal verlaufenden Nagana-Seuche. Für den Menschen ist *Trypanosoma brucei brucei* nicht pathogen, da die Parasiten durch das im menschlichen Serum vorkommende Apolipoprotein L-I lysiert werden [Pays und Vanhollebeke 2008].

*Trypanosoma brucei gambiense* wird vorwiegend von Glossinen der *Palpalis*-Gruppe übertragen, die in wasserreichen Gegenden und Uferwäldern in West- und Zentralafrika beheimatet sind. Diese westafrikanische

Schlafkrankheit wird als chronisch bezeichnet, da das zweite Stadium der Krankheit erst nach einigen Jahren auftreten kann.



**Abbildung 1.3:** Verbreitungsgebiete der humanpathogenen afrikanischen Trypanosomen und Darstellung der Neuerkrankungen sowie des Risikos für Reisende [Brun *et al.* 2010].

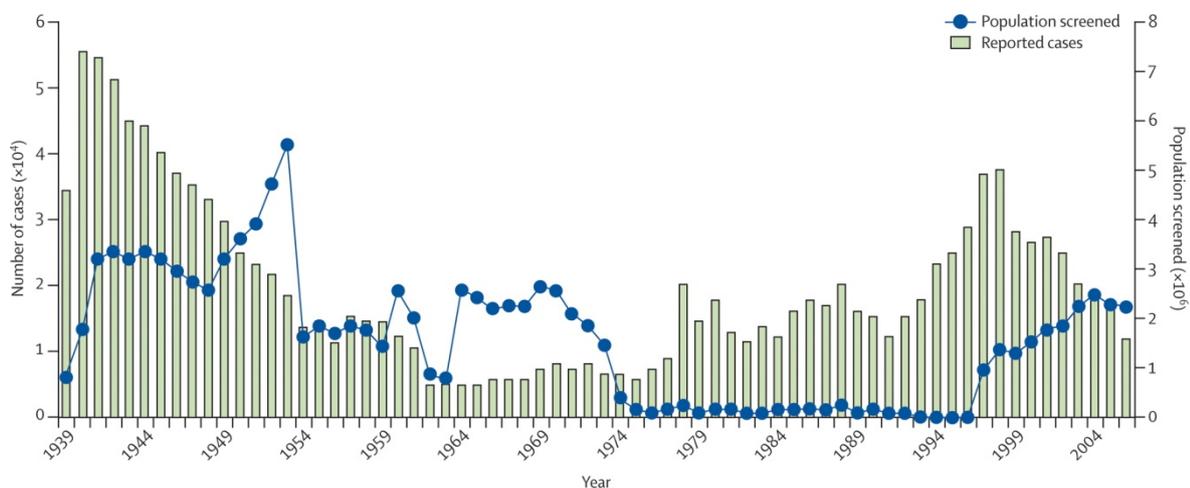
Den Vektor für *Trypanosoma brucei rhodesiense* bilden Tsetsefliegen der *Morsitans*-Gruppe, die auch wasserarme Gegenden der ostafrikanischen Buschsavannen bevölkern. Bei der ostafrikanischen Variante der Schlafkrankheit tritt das Endstadium bereits nach einigen Wochen bis wenigen Monaten auf, weshalb diese Form auch als akut bezeichnet wird.

Bei der Blutmahlzeit erzeugt die Tsetsefliege ähnlich der europäischen Bremse eine schmerzhaft Wunde, durch die sie Blut und Lymphe des Opfers aufsaugt. Werden dabei Trypanosomen in die Wunde übertragen, so

bildet sich in 19% der *T. b. rhodesiense*-Fälle, jedoch kaum bei *T. b. gambiense*, eine Verdickung an der Einstichstelle, der sogenannte Trypanosomenschanter [Brun *et al.* 2010]. Die Parasiten verteilen sich daraufhin in Blut- und Lymphbahnen und nach ein bis drei Wochen treten die Anzeichen des ersten, sogenannten hämolymphatischen Stadiums auf. Dieses äußert sich vor allem durch periodische Fieberschübe, Kopfschmerzen, Hautjucken und Lymphknotenschwellung („Winterbottom-Zeichen“). Bei einer *T. b. rhodesiense*-Infektion, die einen heftigeren Verlauf verursacht, können bereits in dieser Phase tödliche Herzmuskelentzündungen oder Lungenödeme auftreten.

Nach etwa vier bis sechs Monaten - im Falle der ostafrikanischen Erreger oft schon nach wenigen Wochen - überwinden die Trypanosomen die Blut-Hirn-Schranke und dringen in das Zentralnervensystem ein. Im folgenden meningoenzephalitischen Stadium leiden die Patienten unter schweren Schlafstörungen, welche der Krankheit ihren Namen gaben. Sie beruhen auf einer Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus und einer Fragmentierung der Schlafphasen [Buguet *et al.* 2001]. Die weiteren neurologischen Symptome beinhalten Zittern, Muskelzuckungen, Lähmungen von Gliedmaßen sowie Koordinations- und Sprachstörungen. Je länger die Krankheit andauert, umso häufiger treten diese Störungen auf. Auch psychische Symptome wie Reizbarkeit, psychotische Reaktionen, aggressives Verhalten und Apathie können auftreten [Kennedy 2006]. Die fortschreitende Beeinträchtigung des Zentralnervensystems führt im Endstadium zum Koma und letztendlich in 100% der unbehandelten Fälle zum Tod. Oft tritt dieser jedoch schon früher durch Mangelernährung oder Sekundärinfektionen ein.

Nachdem die Kolonialmächte die Erforschung und Bekämpfung der Schlafkrankheit forciert hatten, war sie in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts fast verschwunden. Ab 1960 wurden viele der endemischen Länder unabhängig und verloren die Unterstützung der ehemaligen Kolonialmächte. In vielen Fällen folgte eine Zeit politischer Instabilität und wirtschaftlichen Ruins, was die Gesundheitsversorgung in den betroffenen Staaten zusammenbrechen ließ. Als Folge der schlechten Überwachung stieg die Zahl der Neuerkrankungen seit Ende der 1970er Jahre kontinuierlich an und erreichte 1998 den höchsten Stand dieser jüngsten Epidemiewelle. Seit 1997 ist die Beobachtung der betroffenen Bevölkerung stetig verbessert worden und die Zahl der neuen Fälle geht wieder zurück (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Vergleich zwischen den gemeldeten neuen Schlafkrankheitsfällen (Balken) und der Anzahl an überwachten Menschen (Punkte) [Brun *et al.* 2010].

2009 sank die Zahl der gemeldeten Erkrankungen erstmals seit 50 Jahren unter 10 000. Die Gesamtzahl aller Patienten wird derzeit auf 30 000 geschätzt. Noch im Jahre 2005 lag diese Zahl bei 50 000 bis 70 000 Menschen,

was den Rückgang der Krankheit und die Erfolge der Bemühungen der Weltgesundheitsorganisation eindrucksvoll belegt [WHO 2010].

### 1.3 Bisherige Behandlungsmethoden

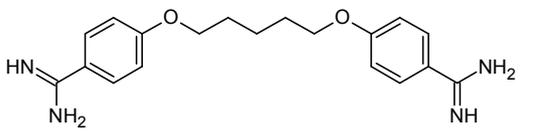
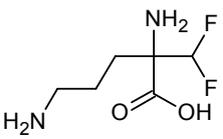
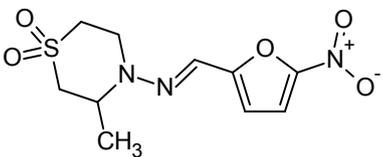
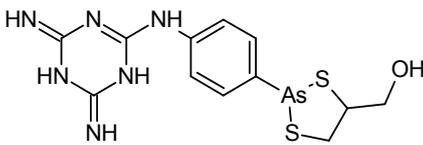
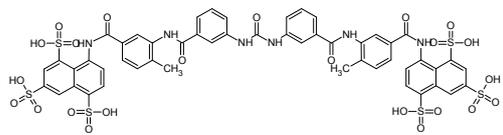
Bereits 1904 berichteten die Ärzte Harold Wolferstan Thomas und Anton Breinl, dass die arsenhaltige Verbindung Atoxyl infizierte Tiere heilen könne [Winkle 2005]. Man hielt Atoxyl für besser geeignet als alle zuvor getesteten Arsen-Verbindungen und für relativ untoxisch. Robert Koch untersuchte die trypanozide Wirkung des Atoxyl an Patienten und fand heraus, dass es keineswegs ungiftig war. 22 von 1622 behandelten Patienten erblindeten komplett, da das Medikament die Sehnerven schwer schädigen kann [Winkle 2005]. Paul Ehrlich, der bereits an der Trypanosomiasis-Chemotherapie interessiert war, wurde 1907 von Koch motiviert, das Atoxyl weiterzuentwickeln. 1916 gelang es Ehrlich und einem Wissenschaftler-Team des Pharmakonzerns Bayer, den ersten effektiven Wirkstoff gegen *T. b. rhodesiense*-Infektionen im ersten Stadium zu entwickeln [Winkle 2005]. Die Verbindung Bayer 205, später in Suramin umbenannt und unter dem Namen Germanin® vertrieben, wird noch heute gegen die ostafrikanischen Erreger im Blut eingesetzt. Im Jahr zuvor hatten die Amerikaner Walter Jacobs und Michael Heidelberger Tryparsamid entdeckt, die erste Verbindung, mit der das zweite Stadium der Schlafkrankheit erfolgreich, wenn auch noch immer mit schweren Nebenwirkungen, behandelt werden konnte. Beide Stoffe halfen maßgeblich bei der Bekämpfung der zweiten großen Schlafkrankheitsepidemie, die von ca. 1920 bis in die späten 1940er Jahre einige afrikanische Länder heimsuchte (Abbildung 1.4) [WHO 2000, 2010].

1937 entwickelte Arthur James Ewins, ein englischer Chemiker, das Medikament Pentamidin, welches gegen das frühe Stadium von *T. b. gambiense*-Infektionen wirksam ist [Bray *et al.* 2003]. Es ist noch heute das einzige verfügbare Medikament für diese Erregerform und Krankheitsphase.

Mit Melarsoprol wurde 1949 das erste wirklich effektive Mittel zur Behandlung des späten Gehirnstadiums beider Erreger-Varianten vorgestellt. Entwickler war der Schweizer Ernst Friedhelm. Die Substanz enthält immer noch Arsen und die Nebenwirkungen sind schwerwiegend. Bei durchschnittlich 4,7% (bei *T. b. gambiense*) und 8,0% (*T. b. rhodesiense*) der Behandelten tritt eine reaktive Enzephalopathie auf, die in etwa der Hälfte der Fälle tödlich verläuft [Brun *et al.* 2010].

Auf der Suche nach neuen Krebstherapeutika fand man Mitte der 1980er Jahre heraus, dass  $\alpha$ -Difluormethylornithin (DFMO, Eflornithin) starke trypanozide Wirkung zeigt. Diese beruht auf der Hemmung der Ornithindecaboxylase und erzielte in ersten Patientenstudien auch bei bestehender Melarsoprol-Resistenz einen durchschlagenden Erfolg [Pepin *et al.* 1987]. Die Sterblichkeit aufgrund der Behandlung ist zudem deutlich geringer als bei Melarsoprol, jedoch ist es nur gegen die westafrikanische Erregerform effektiv genug. 1990 wurde Eflornithin als Arzneistoff zur Behandlung von *T. b. gambiense*-Infektionen im zweiten Stadium zugelassen.

**Tabelle 1.1:** Übersicht über die aktuell gegen die Schlafkrankheit eingesetzten Medikamente sowie deren wichtigste Nebenwirkungen.

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

Das eigentlich gegen die Chagas-Krankheit (verursacht von *Trypanosoma cruzi*) eingesetzte Nifurtimox wurde ebenfalls zur Medikation des Gehirnstadiums eingesetzt. Bei alleinigem Einsatz kommt es aber häufig zu Rückfällen [Pepin *et al.* 1989]. Die Kombination mit Melarsoprol stellte sich dagegen als sehr effektiv heraus [Bisser *et al.* 2007].

Auch Eflornithin kann mit Nifurtimox kombiniert werden. Diese Kombinationstherapie gilt als die vielversprechendste, aktuelle Weiterentwicklung der Schlafkrankheitsbekämpfung und wurde im April 2009 in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel (*List of Essential Medicine*) der Weltgesundheitsorganisation aufgenommen [WHO 2010]. Diese sogenannte NECT-Therapie (*nifurtimox-eflornithine combination therapy*) ist einfacher anzuwenden bei einer kürzeren Behandlungsdauer, ruft nur in etwa halb so vielen Fällen schwere Nebenwirkungen hervor wie Eflornithin alleine und ist zudem billiger [Priotto *et al.* 2009; Yun *et al.* 2010]. Seither bemüht sich die Organisation „Ärzte ohne Grenzen“, diese Behandlungsmethode als Mittel der ersten Wahl in den betroffenen Regionen zu etablieren.

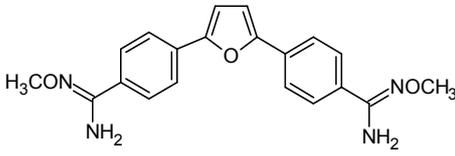
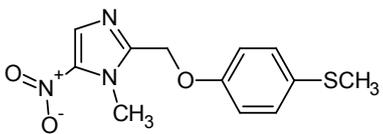
Die Entwicklung neuer Medikamente gegen die Schlafkrankheit erlitt einen großen Rückschlag, als die klinischen Tests der Phase III an dem Pentamidin-Analogon Pafuramidin im Jahre 2008 abgebrochen werden mussten. Der gegen das frühe Stadium oral verabreichte Stoff hatte sich als zu leberschädigend herausgestellt [Pohlig *et al.* 2008].

Mit Fexinidazol befindet sich derzeit nur ein Wirkstoff-Kandidat in den klinischen Tests. Für dieses 5-Nitroimidazol begannen die Phase I Tests an menschlichen Patienten im September 2009. Die präklinischen Daten zeigen, dass es sich auch hier um einen vielversprechenden Wirkstoff handelt, der

oral gegeben werden kann, die Parasiten in beiden Stadien bekämpft, sowohl gegen *T. b. gambiense* als auch *T. b. rhodesiense* wirkt und dabei wenige Nebenwirkungen hervorruft [Torreele *et al.* 2010]. Diese beiden Wirkstoffkandidaten sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Möglich ist die heutige Versorgung der betroffenen Menschen mit den benötigten Medikamenten nur durch Abkommen der WHO mit den Herstellern Sanofi-Aventis (Pentamidin, Melarsoprol und Eflornithin) und der Bayer AG (Suramin und Nifurtimox) sowie durch das Engagement der „Ärzte ohne Grenzen“, die für die logistische Abwicklung sowie oft auch für die Behandlung der Patienten vor Ort sorgt.

**Tabelle 1.2:** Strukturen der beiden Wirkstoffkandidaten der letzten Jahre.

Substanz	Struktur	Stadium	Entwicklungsstand
Pafuramidin (DB289)		erstes	Wegen Nephrotoxizität mussten klinische Tests der Phase III abgebrochen werden
Fexinidazol		beide	Präklinische Studien vielversprechend, derzeit in klinischen Tests der Phase I

So hatte Sanofi-Aventis 1995 die Produktion von Eflornithin mangels Profits eingestellt. Massiver internationaler Druck und die zunehmenden Erkrankungsfälle (Abbildung 1.4) bewegten den Konzern 2001 dazu, der WHO die kostenlose Bereitstellung für zunächst 5 Jahre zuzusichern. 2006 wurde der Vertrag für weitere 5 Jahre verlängert [Sanofi-Aventis 2007].

Aufgrund der Armut der betroffenen Bevölkerung investieren die Pharmakonzerne keine Ressourcen in die Erforschung neuer

Wirkstoffkandidaten. Besonders für die ostafrikanische Schlafkrankheit werden neue Arzneistoffe jedoch dringend benötigt. Diese sollten idealerweise oral verabreicht werden können, wenige Nebenwirkungen haben und gegen beide Erregervarianten wirksam sein.

Für eine erfolgreiche Bekämpfung der afrikanischen Schlafkrankheit ist weiterhin eine dichte Überwachung der bedrohten, oft abgelegenen wohnenden Bevölkerung von entscheidender Bedeutung. Nur so kann die Krankheit bereits im frühen Stadium erkannt und bekämpft werden. Dies verhindert die Entstehung neuer Krankheitsherde.

Die Eindämmung der Fliegenpopulation durch spezielle Fallen ist ebenfalls seit vielen Jahren ein hilfreiches Mittel, um das Übertragungsrisiko zu senken.

## 1.4 Biologie der Kinetoplastiden

### 1.4.1 Systematische Einordnung von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen sind einzellige Parasiten und besitzen ein Flagellum. Sie gehören somit zu den *Protozoen* und innerhalb dieser zur Gruppe der *Flagellaten* (Geißeltiere). Der Kinetoplast, ein DNA-haltiger Abschnitt des Mitochondriums, gab der Ordnung der *Kinetoplastiden* den Namen. Zur Unterordnung der *Trypanosomatidae* wiederum zählen die Vertreter mit nur einer Geißel (Monoflagellaten).

**Tabelle 1.3:** Systematische Einordnung von *Trypanosoma brucei* [Mehlhorn und Piekarski 2002].

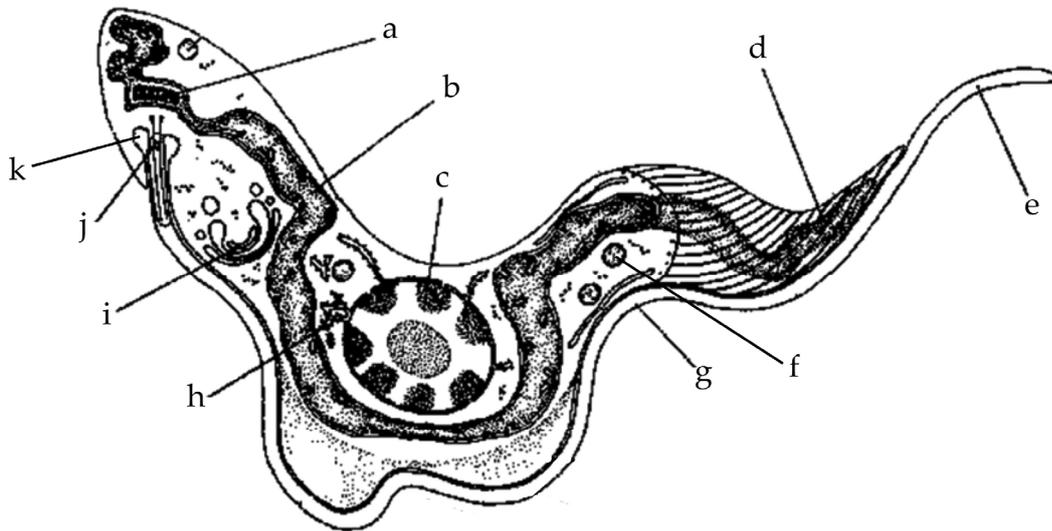
System:	Protozoa
Stamm:	Sarcomastigophora
Unterstamm:	Mastigophora (Flagellata)
Klasse:	Zoomastigophorea
Ordnung:	Kinetoplastida
Unterordnung:	Trypanosomatidae
Gattung:	Trypanosoma
Sektion:	Salivaria
Art:	Trypanosoma brucei
Unterart:	Trypanosoma brucei brucei Trypanosoma brucei gambiense Trypanosoma brucei rhodesiense

Diese unterteilen sich in sieben Gattungen, darunter die *Trypanosomen*. Weiter unterscheidet man die *Stercoraria*, die über den Fäces des Invertebraten übertragen werden, von den *Salivaria*, deren Übertragungsweg über den Speichel des Insektenvektors läuft. Zu den *Stercoraria* zählt beispielsweise *T. cruzi*, während alle Unterarten von *Trypanosoma brucei* zu den *Salivaria* gehören. [Levine *et al.* 1980].

### 1.4.2 Zellmorphologie

Trypanosomen sind spindelförmige, einzellige Parasiten. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Die Zellen haben je nach Lebensstadium eine Länge von 15-40  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,5-2  $\mu\text{m}$ . Stabilisiert wird die Zellform durch ein Zytoskelett aus parallelen Mikrotubuli, die entlang der Längsachse der Zelle ausgerichtet sind und direkt unterhalb der Zellmembran verlaufen. Sie bilden ein dicht gepacktes Netzwerk und verleihen der Zelle große Stabilität, durch die

Verschiebbarkeit der Filamente gegeneinander ist aber auch die benötigte Flexibilität gegeben.



**Abbildung 1.5:** Schematischer Aufbau einer *Trypanosoma brucei*-Zelle. a) Kinetoplast, b) Mitochondrium, c) Nukleus, d) Mikrotubuläres Zytoskelett, e) freies Flagellum, f) Glykosom, g) angeheftetes Flagellum, h) endoplasmatisches Reticulum, i) Golgi-Apparat, j) Basalkörper, k) Flagellumtasche. Modifiziert nach K. Vickerman [Vickerman 1969].

Charakteristisch ist das einzelne, langgestreckte Mitochondrium mit dem Kinetoplast in der Nähe des Basalkörpers. Der Kinetoplast enthält die mitochondriale DNA in Form von ineinander verschlungenen DNA-Ringen. Das Mitochondrium selbst besitzt in den Fliegenformen deutlich mehr Christae als in den Blutformen. Das Flagellum ist durch den Basalkörper im Zytosol verankert und tritt in der Flagellumtasche aus der Zelle hervor. Die Flagellumtasche ist eine Einstülpung der Plasmamembran und bildet das Zentrum aller Aufnahme- und Abgabeprozesse [Landfear und Ignatushchenko 2001]. Endo- und exozytotische Vorgänge an anderen Stellen als der Flagellumtasche werden durch das Zytoskelett und den

Oberflächenmantel verhindert. Das Flagellum ist aus der typischen 9+2-Mikrotubuli-Struktur aufgebaut und in regelmäßigen Abständen durch Fleckdesmosomen an der Zellmembran angeheftet [Mehlhorn und Piekarski 2002]. Es verläuft bis zum Vorderende der Zelle, wo es in einen frei beweglichen Teil übergeht. Bei der Bewegung der Zelle entsteht am Flagellum so der Eindruck einer undulierenden Membran. Der Ursprung des Flagellums liegt in den trypomastigoten Lebensstadien hinter dem Zellkern, im epimastigoten Fliegenstadium hingegen davor.

Die Zelle ist in den Blutformen von einem Mantel aus Glykoproteinen umgeben (*variant surface glycoprotein, VSG*), die mittels GPI-Anker in der Zellmembran befestigt sind. Durch den Austausch der VSG-Moleküle umgehen die Parasiten effektiv die Immunabwehr des Säugerwirts (s. 1.4.3.2). Um sich den veränderten Bedingungen im Darm der Fliege anzupassen, exprimieren die prozyklischen Zellen statt VSG das größtenteils aus Prolin und Glutaminsäure aufgebaute Procyclin. Es ist weniger dicht gepackt als das VSG-Gegenstück.

Neben den üblichen eukaryontischen Zellstrukturen wie Golgiapparat, rauem ER oder Lysosomen besitzen Trypanosomen zusätzlich spezielle peroxisomale Organellen, die Glykosomen. In ihnen läuft der größte Teil der Glykolyse ab, welche den Hauptstoffwechselweg der Parasiten darstellt (s. 1.4.3.1).

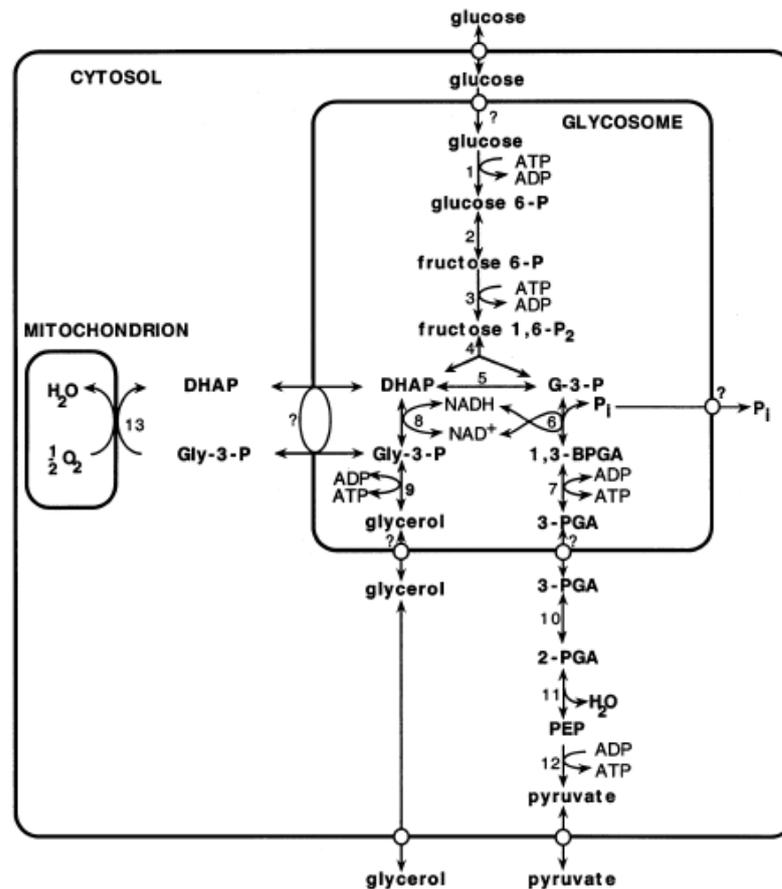
### 1.4.3 Biochemische Besonderheiten von *Trypanosoma brucei*

#### 1.4.3.1 Glykosomen und Energiestoffwechsel

Trypanosomen besitzen in den Blutformen nicht die erforderlichen Enzyme für eine oxidative Phosphorylierung und keinen funktionierenden Citratzyklus. Sie sind daher darauf angewiesen, Adenosin-5'-triphosphat (ATP) aus der Glykolyse zu gewinnen, mit Glukose als Hauptenergiequelle und Glycerin als alternativem Substrat (Abbildung 1.6). Im Gegensatz zu praktisch allen anderen Zellen, bei denen die Glykolyse im Zytosol abläuft, ist sie in Kinetoplastiden zum Großteil in den Glykosomen lokalisiert. Glucose wird aus dem Blut des Wirts in das Glykosom transportiert und dort bis zum 3-Phosphoglycerat umgesetzt. Dieses gelangt über einen Transporter ins Zytosol. Erst die weitere Umsetzung über Phosphoenolpyruvat bis zum Pyruvat liefert der Zelle effektiv ATP.

Im Glykosom selbst bleibt das Verhältnis von ATP zu ADP sowie von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  unverändert. Damit letzteres gewährleistet ist, muss das in der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase entstandene  $\text{NADH}$  innerhalb des Glykosoms reoxidiert werden. Dazu wird das in der Aldolase-Reaktion entstandene Dihydroxyaceton zunächst von der Glycerinphosphat-Dehydrogenase zu Glycerin-3-phosphat reduziert, wobei  $\text{NAD}$  entsteht. Das Glycerin-3-phosphat wird dann aus dem Glykosom heraus und zum Mitochondrium transportiert, wo es durch die trypanosomale Alternative Oxidase (TAO) wieder zu Dihydroxyaceton oxidiert wird. Als Elektronenakzeptor dient molekularer Sauerstoff, wodurch man auch im Medium von Blutform-Trypanosomen trotz nicht vorhandener Atmungskette einen erheblichen Sauerstoffverbrauch

nachweisen kann [Clarkson et al. 1989]. Das Dihydroxyaceton wird anschließend wieder ins Glykosom zurücktransportiert.



**Abbildung 1.6:** Schema der Glykolyse in *T. brucei*. Beteiligte Enzyme: 1) Hexokinase, 2) Glukose-6-phosphat-Isomerase, 3) Phosphofruktokinase, 4) Aldolase, 5) Triosephosphat-Isomerase, 6) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 7) Phosphoglycerat-Kinase, 8) Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, 9) Glycerinkinase, 10) Phosphoglyceratmutase, 11) Enolase, 12) Pyruvatkinase, 13) Glycerin-3-phosphat-Oxidase. Abkürzungen: 1,3-BPGA, 1,3-Bisphosphoglycerat; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; G-3-P, Glycerinaldehyd-3-phosphat; Gly-3-P, Glycerin-3-phosphat; PEP, Phosphoenolpyruvat; 2-PGA, 2-Phosphoglycerat; 3-PGA, 3-Phosphoglycerat. Aus [Bakker et al. 2000].

Unter aeroben Bedingungen kann auch Glycerin verstoffwechselt werden. Nach dem Transport ins Glykosom wird es von der Glycerinkinase zum

Glycerin-3-phosphat umgewandelt. Da jedoch zu wenig NAD vorliegt, kann dieses nicht direkt zu Dihydroxyaceton oxidiert werden. Der Reaktionsweg läuft daher über die TAO im Mitochondrium. Das entstehende Dihydroxyaceton kann nun wiederum zur Regeneration von NAD verwendet oder über die Triosephosphat-Isomerase-Reaktion als Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Glykolyse-Reaktionskette eingeschleust werden.

Bei Sauerstoffmangel oder Hemmung der TAO, z.B. durch Salicylhydroxamsäure, kommt es zur Bildung von äquimolaren Mengen Pyruvat und Glycerin. Das Glycerin-3-phosphat kann dann nicht wieder reoxidiert werden und wird stattdessen von der Glycerinkinase zu Glycerin dephosphoryliert. Das Glycerin muss aus dem Glykosom ausgeschleust werden, damit die Reaktion nicht zum Erliegen kommt. Es wird dann ins Blut abgegeben. Die Hemmung der Glycolyse durch Blockierung der Glycerin- oder Pyruvatausscheidung ist ein möglicher therapeutischer Ansatz gegen die Schlafkrankheit [Wiemer *et al.* 1995; Bakker *et al.* 2000].

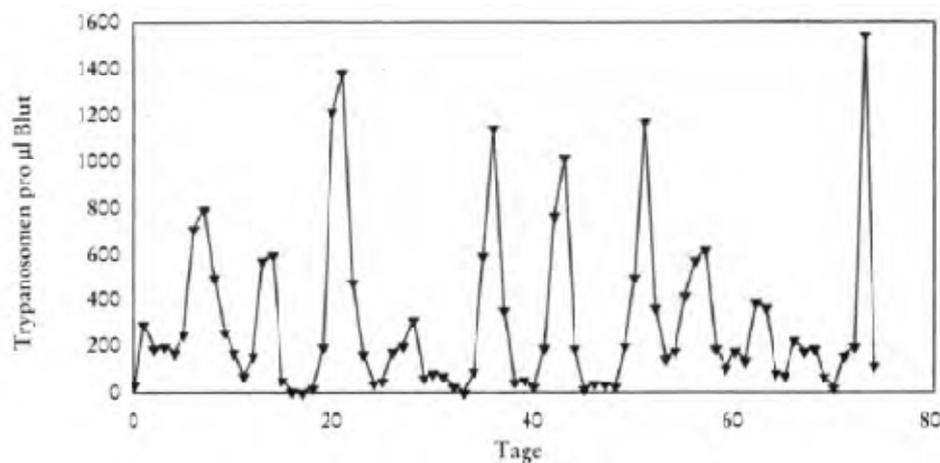
Da die Fliegenformen ATP auch durch oxidative Phosphorylierung gewinnen können, ist ihr Energiestoffwechsel deutlich weniger von Glukose abhängig. Für die Bereitstellung von NAD in den Glykosomen sorgt hier eine NADH-abhängige Fumaratreduktase [Besteiro *et al.* 2002]. Hauptsächlich verwenden prozyklische Trypanosomen zur Energiegewinnung aber Prolin, welches in der Fliege im Gegensatz zu Glukose ausreichend verfügbar ist.

### 1.4.3.2 VSG-Antigenvariation

Trypanosomen entgehen der Immunantwort durch einen häufigen Wechsel ihres Zelloberflächenmantels, was auch als Antigenvariation bezeichnet wird [Cross 1975]. Jede Zelle ist mit etwa  $10^7$  VSG-Molekülen ( $5 \times 10^6$  homodimere Moleküle) bedeckt. Sie bestehen aus einem nach außen gerichteten, variablen N-terminalen Teil und einem relativ konservierten, hydrophoben C-terminalen Teil. Letzterer macht etwa ein Drittel des Gesamtmoleküls aus und ist mit einem GPI-Anker in der Plasmamembran befestigt. Die Moleküle sind so dicht gepackt, dass zum einen die das Komplementsystem aktivierenden Makromoleküle nicht angreifen können und zum anderen weitere Oberflächenmoleküle vor dem Immunsystem maskiert werden. Das durch den Wirt erkennbare Antigen ist also das N-terminale Ende des gerade exprimierten VSG-Moleküls [Cross 1975].

Durch den periodischen Wechsel der VSG-Varianten entgeht ein Teil der Population auch der antikörpervermittelten Immunabwehr des Wirts. Der Wechsel des Oberflächenmantels beruht auf der sequentiellen Expression von verschiedenen VSG-Genen [Borst 1986]. Ein zuvor nicht exprimiertes VSG-Gen gerät durch Rekombinationsprozesse in eine telomerständige VSG *expression site* und das Produkt dieses Gens löst in der Folge die zuvor exprimierte VSG-Variante ab. Zudem besteht die Möglichkeit, eine andere *expression site* zu aktivieren [Borst 2002]. Zu einem Zeitpunkt wird immer nur eine VSG-Variante exprimiert. Von den etwa 1000 VSG-Genen im Genom von *Trypanosoma brucei* sind nur 7% voll funktionsfähig, 9% sind atypisch, 18% sind Genfragmente und 66% Pseudogene [Berriman *et al.* 2005]. Die Anzahl an Varianten wird allerdings durch die Bildung von Mosaikgenen erheblich vergrößert [Marcello und Barry 2007].

Alle  $10^2$  bis  $10^3$  Zellteilungen kommt es so bei pleomorphen Blutform-Trypanosomen zu einem Wechsel des exprimierten VSG [Turner 1997; Robinson *et al.* 1999]. Der Teil der Zellpopulation mit dem neuen Oberflächenantigen ist somit vor den Antikörpern gegen das zuvor exprimierte VSG geschützt. Da der Großteil der Parasiten noch die alte Variante trägt, geht die Parasitämie zunächst zurück. Durch die sich schnell teilenden, die neue Oberfläche tragenden *slender*-Zellen steigt sie daraufhin wieder an. Der Wirt reagiert mit der Bildung von Antikörpern gegen das nun vorherrschende Antigen. Bis diese wiederum einen Großteil der Parasiten bekämpfen können, exprimieren einige Zellen schon den nächsten VSG-Typ. Etwa alle 7-10 Tage tritt eine neue Trypanosomenpopulation auf [Seyfang *et al.* 1990]. So kommt es zu der typischen, wellenförmigen Kurve der Parasitämie, wie sie Ross und Thomson schon 1910 beschrieben (Abbildung 1.7). Dieser Effekt überlagert die Zelldichteregulation der Parasiten (s. 1.5.3).



**Abbildung 1.7:** Verlauf der Trypanosomenkonzentration im Blut eines männlichen Patienten. Modifiziert nach [Ross und Thomson 1910].

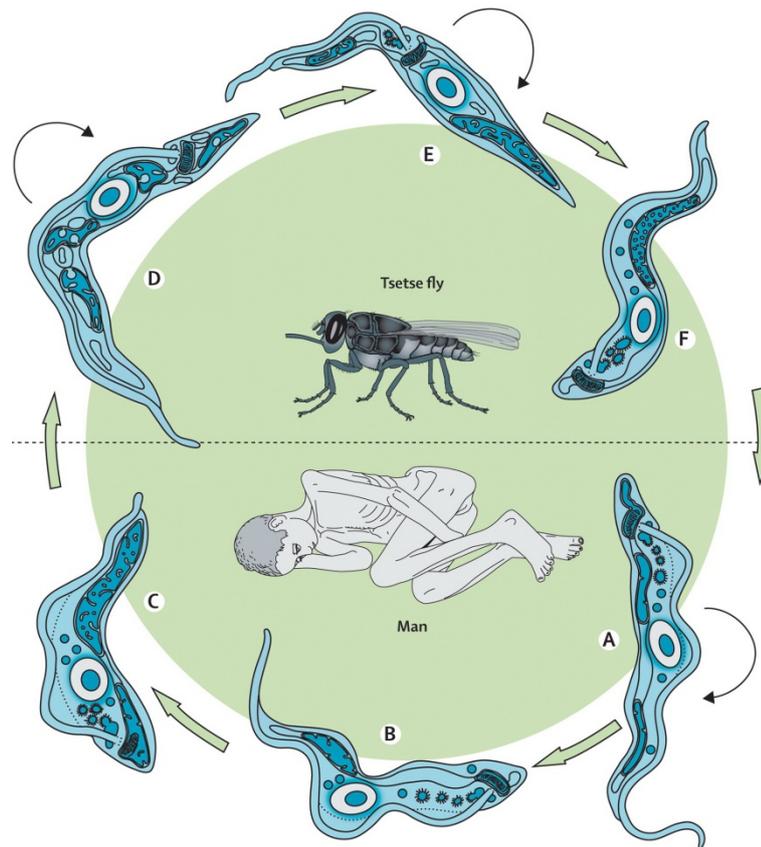
In prozyklischen Formen existieren nur inaktive *VSG-expression sites* [Pays *et al.* 2001; Clayton 2002].

## 1.5 Differenzierung in *Trypanosoma brucei*

### 1.5.1 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* (Abbildung 1.8) ist durch einen obligaten Wirtswechsel zwischen der Tsetsefliege und einem Säugetier gekennzeichnet. Dabei können die verschiedensten Säugetierarten einschließlich des Menschen als Wirt dienen. Alle Unterarten von *Trypanosoma brucei* machen die gleiche zyklische Übertragung durch, in deren Verlauf sie sich an drei verschiedene Umgebungen anpassen müssen: den Blutkreislauf des Säugers, den Verdauungstrakt der Fliege und schließlich deren Speicheldrüse.

Die verschiedenen durchlaufenen Stadien unterscheiden sich in ihrer Morphologie sowie ihren zellbiologischen und biochemischen Eigenschaften. Die auffälligsten Veränderungen erfahren dabei die Plasmamembran und das Mitochondrium. Charakteristisch für den Lebenszyklus ist, dass sich proliferative Stadien, in denen sich die Parasiten schnell vermehren, mit solchen abwechseln, in denen keine Zellteilung möglich ist. Letztere sind aber an die jeweils darauf folgende Umgebung präadaptiert.



**Abbildung 1.8:** Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*. Dargestellte Stadien: (A) *long slender*, (B) *intermediate*, (C) *short stumpy*, (D) prozyklisch, (E) epimastigot, (F) metazyklisch. Aus [Brun *et al.* 2010].

Beim Stich durch eine infizierte Tsetsefliege gelangen metazyklische Trypanosomen mit dem Speichel des Insekts in das Hautgewebe, worauf sich eine lokal begrenzte Infektion bildet, die durch den Trypanosomenschanter gekennzeichnet sein kann [Barry und Emery 1984]. Die metazyklische Form wandelt sich in die *long slender*-Form um, die in das Lymphsystem und den Blutkreislauf eindringt und sich dort stark vermehrt. Ihr Mitochondrium ist zurückgebildet und besitzt nicht alle Enzyme des Citratzyklus und keine Cytochrome der Atmungskette [Fairlamb 1989]. Mit steigender Parasitämie entstehen über eine Zwischenstufe (*intermediate*-Form) die teilungsdefizienten *short stumpy*-Trypanosomen, die eine an den Insektenwirt präadaptierte Form darstellen.

Sie sind durch ein größeres Mitochondrium mit tubulären Cristae charakterisiert und exprimieren mitochondriale Enzyme wie Prolinoxidase oder  $\alpha$ -Ketoglutaratoxidase, die für den auf Aminosäuren als Substrate basierenden Energiestoffwechsel der Insektenformen wichtig sind. Alle Blutformen und die metazyklische Form sind durch einen Oberflächenmantel aus VSG vor der Immunabwehr des Wirtes geschützt (s. 1.4.3.2). Werden *stumpy*-Parasiten nicht wieder in eine Fliege übertragen, so findet ein Apoptose-ähnlicher programmierter Zelltod statt, um die Parasitämie in Grenzen zu halten und den Wirt nicht zu früh zu töten. Vermittelt wird dieser Prozess von Prostaglandinen, die die *stumpy*-Formen selbst bilden [Figarella *et al.* 2005; Figarella *et al.* 2006]. Diese Zelldichteregulation erhöht so die Chance einer Weitergabe der Infektion und stellt ein altruistisches Verhalten einzelliger Organismen dar [Duszenko *et al.* 2006].

Da die *stumpy*-Form bereits Teile der Atmungskette aktiviert hat, ist sie in der Lage im Verdauungstrakt der Fliege zu überleben und zur prozyklischen Form zu transformieren. Im Gegensatz dazu stirbt die *slender*-Form aufgrund des geringen Glukoseangebots und zu niedriger Temperaturen. Die prozyklische Formen besitzt einen voll funktionsfähigen Citratzyklus und nutzt für ihren Stoffwechsel vorwiegend Prolin [Hart *et al.* 1984]. Außerdem werden die VSG-Oberflächenmoleküle durch PARP-Proteine („Procyclin“) ersetzt [Roditi *et al.* 1989], die die Parasiten vor dem Verdauungssystem der Fliege schützen.

Ungefähr 10 Tage nach der Infektion der Fliege wandern die prozyklischen Trypanosomen über den Ösophagus und den Pharynx bis in die Speicheldrüsen. In dieser Zeit wandeln sie sich zunächst in die epimastigote

Form um. Diese weist immer noch eine hohe Proliferationsrate auf und heftet sich im Verlaufe der Entwicklung an die Mikrovilli der Speicheldrüsen an. Dann folgt die Umwandlung zur nicht mehr proliferativen, metazyklischen Form, die infektiös für den Säugwirt ist. Um sich später den Bedingungen im Blut des Vertebraten anpassen zu können, besitzen die metazyklischen Zellen bereits ein zurückgebildetes Mitochondrium und eine erste Variante des VSG-Mantels.

### 1.5.2 Pleomorphe und monomorphe Stämme

Trypanosomenstämme, die den gesamten Entwicklungszyklus durchlaufen können, werden als pleomorphe Stämme bezeichnet. Dies stellt den Normalfall bei allen Wildtyp-Stämmen dar. Stämme oder Klone, die nicht streng alternierend von Säugetier auf Tsetsefliege und zurück, sondern von einem Säuger auf den anderen übertragen werden, verändern sich zu so genannten monomorphen Stämmen. Die Blutformen dieser Stämme differenzieren in der Wirtsspezies, an die sie adaptiert sind, nicht mehr von der *long slender*- zur teilungsinaktiven *short stumpy*-Form, sondern vermehren sich solange, bis der Wirt einige Tage nach der Infektion stirbt. Dementsprechend tritt auch kein wellenförmiger Parasitämieverlauf mehr auf. Man vermutete zunächst, dass diese Stämme die Fähigkeit verloren hätten, von der *long slender*-Form in andere Formen zu differenzieren [Hajduk und Vickerman 1981], da sie für Tsetsefliegen nur gering oder gar nicht mehr infektiös waren. Wie die Arbeiten von Black und Mitarbeitern zeigten, können jedoch Stämme, die sich z.B. in Mäusen monomorph verhalten, in Rindern durchaus pleomorph wachsen und *short stumpy*-Formen ausbilden [Black *et al.* 1983]. Auch *in vitro* sind monomorphe

Stämme in der Lage, von *long slender* zu *short stumpy*-ähnlichen Formen zu differenzieren [Hamm *et al.* 1990]. Die Bezeichnung eines Trypanosomenstammes oder -klons als monomorph bzw. pleomorph sollte daher immer mit Bezug auf das entsprechende Wirts- oder Kultursystem gewählt werden.

### 1.5.3 Differenzierung von *slender*- zu *stumpy*-Blutformen

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Differenzierung von proliferativen *long slender*- zu nicht teilungsfähigen *short stumpy*-Trypanosomen in *in vitro*-Kulturen. Daher soll dieser Vorgang im Folgenden näher betrachtet werden.

Bereits 1965 beschrieb Vickerman den Polymorphismus afrikanischer Trypanosomen und die Änderung der Zellgestalt innerhalb der Blutbahn des Vertebraten [Vickerman 1965]. Die *long slender*-Trypanosomen zeigen eine schlanke, langgezogene Gestalt, sind äußerst beweglich und besitzen eine hohe Teilungsrate. Die teilungsdefizienten *short stumpy*-Zellen sind dagegen kürzer und gedrungener, mit einem verkürzten freien Flagellum im Vergleich zu den *slender*-Zellen. *Stumpy*-Trypanosomen zeigen keine Antigenvariation, da sie sich nicht teilen.

Die Teilungsfähigkeit der *long slender*-Formen ist mit einem ausgeprägten Polyamin-Stoffwechsel verbunden. Im Laufe der Differenzierung werden beteiligte Enzyme, wie die S-adenosyl-L-methionin-Decarboxylase (AdoMet-DC) und die Ornithin-Decarboxylase (ODC) heruntergeregelt [Selzer *et al.* 1996].

Das Mitochondrium ist in der *stumpy*-Form besser ausgebildet und beinhaltet Teile der Atmungskette. Das mitochondriale Membranpotential ( $\Psi_m$ ) ist erhöht und die Zellen produzieren zusätzlich Succinat [Bienen *et al.* 1991]. In den *short stumpy*-Zellen sind außerdem Cytochrome der Atmungskette nachweisbar [Priest und Hajduk 1994]; ihr Sauerstoffverbrauch ist teilweise durch Cyanid hemmbar. Bei *slender*-Trypanosomen kann dieser nur durch Salicylhydroxamsäure inhibiert werden [Bienen *et al.* 1981]. Die *stumpy*-Zellen sind auch widerstandsfähiger gegenüber proteolytischem oder durch niedrige pH-Werte verursachtem Stress [Nolan *et al.* 2000].

Der Mechanismus, der zu diesen zellulären Veränderungen führt, ist bisher nur in Ansätzen bekannt. Eine wichtige Rolle spielt dabei offenbar die Zelldichte [Hamm *et al.* 1990; Hesse *et al.* 1995; Reuner *et al.* 1997; Seed und Black 1997].

Seit längerem ist bekannt, dass Zellkulturmedium, in dem bereits Zellen kultiviert worden sind (konditioniertes Medium), beim erneuten Einsatz in Kulturen wachstumshemmende Wirkung zeigt [Hamm-Künzelmann 1992]. Dieser Effekt ist sowohl von der Konzentration als auch von der Dauer der Inkubation des konditionierten Mediums abhängig. Je höher der Anteil des konditionierten Mediums am Kulturmedium ist bzw. je länger Trypanosomen für die Gewinnung des konditionierten Mediums kultiviert worden sind, desto größer ist die wachstumshemmende Wirkung [Selzer *et al.* 1996]. Eine Verarmung des Mediums an Nährstoffen als Ursache konnte durch Supplementierung des konditionierten Mediums mit Serum, Aminosäuren und Glukose ausgeschlossen werden.

Werden Blutformkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase immer wieder auf eine geringere Zelldichte verdünnt, so wachsen sie stets von neuem hoch. Wurde jedoch einmal eine gewisse Zelldichte erreicht, in axenischem Blutformmedium ca.  $1,2 \times 10^6$  Zellen/ml, so findet auch bei Verdünnung der Kultur kein Wachstum mehr statt. Die Zellen sind dann in der stationären Phase, was einen Zellzyklusarrest in der  $G_0/G_1$ -Phase bedeutet [Vassella *et al.* 1997]. Diese Tatsachen legen die Produktion eines Stoffes nahe, der ab einer bestimmten Konzentration die Differenzierung von *slender*- zu *stumpy*-Blutformen induziert und an das Kulturmedium abgegeben wird [Hamm *et al.* 1990; Vassella *et al.* 1997]. Bezeichnet wird dieser Faktor als DIF (*differentiation induction factor*) bzw. SIF (*stumpy induction factor*). Monomorphe Stämme bilden den verantwortlichen Differenzierungsfaktor zwar, ihr Wachstum wird durch ihn aber deutlich schwächer gehemmt als es bei pleomorphen Stämmen der Fall ist [Vassella *et al.* 1997].

Weiterhin kann man durch Wechsel des Kulturmediums ohne Verdünnung das Absterben der Kultur verhindern. Tauscht man das Medium mindestens alle 24 Stunden komplett aus, so erhält man eine oszillierende Wachstumskurve, die sich langsam auf einen relativ hohen Wert von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen/ml einpendelt [Hesse *et al.* 1995]. Vermutlich wird durch den regelmäßigen Wechsel des Mediums die Konzentration des Differenzierungsfaktors so klein gehalten, dass nicht alle Zellen in die *short stumpy*-Form übergehen und so das Überleben der Kultur ermöglicht wird. Beim weiteren Transduktionsweg des Differenzierungssignals scheint der *second messenger* cAMP eine wichtige Komponente zu sein [Vassella *et al.* 1997; Breidbach *et al.* 2002]. Durch den Einsatz von membranpermeablen cAMP-Analoga, z.B. 8-CPT-cAMP, konnte dies bestätigt werden. Dazu

passend konnte in Trypanosomen eine Familie von Adenylatcyclasen mit einer variablen, rezeptorähnlichen, extrazellulären Region sowie einer konservierten intrazellulären, katalytisch aktiven Domäne nachgewiesen werden [Paindavoine *et al.* 1992; Pays *et al.* 2001]. Mindestens ein Mitglied dieser Proteinfamilie, ESAG4, ist speziell in den Blutformen exprimiert. Außerdem wurde gezeigt, dass die Adenylatcyclaseaktivität dieses Enzyms während der Differenzierung stark ansteigt, während sie in Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, nicht nachweisbar ist [Pays *et al.* 2001]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass nicht die membrangängigen cAMP-Analoga selbst, sondern deren Hydrolyseprodukte die Differenzierung auslösen [Laxman *et al.* 2006].

In der frühen Phase der Differenzierung sinkt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und pendelt sich auf einem niedrigeren Level ein. Zudem enthalten die intrazellulären Speicher insgesamt weniger Calcium-Ionen [Stojdl und Clarke 1996].

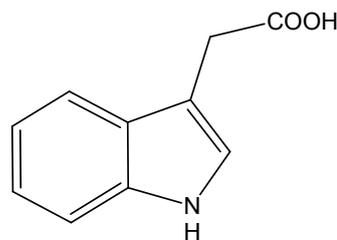
Für die Progression des Zellzyklus mitverantwortlich ist die MAP-Kinase 5. Sie wirkt somit der Differenzierung entgegen. Allerdings konnte ein Knockout dieses Proteins keinen vollständigen Zellzyklusarrest hervorrufen, so dass wohl noch andere Proteine beteiligt sind [Domenicali Pfister *et al.* 2006].

#### **1.5.4 Bekannte Differenzierungsinduktoren**

Signalübertragung durch chemische Substanzen über Zellgrenzen hinweg ist ein bei Lebewesen häufiges Phänomen. In höheren Wirbeltieren sind hier z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone zu nennen. Es existieren aber auch in Pflanzen, Pilzen und Bakterien bekannte Substanzen, die von den

Organismen gebildet und zum Teil auch frei gesetzt werden, um die Differenzierung der Zellen zu induzieren.

So sind in Pflanzen niedermolekulare Substanzen, die Auxine, an der Wachstumsregulation beteiligt [Strassburger 1991]. Sie fördern das Streckungswachstum von Sprossen und hemmen das Längenwachstum der Wurzeln. Das wichtigste Auxin der Pflanzen ist Indol-3-essigsäure (Abbildung 1-9). Der Stoffwechselweg der Biosynthese von Tryptophan über Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetat wurde auch in Trypanosomen nachgewiesen [Stibbs und Seed 1973; Hall *et al.* 1981].



**Abbildung 1.9:** chemische Struktur von Indol-3-essigsäure.

Auch bei einzelligen Organismen ist die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen, das sog. *quorum sensing*, ein bekanntes Phänomen, das oft über niedermolekulare Stoffe vermittelt wird. So wurde aus *in vitro*-Kulturen des einzelligen Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* der Differenzierungsfaktor DIF (*differentiation inducing factor*) isoliert, der die Entwicklung undifferenzierter Zellen zu Stielzellen auslöst [Masento *et al.* 1988]. Es handelt sich dabei um 1-(3,5-Dichlor-2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-hexan-1-on [Morris *et al.* 1987] (s. Tabelle 1.4). Die vorangehende Aggregation der einzelnen Zellen zu einem Zellhaufen wird von einem Glykoprotein mit einer Größe von 80 kDa, dem so genannten *conditioned media factor* (CMF), ausgelöst, sobald dessen Konzentration einen

Schwellenwert übersteigt [Jain *et al.* 1992; Clarke und Gomer 1995]. Es handelt sich hier also um einen Mechanismus zur Erkennung der Zelldichte.

Auch aus Bakterien und dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* sind Substanzen bekannt, die die einzelligen Organismen selbst produzieren und die ab einer gewissen Zelldichte eine Veränderung der Zellen hervorrufen (Tabelle 1.4).

**Tabelle 1.4:** Übersicht über wichtige bekannte *quorum sensing*-Signale.

Chemische Struktur	Name	Organismus	Funktion
<p>The structure shows a benzene ring with a methoxy group (H<sub>3</sub>CO) at the 3-position, two chlorine atoms (Cl) at the 2 and 6 positions, and two hydroxyl groups (OH) at the 4 and 5 positions. A pentyl chain is attached to the ring at the 1-position via a carbonyl group (C=O).</p>	<i>Differentiation-inducing factor</i> (DIF)	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Induziert die Differenzierung zu Stielzellen. [Morris <i>et al.</i> 1987]
<p>The structure shows a benzimidazole ring system. It has a hydroxyl group (OH) at the 2-position, a carboxylic acid group (COOH) at the 3-position, and hydroxyl groups (OH) at the 5 and 7 positions.</p>	Xanthurensäure	<i>Plasmodium falciparum</i>	Löst die Gametogenese im Moskito aus. [Billker <i>et al.</i> 1998]
<p>The structure shows an acyl chain (R) attached to a homoserine lactone ring. The R group is defined as R = C<sub>4</sub> - C<sub>14</sub>.</p>	Acylhomoserin-lactone	Bakterien	zelledichteabhängige Biolumineszenz, Bildung von Biofilmen [Fuqua und Greenberg 2002]

### 1.5.5 Der Differenzierungsfaktor von *Trypanosoma brucei*

Die genaue chemische Struktur des Differenzierungsfaktors ist bislang nicht geklärt. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die Substanz ein Molekulargewicht unter 500 Da besitzt [Vassella *et al.* 1997].

Da die wachstumshemmende Wirkung nach der Einwirkung verschiedener Proteasen und Peptidasen erhalten blieb, scheint es sich nicht um ein Peptid zu handeln [Hesse 1996]. Außerdem ist das Molekül unempfindlich gegen Hitze und bei Kulturbedingungen stabil [Vassella *et al.* 1997]

Der oben erwähnte DIF aus *Dictyostelium* zeigte bei Trypanosomen zwar wachstumshemmende Wirkung, aber erst in deutlich höheren Konzentrationen als es in Tumorzellen bei Mäusen der Fall war [Veigel 1996].

Die Konzentrationen von Alanin und Pyruvat nehmen während der Kultur zu, sind aber nicht relevant für die Differenzierung [Hamm-Künzelmann 1992; Hesse 1996]. Die Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren nehmen dagegen ab, so dass der Faktor möglicherweise ein Stoffwechselprodukt von Tryptophan oder Phenylalanin ist. Verschiedene Metabolite wurden auf ihre wachstumshemmende Wirkung getestet, und es zeigte sich, dass Indol-3-pyruvat Hemmaktivität besitzt, jedoch in konditioniertem Medium nicht vorhanden ist. Die Vermutung, es könne sich allgemein um ein Indol als Stoffwechselprodukt von Tryptophan handeln, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden [Walker 1997].

Der postulierte Differenzierungsfaktor muss ins Medium abgegeben werden, um auf alle Zellen wirken zu können. Aus diesem sollte er theoretisch isoliert und charakterisiert werden können.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Charakterisierung des Differenzierungsfaktors von *Trypanosoma brucei* wäre für die Parasiten-Forschung von großer Bedeutung und ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu neuen Behandlungsmöglichkeiten der afrikanischen Schlafkrankheit. Durch Kenntnis der Struktur und die synthetische Herstellung wäre es möglich, in einem Organismus alle Trypanosomen-Zellen in die teilungsunfähige *short stumpy*-Form zu bringen. So könnten sie von den vom Wirtsorganismus gebildeten Antikörpern gegen das VSG vollständig eliminiert werden, was bei einer normalen Infektion auf Grund der Antigenvariation nicht möglich ist.

Durch die Kenntnis der Struktur könnten nachfolgend neue Einblicke in die Mechanismen und die Kontrolle der Zelldifferenzierung bei Trypanosomen gewonnen werden. Damit stellt der Differenzierungsfaktor ein sowohl in therapeutischer als auch in wissenschaftlicher Hinsicht ein hoch interessantes Molekül dar.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Analyse des von *Trypanosoma brucei brucei* in *in vitro* Kulturen gebildeten und ins Kulturmedium abgegebenen Differenzierungsfaktors. Das Ziel war die Aufklärung der Struktur oder die Generierung von analytischen Daten zur späteren Vereinfachung der Strukturaufklärung.

Im Zusammenhang mit der Differenzierung der proliferierenden *long slender*- zur nicht mehr teilungsfähigen *short stumpy*-Form kommt es zu einer Hemmung des Wachstums. Als primäres Kriterium für das Vorhandensein des Faktors in konditioniertem Medium und in den

nachfolgenden Fraktionen der Reinigung wurde deshalb die Wachstumshemmung verwendet. Die Auswirkungen von konditioniertem Medium und den daraus gewonnenen Fraktionen auf die Zellen wurden näher untersucht.

Für die Anreicherung des Moleküls wurde zunächst untersucht, ob ein vereinfachtes Medium oder das serumhaltige Blutformmedium hinsichtlich erhaltener Substanzmenge sowie der nötigen Aufreinigungsschritte als Ausgangsmaterial geeigneter war. Gegebenenfalls sollte das Medium für die analytischen Schritte angepasst und optimiert werden.

Vom Hemmeffekt des konditionierten Mediums ausgehend sollte nachfolgend die Komponente, die für diesen Effekt verantwortlich ist, durch Gelfiltration angereichert und anschließend mittels einer geeigneten HPLC-Methode und anschließender *on line*-Massenspektrometrie analysiert werden. Die Entwicklung der HPLC-Methode für die weitere Auftrennung der Gelfiltrationsfraktionen sowie die Auswahl und Anwendung der dann folgenden Analyseschritte war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Der gesamte Isolierungsprozess wurde hinsichtlich Geschwindigkeit und Effizienz optimiert.

Die identifizierten HPLC-Fraktionen sollten anschließend mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert werden, um mögliche Summenformeln und gegebenenfalls entsprechende, bereits bekannte Moleküle zu bestimmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen

#### 2.1.1 Verwendete Trypanosomen

In dieser Arbeit wurde der monomorphe *Trypanosoma brucei brucei*-Stamm MITat 1.2 (Molteno Institute Trypanozoon antigenic type, Cambridge) verwendet, der aus dem Stamm Lister 427 kloniert wurde [Cross 1975] und die Antigenvariante 221 exprimiert. Die Experimente mit pleomorphen Zellen wurden mit dem Stamm AnTat 1.1 (Antwerpen Trypanozoon antigenic type) [Le Ray *et al.* 1977] durchgeführt.

#### 2.1.2 Versuchstiere

Für die Gewinnung von Trypanosomen zur Herstellung von Stabilaten sowie für Experimente, für die viele Zellen benötigt wurden, dienten Ratten der Rasse „Wistar Han“ und weibliche NMRI-Mäuse (Harlan Laboratories, Horst (NL)). Die Tiere erhielten R7M-H Alleinfutter (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

### 2.2 Materialien

#### 2.2.1 Chemikalien

Substanz	Lieferant
2'-Desoxythymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Methyladenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
8-cPT-cAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril	Acros Organics, Geel (Belgien)
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
BCS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzyl dimethylamin	Plano, Wetzlar
Bio-Gel P2, <i>extra fine</i>	Biorad, München
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Canusal (Heparin-Na), 10x2ml	CP Pharmaceuticals Ltd, Wrexham (UK)
Chymostatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
cis-Aconitat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, Steinheim
Digitonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Dodeceny succinicanhydrid	Plano, Wetzlar
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa-Stammlösung	Fluka, Buchs (CH) und Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, St. Louis (USA)
Glycerin, 87% und 100%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hemin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
MEM essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylnadicanhydrid	Plano, Wetzlar
Myristinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
NADH	Roche Diagnostics, Mannheim
NADP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumbicarbonat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Plano, Wetzlar
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs (CH)
Penicillin/Streptomycin, 100fach	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propylenoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
RHX Document Type Developer	Rollei GmbH, Berlin
RXA Rapid fixing bath	Rollei GmbH, Berlin
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Sephadex LH-20	GE Healthcare, München
Serum Plus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Succinat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triflouressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Plano, Wetzlar
Wasser reinst ( <i>Ampurva</i> )	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.2.2 Enzyme

Substanz	Lieferant
L-Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Lieferant
6-, 12-, 24-, 48- und 96-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem®-Cups	Plano, Wetzlar
Centricon Ultrafiltrationseinheiten (3 kDa)	Millipore, Schwalbach
Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Dialysemembran (1 kDa)	Millipore, Schwalbach
Eppendorf-Cups	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Glasfaser Mikrofilter	Whatman, Dassel
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Imago®-EM23 Schwarzweiß-Negativfilme	Ahlemeyer GmbH, Duisburg
Kunststoff-Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
Kunststoff-Pasteurpipetten, unsteril	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfernetzchen (200Square mesh)	Plano, Wetzlar
Küvetten - Vollküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Papier-Rundfilter, versch. Größen	Macherey-Nagel, Düren
Reagenzröhrchen (16 und 4 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
SPE-Kartuschen <i>Strata-X</i>	Phenomenex, Aschaffenburg
Spritzen-Sterilfilter (versch. Größen)	Renner, Dannstadt und Millipore, Schwalbach
Sterilfilter, SFCA-Membran	Nalge, Hereford (UK)
Sterilfiltrationsapparatur für Zellisolierung	Whatman, Dassel
UV-Küvette mikro	Brand, Wertheim

## 2.2.4 Geräte

Gerät	Hersteller
8-Kanal-Mikropipette	Eppendorf, Hamburg
Analog-Digital-Wandler <i>ME Redlab 1008</i>	Meilhaus Electronic, Puchheim
Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode
Brutschrank (27°C)	Köttermann, Uetze
Brutschrank <i>Hera Cell</i> (37°C, CO <sub>2</sub> -Begasung)	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer <i>FACSCanto II</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader <i>MRX-II Revelation</i>	Dynex, Chantilli (USA)
Fluoreszenzmikroskop <i>BH2 RFCA</i>	Olympus, Hamburg
FPLC-Anlage <i>ÄktaPrime</i>	Pharmacia Biotech, Cambridge (UK)
Gefriertrocknungsanlage <i>Lyovac GT 2</i>	Finn-Aqua, München
Gerät	Hersteller
Hämozytometer nach Neubauer (Tiefe 0,02 mm)	Brand, Wertheim
HPLC- Injektionsspritzen	Hamilton, Bonaduz (CH)
HPLC-Injektionsventil 7125	Rheodyne, Alsbach
HPLC-Komponenten:	Sykam, Eresing
Programmgeber <i>S2000</i>	
Pumpe <i>S1000</i>	
Gradientenmischer <i>S8110</i>	
Invertmikroskop <i>ID 02</i>	Zeiss, Oberkochen
Kaffeevollautomat <i>Talea Giro Plus</i>	Saeco, München
Kamera <i>U-PMTVC</i>	Olympus, Hamburg
LC-MS-System:	
HPLC-System <i>1100</i> mit	
Entgaser <i>G1379A</i>	Agilent, Böblingen
Binärpumpe <i>G1312A</i>	
Autosampler <i>G1313A</i>	
UV-Detektor <i>G1314A</i>	
ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer <i>Esquire 3000+</i>	Bruker Daltonics, Bremen
Lichtmikroskop <i>Axiostar Plus</i>	Zeiss, Oberkochen
LKB 11800 Pyramitone	LKB, Stockholm (S)
Mikrofuge E	Beckmann, München
Mikropipetten	Gilson, Middleton (USA)
Mikrozentrifuge <i>MC-13</i>	Heraeus, Osterode
pH Meter <i>pH 539</i>	WTW, Weilheim
Schnellkochtopf	CS Solingen, Solingen
Semi-dry Blotting Apparatur	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Spektrophotometer <i>Genequant 1300</i>	GE Healthcare, München
Spektrophotometer <i>Ultrospec 3000</i>	Pharmacia Biotech, Cambridge (UK)
Sterilbank <i>LaminAir HLB 2248 GS</i>	Heraeus, Hanau
Sterilpumpe	Microgon, Laguna Hills (UK)

Gerät	Hersteller
Transmissionselektronenmikroskop <i>EM 109</i>	Zeiss, Oberkochen
Ultrafiltrationsapparatur	Eigenbau der Institutswerkstatt
Ultramikrotom <i>OM U3</i>	C. Reichert, Wien (A)
UV-Detektor <i>UVIS 200</i>	Linear Instruments, Reno (USA)
Vakuumzentrifuge	Bachhofer, Reutlingen
Zentrifuge <i>3 K 12</i>	Sigma, Osterode
Zentrifuge <i>Multifuge 1L-R</i>	Thermo Scientific, Dreieich

### 2.2.5 HPLC-Säulen

Säule	Hersteller
Kinetex 2,6 $\mu$ HILIC 100A, 100 x 4,6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Kinetex 2,6 $\mu$ PFP 100A, 100 x 4,6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
ODS-AQ 5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm	YMC, Dinslaken
Reprosher-C18 Aqua, 5 $\mu$ m, 150 x 10 mm	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch
Synergi Fusion-RP 80A, 4 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg

## 2.3 Medien, Puffer, Lösungen

### 2.3.1 Medien für die Zellkultur

#### 2.3.1.1 Grundmedium

Das MEM-Medium wurde nach Standardprotokoll [Eagle 1959] hergestellt und beinhaltet Modifikationen nach Duszenko *et al.* [Duszenko *et al.* 1985; Duszenko *et al.* 1992].

Substanz	mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	265
KCl	400
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	200
NaCl	6800
HEPES	7140

Nach Einwiegen von Salzen und HEPES wurde der pH-Wert mittels NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt. Dann wurden folgende Aminosäuren und Adenosin darin gelöst:

<u>Substanz</u>	<u>mg/l</u>
L-Arginin x HCl	126
L-Histidin x HCl x H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	60
L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	100
L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin x HCl	50
Adenosin	12

Daraufhin wurden die folgenden kommerziellen Lösungen und Phenolrot zugegeben:

<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
MEM-nichtessentielle Aminosäuren	10 ml/l
MEM-Vitaminlösung	10 ml/l
Phenolrot	10 mg/l

Das gesamte Grundmedium wurde mittels Pumpe und Filter (SFCA-Membran) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Es war so bis zu 6 Monate haltbar. Aufgrund des Gehalts an HEPES sollte das Medium nicht zu lange dem Licht ausgesetzt sein (s. 4.2.4).

### 2.3.1.2 Blutform-Medium

Dem Grundmedium wurden folgende Substanzen zugegeben:

Substanz	gelöst in	ml/L
NaHCO <sub>3</sub>	75,0 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	30
L-Glutamin	29,2 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
L-Cystein	3,03 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
2'-Desoxythymidin	0,39 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
Hypoxanthin	1,36 mg/ml in 0,1 M NaOH	10
BCS	0,56 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	1
BSA/Myristinsäure *		20
Penicillin/Streptomycin		5
Glucose x H <sub>2</sub> O		5940 mg/L
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)		150

\* Für diese Lösung wurde 1 g entfettetes BSA in 20 ml *Aqua dest.* gelöst. Unter Rühren wurde nach und nach die Myristinsäurelösung (24 mg in 100 µl Ethanol) zupipettiert. Zur Aufbewahrung wurden 20 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren [Cross und Manning 1973; Ferguson und Cross 1984]

Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 7,4 nachtitriert. Nach dem Sterilfiltrieren war das BF-Medium 4 Wochen bei 4°C haltbar.

### 2.3.1.3 Medium zur Herstellung von konditioniertem Grundmedium

Um konditioniertes Medium ohne störende Serumkomponenten herzustellen, wurde ein erweitertes Grundmedium verwendet. In diesem konnten die Trypanosomen in hoher Zelldichte überleben, jedoch nicht wachsen.

Dazu wurden dem Grundmedium (2.3.1.1) folgende Substanzen zugesetzt:

<b>Substanz</b>	<b>gelöst in</b>	<b>ml/l</b>
NaHCO <sub>3</sub>	75,0 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	30
L-Glutamin	29,2 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
L-Cystein	3,03 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
2'-Desoxythymidin	0,39 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	10
Hypoxanthin	1,36 mg/ml in 0,1 M NaOH	10
Glucose x H <sub>2</sub> O		5940 mg/l

Für Grundmedium ohne HEPES wurde dieses bereits im Grundmedium (2.3.1.1) weggelassen.

Für die Herstellung von „konditioniertem Grundmedium“ wurde stets dieses Medium verwendet. Es darf daher nicht mit dem in 2.3.1.1 beschriebenen Grundmedium verwechselt werden.

#### 2.3.1.4 HMI-9 Medium

Zunächst wurde IMDM-Grundmedium hergestellt:

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
IMDM für 1 Liter	komplett
NaHCO <sub>3</sub>	3,02 g
<i>Aqua dest.</i>	1000 ml

Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls auf 7,2 nachtitriert.

Das HMI-9 Medium setzte sich folgendermaßen zusammen::

<b>Substanz</b>	<b>gelöst in</b>	<b>ml/L</b>
IMDM Grundmedium		890
L-Cystein 100x	18,2 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	11
Pyruvat 1000x	110 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	1,11
2'-Desoxythymidin 1000x	39 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	1,11
Hypoxanthin 100x	1,36 g in 100 ml 0,4%iger NaOH	11
BCS 1000x	28,2 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>	1,11
2-Mercaptoethanol		0,0155
Penicillin/Streptomycin 100x		11
FCS (30 min bei 56°C inaktiviert)		110
Serum Plus™		110

Vor der Zugabe von FCS und Serum Plus wurde der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf 7,4 eingestellt. Dann wurde sterilfiltriert und es wurden die Seren steril zugegeben.

### 2.3.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### *Separation buffer, pH 8,0:*

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	57	20,41
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	0,41
NaCl	44	2,57
Glucose x H <sub>2</sub> O	55	10,91

#### *Regeneration buffer:*

Der Puffer zur Regenerierung des DEAE-Sephacel-Gels war 1 M NaCl-Lösung (58,44 g/l), die mit HCl auf pH 3,0 eingestellt und mit einer Spatelspitze Natriumazid versetzt wurde.

#### *Phosphate buffered saline PBS, pH 7,4:*

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

#### *Trypanosome dilution buffer (TDB); pH 7,7 [Cross 1975]:*

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	18	6,45
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2	0,28
KCl	5	0,37
NaCl	80	4,67
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1	0,25
Glucose x H <sub>2</sub> O	20	3,96

***Citrat -Glucose-Antikoagulans (CGA), pH 7,7:***

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	102	29,91
Glucose x H <sub>2</sub> O	40	7,93

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

20% Glycerin in TDB

<b>Substanz</b>	<b>Volumen [ml]</b>
TDB	77,00
Glycerin, 87%ig	23,00

**2.3.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie*****PI in PBS zur Nekrosebestimmung:***

Propidiumiodid 0,5 mg/ml in PBS

***PI in PBS zur Bestimmung des DNA-Gehalts:***

Propidiumiodid 20 µg/ml in PBS

***Digitonin-Stammlösung:***Digitonin 6,4 mM in *Aqua dest.****Lysepuffer pH 7,4:***

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3	0,31
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	7,7	2,76

Dazu kamen 10 ml/l RNase-Lösung (10 mg/ml in *Aqua dest.*).***Ringerlösung, pH 7,4:***

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
NaCl	147,2	8,60
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,3	0,33
KCl	4,0	0,30

**Färbelösung zur Apoptose-Detektion:**

Angaben pro Probe

<b>Lösung</b>	<b>µl</b>
Ringerlösung	48
Annexin-Lösung (kommerziell)	1
Propidiumiodid (50 µg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	1

**2.3.4 Giemsa-Färbung****Weise-Puffer:**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	67	23,89
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,6	0,90

Zur Färbung der Zellen wurde die Giemsa-Stammlösung 1:10 mit Weise-Puffer verdünnt.

**2.3.5 Elektronenmikroskopie****Cacodylatpuffer 2fach, pH 7,4:**

<b>Substanz</b>	<b>Konz. [mM]</b>	<b>g/l</b>
Na-Cacodylat x 3		
H <sub>2</sub> O	200	42,8
Saccharose	234	80,0

**Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer:**

Glutaraldehyd 2% in 1x Cacodylatpuffer

**Osmiumtetroxid-Stammlösung, 3%:**0,25 g Osmiumtetroxid gelöst in 8,18 ml *Aqua bidest.*

***Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer:***

3%ige OsO<sub>4</sub>-Lösung 1:1 in 2x Cacodylatpuffer

***Uranylacetat , 5%:***

Uranylacetat 50 mg/ml in *Aqua bidest.* Die Lösung wurde mindestens 1 Tag vor Gebrauch angesetzt, 1 min zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert.

***Einbettungsharz:***

Zusammensetzung für eine Einbettung:

<u>Substanz</u>	<u>Einwaage [g]</u>
Agar 100 Resin	2,00
DDSA	1,00
MNA	1,08
BDMA	0,04

***Bleicitrat -Lösung:***

Bleicitrat 1 mg/ml in *Aqua dest.*, alkalisiert mit 20-50 µl einer 10 M NaOH-Lösung und nach dem Lösen des Bleicitrats sterilfiltriert.

**2.3.6 Pyruvat-Bestimmung*****Phosphat-Puffer, pH 7,0:***

<u>Substanz</u>	<u>Konz. [mM]</u>	<u>g/l</u>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 3 H <sub>2</sub> O	100	22,82
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	100	13,80

Beide Salze wurden getrennt voneinander in *Aqua dest.* gelöst und die entstandenen 100 mM Lösungen gegeneinander titriert, bis sich ein pH-Wert von 7,0 einstellte.

**Reaktionsmix für 40 ml (ausreichend für eine 96-Well-Plate):**

5,68 mg NADH Dinatriumsalz (20 mM) sowie 2,0 µl LDH-Stammlösung in  
40 ml Phosphatpuffer

**2.3.7 Laufmittel für die Chromatographie*****Gelfiltration:***

10% Methanol in *Aqua bidest.*

***HPLC:*****Reversed-Phase-Trennungen:**

Eluent A: 0,1% TFA in *Aqua bidest.*

Eluent B: 0,1% TFA in Acetonitril

**HILIC-Trennungen:**

Eluent A: 90% ACN: 10% wässr. Puffer

Eluent B: 50% ACN: 40% H<sub>2</sub>O: 10% wässr. Puffer

Verwendete wässr. Puffer:	Ammoniumacetat	50 mM	pH 6,9
	Ammoniumformiat	50 mM	pH 5,6
	Ammoniumformiat	50 mM	pH 3,2
	Wasser ohne Puffersalz		

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Sterile Zellisolierung aus infiziertem Blut und Herstellung von Stabilaten

Zur Gewinnung von Parasiten aus infiziertem Blut wurden einer Ratte nach Ether-Betäubung  $5 \times 10^7$  Zellen aus einem Rattenstabilat intraperitoneal injiziert.

Nach ca. 72 h war die Parasitämie normalerweise auf eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/ml Blut angestiegen. Zur Präparation wurde die Ratte mittels  $\text{CO}_2$  getötet, der Thorax mit einer Schere geöffnet und ca. 2 ml CGA (s 2.3.2) vorgelegt. Die *Vena cava inferior* wurde durchtrennt und das Blut mit einer Pasteurpipette in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde der linke Ventrikel punktiert und das Gefäßsystem mit 5 ml CGA gespült. Das so erhaltene Blut wurde nachfolgend für 10-15 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 1500 g zentrifugiert, bis Blutplasma und zelluläre Bestandteile sichtbar voneinander getrennt waren. Der zwischen den Phasen sichtbare und die Parasiten enthaltende *buffy coat* wurde abpipettiert und für die unmittelbare Verwendung der Zellen in Kultur in 2 ml kaltem Separationspuffer resuspendiert. Da die Trypanosomen bei diesem pH-Wert durch den VSG-Mantel ungeladen vorliegen, die Blutzellen jedoch negativ geladen sind, wurden die Parasiten durch Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephacel) aufgereinigt. Dazu wurde der resuspendierte *buffy coat* auf eine sterile, mit kaltem Separationspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Dann wurde mit kaltem Separationspuffer unter Wasserstrahlvakuum eluiert. Die Trypanosomen fanden sich im Durchlauf als trübe Suspension. Diese wurde daraufhin zentrifugiert ( $4^\circ\text{C}$ , 1500 g, 5 min), der Überstand wurde bis auf ca. 2 ml verworfen, die Zellen

wurden ausgezählt und dann entsprechend der weiteren Kulturexperimente angesetzt.

Um Kulturstabilate herzustellen, wurde der *buffy coat* statt in Separationspuffer in 4 ml CGA resuspendiert. Nach Zugabe von 6 ml Blutformmedium (s. 2.3.1.2) und 2 ml Canusal (entsprechen 200 U Heparin-Na) wurde die Zellsuspension ausgezählt, auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt und mit demselben Volumen Einfriermedium (s. 2.3.2) gemischt. Die Suspension wurde nun unter ständiger Kühlung in Cryo-Röhrchen aliquotiert (je 1 ml). Die Aliquots wurden zum schonenden Einfrieren für 1 h bei  $-20^\circ\text{C}$  und dann über Nacht bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer in flüssigen Stickstoff, wo die Stabilate bis zum Gebrauch gelagert wurden.

Zur Herstellung von Rattenstabilaten, die der Infektion neuer Tiere dienen, wurde das Blut nicht abzentrifugiert, sondern gleich mit CGA auf eine Zelldichte von ca.  $5 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt, 1:1 mit Einfriermedium gemischt und dann wie die Kulturstabilate eingefroren.

#### **2.4.2 Axenische Kultivierung von *T. brucei*-Blutformen aus Stabilaten**

Die Stabilate wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Stickstoff-Behälter unter fließendem warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Tube mit 9 ml kaltem Blutform-Kulturmedium (s. 2.3.1.2) überführt und 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 2 ml verworfen, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:10 ausgezählt. Die Vorkultur wurde auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml in einer Kulturflasche mit vorgewärmtem Blutform-Kulturmedium angesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

Bei einer Zelldichte zwischen  $8 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^6$  Zellen/ml (etwa nach 22 h) wurde die Vorkultur verdünnt und die Hauptkultur für die jeweiligen Experimente mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml gestartet. Die Kontrolle erfolgte immer unter Zugabe des Volumens an Lösungsmittel, in dem die jeweiligen Substanzen gelöst worden waren. Nach ca. 36 h bei einer Zelldichte von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/ml erreichte die Hauptkultur die stationäre Phase, um dann in die Absterbephase überzugehen.

### **2.4.3 Sterile Isolierung und axenische Kultivierung der Trypanosomen**

Um große Mengen an Zellen zu erhalten, wurde eine Ratte mit  $5 \times 10^7$  Zellen infiziert und das Blut nach drei Tagen wie bei der Stabilat-Herstellung steril entnommen. Das Vollblut wurde 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 1500 g zentrifugiert, das Plasma steril abgenommen und der *buffy coat* mit 3-4 ml CGA verdünnt. Die Suspension wurde dann auf der DEAE-Säule steril gereinigt.

Zur Herstellung und Vorbereitung der Säule wurden zunächst das DEAE-Säulenmaterial, mehrere Papierfilter mit 55 und 45 mm Durchmesser sowie alle benötigten Gefäße in einem Schnellkochtopf für 30 min autoklaviert. Das Säulenmaterial wurde zum Abkühlen nach der Sterilisation bis zum Gebrauch bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Pinzetten wurden vor dem Gebrauch in Ethanol aufbewahrt und abgeflammt. Als Säule diente eine Vakuum-Sterilfiltrationsapparatur von Whatman. Bevor die DEAE-Sepharose eingefüllt werden konnte, musste der in der Apparatur vorhandene Sterilfilter mit einer Pinzette entfernt und stattdessen ein autoklavierter 55 mm-Papierfilter eingesetzt werden. Danach wurde eine ca. 4 cm hohe Sepharoseschicht in das obere Reservoir eingefüllt und die Säule nach oben mit einem 45 mm-Papierfilter abgeschlossen. Es wurde mehrmals mit

kaltem, steril filtriertem *separation buffer* (s. 2.3.2) gespült. Nach dem Aufgeben des *buffy coats* wurden die Parasiten mit 80 ml *separation buffer* unter Wasserstrahl-Vakuum zügig eluiert. Die erhaltene Trypanosomen-Suspension wurde durch den Vakuumstutzen in Falcons überführt und wiederum 5 min bei 4°C und 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml Blutform-Medium resuspendiert. Das Auszählen und Ansetzen der Kultur erfolgte analog zu 2.4.2.

#### **2.4.4 Axenische Kultivierung von pleomorphen Blutformen**

Mäuse wurden mit je  $1 \times 10^6$  Zellen des Stammes AnTat 1.1 in 100 µl sterilem CGA i.p. infiziert. Die Parasitämie wurde durch tägliche Entnahme von Blut aus der Schwanzvene überwacht. Das Blut wurde mit CGA i.d.R. 1:50 verdünnt und die Parasiten ausgezählt. Zusätzlich wurden Blutausrichungen angefertigt und einer Giemsa-Färbung unterzogen, um morphologisch den Anteil an *slender*- und *stumpy*-Formen zu bestimmen. Bei einem *slender*-Anteil von mind. 80% wurde die Maus präpariert und die Trypanosomen über eine sterile DEAE-Säule analog zu 2.4.1 isoliert. Die Kulturen wurden in Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml entsprechend den gewünschten Kulturbedingungen in HMI-9 Medium (s. 2.3.1.4) angesetzt. Die Inkubation erfolgte auch hier bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.4.5 Herstellung von konditioniertem Blutform-Medium**

Aus einer Vorkultur wurden wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben 50 ml-Hauptkulturen mit einer Anfangszelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt. Dieselbe Menge an frischem Blutformmedium wurde abgefüllt und als Kontrolle mitinkubiert. Nach ca. 24 h im Brutschrank und einer Zelldichte

zwischen  $8,0 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen 10 min bei 1500 g abzentrifugiert und das Medium steril abgenommen. Um eine Verfälschung der Mediumzusammensetzung durch einzelne im Überstand verbliebene und später lysierende Zellen zu verhindern, wurde das Medium nochmal filtriert.

#### **2.4.6 Herstellung von konditioniertem Grundmedium**

Die Anfangszelldichte für die Konditionierung von Grundmedium (s. 2.3.1.3) betrug  $3 - 4 \times 10^6$  Zellen/ml. Nach 4 h wurde die Zelldichte kontrolliert, um sicherzustellen, dass die Zellen nicht abgestorben waren. Dann wurde das Medium wie unter 2.4.5 beschrieben gewonnen.

#### **2.4.7 Aufarbeitung des konditionierten Mediums**

##### ***2.4.7.1 Ultrafiltration***

Um die größeren Moleküle und Proteine aus dem konditionierten Medium zu entfernen, wurde das Medium unter Überdruck durch eine Cellulose-Membran (Millipore) mit einer Porengröße von 1 kDa filtriert und das Filtrat in gekühlten Falcon-Tubes aufgefangen.

##### ***2.4.7.2 Gefriertrocknung***

Das ultrafiltrierte Medium wurde aufgeteilt und in entsprechend großen Kolben (z.B. 50 ml Medium in 250 ml-Rundkolben) an der *Lyovac GT 2*-Anlage getrocknet.

### 2.4.7.3 Gelfiltrations-Chromatographie

Die *size exclusion chromatography* wurde auf einer *ÄktaPrime* FPLC-Anlage durchgeführt. Das Säulenmaterial war *Biogel P2* (Biorad), welches in einer Glassäule mit einem Durchmesser von 1,8 cm etwa 80 cm hoch gepackt war. Als Laufmittel diente 10% Methanol in *Aqua bidest.* Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Das Gerät erfasste die Absorption bei  $\lambda=254$  nm und die Leitfähigkeit; beide Kurven wurden auf einem Schreiber ausgegeben. Zur Probenvorbereitung wurde der gefriergetrocknete Rückstand von jeweils 50 ml konditioniertem Medium oder entsprechender Kontrolle in 10 ml Laufmittel gelöst und anschließend durch einen 0,2  $\mu\text{m}$ -Spritzenvorsatzfilter filtriert. Das Probenvolumen für eine Trennung betrug maximal 5 ml.

#### Programm der Gelfiltration:

Um alle relevanten Peaks des Chromatogramms aufzufangen, wurde folgendes Programm verwendet:

Fluss: 0,3 ml/min

Eluent: H<sub>2</sub>O/Methanol (90:10)

Volumen [ml]	Ereignis	Bemerkung
0	Start	
80	Inject	
90	Load	
140	Start Fraktionierung	1 ml/Frakt.
180	Stop Fraktionierung	
205	Start Fraktionierung	3 ml/Frakt.
217	Stop Fraktionierung	
227	Start Fraktionierung	3 ml/Frakt.
233	Stop Fraktionierung	
240	Start Fraktionierung	5 ml/Frakt.
250	Stop Fraktionierung	
258	Start Fraktionierung	5 ml/Frakt.
268	Stop Fraktionierung	
280	Ende	

Sollte nur der als wachstumshemmend identifizierte Peak aufgefangen werden, so wurden nach 180 ml keine weiteren Fraktionen mehr gesammelt.

#### 2.4.7.4 HPLC

Die Fraktionen der neu entstandenen Peaks wurden vereinigt, gefriergetrocknet (*Lyovac*) und dann 10fach konzentriert in *Aqua bidest.* wieder aufgenommen. Vor dem Einspritzen wurde die Probe über einen Phenex-Spritzenfilter (*Phenomenex*, Durchmesser 4 mm) von Partikeln befreit. Eingespritzt wurden je nach verwendeter Säule zwischen 30 µl und 100 µl. Die Analysen wurden auf einer HPLC-Anlage von *Sykam* durchgeführt. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 214 nm verwendet (*UVIS 200*).

#### HPLC-Programme:

##### **RP-Trennungen auf C18- oder PFP-Säulen:**

Flussrate: 0,5 ml/min  
Eluenten: A: H<sub>2</sub>O mit 0,1 % TFA  
          B: ACN mit 0,1 % TFA

*Gradientenprogramm für die Reprospher-Säule (Dr. Maisch GmbH):*

Zeit [min]	%B
0	0
10	0
30	25
40	75
40,1	100
45	100
45,1	0
50	0

Gradientenprogramm für die Synergi Fusion-Säule (Phenomenex):

Zeit [min]	%B
0	0
20	50
20,1	95
25	95
25,1	0
30	0

Gradientenprogramm für die Synergi Fusion-Säule (Phenomenex):

Zeit [min]	%B
0	5
5	5
20	95
25	95
25,1	0
30	0

### HILIC-Trennung:

Flussrate: 0,5 ml/min

Eluenten: A: ACN/wässr. Puffer (90:10)

B: ACN/H<sub>2</sub>O/wässr. Puffer (50:40:10)

(s. 2.3.7)

Gradientenprogramm für die Kinetex-HILIC-Säule (Phenomenex):

Zeit [min]	%B
0	0
5	0
20	55
20,1	100
25	100
25,1	0
30	0

### 2.4.8 HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS)

Die LC-MS-Messungen wurden an einer *Agilent 1100* HPLC-Anlage mit nachgeschaltetem *Esquire 3000+* Massenspektrometer durchgeführt.

Das Programm für die HPLC-Trennung entsprach dem für die HILIC-Säule unter Abschnitt 2.4.7.4 beschriebenen Ablauf. Die eingestellten Parameter des Massenspektrometers waren wie folgt:

Parameter	Wert
Nebulizer	60 psi
Dry Gas	9,0 l/min
Dry Temp	365°C
Compound Stability	100%
Trap Drive Level	100%
Target	50000
Max. Accu. Time	100 ms
Scan Range	Standard
Scan Resolution	Normal

### 2.4.9 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem *FACSCalibur*- oder einem *FACSCanto II*-Gerät (beide Beckton-Dickinson) durchgeführt und mit dem Programm Cyflogic [[www.cyflogic.com](http://www.cyflogic.com)] ausgewertet.

#### 2.4.9.1 Bestimmung nekrotischer Zellen

Die Kulturen wurden ausgezählt und je 500 µl entnommen. Jeder Probe wurde 0,5 µl Propidiumiodid-Stammlösung (0,5 mg/ml) zugegeben, vorsichtig invertiert und im roten Kanal gemessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen nach Zugabe von 12,8 µM Digitonin.

#### 2.4.9.2 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkerne

Die Kulturen wurden ausgezählt, je 1 ml entnommen und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer (s. 2.3.3)

und 1 µl Digitonin-Stammlösung (6,4 mM) aufgenommen und zur Lyse 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 100 µl PI in PBS (s. 2.3.3) zugegeben und vorsichtig invertiert. Die Messung erfolgte ebenfalls im roten Kanal.

#### **2.4.9.3 Bestimmung apoptotischer Zellen mit Annexin-V**

Für den Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition wurden 500 µl Trypanosomensuspension (Zelldichte  $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml) einmal mit Ringerlösung (s. 2.3.3) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl Farbelösung (s. 2.3.3) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Bevor die Zellen gemessen wurden, wurden in jede Probe 450 µl Ringerlösung zugegeben.

#### **2.4.10 Giemsa-Färbung**

Die Färbung mit Giemsa-Lösung diente der besseren Erkennbarkeit der Zellmorphologie bzw. dem deutlicheren Kontrast der Trypanosomen im Blutausschlag. Ein Tropfen der Kultursuspension oder Blut aus der Schwanzvene des infizierten Tieres wurde auf einem mit Isopropanol gereinigten Objektträger ausgestrichen. Nach dem Trocknen wurden die Zellen zweimal mit Methanol fixiert und der Objektträger dann mit abgekochtem *Aqua dest.* abgespült. Die Färbung erfolgte mittels einer 1:10 mit Weise-Puffer verdünnten Giemsa-Lösung (s. 2.3.4). Nach einer Einwirkzeit von 20 min wurde die Farblösung mit abgekochtem *Aqua dest.* abgespült und die Probe getrocknet. Bis zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop wurden die fertigen Proben bei 4°C aufbewahrt.

### 2.4.11 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für eine TEM-Einbettung wurden mindestens  $1 \times 10^8$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden nach der entsprechenden Behandlung und Inkubationszeit abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1500 g) und zweimal mit TDB (s. 2.3.2) gewaschen. Dann folgte die Fixierung mit 2% Glutaraldehyd für 1 h bei 4°C, danach wurden die Zellen viermal mit Cacodylatpuffer gewaschen und nochmals 1 h bei 4°C in 1,5% Osmiumtetroxid (s. 2.3.5) fixiert. Anschließend wurde einmal mit Cacodylatpuffer und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen. Darauf folgte die Kontrastierung mit 0,5% Uranylacetat für 1 h bei Raumtemperatur.

Zur Entwässerung wurde einmal mit *Aqua bidest.* und nachfolgend je 5 min mit 50%-, 70%- und 95%-igem Ethanol, dann dreimal mit 100% Ethanol und dreimal mit Propylenoxid gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50% Eponharz in Propylenoxid aufgenommen. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Probe mittels reinem Eponharz in Beem-Cups überführt und nochmals 1 h stehen gelassen. Das Eponharz im Überstand wurde dann noch einmal gewechselt und die Probe 12 h bei 45°C und 24 h bei 60°C polymerisiert.

Nach dem Aushärten des Harzes wurden die Beem-Cups entfernt und die Spitze der Einbettung mit dem *LKB 11800 Pyramitone* zu einem Trapez mit einer Basislänge von ca. 0,5 mm getrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom *OM U3* (Reichert) angefertigt und auf Kupfergrids (200 Square mesh) gefischt.

Zur Färbung wurden die Grids mit der Oberseite nach unten auf einen Tropfen Uranylacetatlösung gelegt und so für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die gefärbten Grids wurden dann zur Kontrastierung mit *Aqua bidest.* gewaschen, für 45 s in eine Bleicitrat-Lösung gedippt und dann mit einem scharfen Strahl sterilfiltriertem *Aqua bidest.* abgespült.

Die Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop mit TFP-Großbildkamera auf Schwarzweiß-Negativfilme *IMAGO-EM23* (Ahlemeyer). Diese wurden 4 min mit einer 1:8-Verdünnung des *RHC Document Type Developers* entwickelt und 8 min mit einer 1:8-Verdünnung des *RXA Rapid Fixing Baths* fixiert.

#### 2.4.12 Berechnung der elementaren Zusammensetzung

Die zu der ermittelten genauen Masse möglichen Summenformeln wurden mit Hilfe der Software „Elemental Composition Calculator“ [<http://www.wsearch.com.au/>] berechnet.

Die verwendeten Einstellungen bezüglich der Anzahl der berücksichtigten Elemente waren wie folgt:

Element	min	max
C	0	30
H	0	30
N	0	10
O	0	10
S	0	2
P	0	2

Die maximal tolerierte Abweichung von der gemessenen Masse wurde auf 0,01 Da eingestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Effekte des konditionierten Mediums in Kultur

#### 3.1.1 Wachstumshemmung durch konditioniertes Medium

Schon länger ist bekannt, dass Blutform-Kulturmedium, aus dem die Zellen vor Eintritt in die stationäre Phase entfernt wurden, das Wachstum einer neuen Kultur hemmt. So gewonnenes Medium wird als „konditioniert“ bezeichnet. Der Effekt ist abhängig von der Konzentration des konditionierten Mediums und von der Dauer der Konditionierung.

Weiterhin wird die Hemmung nicht durch einen Mangel an Nährstoffen hervorgerufen und auch eine Veränderung des pH-Wertes konnte als Ursache ausgeschlossen werden [Hesse 1996].

Um die Stärke der wachstumshemmenden Wirkung einschätzen zu können, wurden die in der Kontrolle und in der Probe erreichten maximalen Zellzahlen miteinander verrechnet. Die prozentuale Hemmung wurde daher nach folgender Formel berechnet:

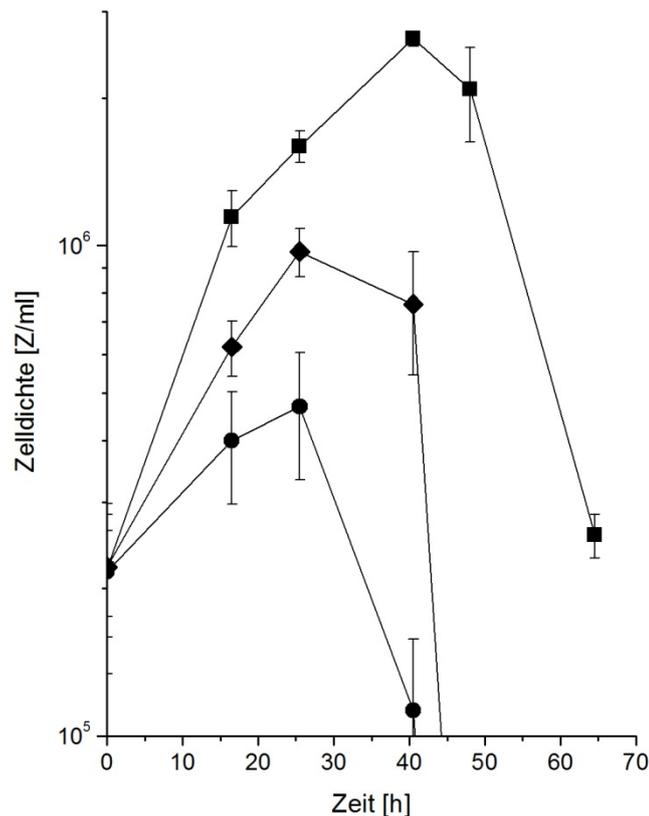
$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{(Z_{\text{max, Probe}} - Z_0) \cdot 100}{(Z_{\text{max, Kontrolle}} - Z_0)}$$

$Z_0$  = eingesetzte Zellkonzentration

$Z_{\text{max}}$  = höchste erreichte Zellkonzentration

Dabei bedeuten 100% Hemmung kein Wachstum und negative Werte ein verstärktes Wachstum der Proben-Kultur.

Sowohl konditioniertes Blutform-Medium als auch konditioniertes Grundmedium (s. 2.4.5) wurden auf ihre jeweilige wachstumshemmende Wirkung untersucht. Das Verhältnis zu frischem Blutformmedium war stets 1:1.



**Abbildung 3.1:** Hemmwirkung von konditioniertem (◆) Grundmedium und (●) Blutformmedium, (■) Kontrolle 100% Blutformmedium. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus jeweils 3 unabhängigen Kulturen dar.

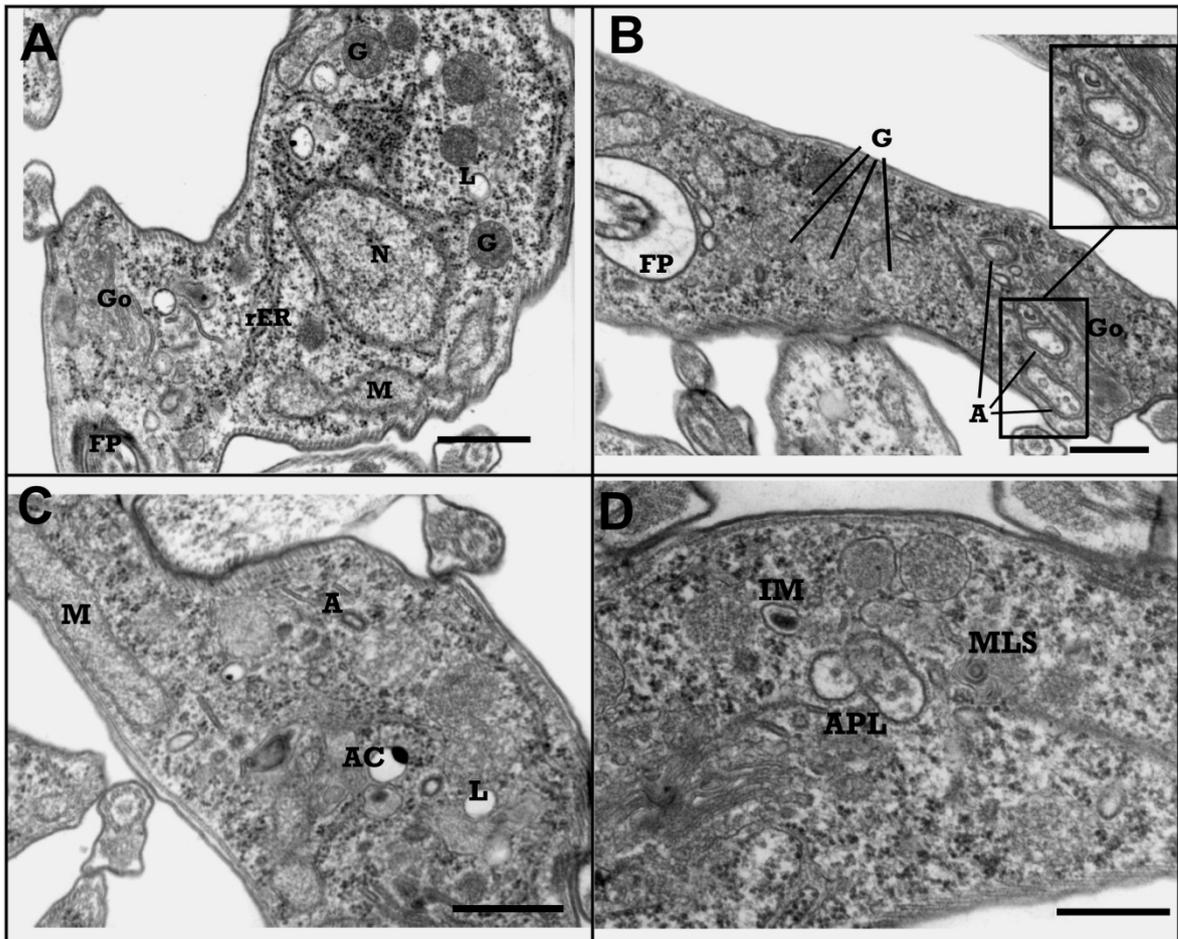
Das konditionierte Blutformmedium wurde nach etwa 24 h aus einer exponentiell wachsenden Hauptkultur gewonnen, wohingegen die Zellen zur Gewinnung von konditioniertem Grundmedium nur kurze Zeiten (4-5 h) inkubiert werden konnten und sich nicht vermehrten. Zwar wurde versucht, die Konzentration des Differenzierungssignals im Grundmedium

durch große Zelldichten zu erhöhen, jedoch enthält das Medium aus normaler Blutformkultur trotzdem mehr DIF. Dies entspricht der Theorie, dass das Differenzierungssignal vor allem von den sich teilenden *long slender*-Trypanosomen gebildet wird.

Aufgrund der deutlich stärkeren Wachstumshemmung von konditioniertem Blutformmedium gegenüber dem Grundmedium (Abbildung 3.1, 69,0% vs. 89,6%) sollte zunächst versucht werden, das konditionierte Blutformmedium weiter zu fraktionieren.

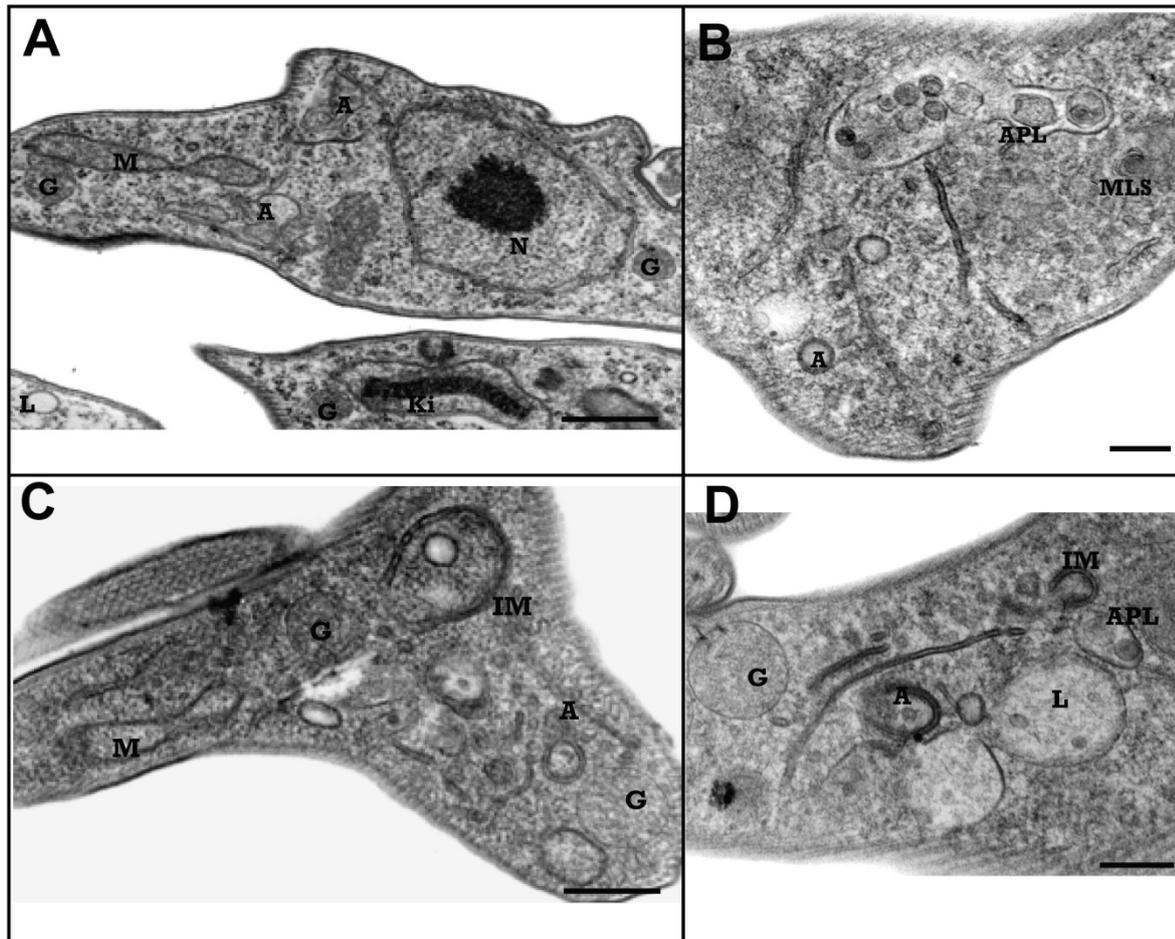
### **3.1.2 Morphologische Veränderungen der Zellen während der Differenzierung**

Um die morphologischen Veränderungen bei der Behandlung mit konditioniertem Medium verfolgen zu können, wurden Zellen aus einer Kultur mit 50% konditioniertem Blutformmedium sowie unbehandelte Parasiten für die Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) in Eponharz eingebettet (s 2.4.11). Um einen zeitlichen Verlauf zu erhalten, wurden Zellen nach 16 und 24 h Kultur präpariert.



**Abbildung 3.2:** TEM-Aufnahmen von unbehandelten (A) und 16 h mit konditioniertem Blutformmedium behandelten Zellen (B-D). M, Mitochondrium; N, Nukleus; G, Glykosom; L, Liposom; Go, Golgi-Apparat; A, Autophagosom; rER, raues endoplasmatisches Retikulum; AC, Acidocalcisom; APL, Autophagolysosom; FP, Flagellumtasche; MLS, multilaminare Struktur; IM, *isolation membrane*; Ki, Kinetoplast. Balken = 0,5  $\mu\text{m}$ .

Bereits nach 16 h (Abbildung 3.2) war eine gegenüber den Kontrollzellen deutlich erhöhte Anzahl autophagischer Strukturen wie Autophagosomen (Abbildung 3.2 B und C), ausgeprägte Autophagolysosomen (D), *isolation membranes* als Vorstufe der Autophagosomen (D), sowie die bei Autophagie häufig beobachteten multilaminaren Strukturen (D) festzustellen.



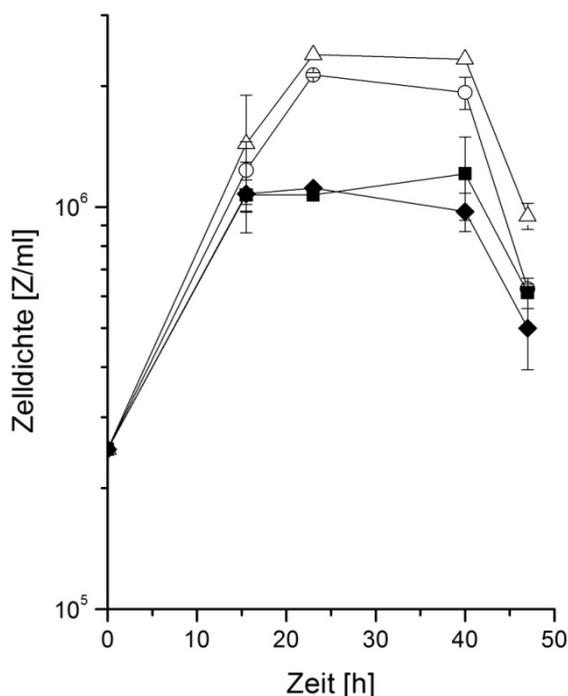
**Abbildung 3.3:** TEM-Aufnahmen von unbehandelten (A) und 24 h mit konditioniertem Blutformmedium behandelten Zellen (B-D). M, Mitochondrium; N, Nukleus; G, Glykosom; L, Liposom; Go, Golgi-Apparat; A, Autophagosom; rER, raues endoplasmatisches Retikulum; AC, Acidocalcisom; APL, Autophagolysosom; FP, Flagellumtasche; MLS, multilaminare Struktur; IM, *isolation membrane*; Ki, Kinetoplast. Balken = 0,5 µm.

Nach 24 h (Abbildung 3.3) waren die Kennzeichen vermehrter Autophagie immer noch deutlich sichtbar. Es wurden ausgeprägte *isolation membranes* gefunden (Abbildung 3.3 C) sowie große Autophagolysosomen, in denen zahlreiche zum Abbau vorgesehene Strukturen zu erkennen waren (B).

Die TEM-Aufnahmen ließen also auf eine erhöhte Autophagie-Aktivität während der Differenzierung schließen.

### 3.1.3 Hemmbarkeit der Autophagie durch Wortmannin und 3-Methyladenin

Eine Hemmung der Autophagie, wie sie in den TEM-Aufnahmen beobachtet wurde, sollte zu einer Aufhebung der Wachstumshemmung führen, falls die Autophagie ein für die Differenzierung essentieller Prozess ist.

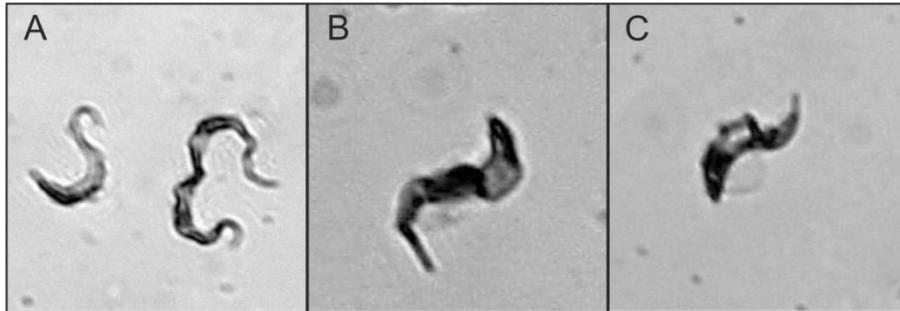


**Abbildung 3.4:** Untersuchung der Wachstumshemmung: (△) Kontrolle 100% BFM, (○) Kontrolle 50% nichtkonditioniertes BFM, (■) 50% konditioniertes BFM, (◆) 50% konditioniertes BFM + 50 nM Wortmannin.

Der Effekt von konditioniertem BFM wurde durch die Zugaben von 50 nM Wortmannin nicht beeinflusst (Abbildung 3.4). Auch die Zugabe von 100  $\mu$ M 3-Methyladenin konnte die Hemmwirkung nicht abschwächen (nicht gezeigt).

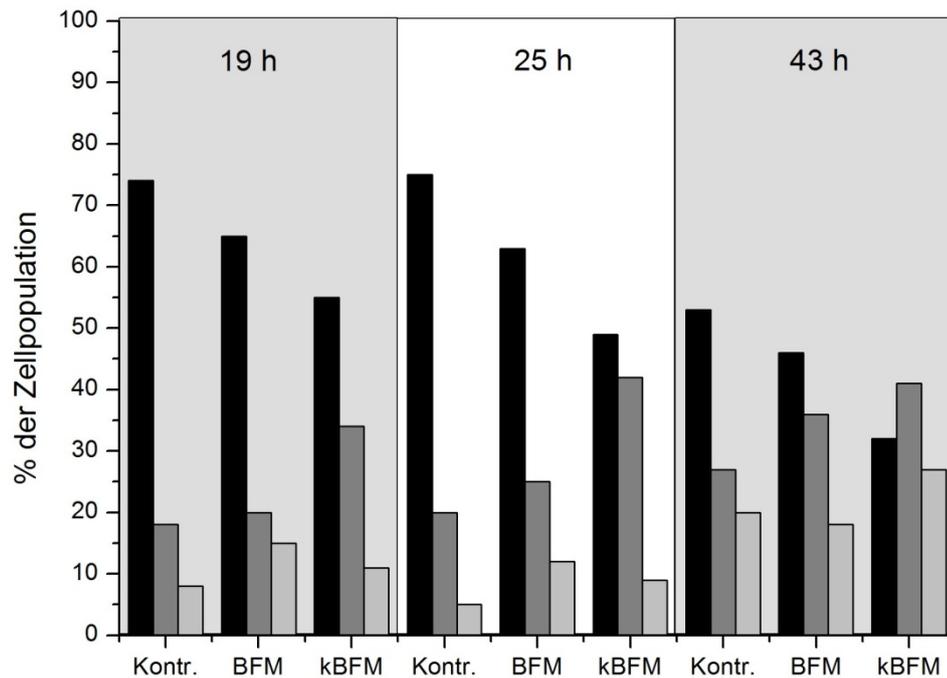
### 3.1.4 Induktion der *short stumpy*-Morphologie

Zusätzlich zur Wachstumshemmung sollte auch noch die Veränderung der Zellmorphologie durch die in Abschnitt 3.2.3.5 identifizierte Fraktion 2 untersucht werden.



**Abbildung 3.5:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellstadien einer AnTat 1.1-Blutformkultur. (A) *long slender*-Zellen, rechts mit einer Zelle in der Teilung; (B) *intermediate*-Form; (C) *short stumpy*-Zelle.

Zur Unterscheidung von *long slender*- und *short stumpy*-Blutformen wurden Zellen des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 kultiviert und mit den entsprechenden Fraktionen behandelt. Die Fraktionen der Gelfiltration wurden 10fach in Medium aufkonzentriert und dann mit 50  $\mu\text{l/ml}$  Kultur eingesetzt. Zur Analyse wurden 50  $\mu\text{l}$  Kultur entnommen und nach 2.3.4 mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop durch Auszählen von mindestens 100 Zellen und Bewertung der Zellmorphologie (Abbildung 3.5).

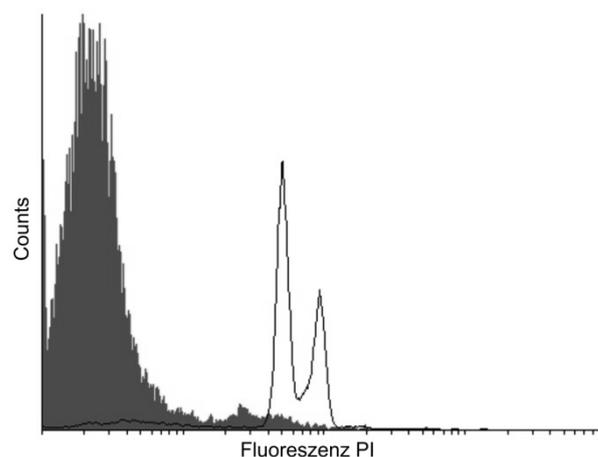


**Abbildung 3.6:** Entwicklung der Zellpopulation in einer AnTat 1.1-Kultur. Dargestellt sind die Anteile an *long slender*- (schwarz), *intermediate*- (dunkelgrau) und *short stumpy*-Formen (hellgrau) nach 19, 25 und 43 h.

Abbildung 3.6 zeigt den Verlauf der Zellpopulation nach 19, 25 und 43 h. Begonnen wurde die Kultur mit einem *slender*-Anteil von 85%. Gezeigt sind jeweils eine Kontrollkultur, eine Kultur mit den Fraktionen von nichtkonditioniertem Blutformedium (BFM) und die Kultur mit den Fraktionen aus konditioniertem Medium (kBFM). Bereits nach 19 Stunden war der Anteil an differenzierenden Zellen höher als in der Kontrolle und der BFM-Kultur. Während die Verteilung von Kontrolle und BFM zwischen 19 und 25 h nahezu unverändert blieb, stieg in der Probe der Anteil der *stumpy*-Zellen weiter an. Nach 43 h war auch in Kontrolle und BFM die Differenzierung zu beobachten, der *stumpy*-Anteil in der kBFM-Kultur war jedoch immer noch deutlich höher.

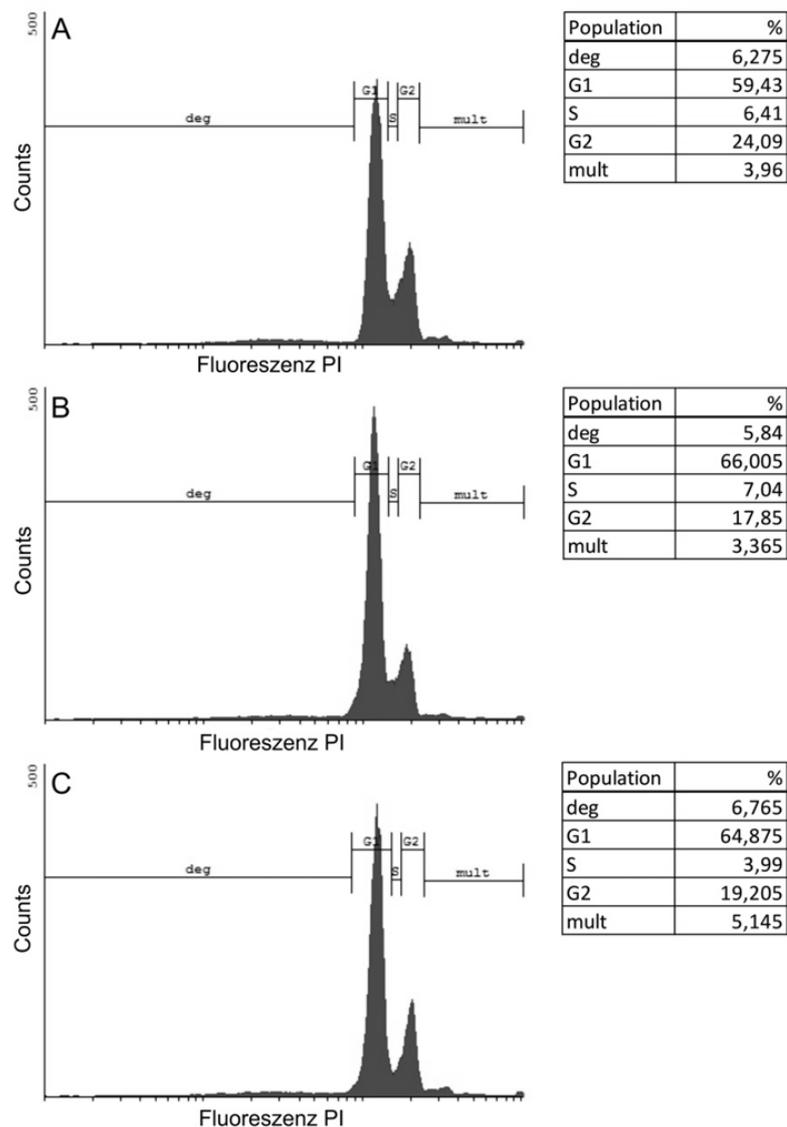
### 3.1.5 Durchflusszytometrische Messungen

Zunächst wurde untersucht, ob die Wachstumshemmung bei der Kultivierung mit konditioniertem Medium auf ein nekrotisches Absterben der Zellen zurückzuführen war. Dazu wurden die Zellen mit PI gefärbt, welches mit der DNA interkalieren kann, wenn die Zellmembran permeabel ist. Da dies bei Nekrose der Fall ist, zeigen die entsprechenden Zellen im Zytometer erhöhte Fluoreszenz. Abbildung 3.7 zeigt, dass Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt wurden, keine Nekrose unterlagen. Die Positivkontrolle stellten mit Digitonin behandelte Parasiten dar (s. 2.4.9.1).



**Abbildung 3.7:** Untersuchung von behandelten Zellen auf Nekrose mittels Propidiumiodid-Färbung. Schwarz dargestellt ist die Positiv-Kontrolle, das gefüllte graue Histogramm zeigt die Fluoreszenz von Zellen, die 16 h mit konditioniertem Medium behandelt wurden.

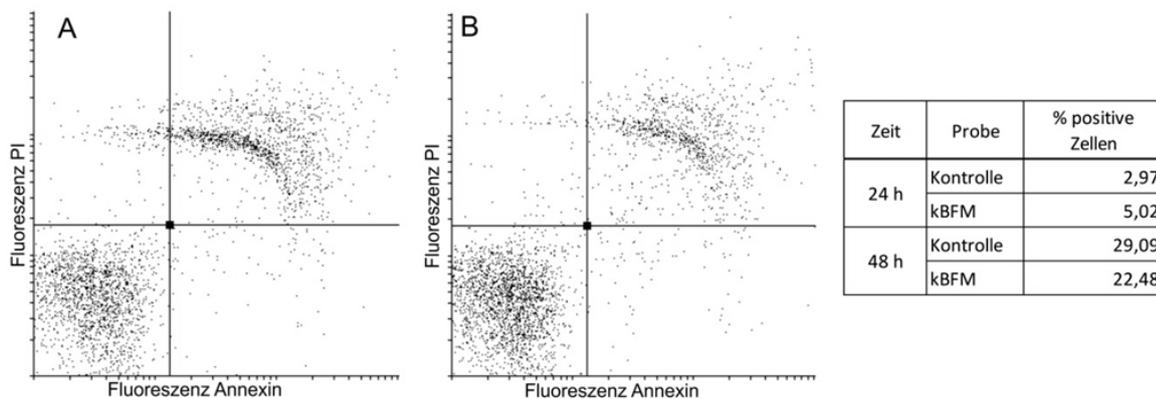
Weiterhin sollten die durch das konditionierte Medium induzierten *stumpy*-Zellen in der  $G_1/G_0$ -Phase des Zellzyklus arretiert sein [Vassella *et al.* 1997]. Dies wurde mittels Färbung der Kern-DNA mit Propidiumiodid untersucht. Abbildung 3.8 zeigt, dass nach 24 h kein verstärkter Zellzyklusarrest gegenüber der Kultur mit nichtkonditioniertem Medium detektiert werden konnte.



**Abbildung 3.8:** Analyse des Kern-DNA-Gehaltes einer 24 h inkubierten Kultur. (A) Kontrollkultur, (B) mit 50% nichtkonditioniertem Medium, (C) mit 50% konditioniertem Medium. Bezeichnungen der Populationen: deg, degenerierte DNA; mult, Kerne mit mehr als doppeltem Chromosomensatz; G1, S und G2 entsprechen den Phasen des Zellzyklus.

Die durch das konditionierte Medium zur Differenzierung angeregten Zellen gehen früher in die stationäre Phase, daher wurde das frühere Auftreten von Apoptose in den behandelten Zellen untersucht. Dazu wurden Trypanosomen mittels Annexin V und Propidiumiodid gefärbt.

Annexin V färbt Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen auf der Außenseite der Zellmembran exponiert wird. Handelt es sich um ein spätes Stadium der Apoptose, so kann zusätzlich Propidiumiodid durch die perforierte Membran in die Zelle eindringen und die DNA färben. Apoptotische Zellen finden sich im *dot plot* daher in den beiden rechten Quadranten.



**Abbildung 3.9:** Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid zur Detektion apoptotischer Zellen. (A) Kontrollzellen, (B) mit konditioniertem Blutformmedium behandelte Zellen nach 48 h Kultur. Die Tabelle gibt den Prozentsatz der Zellen in den beiden rechten Quadranten nach 24 und 48 h Inkubationszeit an.

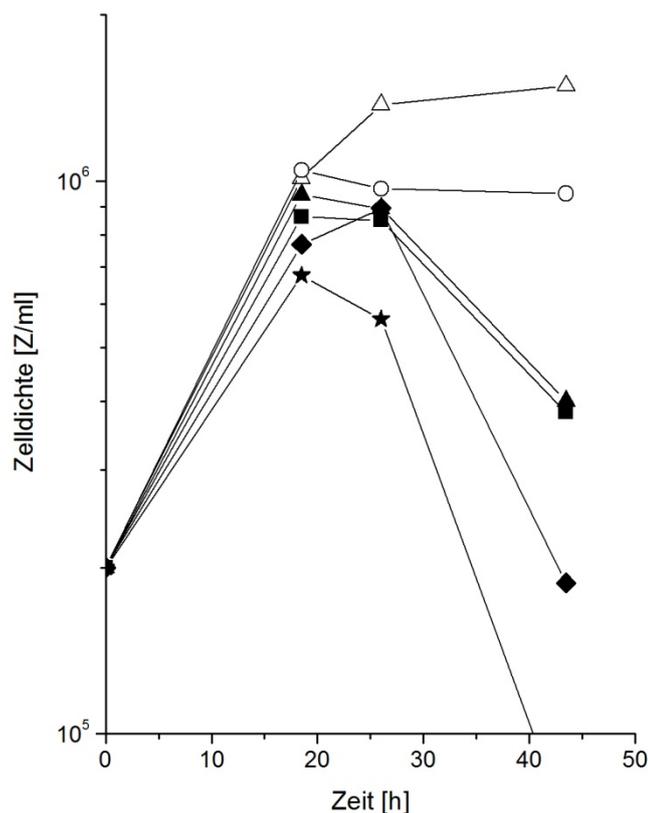
Wie in Abbildung 3.9 zu erkennen ist, trat nach 24 und 48 h gegenüber der Kontrolle keine vermehrte Apoptose auf.

## 3.2 Aufreinigung des konditionierten Mediums

### 3.2.1 Anreicherung der Hemmaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Zur Gewinnung der konditionierten Medien wurden die Zellen wie in unter 2.4.5 und 2.4.6 beschrieben 3 bis 5 h in Grundmedium (GM) oder 22 bis 24 h in Blutform-Medium (BFM) inkubiert.

Für die Inkubation in Grundmedium konnte ein zeitabhängiger Effekt nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.10:** Wachstumshemmende Wirkung von konditioniertem Medium in Abhängigkeit von der Konditionierungsdauer. (△) Kontrolle 100% BFM, (○) Kontrolle 50% nichtkonditioniertes GM, 50% konditioniertes GM nach (▲) 2 h, (■) 3 h, (◆) 4 h und (★) 5 h Konditionierung.

Je länger die Zellen bei hoher Zelldichte im Grundmedium verblieben, umso stärker war der Hemmeffekt (Abbildung 3.10).

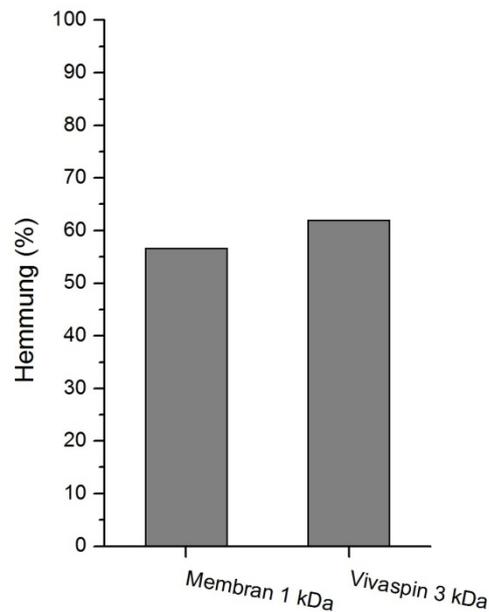
### 3.2.2 Ultrafiltration des Mediums

Nach der Gewinnung des konditionierten Mediums wurde dieses über eine Membran mit einem Größenausschluss von 1 kDa filtriert. Die Hemmaktivität fand sich nach der Ultrafiltration praktisch vollständig im Filtrat wieder.

Das filtrierte Medium zeigte jedoch bereits in der Kontrolle einen deutlich wachstumshemmenden Effekt. Dies ist der Verdünnung von Serum und Nährstoffen aus dem frischen Kulturmedium beim Zugeben des filtrierten Mediums zuzuschreiben.

Die Ultrafiltration in Chargen von 150 - 200 ml wurde zur ersten Fraktionierung als die optimale Methode identifiziert. Eine Trennung dauerte so 3 bis 4 h.

Alternative Verfahren waren zum einen das Zentrifugieren der Proben durch Zentrifugationseinheiten mit eingebauter Membran (Centricon, Millipore oder Vivaspin, Sartorius). Diese sind jedoch nur mit Poren von 3 bzw. 5 kDa erhältlich und erlauben lediglich eine Beladung mit jeweils max. 25 ml. Da sie außerdem relativ teuer waren und keinen signifikanten Vorteil in der Aktivität des Filtrats (Abbildung 3.11) oder in der Geschwindigkeit der Trennung brachten, wurde dieses Verfahren nicht weiter verwendet.



**Abbildung 3.11:** Vergleich der Wachstumsinhibition durch Filtrate aus der Ultrafiltration durch eine 1 kDa-Membran (links) und der Zentrifugation durch Vivaspin-Ultrazentrifugationseinheiten (Sartorius) mit einer Porengröße von 3 kDa.

Zum anderen wurde auch die klassische Dialyse in die Überlegungen zu diesem Schritt einbezogen. Da in diesem Fall jedoch die kleineren Komponenten zur Weiterverarbeitung benötigt wurden, hätte eine Dialyse eine vielfache Verdünnung der Substanz zur Folge gehabt. Somit wäre ein umfangreicherer Trocknungsprozess nötig gewesen, was zusammen mit der ca. zwei Tage dauernden Dialyse ebenfalls keine kürzere Aufarbeitungszeit gebracht hätte.

### 3.2.3 Größenausschlusschromatographie

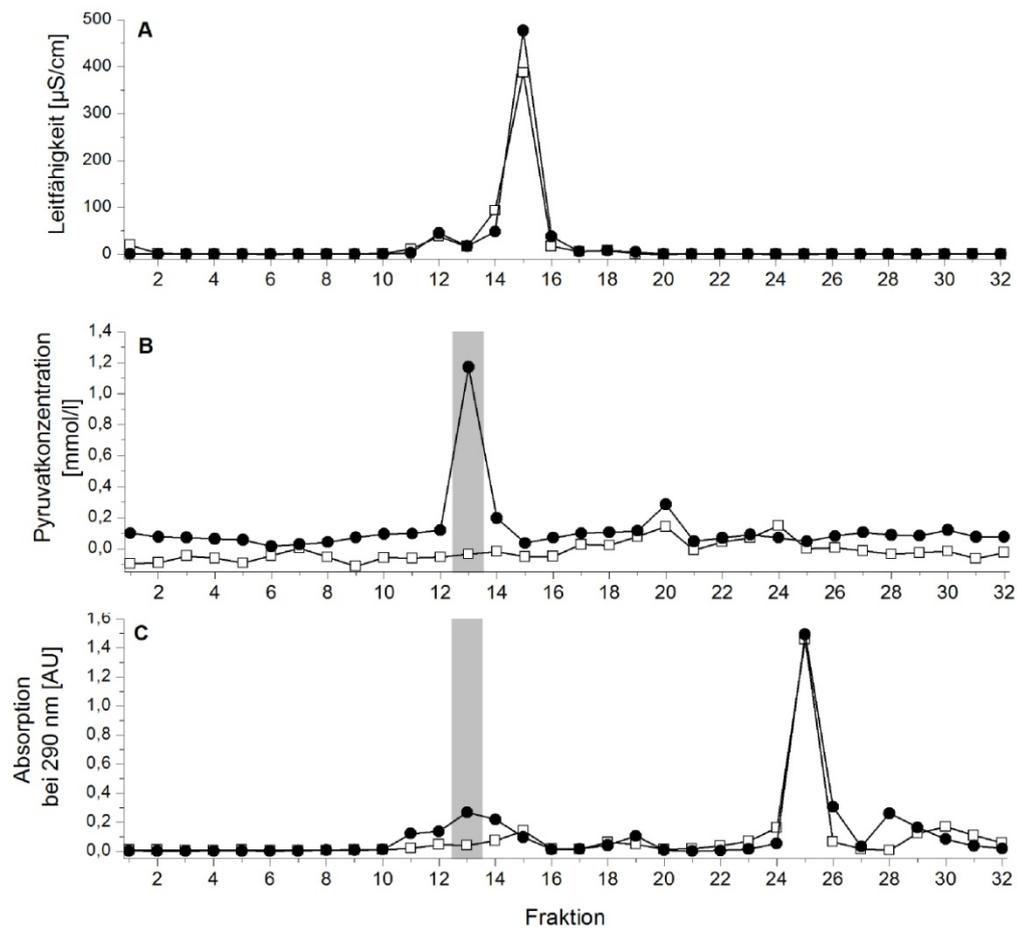
In früheren Arbeiten gelang es nicht, die aktive Substanz mittels eines Ionenaustausch-Verfahrens direkt aus dem dialysierten Medium zu extrahieren [Hesse 1996]. Daher wurde in dieser Arbeit als erster chromatografischer Schritt die Gelfiltration gewählt, um die neu entstandene Substanz von den Mediumbestandteilen anderer Größe

abzutrennen. Für die Trennung wurde „P2 Biogel extra fine“, ein Polyacrylamid-Gel des Herstellers *Biorad* verwendet, für das ein Trennbereich von 100 bis 1800 Da angegeben war.

### *3.2.3.1 Optimierung der Größenausschlusschromatographie*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Trennung wie in [Buchholz 2005] beschrieben durchgeführt. Die Säule wurde mit nachgeschalteter Pumpe und Fraktionssammler betrieben. Eine direkte Detektion fand nicht statt, die Fraktionen mussten hinterher einzeln getestet werden. Dabei wurden die Leitfähigkeit, der Pyruvatgehalt sowie die Absorption bei 290 nm bestimmt (Abbildung 3.12).

Dieses Verfahren war sehr zeitaufwendig und ungenau, da die Werte immer nur für eine komplette Fraktion gemessen wurden. So bestand die Gefahr, dass feinere und evtl. schlechter aufgelöste Peaks insbesondere des Absorptionschromatogramms gar nicht detektiert wurden.

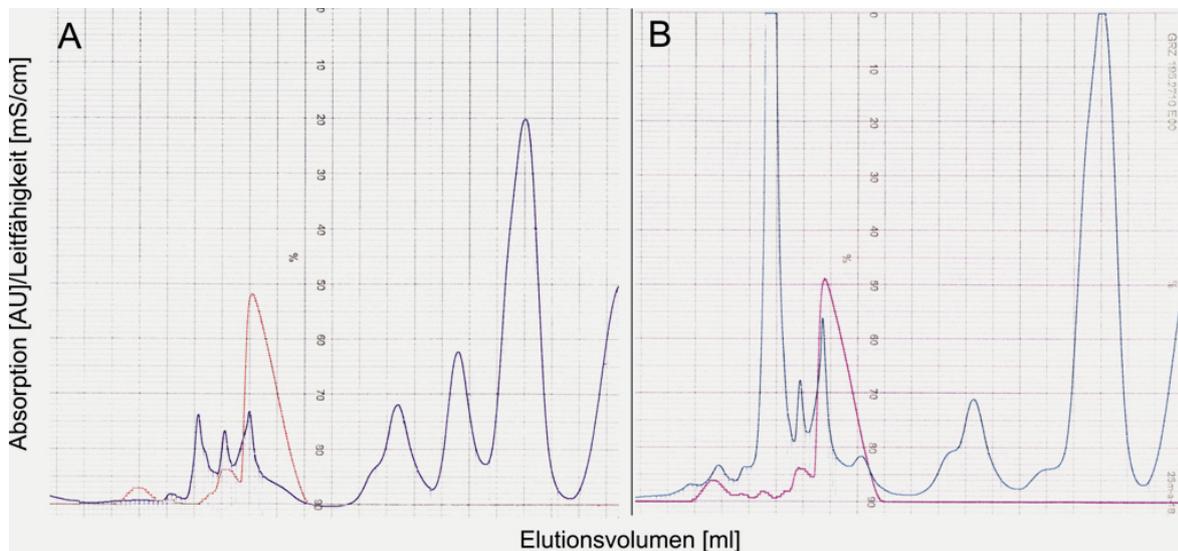


**Abbildung 3.12:** Chromatogramme der einzelnen ausgewerteten Fraktionen: (A) Leitfähigkeit, (B) Pyruvatkonzentration und (C) Absorption. Besonders hervorzuheben sind der erhöhte Pyruvatgehalt sowie die höchste Absorption in Fraktion 13 (grau hinterlegt). (●) konditioniertes Grund-Medium, (□) Kontroll-Medium.

Um die Trennung auf der P2-Biogel-Säule zu beschleunigen und die Genauigkeit zu erhöhen, wurde der Vorgang auf eine *ÄktaPrime* FPLC-Anlage transferiert, welche sowohl die Extinktion als auch die Leitfähigkeit direkt nach der Säule detektierte und auf einem Schreiber ausgab (Abbildung 3.13).

Sämtliche Probleme im Zusammenhang mit einem manuellen Betrieb – Gefahr des Trockenlaufens wegen Fließmittelmangel, ungleichmäßiges

Auftragen der Probe, unklare Chromatogramme aufgrund der einzeln gemessenen Fraktionen - konnten so eliminiert werden.

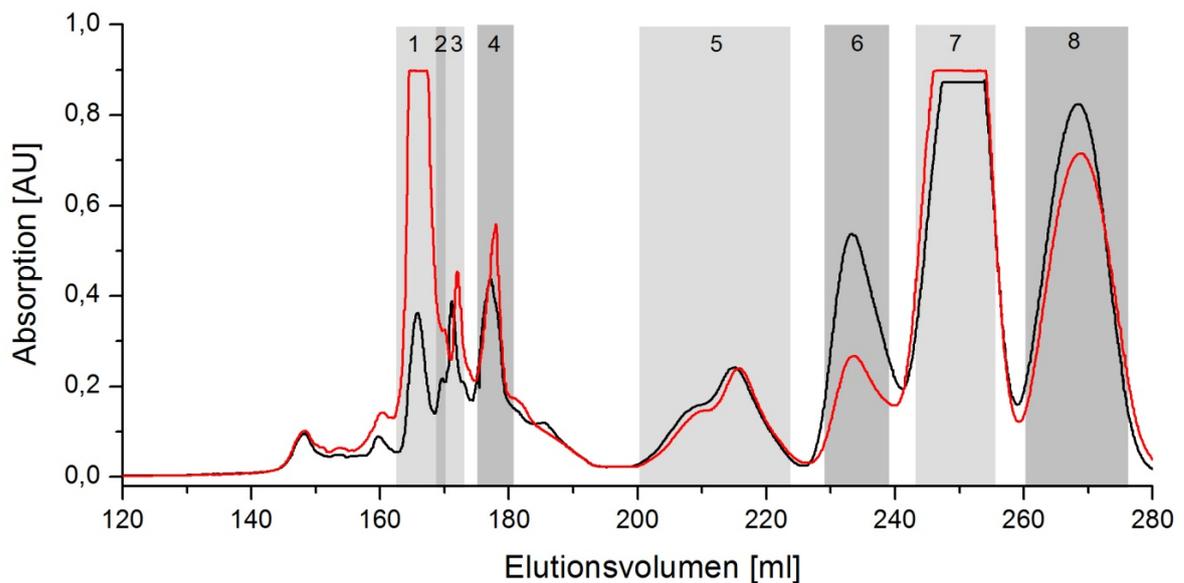


**Abbildung 3.13:** Scans der Gelfiltration-Chromatogramme mit der *ÄktaPrime*-Anlage. (A) Kontrollmedium, (B) konditioniertes Blutformmedium. In rot ist die Leitfähigkeit, in blau die Absorption bei  $\lambda=254$  nm dargestellt.

Tatsächlich erkennt man in den von der FPLC-Anlage aufgezeichneten Chromatogrammen die Grundstruktur der Daten aus der manuellen Trennung wieder, jedoch zeigt das Absorptionschromatogramm erwartungsgemäß eine deutlich feinere Struktur. Bei einem Fluss von 0,3 ml/min und einem Gesamtelutionsvolumen von 280 ml dauerte ein Trennvorgang fast 16 h. Da durch den automatisierten Ablauf jedoch Trennungen über Nacht möglich waren und die Einzelmessungen der Fraktionen wegfielen, wurde der Gesamtzeitaufwand zur Auftrennung des Mediums durch den Einsatz der *Äkta*-Anlage deutlich reduziert.

Mit dieser Methode konnten die neu entstandenen bzw. in deutlich höherer Konzentration auftretenden Substanzen schon im Chromatogramm

identifiziert werden. Zur besseren Übersicht wurden die Absorptionschromatogramme digitalisiert und übereinander gelegt (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14:** Digitalisierte Absorptions-Gelfiltrationschromatogramme von konditioniertem Blutformmedium (rot) und Mediumkontrolle (schwarz). Die Detektion erfolgte bei  $\lambda=254$  nm.

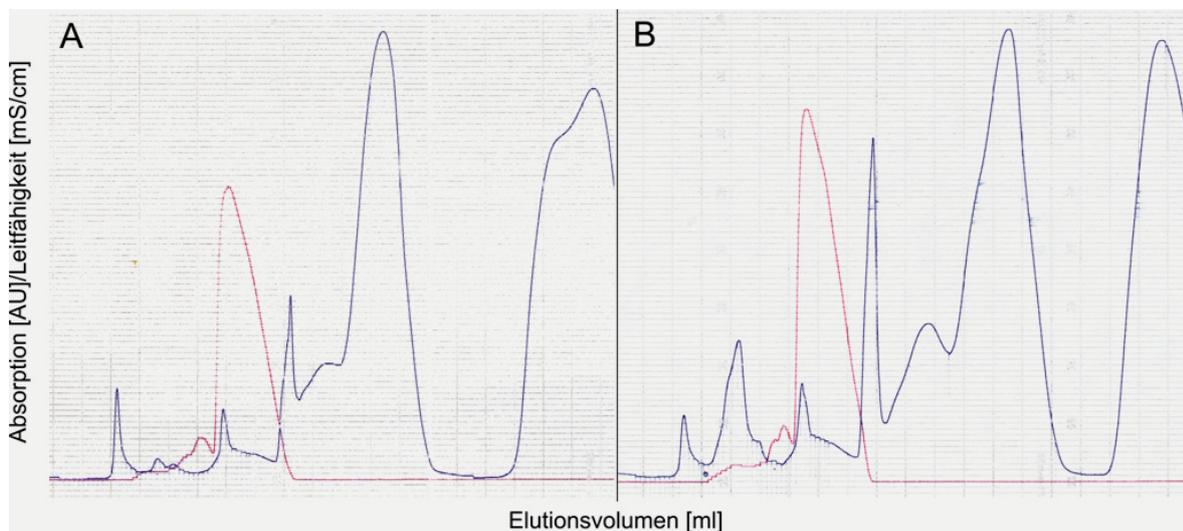
Die Bezeichnung der Fraktionen wurde entsprechend der auftretenden Peaks gewählt. Aufgrund der Schulter von Peak 1 wurde eine Überlappung mehrerer Substanzen angenommen. Die mit 2 bezeichneten Fraktionen wurden daher getrennt untersucht.

### 3.2.3.2 Gelfiltration von konditioniertem Grundmedium ohne HEPES

Im Zuge der LC/MS-Analysen der aktiven Gelfiltrations-Fraktionen wurde auch die Konditionierung von Grundmedium ohne HEPES als Puffersubstanz getestet. Wie bei der Konditionierung von Grundmedium

konnte während der Inkubationszeit von 4 h kein Zellsterben festgestellt werden.

Die entsprechenden *size exclusion*-Chromatogramme sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Es zeigte sich, dass die starke Extinktion von Fraktion 1 in Abbildung 3.14 praktisch vollständig auf den geänderten Protonierungszustand der Puffersubstanz zurückzuführen war.



**Abbildung 3.15:** Scans der Gelfiltrationschromatogramme von konditioniertem Grundmedium ohne HEPES-Puffer. (A) unkonditioniertes Grundmedium, (B) konditioniertes Grundmedium. In rot ist die Leitfähigkeit, in blau die Absorption bei  $\lambda=254$  nm dargestellt.

### 3.2.3.3 Weitere Gelfiltrationsexperimente

Ein weiteres, laut Hersteller für die Trennung von niedermolekularen Substanzen geeignetes Gelfiltrationsmaterial, "Sephadex LH-20" von *GE Healthcare*, konnte das Medium nicht zufriedenstellend auftrennen.

#### *3.2.3.4 Festphasenextraktion mit Ionentauschern als Alternative zur Gelfiltration*

Alternativ wurde versucht, die aktive Substanz durch Ionentauscher-Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*) von weiteren Komponenten zu trennen.

Weder mit einem Kationen- noch mit einem Anionentauscher war die Substanz zu retentieren. Der Durchlauf und der erste Waschritt enthielten jeweils die gesamten UV-aktiven Komponenten. Für eine erfolgreiche Anwendung dieser Technik hätte aber auch im Elutionsschritt eine absorbierende Substanz detektiert werden müssen, die dann weiter untersucht worden wäre.

Es war daher nicht möglich, die Substanz mittels SPE aus dem Medium aufzukonzentrieren.

#### *3.2.3.5 Identifizierung der hemmaktiven Fraktionen*

Um den Peak zu identifizieren, der die Hemmaktivität enthielt, wurden die einzelnen Peaks vereinigt, aufkonzentriert und dann in Zellkultur eingesetzt. Die Verteilung der Fraktionen auf die Peaks ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Peaks ergaben im Kulturassay nach 24 h die in Tabelle 3.1 aufgeführten prozentualen Hemmungen. Zusätzlich sind die in den Fraktionen identifizierten Substanzen aufgelistet. Die Zuordnung der Peaks erfolgte mittels HPLC-ESI-MS und der Gelfiltration von entsprechenden Standard-Lösungen.

**Tabelle 3.1:** Hemmwirkungen der Gelfiltrationsfraktionen nach 24 h sowie die jeweils gefundenen darin enthaltenen Substanzen.

Fraktion	Hemmung [%]	Substanzen
1	64,6	
2	102,0	
3	n. d.	Methionin
4	n. d.	Phenylalanin, Streptomycin
5	n. d.	Tyrosin
6	-25,4	Adenosin
7	26,8	Penicillin, Hypoxanthin
8	6,5	Tryptophan

Erwartungsgemäß traten in den Peaks, die im UV-Chromatogramm von Probe und Kontrolle gleichermaßen vorhanden waren, keine zusätzlichen Massen auf.

Zusammen mit dem Test der Wirkung in Zellkultur konnten die für den DIF in Frage kommenden Fraktionen so auf 1 und 2 eingeschränkt werden.

### 3.2.4 HPLC

Die Fraktionen der Gelfiltration wurden mittels HPLC weiter aufgetrennt. Der erste Schritt bei der HPLC-Methodenentwicklung war der Test, ob in den Fraktionen der Gelfiltrationstrennung einzelne, neu entstandene Peaks erkennbar waren und wie gut diese von anderen Komponenten getrennt wurden. Nach Bedarf sollten weitere Säulenmaterialien getestet werden.

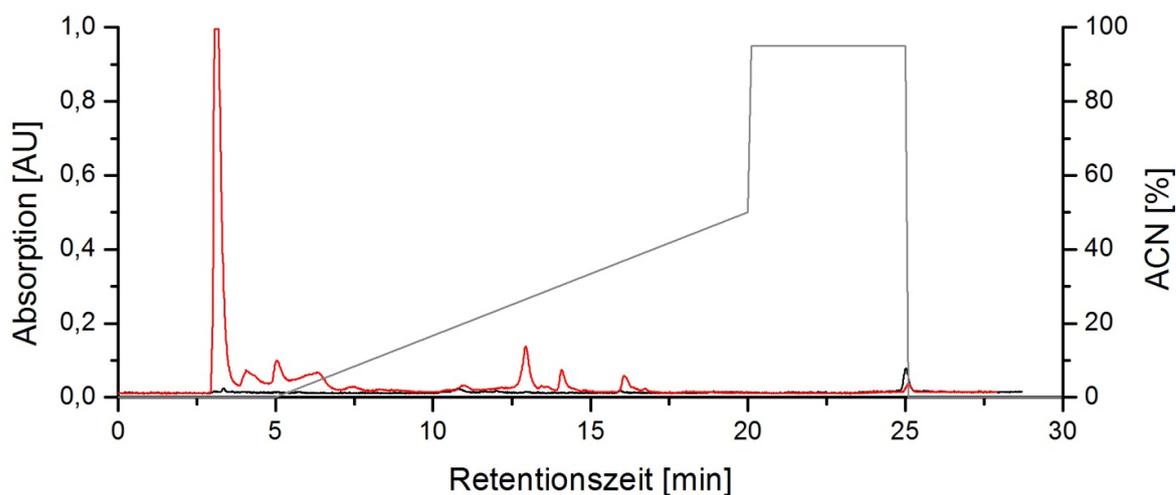
Wie aus früheren Arbeiten bereits bekannt war, handelt es sich bei dem postulierten Differenzierungsfaktor um eine relativ polare Substanz [Hesse 1996]. Auf eine Trennung mit einer reinen C18-Phase wurde daher

verzichtet. Stattdessen wurde mit C18-Mischphasen begonnen, die polare Gruppen enthielten und somit eine bessere Retention polarer Analyten versprachen.

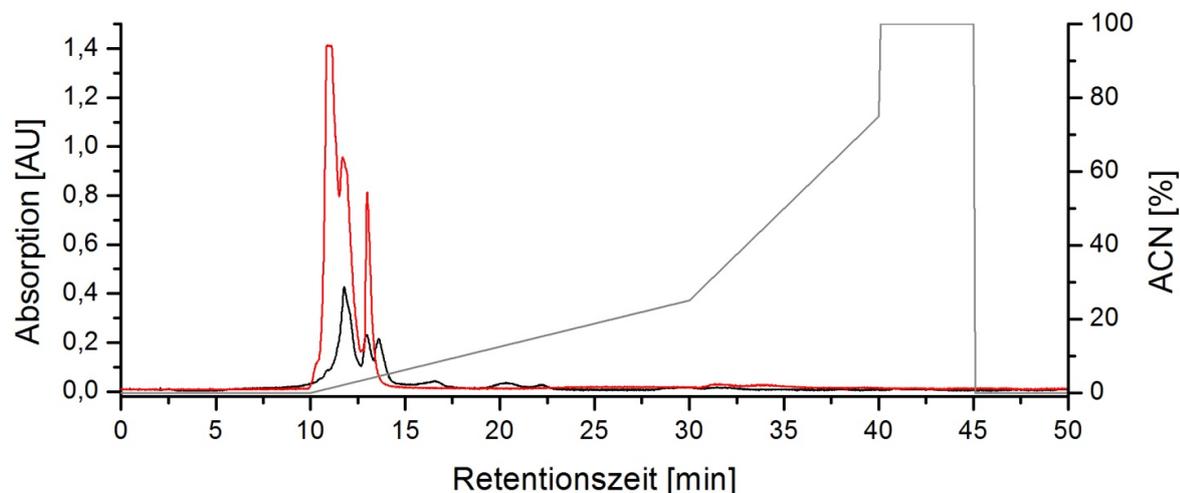
### 3.2.4.1 HPLC Methodenentwicklung und Optimierung

#### Auftrennung auf C18-Säulen mit polarem Anteil

Um zu testen, ob polarere Säulenmaterialien eine bessere Retention neu entstandener Peaks hervorrufen, wurden verschiedene *reversed phase*-Materialien mit polarem Anteil verwendet: Synergi Fusion (Phenomenex), ODS-AQ (YMC) sowie Reprospher-Aqua (Maisch). Abbildung 3.16 zeigt das Chromatogramm der Trennung auf der Synergi Fusion-Säule, Abbildung 3.17 das Chromatogramm mit der Reprospher-Säule. Das Chromatogramm mit der ODS-AQ-Säule wies keine Unterschiede zur Synergi Fusion-Säule auf.



**Abbildung 3.16:** Trennung der aktiven SEC-Fractionen auf der Synergi Fusion-Säule. Rot dargestellt ist die Fraktion des konditionierten Mediums, schwarz das Kontrollmedium, jeweils detektiert bei  $\lambda=214$  nm. Die graue Kurve gibt den verwendeten Acetonitril-Gradienten wieder.



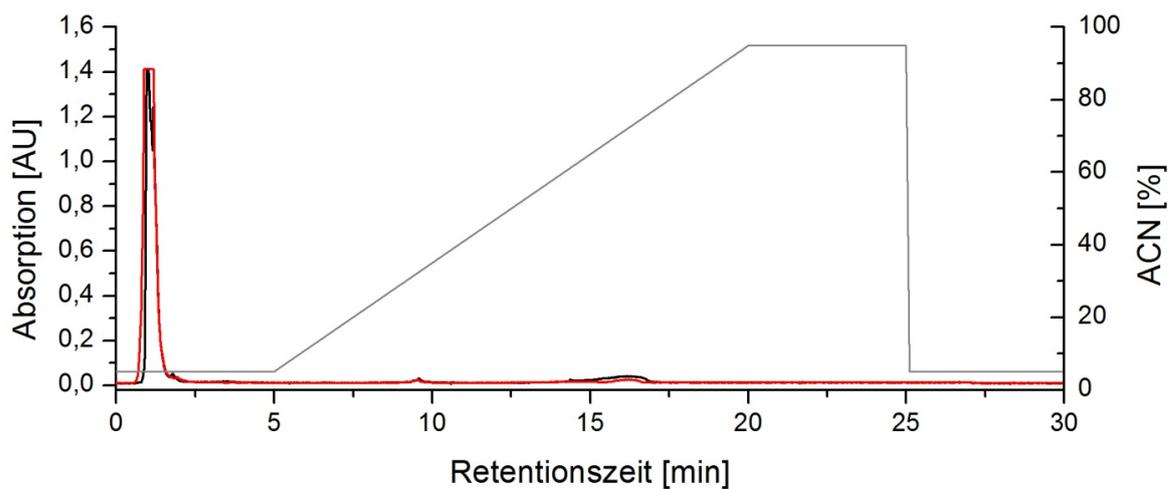
**Abbildung 3.17:** Trennung der aktiven SEC-Fraktion auf der Reprospher-Aqua-Säule. Rot dargestellt ist die Fraktion des konditionierten Mediums, schwarz das Kontrollmedium, jeweils detektiert bei  $\lambda=214$  nm. Die graue Kurve gibt den verwendeten Acetonitril-Gradienten wieder.

Die grauen Kurven stellen die auf der jeweiligen Säule als optimal ermittelten Gradienten dar, um eine rasche Laufzeit bei bestmöglicher Trennung zu erreichen.

Trotz der polaren Gruppen der stationären Phase zeigte der Hauptteil der im konditionierten Medium zusätzlich vorhandenen Substanzen keine signifikante Retention.

#### Auftrennung auf einer RP-Säule mit aromatischer stationärer Phase

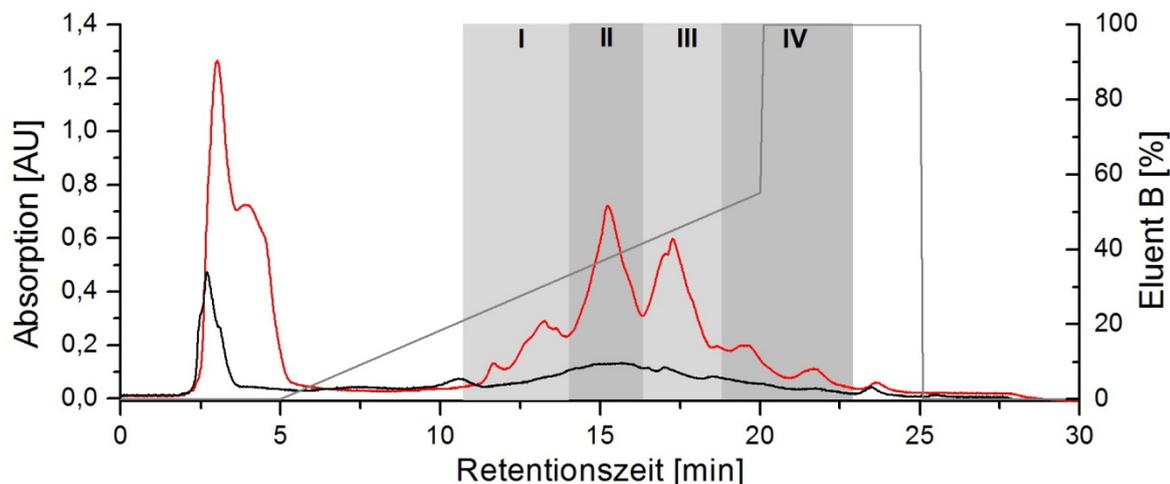
Um den Analyten über aromatische Wechselwirkungen bzw. Dipol-Dipol-Kräfte zu retentieren, wurde eine Pentafluorphenyl-Phase getestet (Kinetex PFP, Phenomenex). Auch hier konnte keine Retention erreicht werden. Im Gegenteil, alle Komponenten fanden sich bereits im Einspritzpeak (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** Trennung der aktiven SEC-Fractionen auf der Kinetex Pentafluorphenyl-Säule. Rot dargestellt ist die Fraktion des konditionierten Mediums, schwarz das Kontrollmedium, jeweils detektiert bei  $\lambda=214$  nm. Die graue Kurve gibt den verwendeten Acetonitril-Gradienten wieder.

### Auftrennung mittels HILIC-HPLC

Da eine *reversed phase*-Säule keinen Erfolg brachte, wurde im nächsten Schritt die Trennleistung einer *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC)-Phase getestet. Mit einer entsprechenden Säule ist es mit dieser Methode theoretisch möglich, auch hochpolare Substanzen mittels HPLC zu trennen. Verwendet wurde hier eine *Kinetex* HILIC-Säule (Phenomenex). Tatsächlich zeigte ein Großteil der Komponenten des Gemischs unter HILIC-Bedingungen eine deutliche Retention (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19:** Trennung der aktiven SEC-Fractionen auf der Kinetex HILIC-Säule. Rot dargestellt ist die Fraktion des konditionierten Mediums, schwarz das Kontrollmedium, jeweils detektiert bei  $\lambda=214$  nm. Die graue Kurve gibt den verwendeten Gradienten mit dem Laufmittel B wieder.

Da HILIC-Trennungen im Allgemeinen sehr pH-Wert-abhängig sind, wurden verschiedene Puffer-pH-Werte getestet. Es stellte sich heraus, dass bei einem pH von 6,9 – 7,0 die beste und reproduzierbarste Auftrennung erreicht wurde (Abbildung 3.19).

### 3.2.4.2 Lokalisierung der Hemmung nach der HPLC

Die in den HPLC-Trennungen mit der HILIC-Säule aufgefangenen Fraktionen (s. Abbildung 3.19) zeigten nach 24 h die in Tabelle 3.2 angegebenen Hemmwirkungen.

**Tabelle 3.2:** Hemmwirkungen der HPLC-Fractionen von der HILIC-Säule nach 24 h:

Fraktion	Hemmung [%]
I	110,20
II	125,93
III	4,60
IV	3,20

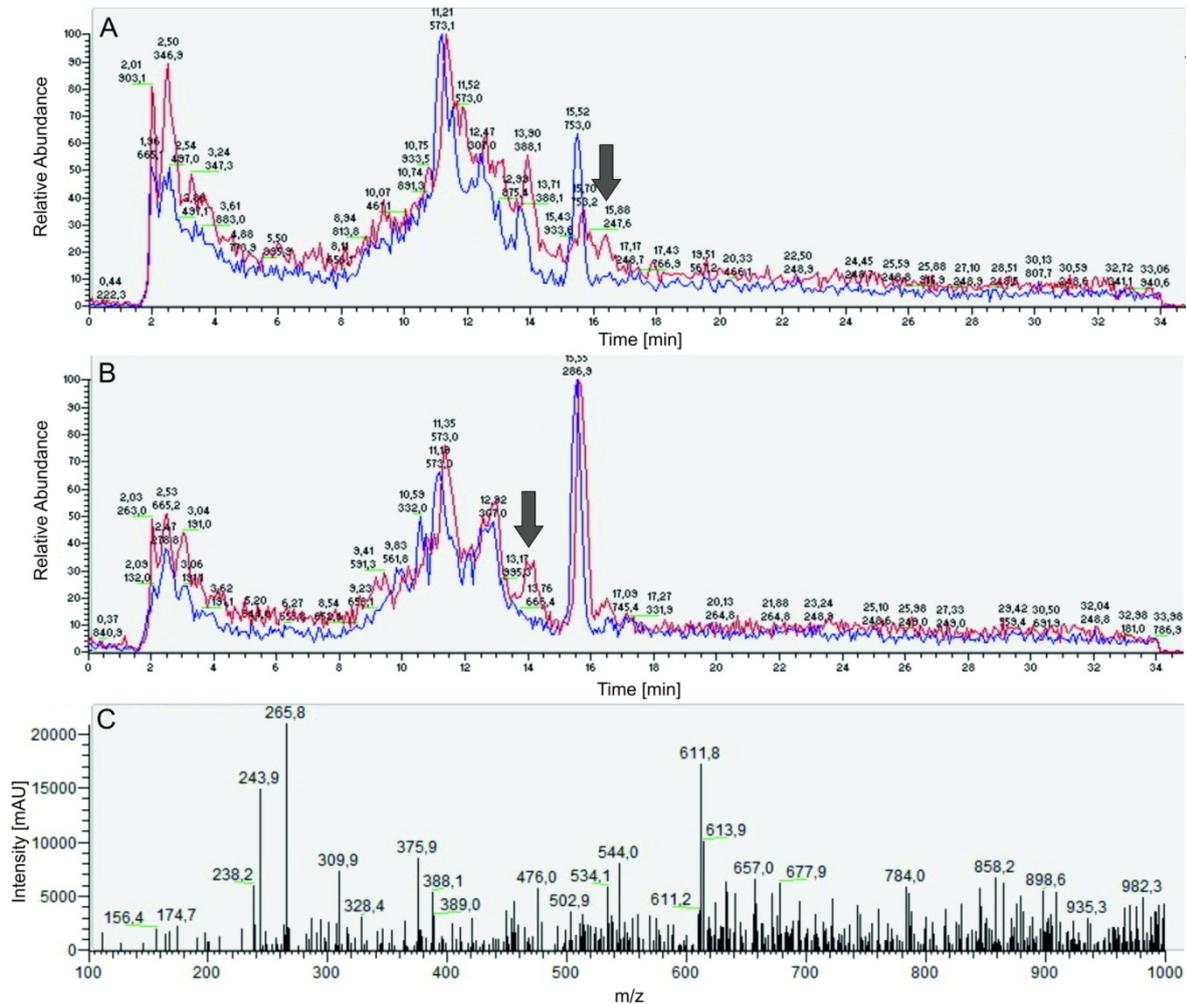
### 3.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

#### 3.3.1 LC-MS

##### *3.3.1.1 Analyse der Fraktionen aus konditioniertem Blutformmedium*

Zunächst wurden die Peaks des Gelfiltrationschromatogramms (Abbildung 3.14) mittels RP-HPLC/ESI-MS untersucht, um festzustellen, ob in einem der Peaks neue Substanzen auftraten.

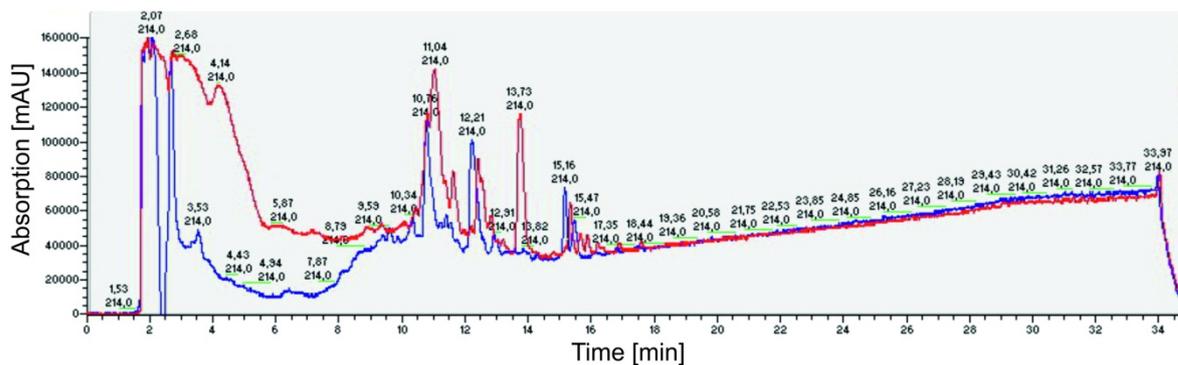
Besonderes Augenmerk lag hier auf den Fraktionen 1 und 2, da diese bereits erhöhte Wachstumshemmung gezeigt hatten (s. 3.2.3.5). Abbildung 3.20 zeigt die TIC-Chromatogramme (*total ion current* = Gesamtionenstrom) von Fraktion 1 (A) und 2 (B) im negativen Ionisierungsmodus. (C) zeigt beispielhaft das Massenspektrum des in (B) markierten Peaks bei einer Retentionszeit von 14,0 min. Beide mit Pfeilen markierten Peaks zeigten keine eindeutigen, neu hinzugekommenen Massen. Im positiven Ionisierungsmodus waren ebenfalls keine neuen Massen zu identifizieren.



**Abbildung 3.20:** TIC-Chromatogramme der Fraktionen 1 (A) und 2 (B) auf einer C18-Säule. Rot: Fraktionen des konditionierten Mediums, blau: Fraktionen des nichtkonditionierten Mediums (Fraktionsnummern entsprechen denen in Abbildung 3.14). Die Pfeile markieren neu hinzugekommene Peaks, die näher untersucht wurden. Beide markierten Peaks enthielten keine neuen, detektierten Massen. (C) zeigt beispielhaft das Massenspektrum des in (B) markierten Peaks im negativen Ionisierungsmodus.

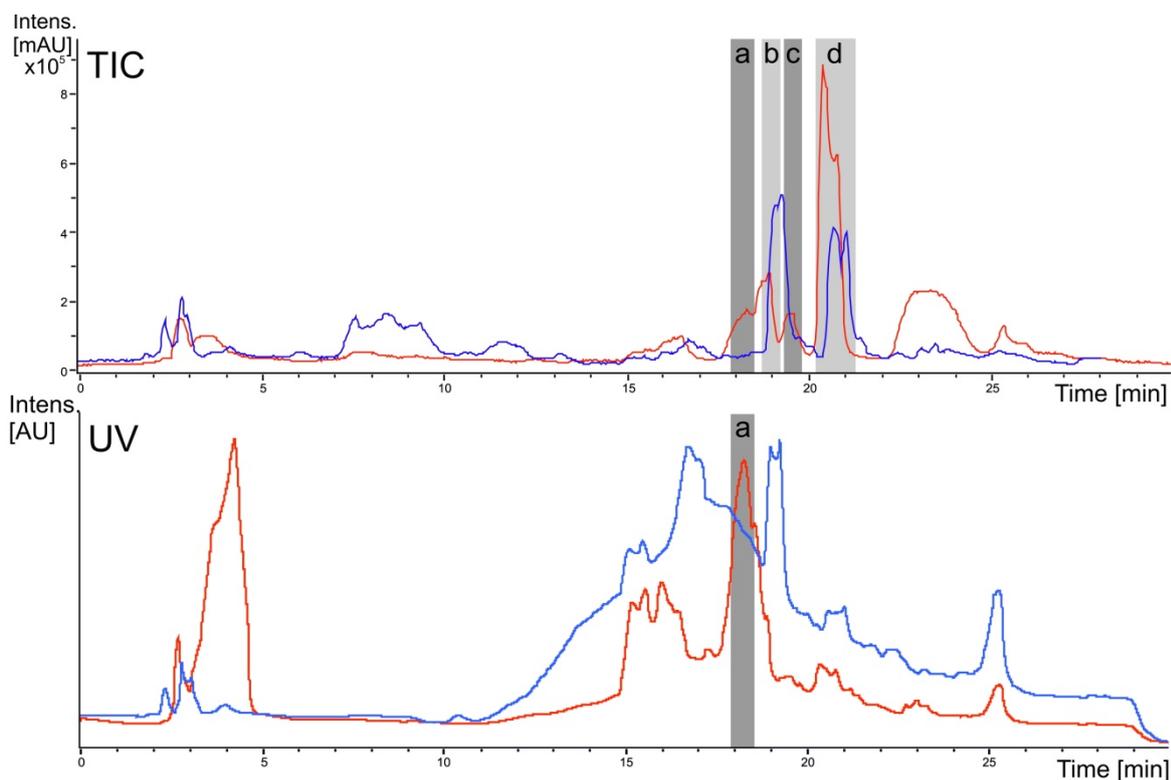
Da jedoch auch hier im UV-Chromatogramm bei kurzen Retentionszeiten eine deutlich erhöhte Absorption zu erkennen war, der keine Ionen zugeordnet werden konnten (Abbildung 3.21, Retentionszeit 2,5 – 5,5 min), lag der Schluss nahe, dass das gesuchte Molekül entweder mit der verwendeten Elektronenspray-Methode gar nicht zu ionisieren war, oder aber nur unter den gegebenen Messbedingungen keine Ionen ausbildete.

Die HPLC-Eluenten enthielten 0,1% Ameisensäure zur Verminderung ionischer Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase, was positive Ionisierungsvorgänge stark begünstigte. Es bestand also die Möglichkeit, dass der Differenzierungsfaktor zwar negative Ionen ausbilden konnte, jedoch nicht unter den gegebenen sauren Bedingungen.



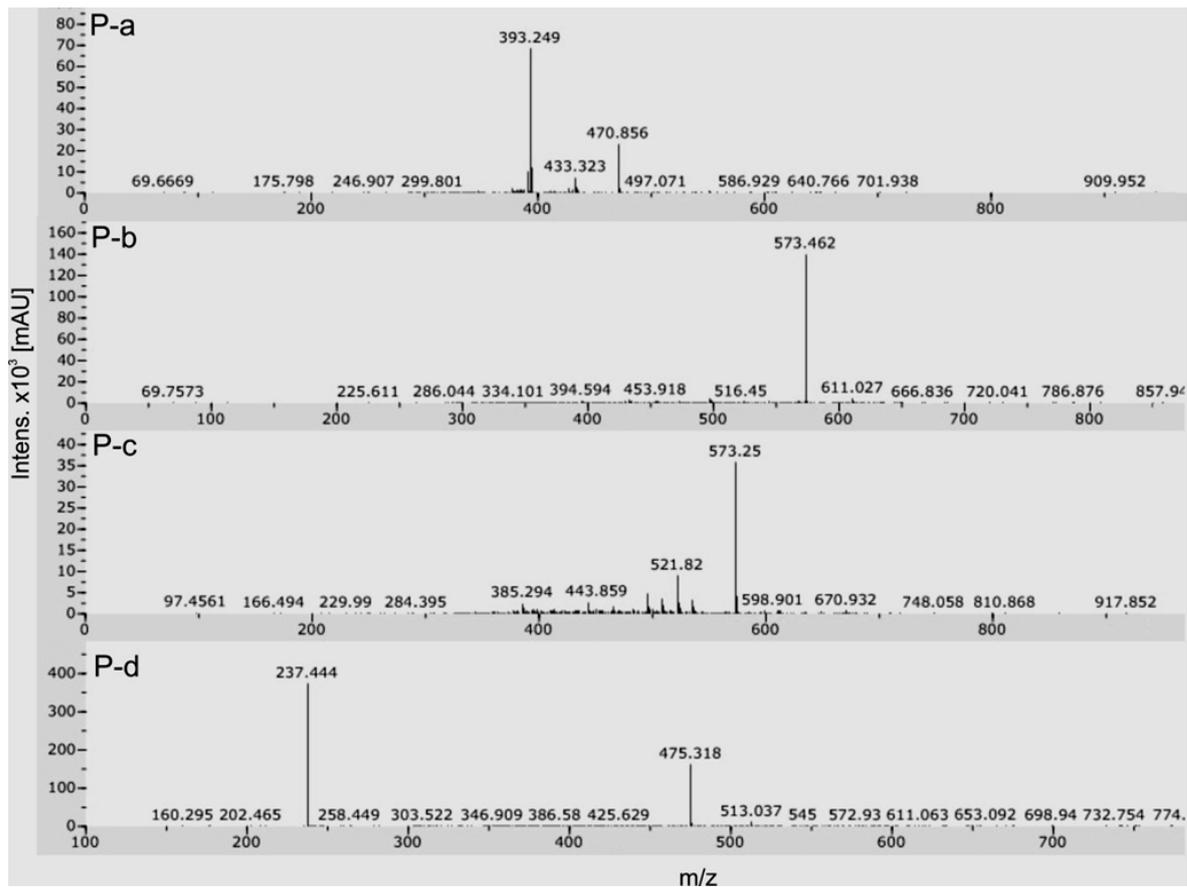
**Abbildung 3.21:** UV-Chromatogramme von Fraktion 2, detektiert bei  $\lambda=214$  nm. Rot: konditioniertes Medium, blau: Kontrolle.

Um zum einen besser getrennte Komponenten untersuchen zu können und gleichzeitig die Bildung negativer Ionen zu begünstigen, wurde die dem Massenspektrometer vorgeschaltete HPLC ebenfalls auf den HILIC-Betrieb umgestellt.



**Abbildung 3.22:** HPLC/MS-Trennung der aktiven Gelfiltrations-Fractionen auf einer HILIC-Säule. Oben sind die TIC-Chromatogramme im negativen Ionisierungsmodus abgebildet, unten die entsprechenden UV-Chromatogramme bei  $\lambda=214$  nm. Rot: Probe, blau: Kontrollmedium.

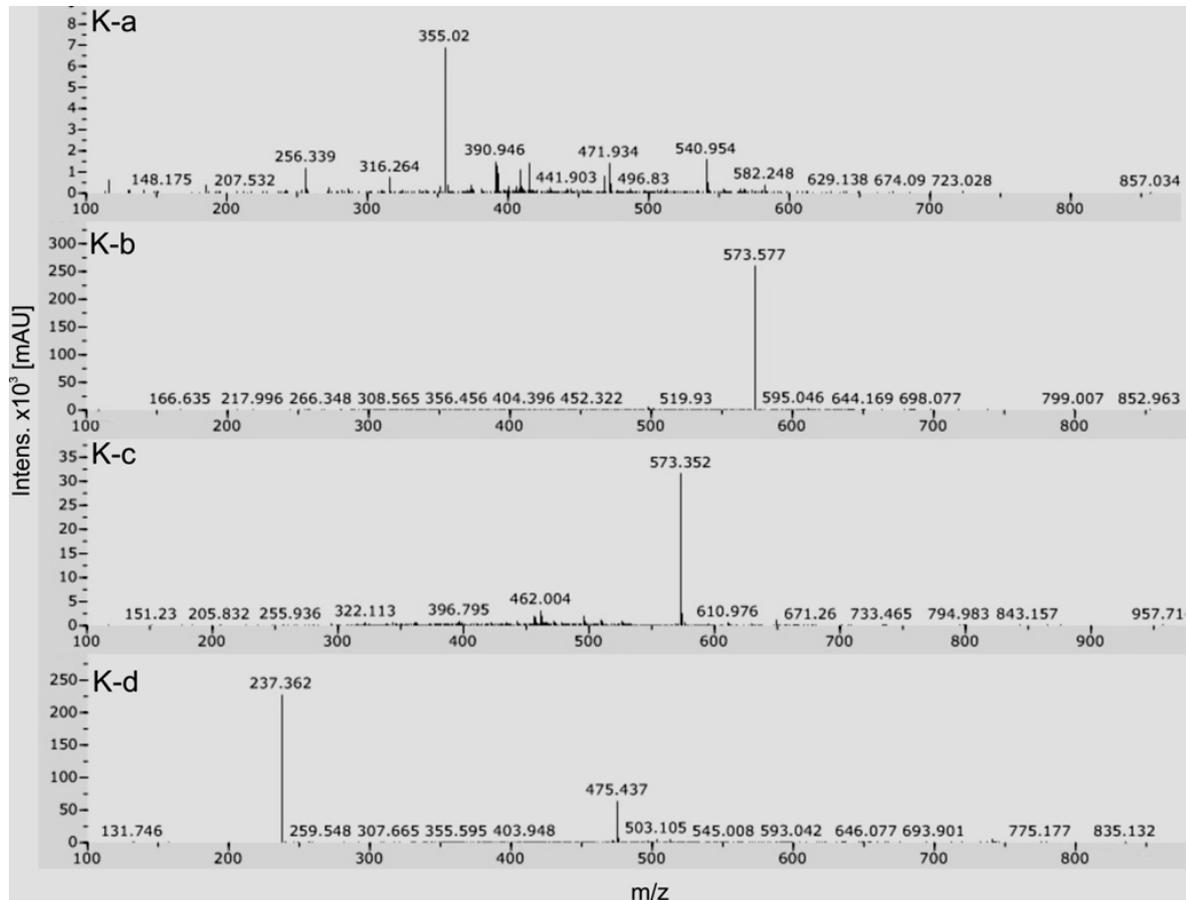
In Abbildung 3.22 ist zu erkennen, dass unter diesen Bedingungen mit dem negativen Ionisierungsmodus dem UV-Chromatogramm entsprechende Ionen identifiziert werden konnten. Da deren Retentionszeiten annähernd den in Abbildung 3.19 ermittelten Zeiten entsprachen, lag der Fokus auf den mit (a) bis (d) markierten Peaks. Die Massenspektren des konditionierten Mediums sind in Abbildung 3.23 dargestellt, die der Kontrolle in Abbildung 3.24.



**Abbildung 3.23:** Massenspektren der in Abbildung 3.22 gekennzeichneten Peaks. P-a bis P-d bezeichnen die Massenspektren der im Chromatogramm entsprechend bezeichneten Peaks aus dem konditionierten Medium.

Bei der Masse 237, die in den beiden identischen Spektren (d) gefunden wurde, handelte es sich vermutlich um HEPES, welches als Puffersubstanz in großer Menge im Medium enthalten war. Die Masse 573, die in den Spektren (b) und (c) erschien, konnte nicht direkt einer Komponente des Mediums zugeordnet werden. Es bestand jedoch die Vermutung, dass es sich dabei um Derivate oder Umbauprodukte von Streptomycin ( $M=581,6$  g/mol) oder Bathocuproindisulfonat-Dinatriumsalz ( $M=564,6$ ) handeln könnte. Bei dem Ion mit  $m/z$  355, welches im Spektrum (a) der Kontrolle in geringer Konzentration vorhanden war, könnte es sich um Penicillin handeln. Das Spektrum (a) des konditionierten Mediums zeigt, dass nur

hier Massen detektiert wurden, die nicht in der Kontrolle vorkamen. Dabei handelte es sich reproduzierbar um die Ionen  $m/z$  471 und 393.

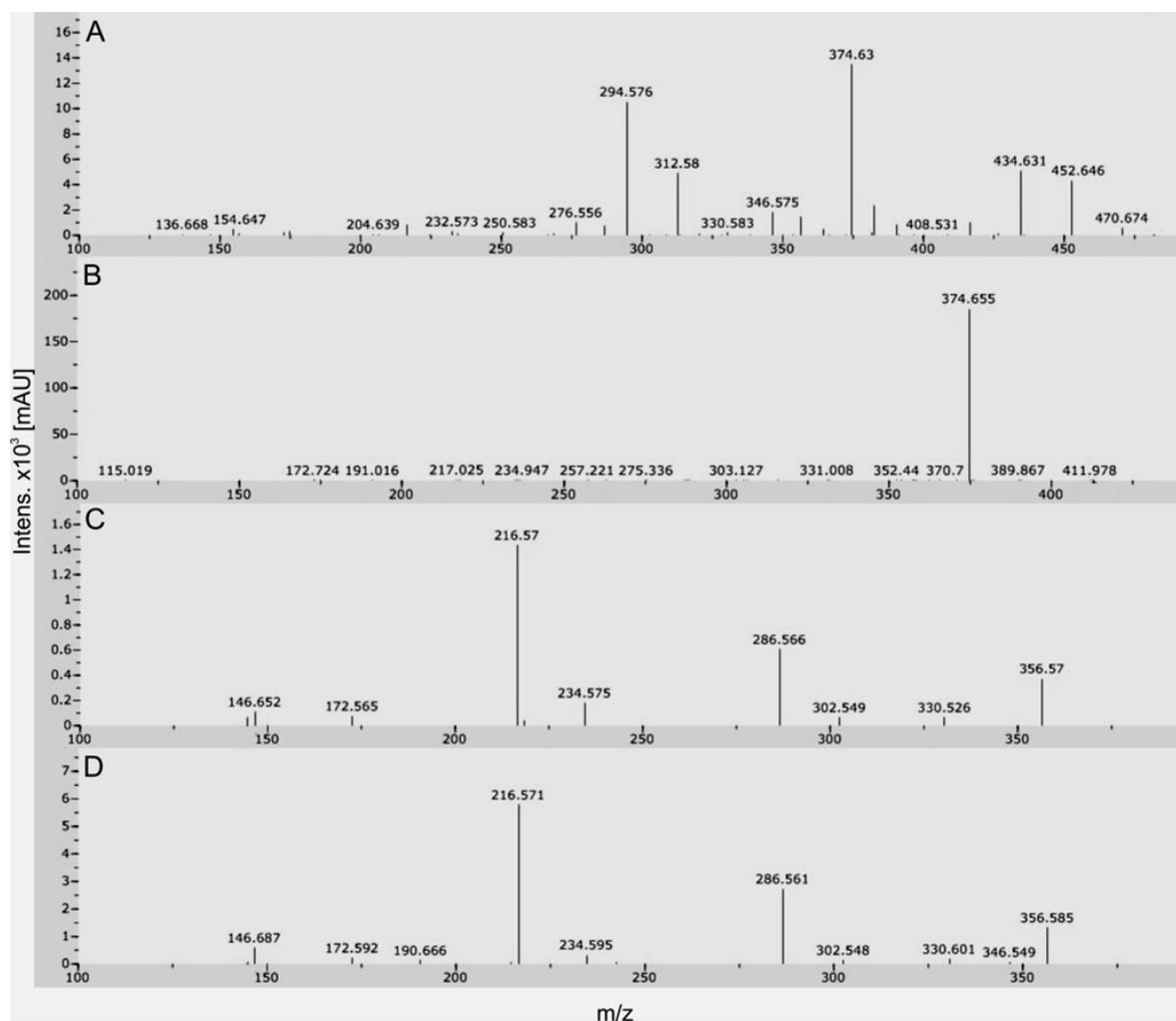


**Abbildung 3.24:** Massenspektren der in Abbildung 3.22 gekennzeichneten Peaks. K-a bis K-d bezeichnen die Massenspektren der im Chromatogramm entsprechend bezeichneten Peaks aus dem Kontrollmedium.

Anhand dieser Chromatogramme erschien eine weitere Aufreinigung und Anreicherung der Substanz mittels HPLC nicht zufriedenstellend möglich, da die Peaks (a) und (b) im UV-Chromatogramm nur unzureichend getrennt wurden. Die Vermutung, es könne sich bei der Komponente mit  $m/z$  573 um einen Bestandteil des Blutformmediums handeln, sollte nun mit einer erneuten Analyse von konditioniertem Grundmedium überprüft werden.

### 3.3.1.2 Fragmentierung der identifizierten Massen

Die Massen  $m/z$  471 und 393 wurden mittels der Ionenfalle weiter fragmentiert, um weitere Hinweise auf die Struktur zu erhalten. Außerdem sollte so geklärt werden, ob die beiden Massen aus demselben Molekül stammen oder ob es sich um zwei verschiedene Moleküle handelt. Die Fragmentierungsspektren sind in Abbildung 3.25 dargestellt.



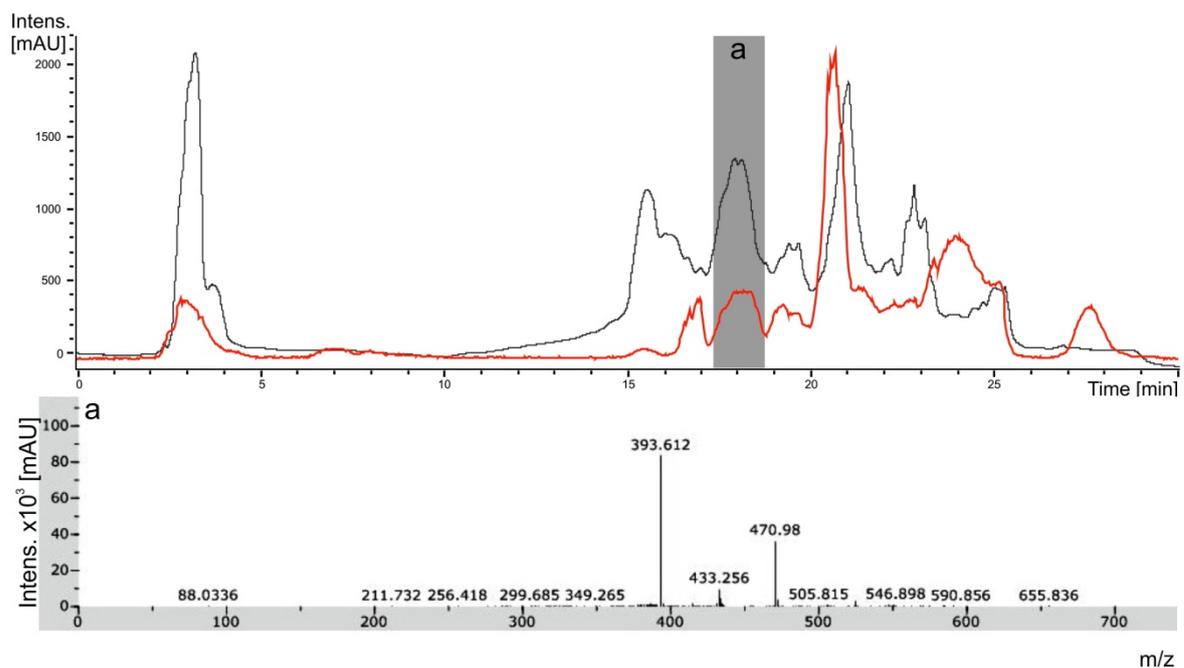
**Abbildung 3.25:** Fragmentierungsspektren der Massen  $m/z$  471 und 393. (A): MS<sup>2</sup>-Spektrum von  $m/z$  471; (B): MS<sup>2</sup>-Spektrum von  $m/z$  393; (C): MS<sup>3</sup>-Spektrum von  $m/z$  471 → 375; (D) MS<sup>3</sup>-Spektrum von  $m/z$  393 → 375.

Sie zeigen, dass beide Massen ein Fragmentation mit  $m/z$  475 bilden. Dieses ist bei  $m/z$  393 als Mutterion das einzige Fragment (Spektrum B), während bei  $m/z$  471 als Ausgangsmasse noch weitere Fragmente entstehen (Spektrum A).

Die Fragmente  $m/z$  375 wurden dann weiter fragmentiert, um die vermutete gemeinsame Identität sicher bestätigen zu können. Spektrum C zeigt das Fragmentierungsmuster von  $m/z$  375, entstanden aus  $m/z$  471, während Spektrum D die Fragmentierung von  $m/z$  375, entstanden aus  $m/z$  393 darstellt. Über die beiden identischen  $MS^3$ -Fragmentierungsmuster konnte also ein gemeinsames Molekülgerüst nachgewiesen werden.

### ***3.3.1.3 Analyse von konditioniertem Grundmedium***

Um das Chromatogramm zu vereinfachen und die identifizierten Ionen  $m/z$  393 und 471 weiter aufreinigen zu können, wurde konditioniertes Grundmedium auf dieselbe Weise analysiert wie zuvor das Blutformmedium. Abbildung 3.26 zeigt die Chromatogramme des konditionierten Grundmediums.



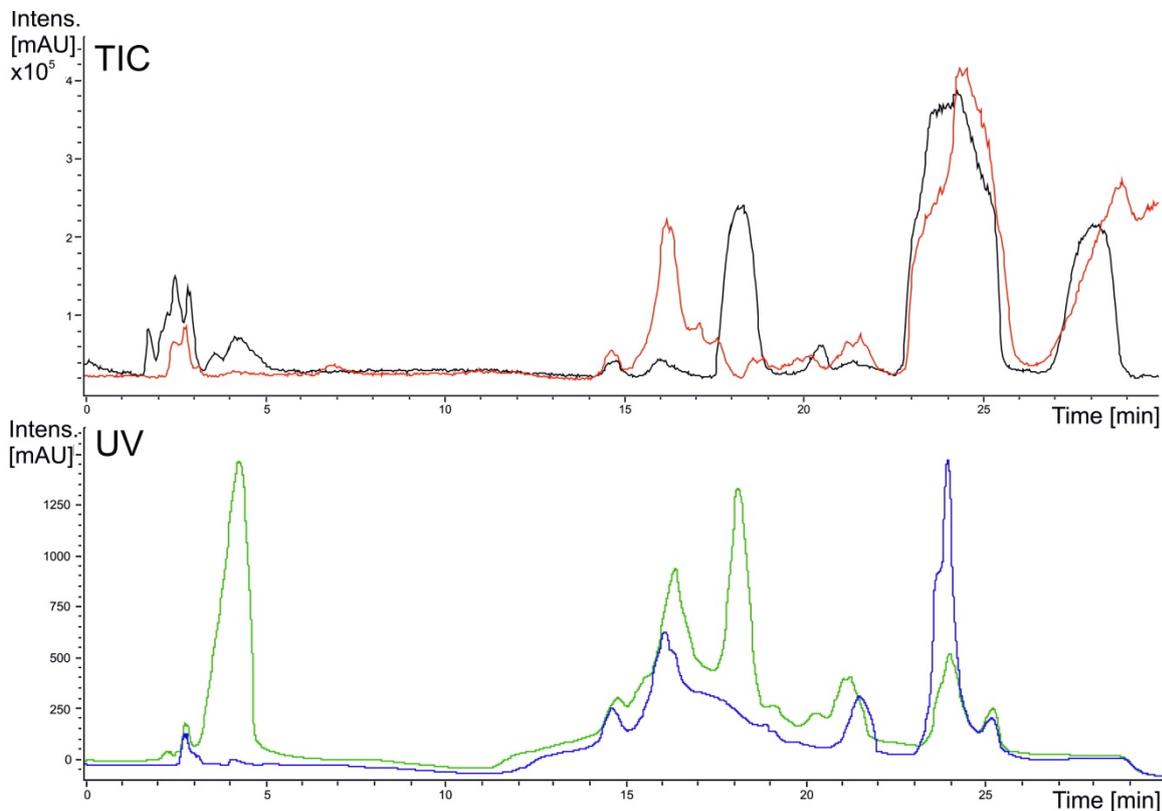
**Abbildung 3.26:** HPLC/MS-Trennung der aktiven Gelfiltrations-Fractionen von konditioniertem Grundmedium auf einer HILIC-Säule *Oben:* MS- und UV-detektiertes Chromatogramm, rot: TIC-Chromatogramm, grau: UV-Chromatogramm bei  $\lambda=214$  nm. *Unten:* Massenspektrum des mit (a) markierten Peaks.

Man erkennt, dass der mit (a) markierte Peak, der die in Abbildung 3.23 identifizierten Massen 393 und 471 enthielt, nun besser von den anderen Komponenten getrennt wurde. Für weitere Analysen sollte der Peak nun über die HILIC-Säule aufgereinigt werden können. Trotzdem wurde versucht, das in Abbildung 3.26 gezeigte Chromatogramm durch das Weglassen von HEPES weiter zu optimieren.

#### ***3.3.1.4 Analyse von konditioniertem Grundmedium ohne HEPES***

Um die Zahl der eventuell störenden Komponenten zu reduzieren und weil HEPES mit anderen organischen Substanzen reagieren könnte [Gäb *et al.* 2010], wurde getestet, ob eine Konditionierung von Grundmedium auch

ohne HEPES möglich war. Wie in Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben, überlebten die Zellen die Inkubation auch ohne HEPES.



**Abbildung 3.27:** HPLC/MS-Trennung der aktiven Gelfiltrations-Fractionen aus konditioniertem Grundmedium ohne HEPES auf einer HILIC-Säule. Oben: TIC-Chromatogramme im negativen Ionisierungsmodus, schwarz: Probe, rot: Kontrollmedium. Unten: entsprechende UV-Chromatogramme bei  $\lambda=214$  nm, grün: Probe, blau: Kontrollmedium.

Der Peak bei einer Retentionszeit von 18 min war mit dieser Methode zum einen immer noch vorhanden, was zeigt, dass diese Komponente nicht über eine Reaktion der Puffersubstanz entsteht. Zum anderen war der Peak noch besser von den anderen Komponenten getrennt, was optimierte Voraussetzungen für eine Aufreinigung und anschließende Analysen bedeutete.

### 3.3.2 Messung von bekannten Differenzierungsinduktoren

In der Literatur wurde nach bekannten, mit der Differenzierungsinduktion in Zusammenhang stehenden Verbindungen gesucht, die den in Abbildung 3.23 identifizierten Massen  $m/z$  393 und 471 entsprachen. Da im *negative mode* ionisiert wurde, entspräche dies bei neutralen Molekülen Molekulargewichten von 394 bzw. 472 g/mol. Mit einer Masse von 471,8 g/mol kam zum einen 8-para-Chlorphenylthio-cAMP (pCPTcAMP) in Frage, ein bekannter Aktivator der cAMP-abhängigen Proteinkinasen. Dieses Molekül löst auch in Trypanosomen die Differenzierung aus [Vassella *et al.* 1997]. Als weiteres, mit der Bildung von *stumpy*-ähnlichen Trypanosomen assoziiertes Molekül wurde das Carbobenzoxy-Phenylalanin-Alanin-Diazomethylketon (Z-Phe-Ala-CHN<sub>2</sub>) mit einem Molekulargewicht von 394,4 g/mol gefunden [Scory *et al.* 1999; Scory *et al.* 2007].

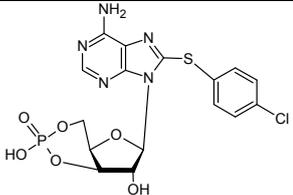
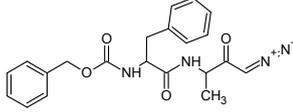
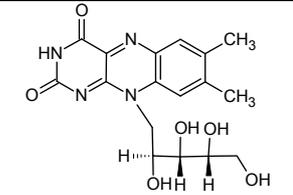
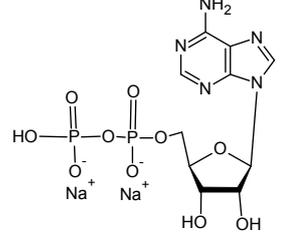
Da ADP als Dinatriumsalz eine Masse von 471,2 g/mol besitzt, wurde es ebenfalls getestet. Bei dem in den MS/MS-Fragmentierungsexperimenten erhaltenen Peak der Masse 375 (s. Abbildung 3.25) könnte es sich um Riboflavin (M=376,4) als Grundgerüst handeln, da dieses im Kulturmedium vorhanden war. Das Vitamin wurde im MS/MS-Modus vermessen und zeigte eine zu kurze Retentionszeit und keine der in den Fragmentierungen des gesuchten Moleküls enthaltenen Massen.

Wie Tabelle 3.3 zeigt, konnte bei allen diesen Vergleichssubstanzen über die Retentionszeit ausgeschlossen werden, dass es sich um das gesuchte Molekül handelt. Die gemessenen Massen und Fragmentationen sind ebenfalls aufgeführt und verdeutlichen diesen Sachverhalt.

### 3.3.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Obwohl die *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*-Methode (MALDI) eigentlich besonders zur Ionisierung von großen Molekülen und Proteinen geeignet ist, wurde untersucht, ob mit dieser Methode auch eine bessere Ionisierung der Probe erreicht werden konnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle Analytionen in dem Massebereich auftraten, in dem sich auch die Matrixmoleküle befanden. Es war daher keine Aussage über die Massen in der Probe möglich.

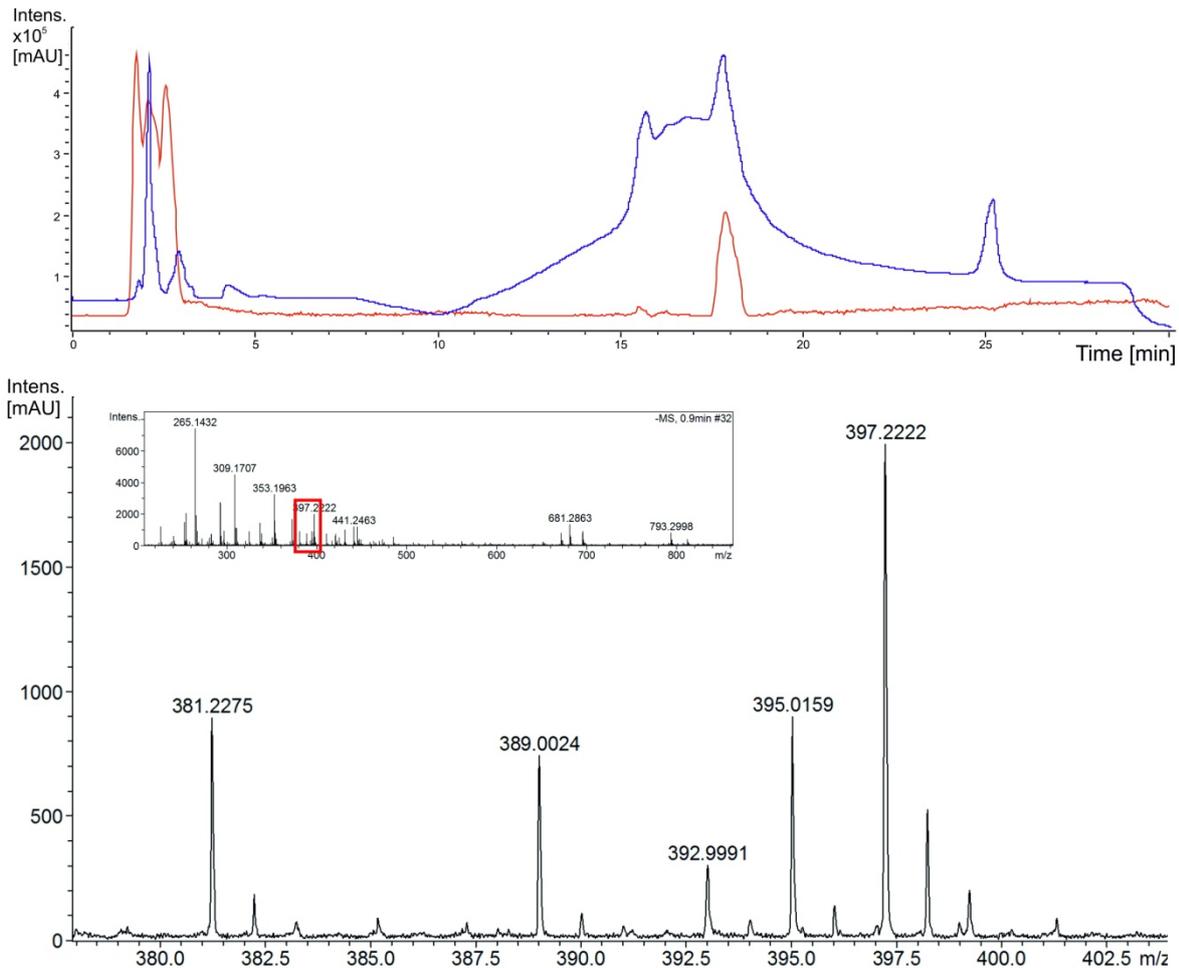
**Tabelle 3.3:** Übersicht über die gemessenen Vergleichssubstanzen.

Substanz	Molekulargewicht	Retentionszeit	Massen MS	Massen MS <sup>2</sup>	Struktur
DIF	?	18 min	393 471	375 375, 295	?
8-pCPT-cAMP	471,8 g/mol	3 min	471	276	
Z-Phe-Ala-CHN <sub>2</sub>	394,4 g/mol	3 min	768 385 277	nd	
Riboflavin	376,4 g/mol	4,5 min	nd	255	
ADP	471,2 g/mol	25 min	426	328 134	

### 3.3.4 ESI-TOF

Zur Bestimmung der genauen Massen der beiden Ionen sollte ein hochauflösendes Massenspektrometer genutzt werden. Da dieses ebenfalls eine Elektronenspray-Ionenquelle besaß, sollten die beiden Ionen detektiert werden können

Die entsprechende Fraktion der HPLC-Trennung (Abbildung 3.25) wurde lyophilisiert und etwa 10fach konzentriert in Wasser/Acetonitril 50:50 wieder aufgenommen. Dann wurde an der ESI-Ionenfalle überprüft, ob die Fraktion die gesuchten Ionen enthielt und wie rein die Probe war. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass das gesuchte Molekül durch das Einengen und Wiederaufnehmen abgebaut wird oder die Fraktionen der HPLC nicht sauber getrennt werden konnten. Die entsprechenden Peaks zeigten eine deutlich geringere Polarität als der Analyt und eluierten sehr früh von der Säule (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** *Oben:* LC/MS-Analyse des in Abbildung 3.26 mit „a“ markierten und aufgefangenen Peaks. *Unten:* Ausschnitt aus dem Massenspektrum derselben Probe im ESI-TOF. Das eingefügte Spektrum zeigt den gesamten gemessenen Bereich mit der Markierung des vergrößerten Bereichs.

Durch diese Gegebenheiten war es zwar möglich, mit der Direkteinspritzung in das ESI-TOF eine genaue Masse zu bestimmen, jedoch war es aufgrund der vielen weiteren Massen im Spektrum nicht möglich, aus dem Isotopenmuster verlässliche Informationen bezüglich der Struktur zu erhalten. Die genaue Masse des Ions, das vorher in der Ionenfalle mit 393 bestimmt wurde, betrug nach diesen Messungen 393,9991 (Abbildung 3.28) Diese Masse wurde daher auch den folgenden Berechnungen zugrunde gelegt. Die Masse 471 konnte im ESI-TOF nicht

detektiert werden. Vermutlich läuft der Verlust des 78 Da-Fragments hier vollständig ab.

#### 3.3.4.1 Berechnung der möglichen elementaren Zusammensetzung

Die möglichen Summenformeln wurden mit Hilfe der Software „Elemental Composition Calculator“ [<http://www.wsearch.com.au/>] berechnet. Die verwendeten Einstellungen sind in Abschnitt 2.4.12 zusammengefasst. Für die verschiedenen, möglicherweise enthaltenen Elemente wurde jeweils eine eigene Berechnung durchgeführt (s. Tabelle 3.4) Dabei wurden die Elemente C, H, O, N, P und S in Erwägung gezogen. Dann wurden die gefundenen Summenformeln auf ihre Plausibilität im Hinblick auf die Anzahl der berechneten Atome überprüft. So wurden Vorschläge mit weniger als halb so vielen Wasserstoff- wie Kohlenstoffatomen oder mehr als acht Stickstoffatomen nicht berücksichtigt. Geht man davon aus, dass es sich bei der gemessenen Masse um diejenige des Ions  $[M-H]^-$  handelte, so wäre die Molekülmasse, also  $[M]$ , 394,0069 Da ( $392,9991 + 1,0078$ ). Da diese gerade war, sollte nach der Stickstoffregel die Anzahl der Stickstoffmoleküle gerade oder Null sein [de Hoffmann und Stroobant 2007]. Ein weiterer Wert zur Abschätzung theoretisch möglicher Zusammensetzungen ist das Doppelbindungsäquivalent (DBA), das sich bei einem Molekül mit der Formel  $C_aH_bN_cO_d$  nach

$$DBA = a - 1/2b + 1/2c + 1$$

berechnet [Badertscher *et al.* 2001; Webb *et al.* 2004]. Dabei wird die Zahl der Schwefelatome zu der der Sauerstoffe und die Zahl der Phosphoratome zu der der Stickstoffe hinzugezählt.

Da es sich bei dem in der ESI-Quelle erzeugten [M-H]-Ion nicht um ein Radikation handelt, sondern um ein Anion mit einer geraden Anzahl an Elektronen, durfte der DBA-Wert der ausgewählten Formeln nicht ganzzahlig sein [Webb *et al.* 2004].

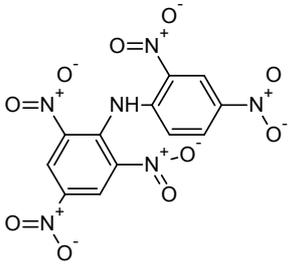
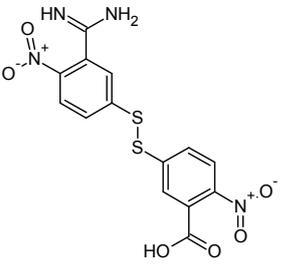
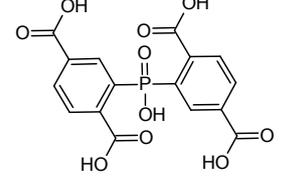
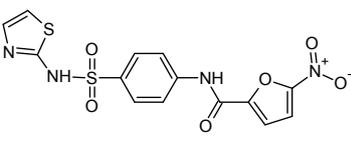
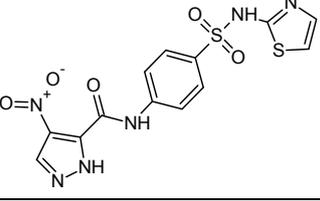
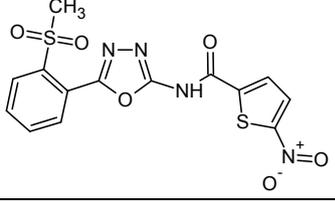
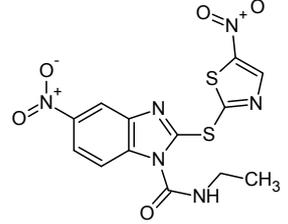
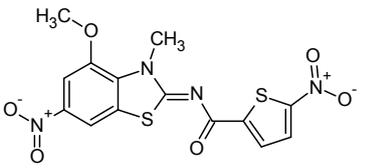
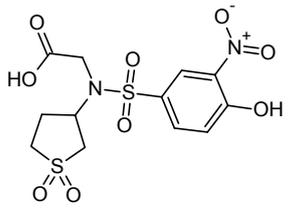
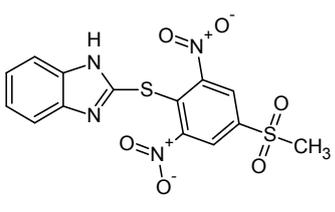
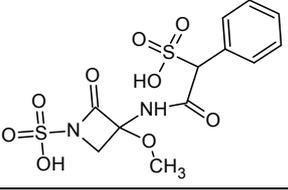
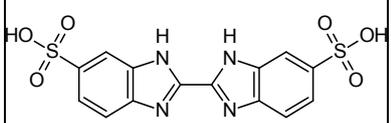
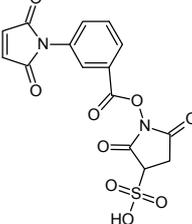
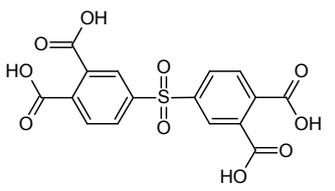
**Tabelle 3.4:** Zusammenstellung der berechneten und als plausibel erscheinenden Summenformeln für die im ESI-TOF-MS bestimmte Masse 392,9991 Da. Für die mit Buchstaben gekennzeichneten Summenformeln waren Datenbankeinträge bekannter Verbindungen vorhanden. Diese sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Formel	DBA	Berechnete Masse [Da]	Abweichung [mDa]
<b>C, H, N, O:</b>			
C12H5N6O10 (a)	13,5	393,006715	-7,615
<b>C, H, N, O, P:</b>			
C15H11N2O7P2	12,5	393,004149	-5,049
C16H10O10P (b)	12,5	393,001158	-2,058
C10H11N4O9P2	8,5	393,000126	-1,026
C12H6N6O8P	13,5	392,998473	0,627
C16H11O8P2	12,5	392,992915	6,185
<b>C, H, N, O, S:</b>			
C13H9N6O5S2 (c)	12,5	393,007584	-8,484
C12H13N2O9S2 (d)	7,5	393,006246	-7,146
C8H9N8O7S2	8,5	393,003561	-4,461
C15H9N2O9S (e)	12,5	393,002876	-3,776
C14H9N4O6S2 (f)	12,5	392,99635	2,750
C13H13O10S2	7,5	392,995013	4,087
C16H9O10S (g)	12,5	392,991642	7,458
<b>C, H, N, O, P, S:</b>			
C16H15N2O2P2S2	11,5	393,005017	-5,917
C8H11N8O5P2S	8,5	393,004834	-5,734
C15H11N2O7P2	12,5	393,004149	-5,049
C7H15N4O9P2S	3,5	393,003497	-4,397
C18H10N4OPS2	16,5	393,003364	-4,264
C12H11N8P2S2	12,5	393,002332	-3,232
C17H14O5PS2	11,5	393,002026	-2,926
C9H10N6O8PS	8,5	393,001844	-2,744

C19H11N2O2P2S	16,5	393,001646	-2,546
C11H15N4O4P2S2	7,5	393,000994	-1,894
C10H19O8P2S2	2,5	392,999657	-0,557
C13H10N6O3PS2	12,5	392,999341	-0,241
C12H14N2O7PS2	7,5	392,998004	1,096
C14H11N4O4P2S	12,5	392,997624	1,476
C6H15N6O6P2S2	3,5	392,996972	2,128
C13H15O8P2S	7,5	392,996286	2,814
C15H10N2O7PS	12,5	392,994633	4,467
C7H14N4O9PS2	3,5	392,993981	5,119
C17H15O3P2S2	11,5	392,993784	5,316

Die dazu gefundenen bekannten Moleküle sind in Tabelle 3.5 aufgeführt, wobei entsprechend der negativen Ionisierung immer mit einem H-Atom mehr gesucht wurde.

**Tabelle 3.5:** Übersicht über die in der Online-Datenbank gefundenen, mit den in Tabelle 3.4 markierten Summenformeln korrespondierenden Strukturen.

Formel	Struktur	Formel	Struktur
$C_{12}H_6N_6O_{10}$ (a)			
$C_{16}H_{11}O_{10}P$ (b)			
$C_{13}H_{10}N_6O_5S_2$ (c)		$C_{14}H_{10}N_4O_6S_2$ (f)	
			
$C_{12}H_{14}N_2O_9S_2$ (d)			
			
$C_{15}H_{10}N_2O_9S$ (e)		$C_{16}H_{10}O_{10}S$ (g)	

## 4 Diskussion

### 4.1 Effekte des konditionierten Mediums in Kultur

#### 4.1.1 Morphologische Veränderungen der Zellen während der Differenzierung

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass in den Zellen bereits nach 16-stündiger Kultivierung mit 50% konditioniertem Medium vermehrt autophagische Prozesse abliefen, welche auch nach 24 h noch deutlich sichtbar waren. Die behandelten Zellen zeigten gegenüber Kontrollzellen eine höhere Anzahl an Phagophoren (*isolation membranes*), Autophagosomen und Autophagolysosomen. Das Auftreten dieser Strukturen ist charakteristisch für die Makroautophagie [Klionsky *et al.* 2008]. Dabei deutete das Vorhandensein von Autophagolysosomen, also mit Lysosomen fusionierte Autophagosomen, auf einen vollständigen Autophagieablauf hin [Klionsky *et al.* 2008].

Die Rolle der Autophagie ist im Zusammenhang mit der Differenzierung verschiedener Zelltypen schon häufig untersucht worden. Bei den einzelligen Parasiten wird beispielsweise in *Trypanosoma cruzi* der Übergang von epimastigoten zu metazyklischen Zellen durch den Nahrungsmangel im Verdauungstrakt des Insektenvektors ausgelöst. Die differenzierenden epimastigoten Zellen zeigen autophagische Strukturen, die von Antikörpern gegen TcATG8.1 erkannt werden [Alvarez *et al.* 2008]. Weiterhin wurde für *Leishmania major* gezeigt, dass die Funktion der späten Endosomen sowie Autophagie eine große Bedeutung für die Entwicklung der Zellen zur infektiösen metazyklischen Form spielen [Besteiro *et al.* 2006].

In *Trypanosoma brucei* wurde während der *slender* zu *stumpy*-Differenzierung eine erhöhte Assoziation von Glykosomen an Lysosomen beobachtet, welche beim Übergang zu prozyklischen Zellen stark zunahm. Glykosomen in autophagischen Vakuolen wurden ebenfalls beobachtet [Herman *et al.* 2008]. Als spezielle Form der Autophagie scheint hier die sog. „Glykophagie“ eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Hinweise auf autophagische Prozesse, die auf den elektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen waren, sind daher durchaus schlüssig. Die Wachstumshemmung des konditionierten Mediums konnte jedoch durch die Autophagie-Inhibitoren Wortmannin und 3-Methyladenin nicht abgeschwächt oder aufgehoben werden. Daher stellt sich die Frage, ob die beobachtete Autophagie nur eine Nebenerscheinung der Differenzierung ist, oder ob sie so gehäuft auftritt, dass die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen zur Aufhebung nicht ausreichen. Es ist aber auch denkbar, dass die im Zuge der Differenzierung auftretende Autophagie über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-unabhängigen Weg abläuft, da beide Substanzen als Inhibitoren dieses Enzyms der Klasse III wirken [Seglen und Gordon 1982; Powis *et al.* 1994; Blommaart *et al.* 1997]. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung höherer Konzentrationen an Autophagieinhibitoren oder das Testen anderer Autophagie-Hemmer lohnenswert.

Eine verlässliche Quantifizierung und Verfolgung der Autophagie war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da keine spezifischen Antikörper für trypanosomale Autophagiemarkers zur Verfügung standen. Zwar wurde die Struktur von ATG8 aus *Trypanosoma brucei* bereits gelöst [Koopmann *et al.*

2009], jedoch waren keine Antikörper verfügbar, die tbATG8 spezifisch erkennen konnten.

#### **4.1.2 Durchflusszytometrie und die Bildung von *stumpy*-Trypanosomen**

Die entsprechenden Experimente zeigten, dass Trypanosomen unter dem Einfluss von konditioniertem Medium keinen nekrotischen Zelltod erlitten, da die Zellmembran von mit konditioniertem Medium behandelten Zellen für Propidiumiodid nicht permeabel war. Die wachstumshemmende Wirkung des konditionierten Mediums beruht auf der vermehrten Induktion der Differenzierung von der *slender*- zur *stumpy*-Blutform. Ein nekrotisches Absterben der Zellen bei Behandlung mit konditioniertem Medium hätte diesem Mechanismus widersprochen.

Die behandelten Zellen zeigten auch keine verstärkten Anzeichen von Apoptose. Die *short stumpy*-Trypanosomen produzieren Prostaglandine, die das apoptotische Absterben der Zellen induzieren und so die Zelldichte regulieren [Figarella *et al.* 2005]. Der früheren Differenzierung zur *stumpy*-Form, wie sie vom konditionierten Medium ausgelöst wird, sollte also auch ein früheres Absterben der Zellen folgen. Der gemessene Zeitraum von 48 h war offenbar zu kurz, um den Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen aufzuzeigen. Diese Feststellung, dass die behandelten Zellen die stationäre Phase früher erreichen, aber keine Apoptose zeigen, bestätigt die These eines ins Medium abgegebenen Differenzierungsfaktors. Dieser sollte in den Zellen morphologische Veränderungen hervorrufen, jedoch die Zellen nicht unmittelbar in die Apoptose treiben.

Da *short stumpy*-Trypanosomen in der  $G_0/G_1$ -Phase des Zellzyklus arretiert sind [Vassella *et al.* 1997; Breidbach *et al.* 2002], wurde der DNA-Gehalt der behandelten Zellen durch Färbung mit Propidiumiodid bestimmt. Entsprechend der Wachstumshemmung wurde eine verstärkte Differenzierung bereits nach 24 h angenommen und die Messungen zunächst nach dieser Zeit durchgeführt. Jedoch befanden sich gegenüber der Kontrolle nicht mehr Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase. Auch nach 48 h waren keine Unterschiede in der Verteilung zu erkennen. Diese Ergebnisse entsprechen dem von Vassella *et al.* beschriebenen Verhalten des monomorphen Stammes MITat 1.2 unter Einwirkung von konditioniertem Medium [Vassella *et al.* 1997]. Dieselben Autoren stellten ebenfalls fest, dass monomorphe Stämme den Differenzierungsfaktor ebenso wie pleomorphe produzieren. Die Weiterleitung des Differenzierungssignals sei jedoch unterbrochen, wodurch diese Zellen nicht zur Differenzierung fähig seien und daher auch nicht im Zellzyklus arretieren. Weiterhin fanden sie heraus, dass der lipophile cAMP-Agonist 8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP (pCPTcAMP) in pleomorphen Trypanosomen die gleichen Effekte hervorruft wie das konditionierte Medium.

Behandelt man monomorphe Trypanosomen mit pCPTcAMP, so findet man jedoch die typischen Differenzierungszeichen wie Wachstumshemmung, *stumpy*-Morphologie und Arrest in der  $G_0/G_1$ -Phase [Breidbach *et al.* 2002]. Diese Beobachtungen legen die Beteiligung von cAMP an der Transduktion des Differenzierungssignals nahe, zumal die intrazelluläre cAMP-Konzentration im Laufe des Lebenszyklus schwankt [Mancini und Patton 1981].

Nach neueren Studien zeigen jedoch die Hydrolyseprodukte von membrangängigen cAMP-Analoga deutlich höhere antiproliferative und

differenzierende Eigenschaften als die Ausgangssubstanzen. Hydrolyseresistente Derivate dagegen zeigten keinen Effekt [Laxman *et al.* 2006].

Troglitazon löste ebenfalls die Differenzierung von *long slender*-Blutformen zu *stumpy*-ähnlichen Zellen aus [Denninger *et al.* 2007]. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass die behandelten Zellen *stumpy*-Morphologie zeigen und in der Lage sind, zu prozyklischen Fliegenformen zu transformieren. Ein Zellzyklusarrest wurde jedoch nicht detektiert. Dies entspricht den hier erhaltenen Ergebnissen aus den durchflusszytometrischen Messungen des Kern-DNA-Gehalts.

Die Inkubation mit den hemmaktiven Gelfiltrationsfraktionen führt bei pleomorphen Trypanosomen zu einer vermehrten Abnahme der *slender*-Parasiten und einer Zunahme an *intermediate*- und *stumpy*-Formen. Bei den entsprechenden Auswertungen der Morphologien wurden Zellen, die zu breit waren als dass sie als *slender* gelten konnten, aber noch nicht so gedrunken wie *stumpy*-Zellen, als *intermediate*-Population zusammengefasst. Damit sollte die Entwicklung der Morphologie eingehender untersucht werden. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Kulturen mit den hemmaktiven Fraktionen bereits nach 19 h einen erhöhten Anteil an intermediären Zellen gegenüber den Kontrollen enthielten. Diese Tendenz setzte sich fort bis zum Messpunkt nach 25 h. Erst nach 43 h wurden deutlich mehr *short stumpy*-Zellen als zu den früheren Zeitpunkten detektiert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Übergangsstadien bei der Differenzierung hin.

Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass die eigentliche Aufgabe der zellzyklusarretierten *stumpy*-Trypanosomen in der Regulierung der

Zelldichte besteht. Dazu besitzen sie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Prostaglandinen, welche wie bereits beschrieben zu programmiertem Zelltod führen können [Figarella *et al.* 2005; Duszenko *et al.* 2006; Figarella *et al.* 2006].

Die mitochondriale Entwicklung der Zwischenformen entspricht eher der der *short stumpy*-Zellen [Tyler *et al.* 1997], weswegen sie meist zur *stumpy*-Population gezählt werden. Statistische Betrachtungen der Blutformdifferenzierung wiederum berücksichtigen die *intermediate*-Subpopulation als wichtigen Faktor [Savill und Seed 2004]. Die Differenzierung zu zellzyklusarretierten *stumpy*-Formen findet am Ende des Übergangsprozesses während der letzten Zellteilung statt [Matthews und Gull 1994]. Dies lässt vermuten, dass der Differenzierungsfaktor die Bildung von *intermediate*-Trypanosomen auslöst, welche bereits die metabolischen Voraussetzungen für ein Überleben im Darm der Fliege besitzen, aber noch nicht im Zellzyklus arretiert sind.

Wie bereits für die Behandlung mit Troglitazon beschrieben [Denninger 2007], könnten diese Zwischenstadien somit die für den Fortbestand der Parasiten in der Fliege verantwortliche Population darstellen.

## 4.2 Aufreinigung des konditionierten Mediums

Die Differenzierung der sich teilenden *long slender*- zu den nicht mehr proliferierenden *short stumpy*-Trypanosomen stellt eine Regulierung der Zelldichte sowie eine Adaption an das folgende Lebensstadium des Parasiten dar. Es handelt sich hier um eine Form des *quorum sensing*, also der Kommunikation einzelner unabhängiger Zellen untereinander. Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass diese Kommunikation durch einen

bestimmten Faktor vermittelt wird. Dazu zählen beispielsweise das längere Überleben einer *in vitro* Kultur bei regelmäßigem Mediumwechsel sowie die wachstumshemmende und differenzierende Wirkung von konditioniertem Medium.

Nach der heute allgemein akzeptierten Vorstellung wird der postulierte Differenzierungsfaktor von den sich teilenden *long slender*-Blutformen gebildet und führt ab einer bestimmten Umgebungskonzentration zur Induktion der *stumpy*-Bildung [Reuner *et al.* 1997]. Da Zell-Zell-Kontakte als Auslöser der Differenzierung ausgeschlossen werden konnten [Vassella *et al.* 1997], muss der Differenzierungsfaktor in das Blut bzw. in das Medium abgegeben werden.

#### 4.2.1 Wahl des Ausgangsmaterials

Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, das entsprechende Molekül zu isolieren und zu identifizieren. Um herauszufinden, welches Medium die beste Grundlage für die weitere Aufarbeitung darstellt, wurde die Wachstumshemmung von konditioniertem Blutform-Kulturmedium und von konditioniertem Grundmedium getestet. Je höher das Inhibitionspotential, umso größer der Gehalt an Differenzierungsfaktor. Es zeigte sich, dass konditioniertes Blutformmedium das Wachstum des monomorphen Stammes MiTat 1.2 deutlich stärker hemmte als das konditionierte Grundmedium. Da aufgrund des im Grundmedium fehlenden Serums ein Wachstum der Zellen nicht möglich war, wurde dieses Medium für 3 bis 5 h mit einer hohen Zelldichte an *slender*-Parasiten konditioniert.

Die Beobachtung, dass das Vollmedium aus einer regulären Kultur deutlich mehr Differenzierungsfaktor enthält als das Grundmedium, entsprach folglich den Erwartungen.

Daher erschien es sinnvoll, das konditionierte Blutformmedium für die Aufreinigung und Isolierung des Differenzierungsfaktors zu verwenden. Dazu wurde die Gelfiltrations-Trennung bezüglich Säulendurchmesser und Flussrate optimiert. Durch den Transfer der Methode auf das automatische FPLC-System (ÄKTAprime) konnte nun auch das konditionierte Vollmedium (nach Ultrafiltration durch 1 kDa-Membranen) reproduzierbar und ohne Störungen aufgetrennt werden. Mit dieser Methode konnte somit konditioniertes Blutformmedium in großen Mengen mittels entsprechenden Hauptkulturansätzen gewonnen werden. Bei der Gewinnung von konditioniertem Grundmedium dagegen musste die Vorkultur auf die hohen Zellzahlen von  $3-4 \times 10^6$  Zellen/ml aufkonzentriert werden. Dies bedeutete entweder die Verwendung einer großen Anzahl an Stabilaten oder von Zellen aus Versuchstieren, um auf die gleichen Volumina an konditioniertem Grundmedium zu kommen. Die weitere Aufarbeitung von Blutformmedium war also auf Dauer der ressourcenschonendere Weg. Ein weiterer Nachteil bei Zellkulturexperimenten mit konditioniertem Grundmedium lag in der ausgeprägten Hemmwirkung, die bereits das Kontrollmedium zeigte. Dieser Effekt wurde auf die Verdünnung von Serum und von im Grundmedium nicht enthaltenen Komponenten zurückgeführt, die bei der Mischung der beiden Medienarten zwangsläufig entstand. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die meisten durchgeführten Trennungen konditioniertes Blutformmedium verwendet. Das Blutformmedium wurde aber entgegen der bei Hesse beschriebenen Vorgehensweise, welcher 2 bis 3 Tage alte Kulturen verwendete [Hesse

1996], bereits nach etwa 24 h aus der exponentiell wachsenden Kultur entnommen. Dies sollte eine Anreicherung an Prostaglandinen im Kulturmedium verhindern. Blutform-Trypanosomen können Arachidonsäure zu Prostaglandinen umwandeln, wobei hauptsächlich PGD<sub>2</sub> entsteht [Kubata *et al.* 2000]. Erhöhte Prostaglandin-Konzentrationen führen bei *stumpy*-Trypanosomen zu einer Caspase-unabhängigen Apoptose. Die *stumpy*-Formen selbst produzieren auch den Hauptteil der für diesen Effekt verantwortlichen Prostaglandine [Figarella *et al.* 2005]. Dennoch wird das gesamte Kulturwachstum durch die Zugabe von Prostaglandinen gehemmt. Dieser Effekt konnte durch Gewinnung des konditionierten Mediums in der späten exponentiellen Wachstumsphase ausgeschlossen werden. Eine etwas geringere Konzentration an Differenzierungsfaktor wurde dabei in Kauf genommen.

#### 4.2.2 Größenausschlusschromatographie

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Säulenmaterial *Biogel P2* zeigte das UV-Chromatogramm des konditionierten Mediums eine Auftrennung in mehrere Peaks. Die Auftrennung des konditionierten Mediums und der entsprechenden Kontrollen konnte durch die Verwendung der *ÄKTAprime*-Anlage maßgeblich erleichtert und beschleunigt werden, da die direkte Aufzeichnung der UV-Absorption deutlich besser aufgelöste Chromatogramme ergab. Eine Identifizierung von hemmaktiven Fraktionen war nun möglich. Für die erste Fraktionierung stellte die Trennung des konditionierten Mediums mittels der beschriebenen Gelfiltrationsmethode einen effektiven und praktikablen Weg dar.

Obwohl die Trennung mit dem polyacrylamid-basierten *Biogel P2* die während der Zellkultur neu entstandenen UV-Peaks bereits gut erkennen ließ, wurde die Verwendung anderer Gelfiltrations-Säulenmaterialien in Erwägung gezogen, um evtl. eine weitere Verbesserung der Trennung zu erzielen. Die einzige Alternative für Molekülgrößen unter 1000 Da bot dabei *Sephadex LH-20*, ein Gelmaterial auf Dextran-Basis. Die ersten Versuche zeigten jedoch keine zufriedenstellende Trennung einzelner Peaks, woraufhin die Experimente in diese Richtung nicht weitergeführt wurden. Andere Materialien mit größeren Ausschlussgrenzen wurden nicht getestet, da diese in der Vergangenheit keine eindeutige Isolierung hemmaktiver Fraktionen erlaubten [Hesse 1996]. Stattdessen wurde der Fokus auf die Analyse der aktiven Fraktionen mittels HPLC gelegt.

#### 4.2.3 HPLC-Trennungen

Der Differenzierungsfaktor wurde von Hesse als ein kleines, polares Molekül beschrieben, basierend auf seinen Experimenten zu dessen Isolierung aus dem Kulturmedium [Hesse 1996]. Die durchgeführten HPLC-Trennungen auf *reversed phase (RP)*-Säulen bestätigten dies. Selbst auf polareren Mischphasen konnte keine signifikante Retention und auch keine weitere Auftrennung der Gelfiltrations-Fraktionen erreicht werden. Dies gelang erst mit der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC), bei der Wasser als starker Eluent eingesetzt wird. Während RP-Trennungen normalerweise bei saurem pH-Wert durchgeführt werden, um ionische Wechselwirkungen der Analyten mit dem Säulenmaterial zu unterbinden, sind HILIC-Phasen i.d.R. sehr pH-sensitiv bezüglich der Trennleistung. Um die Fraktionen später in Kultur testen zu können und um die optimierte

Methode am Massenspektrometer anwenden zu können, kamen nur flüchtige Puffersubstanzen in Frage. Die Säule wurde daher mit 5 mM Ammoniumformiat (pH 3,2 und 5,6), 5 mM Ammoniumacetat (pH 6,9) und mit Wasser ohne Puffersalz getestet. Bei pH 6,9 zeigte die Säule die beste Trennleistung, alle weiteren Analysen wurden daher entsprechend durchgeführt.

Die mit dieser Methode gewonnenen Fraktionen wurden in Zellkulturassays auf ihre wachstumshemmende Wirkung untersucht. Die Aktivität konnte nach der HPLC-Aufreinigung immer noch einzelnen Fraktionen zugeordnet werden. Der Differenzierungsfaktor wurde durch die Trennung bei Raumtemperatur und das anschließende Trocknen und Wiederaufnehmen der Fraktionen also nicht zersetzt. Somit stellt die beschriebene HILIC-Trennung eine erhebliche Verbesserung zur weiteren Aufreinigung des gesuchten Moleküls dar.

#### **4.2.4 Die Bedeutung von HEPES im Kulturmedium**

Um bereits vor der Analyse der einzelnen HPLC-Fraktionen einen ersten Überblick über die enthaltenen Komponenten zu bekommen, wurden zunächst die Fraktionen der Gelfiltration mittels LC/MS untersucht. Dabei fiel auf, dass in den beiden Fraktionen des in der Probe neu hinzugekommenen UV-Peaks im Massenspektrometer ein signifikantes Signal mit  $m/z$  237 und 485 bei einer Retentionszeit von ca. 20 min. vorhanden war. Durch Vergleich der Molekulargewichte der im Kulturmedium eingesetzten Substanzen, wurden die beiden gefundenen Massen der als Puffersubstanz verwendeten 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) zugeordnet. Diese besitzt ein

Molekulargewicht von 238,3 g/mol, was im verwendeten negativen Ionisierungsmodus einem Signal bei  $m/z$  237 entspricht. Die Masse 485 entspräche dann einer dimeren Struktur. Durch die Analyse einer HEPES-Lösung mit der im Kulturmedium verwendeten Konzentration von 30 mmol/l konnte diese Annahme bestätigt werden.

Der entsprechende Peak eluierte nach ca. 163 bis 172 ml von der Gelfiltrationsäule, wobei zu Beginn eine sehr hohe Absorption vorhanden war und am Ende des Peaks eine niedrigere Schulter. Die LC/MS-Signale von HEPES waren in der Fraktion mit der höchsten Absorption stärker als in der zweiten Fraktion aus der Schulter des Peaks. Letztere hemmte das Wachstum der Kulturen jedoch stärker, wodurch ein direkter Zusammenhang von HEPES mit der Hemmaktivität unwahrscheinlich war. Da der beschriebene Peak im Gelfiltrationschromatogramm den Großteil der neu entstandenen UV-Aktivität bei  $\lambda=254$  nm ausmachte, konnte man davon ausgehen, dass der veränderte Protonierungszustand von HEPES zum Großteil für die Zunahme der UV-Absorption verantwortlich war. Nach den hier erhaltenen Ergebnissen war somit die im zeitlichen Verlauf der Kultur steigende Extinktion kein Zeichen für die Bildung des Differenzierungsfaktors, sondern für die zunehmende Protonierung der Puffersubstanz. Für die HPLC-Detektionen wurde eine Wellenlänge von 214 nm verwendet, um auch Komponenten ohne aromatisches System, aber mit Peptid- oder Doppelbindungen detektieren zu können. Auch für diese Wellenlänge war der Zusammenhang von Protonierung und Absorption offensichtlich.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurden auch Berichte über andere Nebeneffekte der Substanz in Kulturmedien gefunden. So kann HEPES-gepuffertes Kulturmedium, das vor Verwendung zu viel Licht ausgesetzt

ist, wachstumshemmende Wirkung entwickeln [Spiereburg *et al.* 1984]. Weiterhin scheint die Substanz eine Rolle in der Freisetzung von Wasserstoffperoxid zu spielen [Kirsch *et al.* 1998] und ist in der Lage, mit bestimmten organischen Substanzen Addukte zu bilden [Gäb *et al.* 2010]. Letztere könnten weitere Analysen ebenfalls erschweren, obwohl es sich bei den von Gäb untersuchten Molekülen um sehr kleine Verbindungen handelt. Bei der Auftrennung von Medium, welches mit HEPES gepuffert ist, sollten folglich die Fraktionen, die die Puffersubstanz enthalten, in Zukunft zur Sicherheit lichtgeschützt aufbewahrt werden. Ebenfalls sollte das Kulturmedium nicht zu lange dem Licht ausgesetzt werden, beispielsweise beim Aufwärmen vor dem Ansetzen einer Kultur.

Um unerwünschte Nebenwirkungen mit HEPES auszuschließen und zusätzlich eine Substanz mit hoher UV-Aktivität aus dem System zu entfernen, wurde die weitere Aufreinigung und Analyse von konditioniertem Grundmedium ohne HEPES durchgeführt. Das Überleben der Zellen in der Grundmedium-Kultur wurde dadurch nicht beeinträchtigt. In den resultierenden Chromatogrammen und LC/MS-Analysen war die in den Proben hinzukommende UV-Aktivität insgesamt zwar deutlich geringer, jedoch war es einfacher, die entsprechenden Fraktionen zu identifizieren. Auch bei der Trennung auf der HILIC-Säule waren die entsprechenden Fraktionen leichter zu identifizieren und aufzufangen.

### 4.3 Struktur des Differenzierungsfaktors

#### 4.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die ersten Messungen an der HPLC-gekoppelten ESI-Ionenfalle wurden mit einer unmodifizierten RP-Säule (C18) durchgeführt. Wie durch die reinen HPLC-Experimente bereits erwartet, fand sich ein Großteil der neu entstandenen UV-Aktivität am Beginn des Chromatogramms. Dieser erhöhten Extinktion konnten jedoch keine neuen Massenpeaks zugeordnet werden, und zwar weder bei positiver noch bei negativer Ionisierung. Mit der verwendeten Methode wäre eine positive Ionisierung deutlich begünstigt gewesen, da den Laufmitteln Ameisensäure beigemischt war. Das gesuchte Molekül wurde also sicher nicht positiv ionisiert, wohingegen die Fähigkeit zur Bildung negativer Ionen nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte. Es wurde in Erwägung gezogen, dass es sich bei dem Differenzierungsfaktor um ein Molekül handelt, welches unter ESI-Bedingungen nicht negativ ionisiert werden kann. Wahrscheinlicher erschien jedoch die Annahme, dass das saure Milieu bei den Messungen die Bildung negativer Ionen verhinderte.

Wie beschrieben erwies sich bei der HILIC-Methodenoptimierung ein pH-Wert von 6,9 als optimal. Da dieser erheblich besser für die Generierung negativer Ionen geeignet war, wurde nun die HILIC-Säule mit dem ESI-MS gekoppelt, um die bessere Auftrennung und die Detektion negativ geladener Ionen zu kombinieren. Tatsächlich konnten neu entstandene negative Ionen mit den Massen 393 und 471 identifiziert werden. Diese traten reproduzierbar in den als hemmaktiv bestimmten Fraktionen der Gelfiltration und nur im konditionierten Medium auf. In allen Analysen wurden diese beiden Massen stets zusammen in einem Peak detektiert. Es

war daher davon auszugehen, dass es sich um eine Fragmentierung der Masse 471 direkt in der ESI-Ionenquelle handelt. Über Fragmentierungsspektren konnte ein gemeinsames Molekülgerüst nachgewiesen werden.

Auch die pH-Werte 3,2 und 5,6 wurden in beiden Ionisierungsmodi auf der MS-gekoppelten HILIC-Säule getestet, um sicherzugehen, dass in den früheren Messungen keine positiv geladenen Ionen übersehen worden waren. Es wurden aber auch hier keine neuen positiven Ionen detektiert.

#### 4.3.2 Analyse von Vergleichssubstanzen

Ausgehend von den bei negativer Ionisierung gefundenen Massen 393 und 471, wurde nach bekannten, mit der Differenzierung von *Trypanosoma brucei* in Zusammenhang stehenden Molekülen mit den Molekulargewichten 394 bzw. 472 g/mol gesucht. Dabei fiel zunächst auf, dass das bereits öfters beschriebene und zur Differenzierung von Trypanosomen eingesetzte cAMP-Analogon pCPTcAMP [Vassella *et al.* 1997; Breidbach *et al.* 2002] ein Molekulargewicht von 471,8 g/mol besitzt und somit der Differenzierungsfaktor diesem Molekül zumindest ähnlich sein könnte. Über die Retentionszeit auf der HILIC-Säule konnte eine große Ähnlichkeit der Moleküle allerdings ausgeschlossen werden. Sie war mit ca. 3 min gegenüber 18 min der untersuchten Massen deutlich kürzer. Die Thiophenyl-Modifikation des cAMP macht das gesamte pCPTcAMP-Molekül also deutlich hydrophober als das gesuchte Molekül.

Ein weiteres Molekül, das Carbobenzoxy-Phenylalanin-Alanin-Diazomethylketon mit einem Molekulargewicht von 394,4 g/mol ist ein spezifischer Cystein-Proteasen-Inhibitor [Shaw 1990], dessen Hauptziel das

Trypanopain zu sein scheint [Scory *et al.* 1999]. Es wurde ebenfalls als Auslöser für die Bildung *stumpy*-ähnlicher Zellen beschrieben [Scory *et al.* 2007] und daher auch analysiert. Durch die beiden vorhandenen aromatischen Ringe ist dieses Molekül jedoch sehr hydrophob und eluierte bereits nach 3 min von der HILIC-Säule.

Als dritte Möglichkeit wurde ADP als Dinatriumsalz in Betracht gezogen. Es hat ein Molekulargewicht von 471,2 g/mol und ist relativ hydrophil. Das Molekül ist aber so polar, dass es später als der untersuchte Peak von der Säule eluierte. Zudem war kein Peak der Masse 471 vorhanden, stattdessen wurde das ADP ohne Natriumionen bei  $m/z$  426 als einfach negativ geladen detektiert.

Der in den MS/MS-Fragmentierungen enthaltene Peak der Masse 375 legte die Vermutung nahe, es könne sich um ein Riboflavin-Grundgerüst handeln. Das MS/MS-Spektrum von Riboflavin zeigte jedoch keine der in der Probe gefundenen Fragmente.

### 4.3.3 Hochoflösende Massenspektrometrie

Die Messungen am ESI-TOF wurden in Zusammenarbeit mit Professor Mike Ferguson am *College of Life Sciences* der Universität Dundee in Schottland durchgeführt. Die Proben der zuvor über die HILIC-Säule isolierten Fraktionen zeigten zahlreiche weitere Massen. Diese waren auch beim vorherigen Messen der Proben an der Ionenfalle zu sehen, konnten jedoch durch die vorgeschaltete Säule von den Massen 393 und 471 abgetrennt werden. Dies gelang am ESI-TOF aufgrund der verwendeten Direkteinspritzung nicht, was zur Folge hatte, dass die Masse 393 nur in geringer Intensität detektiert werden konnte. Die Masse 471 zerfiel im

Flugzeitmassenspektrometer offenbar vollständig und wurde nicht detektiert. Das Auftreten der neuen Massen direkt nach dem Aufkonzentrieren der entsprechenden HPLC-Fraktion sprach entweder für eine thermische Instabilität des Moleküls oder für eine immer noch nicht ganz reine Substanz. Letztere Annahme wurde durch den zusätzlichen UV-Peak bei 15,8 min gestützt, der trotz der vorangegangenen HPLC-Reinigung noch vorhanden war. Die UV- und Massenpeaks zu Beginn des Chromatogramms (1,5 – 3,0 min) waren dagegen auch in der Leermessung mit reinem Lösemittel enthalten. Sie entstanden also durch das Gerät oder die Säule und sollten in der ESI-TOF-Messung nicht enthalten sein.

Zusätzlich ist es denkbar, dass die am TOF-Massenspektrometer verwendete ESI-Ionisierung zerstörend auf das Molekül wirkte.

Die genaue Masse des kleineren Ions wurde mit 392,9991 bestimmt. Basierend auf dieser genauen Masse wurden in Frage kommende Strukturformeln vorgeschlagen. Die entsprechenden Berechnungen wurden mit verschiedenen Kombinationen der möglichen Heteroatome durchgeführt. Die vorgeschlagenen Zusammenfassungen wurden mit der Chemikaliendatenbank *ChemSpider* ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)) auf bekannte, in Frage kommende Moleküle überprüft.

Da ein kleines Peptid oder eine Nukleotid-Struktur als Basis des Moleküls gut vorstellbar sind, wird mit großer Wahrscheinlichkeit Stickstoff in der Struktur enthalten sein. Das Vorkommen von Phosphatresten sowie eventuell Schwefel in Sulfatgruppen oder in Cystein ist ebenfalls gut denkbar.

Passend zu diesen Überlegungen wurden für die Elemente C, H, O im Toleranzbereich von 10 mDa keine möglichen Zusammensetzungen

gefunden. Für die Elemente C, H, O, N konnte mit einer Abweichung von 7,62 mDa die Summenformel  $C_{12}H_5N_6O_{10}$  berechnet werden. Die Internetrecherche ergab für die daraus resultierende Molekülformel mit einem Wasserstoff mehr das N-(2,6-dinitrophenyl)-2,4,6-trinitroanilin als bekanntes Molekül. Dessen Struktur erscheint mit seinen fünf Nitrogruppen jedoch sehr unwahrscheinlich.

Erweitert man die Suche um die Atome P oder S, so nimmt die Zahl der gefundenen Zusammensetzungen erwartungsgemäß deutlich zu. Mit P und S in der Struktur ergibt sich eine nochmals deutlich gesteigerte Anzahl an Vorschlägen.

Bei den vorgeschlagenen Formeln mit den Elementen C, H, O, N, P konnte in der Datenbank nur zur Zusammensetzung  $C_{16}H_{10}O_{10}P$  ein bekanntes Molekül gefunden werden, 2,2'-(Hydroxyphosphoryl)dibenzyl-1,4-dicarbonensäure. Dessen Struktur passt jedoch nicht zu den mit der Ionenfalle erhaltenen Fragmentierungsmustern.

Bei der Suche nach möglichen Zusammensetzungen mit S statt P wurden zu den Verbindungen  $C_{13}H_9N_6O_5S_2$ ,  $C_{12}H_{13}N_2O_9S_2$ ,  $C_{15}H_9N_2O_9S$ ,  $C_{14}H_9N_4O_6S_2$  und  $C_{16}H_9O_{10}S$  bekannte Moleküle gefunden, von denen jedoch ebenfalls keines die gemessenen Fragmentmassen erklären konnte.

Die berechneten Summenformeln mit S und P erbrachten keine Treffer in der Datenbank.

Die Halogen-Atome Cl und Br besitzen Isotope, die zwei Neutronen mehr besitzen und in der Natur relativ häufig sind. Man beobachtet daher bei den MS-Analysen entsprechender Substanzen Satellitenpeaks in Abstand von je zwei Masseeinheiten. Da solche Peaks bei keiner der Analysen zu finden

war, konnte ein Vorhandensein von Cl oder Br in der Struktur mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Ausblick

Mit der in dieser Arbeit etablierten und optimierten Methode zur Aufreinigung des konditionierten Kulturmediums gelang es, wachstumshemmende Fraktionen zu isolieren. Die Analyse mittels LC/ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus identifizierte die enthaltenen Massen als  $m/z$  393 und 471.

Für eine zukünftige Analyse der Substanz ist es von großer Bedeutung, die Fraktionen der HPLC so trocknen und aufbewahren zu können, dass die Entstehung von Abbauprodukten minimiert wird.

Weitere Analysen mit hochauflösender Massenspektrometrie könnten Fragmente des Moleküls mit genauen Massen bestimmen. Diese Experimente müssten jedoch mit der reinen Substanz durchgeführt werden, oder mit einem HILIC-gekoppelten hochauflösenden Massenspektrometer, welches für die Analysen in Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand.

Für weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur mittels IR- und NMR-Spektroskopie wird die Substanz in relativ großer Menge und sehr rein benötigt. Dies stellt bezüglich der Substanzmenge ein erhebliches Problem dar, da die Trypanosomen bei der Konditionierung des Mediums nicht in beliebig großen Kulturansätzen inkubiert werden können, sondern auf bestimmte Verhältnisse von Volumen zu Oberfläche limitiert sind. Die Reinheit der Substanz ist ebenfalls nicht einfach zu erreichen, wie die

durchgeführten HPLC-Experimente und –Fraktionierungen sowie die LC/MS-Analysen zeigten.

Die identifizierten Moleküle könnten dann in Kultur getestet werden. Dies wäre ein entscheidender Schritt, um weitere Einblicke in die Differenzierung und den ersten Schritt ihres Mechanismus zu erhalten. Es ist durchaus denkbar, dass mit gezielten Modifikationen des Moleküls dessen geringe Halbwertszeit im Blut des Wirts umgangen oder die Differenzierungseffizienz gesteigert werden könnte.

## 5 Zusammenfassung

Afrikanische Trypanosomen sind einzellige Parasiten, die bei Nutztieren die Nagana und bei Menschen die afrikanische Schlafkrankheit auslösen. Ihr Lebenszyklus ist durch einen obligaten Wirtswechsel zwischen Säuger und Tsetsefliege geprägt. Dabei wechseln sich teilungsfähige mit teilungsdefizienten Formen ab.

Beim Stich einer infizierten Fliege werden metazyklische Trypanosomen von der Insekten-Speicheldrüse in die Blutbahn eines Vertebraten übertragen. Sie wandeln sich dann spontan in die Blutform um, die als *long slender*-Form bezeichnet wird. Durch ihre hohe Teilungsrate sorgen sie für den Anstieg der Parasitämie. Ab einer gewissen Zelldichte differenzieren die *slender*-Zellen zu den nicht teilungsaktiven *short stumpy*-Parasiten. Die Differenzierung ist ein transienter Prozess, der über eine Intermediär-Form verläuft, welche metabolisch eher *stumpy*-Charakter besitzt, jedoch morphologisch schwer zu bestimmen ist. *Intermediate*- und *stumpy*-Zellen besitzen ein teilweise aktiviertes Mitochondrium und Teile der Atmungskette. Sie sind damit für das Überleben in der Fliege präadaptiert.

Die Vermittlung dieser zelldichteabhängigen Differenzierung von *Trypanosoma brucei*-Blutformen von der *long slender* zur *short stumpy*-Form wird einem von den *slender*-Formen ins Blut bzw. ins Medium abgegebenen Differenzierungsfaktor zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurden die Effekte von konditioniertem Medium und den erzeugten Fraktionen daraus auf die Zellen in axenischer Kultur weiter beleuchtet.

Die Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, dass die mit konditioniertem Blutformmedium behandelten Zellen vermehrt Autophagie betreiben. In Durchflusszytometrie-Experimenten konnte nach 24 und 48 h Behandlung mit konditioniertem Medium keine Nekrose und keine verstärkte Apoptose detektiert werden. Die Zellen zeigten jedoch auch keinen Zellzyklusarrest in der  $G_1/G_0$ -Phase, wie er für *stumpy*-Zellen eigentlich charakteristisch ist. Bei der Behandlung mit der hemmaktiven Fraktion aus der Größenausschlusschromatographie zeigen pleomorphe Trypanosomen nach 19 und 25 h jedoch einen Anstieg der Zellen mit intermediate-Morphologie. Eine deutliche Zunahme der *stumpy*-Population findet erst nach 40 h statt. Dies könnte, ähnlich wie im Falle des Troglitazons, auf eine bedeutendere Rolle der Übergangsformen im Differenzierungsprozess hindeuten, als bisher angenommen.

Die Identifizierung des Differenzierungsfaktors wäre ein großer Schritt auf dem Weg der Entwicklung neuer Therapeutika. Der Faktor sollte theoretisch aus dem Kulturmedium isoliert werden können. Die Aufarbeitung des konditionierten Kulturmediums zur Isolierung von hemmaktiven Fraktionen und deren Identifizierung erwies sich jedoch als sehr komplex, da das gesuchte Molekül ein geringes Molekulargewicht besitzt und sehr polar ist.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung des Differenzierungsfaktors aus dem Kulturmedium etabliert und optimiert. Das gesuchte Molekül hat ein Molekulargewicht von unter 500 Da, daher wurde das Medium im ersten Schritt durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 1000 Da ultrafiltriert. Die Hemmaktivität des

konditionierten Mediums fand sich dabei komplett im Filtrat, welches danach über eine Größenausschlusschromatographie-Säule weiter fraktioniert wurde. Durch den Einsatz eines automatisierten FPLC-Systems wurde die Trennung über diese Säule optimiert und stark beschleunigt. Die wachstumshemmende Fraktion wurde in Zellkulturassays identifiziert. Sie löste in kultivierten pleomorphen Trypanosomen die vermehrte Bildung von insbesondere intermediären und später auch von *stumpy*-Zellen aus und führte damit zur Differenzierung.

Für die weitere Trennung der biologisch aktiven Gelfiltrations-Fraktion wurden verschiedene HPLC-Bedingungen und -Säulen getestet. Aufgrund der hohen Polarität des gesuchten Moleküls konnte nur mit der hydrophilen Interaktions-Chromatographie eine zufriedenstellende Auftrennung der Fraktion erreicht werden.

Die folgende Analyse der hemmaktiven HPLC-Fractionen erfolgte am HPLC/ESI-Massenspektrometer. Sie ergab, dass bei negativer Ionisierung stets die Massen 471 und 393 im konditionierten Medium, nicht jedoch in der Kontrolle vorhanden waren. Bei der Kontrolle der Reinheit der auf der HPLC-Säule getrennten Fraktionen wurde festgestellt, dass sich die Substanz in relativ kurzer Zeit zersetzt, was durch wiederholtes Trocknen und Wiederaufnehmen verstärkt wurde.

Bei den massenspektrometrischen Analysen wurde offensichtlich, dass die im Kulturmedium eingesetzte Puffersubstanz HEPES durch ihren veränderten Protonierungszustand massiv zur erhöhten Absorption des konditionierten Mediums beitrug. Zudem produzierte HEPES einen störenden Peak in den Chromatogrammen. Statt Blutformmedium wurde daher für die Konditionierung Serum- und HEPES-freies Grundmedium

verwendet. Die Analyse mittels HPLC und Massenspektrometer konnte so entscheidend vereinfacht werden.

Bekannt, mit der Differenzierung in Zusammenhang stehende Verbindungen mit entsprechenden Molekulargewichten wurden zum Vergleich ebenfalls im LC/MS vermessen. Dabei zeigten das cAMP-Analogon 8-para-Chlorphenylthio-cAMP und der Cysteinproteasen-Inhibitor Carbobenzoxy-Phenylalanin-Alanin-Diazomethylketon eine deutlich zu kurze Retentionszeit. Das ADP-Dinatriumsalz war dagegen hydrophiler als die gesuchte Substanz und zeigte die falschen Peaks.

Mit einem ESI-TOF-Massenspektrometer konnte die genaue Masse des kleineren Ions mit 392,9991 Da bestimmt werden. Basierend darauf wurden mögliche Summenformeln für dieses Ion berechnet und diskutiert. Diese Erkenntnisse sind ein wichtiger Schritt zur vollständigen Strukturaufklärung des Faktors.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Isolierung des trypanosomalen Differenzierungsfaktors aus konditioniertem Medium stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Analysen und die Aufklärung der chemischen Struktur des Moleküls dar.

## 6 Abstract

African trypanosomes are unicellular parasites that cause the nagana disease in cattle and the African sleeping sickness in humans. Their life cycle involves an obligatory change between the vertebrate and the tsetse fly. Dividing and non-proliferating stages alternate within the cycle.

With the bite of an infected fly metacyclic trypanosomes from the insect's salivary glands are transferred to the bloodstream of a mammal. They then transform spontaneously to the bloodstream form that is called the long slender form. Their fast dividing rate causes an increase of parasitaemia. When the cell density reaches a certain threshold value, the slender cells differentiate to the non-dividing short stumpy parasites. The differentiation is a transient process that involves intermediate forms whose metabolism is similar to stumpy cells, their morphology, however, is difficult to determine. Intermediate and stumpy cells possess partly activated mitochondria and parts of the respiratory chain. They are therefore preadapted to survive in the fly.

The transduction of this cell density dependent differentiation from the long slender to the short stumpy bloodstream form is attributed to a differentiation inducing factor, that is secreted into the blood or the culture medium by the slender cells.

In this thesis the effects of conditioned medium and its fractions on the cells in axenic culture were illuminated more detailed.

Transmission electron micrographs revealed the cells that were treated with conditioned medium to show increased autophagy. In flow cytometry

experiments these cells did not show signs of necrosis or enhanced apoptosis after 24 and 48 hours. However, the cells were not arrested in the  $G_1/G_0$  phase of the cell cycle, which usually is typical for stumpy cells. Treated with the growth inhibitory fraction from gel filtration for 19 and 25 hours, pleomorphic cells developed more intermediate morphology. A significant increase of cells with stumpy morphology did not take place until after 40 hours. Similar to the effects observed with troglitazone, this finding could point towards a more important role of the intermediate trypanosomes during differentiation than currently assumed.

The identification of the differentiation factor would be a milestone for the development of new sleeping sickness drugs. Theoretically it should be possible to isolate this molecule from the culture medium. The processing of the conditioned media in order to isolate biologically active fractions turned out to be very complex due to the small molecular weight and the strong hydrophobicity of the factor.

In this thesis a procedure for the isolation of the differentiation factor from the culture medium was established and optimized. The molecule has a molecular weight of less than 500 Da, as first step the medium therefore was ultrafiltrated through a membrane with a 1000 Da cut off. The growth inhibition effect was found completely in the filtrate fraction, which was then separated on a size exclusion column. This step was significantly optimized and accelerated by transferring it to an automated FPLC system. The fraction containing the growth inhibition effect was identified in cell culture assays. It triggered the differentiation of cultured pleomorphic trypanosomes to intermediate and later also to stumpy forms.

For the further separation of the biologically active fraction different HPLC conditions and columns were tested. According to the high polarity of the molecule a satisfying separation could only be achieved by hydrophobic interaction chromatography.

The analysis of the active HPLC fractions was performed with HPLC/ESI mass spectrometer. In negative ionization mode this revealed the masses 471 and 393 to occur in the fractions from conditioned medium, but not in the control fractions. When the purity of the fractions which were separated on the HPLC was tested, the substance turned out to be degraded quite fast. The effect intensified when the sample was dried and resolved again.

During the mass spectrometric analyses it became obvious that HEPES, which was used as buffer in the culture media, was mainly responsible for the increase of the absorption in the course of cell culture. Moreover, HEPES produced an interfering peak in the HPLC chromatograms. A serum- and HEPES-free culture medium was therefore used instead of bloodform medium. Thus, the analyses with HPLC and mass spectrometry could be significantly simplified.

Compounds that are known to be related to the differentiation process and have corresponding molecular weights were tested on the LC/MS. The cAMP analogon 8-(4-chlorphenolthio)-cAMP and the cysteine protease inhibitor carbobenzoxy-phenylalanine-alanine-diazomethylketone showed retention times that were much too short. In contrast, ADP disodium salt was more hydrophilic than the analyte and gave the wrong mass peaks.

On The accurate mass of the smaller ion could be determined as 392,9991 Da on an ESI-TOF mass spectrometer. Based on this mass, several possible sum

formulae were calculated and discussed. These results are an important step on the way to the complete structure elucidation of the factor.

The procedure of isolating the trypanosomal differentiation factor from conditioned culture medium developed in this thesis is a promising basis for further analyses and for the elucidation of the chemical structure of this molecule.

## Literaturverzeichnis

- Alvarez V.E., Kosec G., Sant'Anna C., Turk V., Cazzulo J.J. und Turk B.** (2008). Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **283**(6): 3454-3464.
- Badertscher M., Bischofberger K., Munk M.E. und Pretsch E.** (2001). A novel formalism to characterize the degree of unsaturation of organic molecules. *J Chem Inf Comput Sci* **41**(4): 889-893.
- Bakker B.M., Westerhoff H.V., Opperdoes F.R. und Michels P.A.** (2000). Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol* **106**(1): 1-10.
- Barrett M.P., Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasch A.C., Cazzulo J.J. und Krishna S.** (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**(9394): 1469-1480.
- Barry J.D. und Emergy D.L.** (1984). Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology* **88** ( Pt 1): 67-84.
- Besteiro S., Biran M., Biteau N., Coustou V., Baltz T., Canioni P. und Bringaud F.** (2002). Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *J Biol Chem* **277**(41): 38001-38012.
- Besteiro S., Williams R.A., Morrison L.S., Coombs G.H. und Mottram J.C.** (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem* **281**(16): 11384-11396.
- Bienen E.J., Hammadi E. und Hill G.C.** (1981). *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. *Exp Parasitol* **51**(3): 408-417.

- Bienen E.J., Saric M., Pollakis G., Grady R.W. und Clarkson A.B., Jr.** (1991). Mitochondrial development in *Trypanosoma brucei brucei* transitional bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **45**(2): 185-192.
- Billker O., Lindo V., Panico M., Etienne A.E., Paxton T., Dell A., . . . Morris H.R.** (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**(6673): 289-292.
- Bisser S., N'Siesi F.X., Lejon V., Preux P.M., Van Nieuwenhove S., Miaka Mia Bilenge C. und Buscher P.** (2007). Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J Infect Dis* **195**(3): 322-329.
- Black S.J., Jack R.M. und Morrison W.I.** (1983). Host-parasite interactions which influence the virulence of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei* organisms. *Acta Trop* **40**(1): 11-18.
- Blommaert E.F., Krause U., Schellens J.P., Vreeling-Sindelarova H. und Meijer A.J.** (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **243**(1-2): 240-246.
- Borst P.** (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu Rev Biochem* **55**: 701-732.
- Bray P.G., Barrett M.P., Ward S.A. und de Koning H.P.** (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **19**(5): 232-239.
- Breidbach T., Ngazoa E. und Steverding D.** (2002). *Trypanosoma brucei*: in vitro slender-to-stumpy differentiation of culture-adapted, monomorphic bloodstream forms. *Exp Parasitol* **101**(4): 223-230.
- Bruce D.** (1895). Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zululand. Bennett and David, Durban (South Africa).

- Bruce D.** (1903). Further report on sleeping sickness in Uganda. *Rep. Sleeping Sickness Comm. R. Soc.* **4**: 3-6.
- Brun R., Blum J., Chappuis F. und Burri C.** (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet* **375**(9709): 148-159.
- Buchholz B.** (2005). Untersuchungen zur Isolierung eines Differenzierungsfaktors aus *Trypanosoma brucei brucei*. *Diplomarbeit*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Buguet A., Bourdon L., Bisser S., Chapotot F., Radomski M.W. und Dumas M.** (2001). Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm. *Med Trop (Mars)* **61**(4-5): 328-339.
- Clarke M. und Gomer R.H.** (1995). PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia* **51**(12): 1124-1134.
- Clayton C.E.** (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* **21**(8): 1881-1888.
- Cox F.** (2004). History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infect Dis Clin N Am* **18**: 231 - 245.
- Cross G.A.** (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **71**(3): 393-417.
- Cross G.A. und Manning J.C.** (1973). Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology* **67**(3): 315-331.
- de Hoffmann E. und Stroobant V.** (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition. Wiley, Chichester.
- Denninger V.** (2007). Effekte von Troglitazon und anderen Thiazolidindionen auf die Blutform von *Trypanosoma brucei* – Induktion der Differenzierung von *slender*-Formen. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- Denninger V., Figarella K., Schonfeld C., Brems S., Busold C., Lang F., . . . Duszenko M.** (2007). Troglitazone induces differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Exp Cell Res* **313**(9): 1805-1819.
- Domenicali Pfister D., Burkard G., Morand S., Renggli C.K., Roditi I. und Vassella E.** (2006). A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **5**(7): 1126-1135.
- Duszenko M., Ferguson M.A., Lamont G.S., Rifkin M.R. und Cross G.A.** (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *J Exp Med* **162**(4): 1256-1263.
- Duszenko M., Figarella K., Macleod E.T. und Welburn S.C.** (2006). Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* **22**(11): 536-542.
- Duszenko M., Muhlstadt K. und Broder A.** (1992). Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **50**(2): 269-273.
- Dutton J.E.** (1902). Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man. *Thompson Yates Lab Rep* **4**: 455-468.
- Eagle H.** (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**(3373): 432-437.
- Fairlamb A.H.** (1989). Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology* **99 Suppl**: S93-112.
- Ferguson M.A. und Cross G.A.** (1984). Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem* **259**(5): 3011-3015.
- Figarella K., Rawer M., Uzcategui N.L., Kubata B.K., Lauber K., Madeo F., . . . Duszenko M.** (2005). Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ* **12**(4): 335-346.

- Figarella K., Uzcategui N.L., Beck A., Schoenfeld C., Kubata B.K., Lang F. und Duszenko M.** (2006). Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ* **13**(10): 1802-1814.
- Fischer W.** (1912). Beitrag zur Kenntnis der Trypanosomen. *Medical Microbiology and Immunology* **70**(1): 93-103.
- Forde R.** (1902). Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed. *J Trop Med* **5**: 261 - 263.
- Fuqua C. und Greenberg E.P.** (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 685-695.
- Gäß J., John H., Melzer M. und Blum M.M.** (2010). Stable adducts of nerve agents sarin, soman and cyclosarin with TRIS, TES and related buffer compounds--characterization by LC-ESI-MS/MS and NMR and implications for analytical chemistry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**(17-18): 1382-1390.
- Gruby D.** (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. In: *Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences*. Paris. **17**: 1134-1136.
- Hajduk S.L. und Vickerman K.** (1981). Absence of detectable alteration in the kinetoplast DNA of a *Trypanosoma brucei* clone following loss of ability to infect the insect vector (*Glossina morsitans*). *Mol Biochem Parasitol* **4**(1-2): 17-28.
- Hall J.E., Dahm K.H. und Seed J.R.** (1981). Quantification of tryptophan catabolites from *Trypanosoma brucei gambiense* in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **68**(4): 521-526.
- Hamm-Künzelmann B.** (1992). Differenzierung von *Trypanosoma brucei* in *in vitro* Kulturen. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- Hamm B., Schindler A., Mecke D. und Duszenko M.** (1990). Differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. *Mol Biochem Parasitol* **40**(1): 13-22.
- Hart D.T., Misset O., Edwards S.W. und Opperdoes F.R.** (1984). A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **12**(1): 25-35.
- Herman M., Perez-Morga D., Schtickzelle N. und Michels P.A.** (2008). Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* **4**(3): 294-308.
- Hesse F.** (1996). Axenische Kultivierung und in vitro-Differenzierung der Blutformen von *Trypanosoma brucei*. *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Hesse F., Selzer P.M., Muhlstadt K. und Duszenko M.** (1995). A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro. *Mol Biochem Parasitol* **70**(1-2): 157-166.
- Jain R., Yuen I.S., Taphouse C.R. und Gomer R.H.** (1992). A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes Dev* **6**(3): 390-400.
- Kennedy P.G.** (2006). Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *J Neurol* **253**(4): 411-416.
- Kirsch M., Lomonosova E.E., Korth H.G., Sustmann R. und de Groot H.** (1998). Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxyxynitrite with HEPES and related tertiary amines. Implications for a general mechanism. *J Biol Chem* **273**(21): 12716-12724.
- Kleine F. und Fischer W.** (1912). Schlafkrankheit und Tsetsefliegen. *Medical Microbiology and Immunology* **73**(1): 253-259.
- Kleine F.K.** (1909). Weitere wissenschaftliche Beobachtungen über die Entwicklung von Trypanosomen in Glossinen. *Dtsch Med Wochenschr* **35**: 924-925.

- Klionsky D.J., Abeliovich H., Agostinis P., Agrawal D.K., Aliev G., Askew D.S., . . . Deter R.L.** (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**(2): 151-175.
- Koopmann R., Muhammad K., Perbandt M., Betzel C. und Duszenko M.** (2009). Trypanosoma brucei ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy* **5**(8): 1085-1091.
- Kubata B.K., Duszenko M., Kabututu Z., Rawer M., Szallies A., Fujimori K., . . . Hayaishi O.** (2000). Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in Trypanosoma brucei. *J Exp Med* **192**(9): 1327-1338.
- Landfear S.M. und Ignatushchenko M.** (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**(1): 1-17.
- Laxman S., Riechers A., Sadilek M., Schwede F. und Beavo J.A.** (2006). Hydrolysis products of cAMP analogs cause transformation of Trypanosoma brucei from slender to stumpy-like forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 19194-19199.
- Le Ray D., Barry J.D., Easton C. und Vickerman K.** (1977). First tsetse fly transmission of the "AnTat" serodeme of Trypanosoma brucei. *Ann Soc Belg Med Trop* **57**(4-5): 369-381.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., . . . Wallace F.G.** (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* **27**(1): 37-58.
- Mancini P.E. und Patton C.L.** (1981). Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of Trypanosoma brucei brucei in the rat. *Mol Biochem Parasitol* **3**(1): 19-31.
- Marcello L. und Barry J.D.** (2007). Analysis of the VSG gene silent archive in Trypanosoma brucei reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Res* **17**(9): 1344-1352.

- Masento M.S., Morris H.R., Taylor G.W., Johnson S.J., Skapski A.C. und Kay R.R.** (1988). Differentiation-inducing factor from the slime mould *Dictyostelium discoideum* and its analogues. Synthesis, structure and biological activity. *Biochem J* **256**(1): 23-28.
- Matthews K.R. und Gull K.** (1994). Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* **10**(12): 473-476.
- Mehlhorn H. und Piekarski G.** (2002). Grundriss der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere. Spektrum.
- Morris H.R., Taylor G.W., Masento M.S., Jermyn K.A. und Kay R.R.** (1987). Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **328**(6133): 811-814.
- Nolan D.P., Rolin S., Rodriguez J.R., Van Den Abbeele J. und Pays E.** (2000). Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *Eur J Biochem* **267**(1): 18-27.
- Paindavoine P., Rolin S., Van Assel S., Geuskens M., Jauniaux J.C., Dinsart C., . . . Pays E.** (1992). A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **12**(3): 1218-1225.
- Pays E., Lips S., Nolan D., Vanhamme L. und Perez-Morga D.** (2001). The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Mol Biochem Parasitol* **114**(1): 1-16.
- Pays E. und Vanhollebeke B.** (2008). Mutual self-defence: the trypanolytic factor story. *Microbes Infect* **10**(9): 985-989.
- Pepin J., Guern C., Milord F. und Schechter P.J.** (1987). Difluoromethylornithine for arseno-resistant *trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *The Lancet* **330**(8573): 1431-1433.

- Pepin J. und Meda H.A.** (2001). The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol* **49**: 71-132.
- Pepin J., Milord F., Mpia B., Meurice F., Ethier L., DeGroof D. und Bruneel H.** (1989). An open clinical trial of nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in central Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83**(4): 514-517.
- Pohlig G., Bernhard S., Blum J. und Burri C.** (Year). Phase 3 trial of pafuramidine maleate (DB289), a novel, oral drug, for treatment of first stage sleeping sickness: safety and efficacy. *57th Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene* New Orleans, Dec 7-1, 2008, No. 542
- Powis G., Bonjouklian R., Berggren M.M., Gallegos A., Abraham R., Ashendel C., . . . et al.** (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**(9): 2419-2423.
- Priest J.W. und Hajduk S.L.** (1994). Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Bioenerg Biomembr* **26**(2): 179-191.
- Priotto G., Kasparian S., Mutombo W., Ngouama D., Ghorashian S., Arnold U., . . . Kande V.** (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet* **374**(9683): 56-64.
- Reuner B., Vassella E., Yutzy B. und Boshart M.** (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol Biochem Parasitol* **90**(1): 269-280.
- Robinson N.P., Burman N., Melville S.E. und Barry J.D.** (1999). Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol* **19**(9): 5839-5846.
- Roditi I., Schwarz H., Pearson T.W., Beecroft R.P., Liu M.K., Richardson J.P., . . . et al.** (1989). Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* **108**(2): 737-746.

- Ross R. und Thomson D.** (1910). A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *Br Med J* **1**(2582): 1544-1545.
- Sanofi-Aventis** (2007). Access to Medicines Brochure. 19.
- Savill N.J. und Seed J.R.** (2004). Mathematical and statistical analysis of the *Trypanosoma brucei* slender to stumpy transition. *Parasitology* **128**(Pt 1): 53-67.
- Scory S., Caffrey C.R., Stierhof Y.D., Ruppel A. und Steverding D.** (1999). *Trypanosoma brucei*: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Exp Parasitol* **91**(4): 327-333.
- Scory S., Stierhof Y.D., Caffrey C.R. und Steverding D.** (2007). The cysteine proteinase inhibitor Z-Phe-Ala-CHN2 alters cell morphology and cell division activity of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vivo. *Kinetoplastid Biol Dis* **6**: 2.
- Seed J.R. und Black S.J.** (1997). A proposed density-dependent model of long slender to short stumpy transformation in the African trypanosomes. *J Parasitol* **83**(4): 656-662.
- Seglen P.O. und Gordon P.B.** (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(6): 1889-1892.
- Selzer P.M., Hesse F., Hamm-Kunzelmann B., Muhlstadt K., Echner H. und Duszenko M.** (1996). Down regulation of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activity of *Trypanosoma brucei* during transition from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. *Eur J Cell Biol* **69**(2): 173-179.
- Seyfang A., Mecke D. und Duszenko M.** (1990). Degradation, recycling, and shedding of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Protozool* **37**(6): 546-552.

- Shaw E.** (1990). Cysteinyl proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 271-347.
- Spiereburg G.T., Oerlemans F.T., van Laarhoven J.P. und de Bruyn C.H.** (1984). Phototoxicity of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid-buffered culture media for human leukemic cell lines. *Cancer Res* **44**(5): 2253-2254.
- Stephens J.W.W. und Fantham H.B.** (1910). On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*). *Proc R Soc Lond B* **83**: 28-33.
- Steverding D.** (2008). The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* **1**(1): 3.
- Stibbs H.H. und Seed J.R.** (1973). Chromatographic evidence for the synthesis of possible sleep-mediators in *Trypanosoma brucei gambiense*. *Experientia* **29**(12): 1563-1565.
- Stojdl D.F. und Clarke M.W.** (1996). *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol* **83**(1): 134-146.
- Strassburger E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W., Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorf, F., Bresinsky, A.** (1991). Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Torreele E., Bourdin Trunz B., Tweats D., Kaiser M., Brun R., Mazué G., . . . Pécoul B.** (2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* **4**(12): e923.
- Turner C.M.** (1997). The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett* **153**(1): 227-231.

- Tyler K.M., Matthews K.R. und Gull K.** (1997). The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. *Proc Biol Sci* **264**(1387): 1481-1490.
- Vassella E., Reuner B., Yutzy B. und Boshart M.** (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* **110 ( Pt 21)**: 2661-2671.
- Veigel J.** (1996). Untersuchung der Differenzierung und ihrer Faktoren an *Trypanosoma brucei brucei* in axenischen Kulturen. *Diplomarbeit*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Vickerman K.** (1965). Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature* **208**(5012): 762-766.
- Vickerman K.** (1969). On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci* **5**(1): 163-193.
- Walker G.** (1997). Untersuchung der Differenzierung von *Trypanosoma brucei brucei* in axenischer Kultur. *Diplomarbeit*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Webb K., Bristow T., Sargent M. und Stein B.** (2004). Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules. Teddington, LCG Limited.
- WHO** (2000). Chapter 8 - African Trypanosomiasis. In: *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases*: 95-106.
- WHO** (2010). "Fact sheet No. 259 - African trypanosomiasis (sleeping sickness)." Retrieved 22.12.2010, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
- Wiemer E.A., Michels P.A. und Opperdoes F.R.** (1995). The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications. *Biochem J* **312 ( Pt 2)**: 479-484.

---

**Winkle S.** (2005). *Geißeln der Menschheit. Kulturgeschichte der Seuchen.* Artemis & Winkler, Düsseldorf.

**Yun O., Priotto G., Tong J., Flevaud L. und Chappuis F.** (2010). NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5): e720.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name	Björn Buchholz
Geburtsdatum/-ort	27. August 1980, Schramberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

### Ausbildung

1987 - 1991	Grundschule am Kirchplatz, Schramberg
1991 - 2000	Gymnasium Schramberg, Abitur (27.06.2000)
2000 - 2005	Studium der Chemie in Tübingen
10/2002	Vordiplom in Chemie (07.10.2002)
06/2005 – 12/2005	Diplomarbeit am Interfakultären Institut für Biochemie, Tübingen, Titel: „Untersuchungen zur Isolierung eines Differenzierungsfaktors aus <i>Trypanosoma brucei brucei</i> “ Betreuer: Prof. Dr. Michael Duszenko
12/2005	Diplom in Chemie mit Wahlpflichtfach Biochemie (19.12.2005)
10/2002 – 07/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Tübingen, Fakultät für Chemie, Betreuung von Praktika
11/2007 – 10/2010	Lehrbeauftragter der medizinischen Fakultät für das Fach Biochemie, Organisation von Praktika
2006 - 2011	Promotion am Interfakultären Institut für Biochemie, Tübingen, Betreuer: Prof. Dr. Michael Duszenko

**Vorträge**

- 2008                      Buchholz, B., Duszenko, M.: Investigation of the differentiation in *Trypanosoma brucei* with emphasis on the isolation of a differentiation-inducing molecule.  
*Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg*
- 2010                      Buchholz, B., Schönfeld, C., Duszenko, M.: Induction of autophagy during differentiation of *T. brucei* from slender to stumpy BSF.  
*COST Meeting, Lausanne, Schweiz*
- Buchholz, B., Duszenko, M.: A DIFficult search and the induction of autophagy during differentiation of *T. brucei*.  
*Young scientist symposium, Blaubeuren*