
Aus dem Interfakultären Institut für Biochemie
der Universität Tübingen

**Klonierung und heterologe Expression
zur Analyse der Metalloproteasen TbMSP-B und TbMSP-C
aus *Trypanosoma brucei brucei***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Lorenz, geb. Zachmann, Julia

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. M. Duszenko

2.Berichterstatter: Professor Dr. P. Kahle

Tag der Disputation: 10.02.2017

Für Dominik

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT).....	1
1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsbild	1
1.1.2 Lebenszyklus der Trypanosomen	5
1.1.3 Diagnostik	7
1.1.4 Prävention und Therapie	10
1.2 Auswahl wichtiger Pathogenitätsmechanismen.....	13
1.2.1 Immunescape durch Antigenvariation.....	13
1.2.2 Differenzierung.....	16
1.2.3 Migration ins extravasale Gewebe	18
1.3 Metalloproteasen	20
1.3.1 Funktion und Bedeutung humaner Metalloproteasen	20
1.3.2 Metalloproteasen der Trypanosomen.....	21
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Material & Methoden	25
2.1 Kultivierungstechniken von Organismen	25
2.1.1 Kultivierung und Selektion von E. coli auf solidem Nährmedium	25
2.1.2 Kultivierung von E. coli in Flüssigmedium	27
2.1.3 In-vitro-Kultivierung und Selektion von Trypanosomen	28
2.1.4 In-vivo-Kultivierung von Trypanosomen	33
2.2 Molekulargenetische Verfahren	37
2.2.1 Amplifizierung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2 Gelelektrophorese.....	41
2.2.3 Sequenzierung.....	43
2.2.4 Reverse Transkription	43

2.2.5	Restriktionsverdau	43
2.3	Transfektion der Plasmide in T.b.b.	44
2.3.1	Herstellung der Fusions-Plasmide	44
2.3.2	Transformation der Fusions-Plasmide in E. coli.....	46
2.3.3	Elektroporation der LFPs in T.b.b	47
2.4	Luciferase-Assay	48
2.4.1	Extraktion der Luciferase	48
2.4.2	Luminometrie	49
2.4.3	Statistik	49
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Herstellung der Ligations-Sequenzen LS-B, LS-C und LS-mC.....	51
3.1.1	Identifizierung der 3'UTRs im trypanosomalen Genom.....	51
3.1.2	Konstruktion und Herstellung von Primern.....	54
3.1.3	Herstellung der Ligations-Sequenzen	57
3.1.4	Sequenzierung der Ligations-Sequenzen	59
3.2	Herstellung 3'UTR-tragender Plasmide	63
3.2.1	Konstruktion der pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide	63
3.2.2	Herstellung der pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide	64
3.2.3	Konstruktion der Luciferase-Fusions-Plasmide.....	68
3.2.4	Herstellung der Luciferase-Fusions-Plasmide.....	72
3.3	Herstellung rekombinanter Trypanosomen-Stämme durch Transfektion der LFPs mit dem Elektroporations-Verfahren.....	78
3.3.1	Transfektion der LFPs in MiTat1.2	78
3.3.2	Nachweis des Luciferase-Gens in rekombinanten MiTat1.2 ...	78
3.3.3	Transfektion der LFPs in AnTat1.1	80
3.4	Überprüfung der rekombinanten Trypanosomen-Stämme	83
3.4.1	Implementierung eines Luciferase-Assays zur Validierung der Luciferase-Expression der LFP-MiTat1.2-Stämme	83
3.4.2	Überprüfung der Wachstumseigenschaften rekombinanter LFP- MiTat1.2-Stämme	87

4	Diskussion	89
4.1	Konzept zur Analyse der TbMSPs mit dem Luciferase-Reporter-System.....	89
4.2	Auswahl der TbMSP-regulierenden Sequenzmotive	92
4.3	Auswahl der LS-Klone	93
4.4	Elektroporation von Trypanosomen.....	95
4.5	Kultivierung pleomorpher Trypanosomen	96
4.6	Kultivierung rekombinanter LFP-MiTat1.2	97
4.7	Luciferase-Assay	97
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis	103
7	Erklärung zum Eigenanteil	119
	Danksagung	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Verbreitungsgebiet der HAT auf dem afrikanischen Kontinent..	2
Abbildung 2:	Lebenszyklus von T.b.	6
Abbildung 3:	Diagnose-Algorithmus der Gambiense-HAT	8
Abbildung 4:	BF-Trypanosomen	17
Abbildung 5:	Trypanosomen im Plexus choroideus	19
Abbildung 6:	Tertiärstruktur der Leishmanien-MSP	23
Abbildung 7:	Formel zur Berechnung der Zelldichte	31
Abbildung 8:	Formel zur Berechnung des Ligations-Ansatzes.....	45
Abbildung 9:	Längen der TbMSP-3'UTRs.....	51
Abbildung 10:	Nukleotid-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR nach Helm.....	52
Abbildung 11:	Nukleotid-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR aus der TriTrypDB.....	54
Abbildung 12:	Nukleotid-Sequenz der TbMSP-C-3'UTR aus der TriTrypDB.....	54
Abbildung 13:	Herstellung der Ligations-Sequenzen LS-B, LS-C und LS-mC.....	58
Abbildung 14:	Sequenzierung der LS-B.....	60
Abbildung 15:	Sequenzierung der LS-C.....	61
Abbildung 16:	Sequenzierung der LS-mC.....	62
Abbildung 17:	pCR®2.1-TOPO.....	63
Abbildung 18:	Nukleotid-Sequenz des pCR®2.1-TOPO	64
Abbildung 19:	Gelelektrophorese der LS-B aus E. coli	66
Abbildung 20:	Gelelektrophorese der LS-C aus E. coli	66
Abbildung 21:	Gelelektrophorese der LS-mC aus E. coli	67
Abbildung 22:	pLEW20	69
Abbildung 23:	Nukleotid-Sequenz des pLEW20	71

Abbildung 24: Gelelektrophorese LS-B, LS-mC und pLEW20-BB	73
Abbildung 25: LS-B des LFP-B aus E. coli.....	75
Abbildung 26: LS-mC des LFP-mC aus E. coli	76
Abbildung 27: Sequenzierung des LFP-B	77
Abbildung 28: Sequenzierung des LFP-mC.....	77
Abbildung 29: Gelelektrophorese der LS-B aus LFP-B-MiTat1.2.....	79
Abbildung 30: Gelelektrophorese der LS-mC aus LFP-mC-MiTat1.2	80
Abbildung 31: Toxizität von Phleomycin auf AnTat1.1	81
Abbildung 32: Wachstumskurve von AnTat1.1	82
Abbildung 33: Luciferase-Assay der LFP-MiTat1.2-Trypanosomen, linear	84
Abbildung 34: Luciferase-Assay der LFP-MiTat1.2-Trypanosomen, logarithmisch.....	85
Abbildung 35: Wachstumskurven genuiner und rekombinanter MiTat1.2	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	HAT-Therapeutika.....	11
Tabelle 2:	Prokaryontische Zelllinien	25
Tabelle 3:	LB-Medium 2x [107].....	26
Tabelle 4:	Amp-LB-X-Gal-Agar	26
Tabelle 5:	Material zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	26
Tabelle 6:	Material für das Autoklavieren.....	26
Tabelle 7:	Material für Stabilate	28
Tabelle 8:	Eukaryontische Zelllinien	29
Tabelle 9:	HMI-9-Medium [111]	29
Tabelle 10:	Semisolide Agarose [109]	29
Tabelle 11:	Material zur Kultivierung von Trypanosomen	30
Tabelle 12:	<i>Trypanosome dilution buffer</i> pH7,7 [51]	32
Tabelle 13:	Einfriermedium	32
Tabelle 14:	Phleomycin	33
Tabelle 15:	Tiere.....	34
Tabelle 16:	Materialien zur in-vivo-Kultivierung von Trypanosomen.....	34
Tabelle 17:	Citrat-Glukose-Antikoagulanz pH7,7 (CGA).....	35
Tabelle 18:	Cytomix pH7,6 [111, 113].....	35
Tabelle 19:	Materialien zur Gewinnung von Trypanosomen aus Blut.....	36
Tabelle 20:	Separationspuffer pH8,0 [111]	37
Tabelle 21:	Regenerationspuffer pH3,0 [115].....	37
Tabelle 22:	Kits.....	38
Tabelle 23:	PCR-Ansatz zur Herstellung der LS.....	39
Tabelle 24:	PCR-Protokoll zur Herstellung der LS.....	39
Tabelle 25:	Reaktionsansatz Colony-PCR.....	40

Tabelle 26:	Protokoll Colony-PCR	40
Tabelle 27:	PCR-Ansatz zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in <i>T. b. b.</i>	41
Tabelle 28:	PCR-Protokoll zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in <i>T. b. b.</i>	41
Tabelle 29:	TAE-Puffer 50x pH8,0	42
Tabelle 30:	Agarose-Gel 1 %	42
Tabelle 31:	Materialien für die Gelelektrophorese	42
Tabelle 32:	Enzyme und Puffer für Restriktionsverdauung	44
Tabelle 33:	Plasmide	45
Tabelle 34:	Ligationsansätze der pCR®2.1-TOPO-3'UTR-Plasmide	46
Tabelle 35:	Ligationsansätze für die Herstellung der LFPs	46
Tabelle 36:	Ligationsprotokoll zur Herstellung der LFPs	46
Tabelle 37:	Elektroporationsprotokolle	48
Tabelle 38:	Materialien für den Luciferase-Assay	49
Tabelle 39:	Identifizierung der TbMSP-B und TbMSP-C und ihrer 3'UTRs im trypanosomalen Genom	53
Tabelle 40:	Primer zur Herstellung der Ligations-Sequenzen (LS-B, LS-C, LS-mC)	55
Tabelle 41:	Primer zur Überprüfung der Vektoren und Fusions-Plasmide	56
Tabelle 42:	Primer zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in Trypanosomen	57
Tabelle 43 :	Photometrie der LS-B, LS-mC und des pLEW20-BB nach Gelextraktion	74
Tabelle 44:	Messwerte des Luciferase-Assays	86
Tabelle 45:	Levene-Test-Ergebnisse	86
Tabelle 46:	Welch-Test-Ergebnisse	86

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslated region
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AnTat	<i>Antwerp Trypanozoon antigen type</i>
ANOVA	one-way analysis of variances
AURE	<i>adenine and uracil rich element</i>
BB	Backbone
BC	<i>buffy coat</i>
BF	Blutform, <i>blood stream form</i>
CATT	<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>
CGA	Citrat-Glukose-Antikoagulan
DALYs	disability-adjusted life years
DLRAS	Dual-Luciferase® Reporter Assay System
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
GPEET	Glycin-Prolin-Glutamat-Glutamat-Threonin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GPI-PLC	GPI-spezifische Phospholipase C
HAT	Humane Afrikanische Trypanosomiasis
HMI-9-Medium	<i>Hirumi's modified Iscove's medium 9</i>
ICR	intercoding Region
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LB	<i>lysogeny broth</i>
LFP	Luciferase-Fusions-Plasmid
LS	Ligations-Sequenz
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMP	Metalloprotease
MSP	<i>Major surface protease</i>

MiTat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigenic type</i>
NECT	Nifurtimox-Eflornithin-Kombinations-Therapie
OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
RDT	<i>rapid test for serodiagnosis</i>
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TbAOX	<i>Trypanosoma brucei</i> Alternative Oxidase
<i>T.b.b.</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<i>T.b.g.</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
TbMSP	<i>Trypanosoma brucei</i> Major surface protease
<i>T.b.r.</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
TDB	<i>Trypanosome dilution buffer</i>
TL	immunologische Trypanolyse
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropandiol
TriTrypDB	<i>Trypanosoma brucei</i> gene data base
URE	<i>uracil rich element</i>
UV	ultra violett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT)

1.1.1 Epidemiologie und Krankheitsbild

Die Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT) wird umgangssprachlich auch als Schlafkrankheit bezeichnet und ist eine Anthroponose, die durch begeißelte Protozoen der Spezies *Trypanosoma brucei* (*T.b.*) hervorgerufen wird [1]. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich über tropische und subtropische Gebiete des afrikanischen Kontinents. Westafrika und Zentralafrika sind von der chronischen Erkrankungsform durch die Subspezies *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) betroffen während die Unterart *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*), die eine akute Verlaufsform der HAT auslöst, überwiegend in Ostafrika vertreten ist (Abbildung 1)[2]. Übertragen wird die Krankheit durch mehrere Arten der Tse-Tse-Fliege, *Glossinae*, auf deren Habitate sich das Endemiegebiet der HAT beschränkt [3]. Die Tse-Tse-Fliege ernährt sich von menschlichem Blut indem sie die Haut mehrfach sticht. Trypanosomen, die sich im Stadium der metazyklischen Form befinden gelangen mit dem Speichel der Tse-Tse-Fliege in die vulnerable Wunde, dringen in das Blut und die Lymphe ein und infizieren auf diese Art Säugetiere [4]. Im Gegensatz zu Tieren, die nicht erkranken und daher als Reservoir fungieren [5], führt die Infektion bei Menschen zum Krankheitsbild HAT. Das Habitat der Tse-Tse-Fliege umfasst derzeit 36 Länder der afrikanischen Subsaharazone. Infektionen mit *T.b.g.* (chronische Verlaufsform) sind in 24 Ländern verbreitet und umfassen mit 98% die Mehrzahl aller registrierten Fälle. Zu etwa 2% liegen Infektionen mit *T.b.r.* vor, die in 13 Ländern dokumentiert werden und nur in Uganda neben der chronischen Verlaufsform koexistieren. Dennoch können beide Erkrankungsformen auch in Uganda unterschiedlichen Gebieten zugeordnet werden (Abbildung 1)[2]. Die Verbreitungsgebiete der akuten und chronischen Verlaufsform der HAT betreffen arme, politisch instabile Staaten mit geringer Infrastruktur [6] in denen sich die Bevölkerung von Agrarwirtschaft, Fischerei, Tierhaltung oder Jagd ernährt [5]. Eine weitere, jedoch nicht humanpathogene Unterart, löst bei Tieren Nagana aus

[1]. Diese Erkrankung wird durch eine Infektion mit der Unterart *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) oder *Trypanosoma congolense* (*T.c.*) hervorgerufen und bedroht durch eine fulminante Kachexie der Tiere nicht nur die Agrarwirtschaft und damit das ökonomische Wachstum, sondern auch die Nahrungsmittelversorgung der Bevölkerung.

Aus diesen Gründen werden die HAT und die Nagana als ursächlich für die Unterentwicklung in diesen Regionen angesehen [8]. Die Arbeitsgruppe um Erika Reinhardt postuliert, dass die afrikanische Agrarwirtschaft dadurch einen jährlichen Verlust von 4,5 Milliarden US-Dollar erleidet [9].

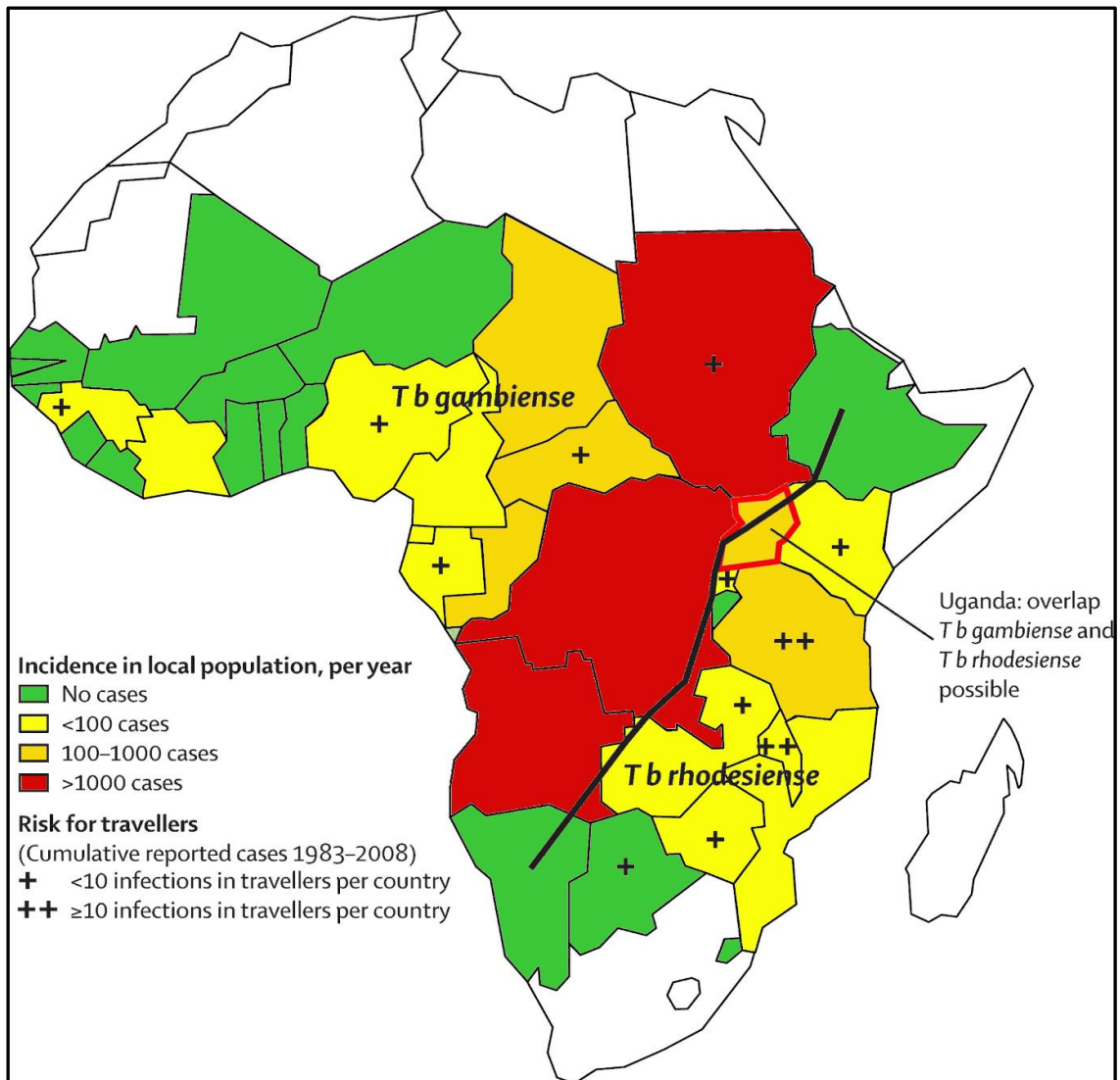


Abbildung 1: Verbreitungsgebiet der HAT auf dem afrikanischen Kontinent
schwarze Linie trennt die Endemiegebiete von *T. b. r.* und *T. b. g.*, Grafik aus [2], Farbgebung mit GIMP2 [7] verändert

Nach den Epidemien in den Jahren 1896 bis 1906 und 1920 bis 1940 [2] wurden nationale Kontrollprogramme durchgeführt um weitere Ausbrüche zu verhindern. In den 1960er Jahren galt die HAT sogar als kontrolliert [5, 10]. Nach dem Abzug der Kolonialmächte aus Afrika wurden die präventiven Maßnahmen jedoch vernachlässigt. Dies führte zu einer erneuten Epidemie in den Jahren 1970 bis 1990 [2]. Während dieser letzten Epidemie [2] lag die Prävalenz der Schlafkrankheit in vielen afrikanischen Dörfern, Orten in Angola, der Demokratischen Republik Kongo und im Südsudan, bei 50% und war für mehr Todesfälle verantwortlich als das *acquired immune deficiency syndrom* (AIDS) [5, 10]. Da von 60 Millionen Menschen in den Risikogebieten aber nur 10-15% der Bevölkerung unter Kontrolle sind [11] geht Geiger davon aus, dass die Anzahl der infizierten Menschen stark unterschätzt wird [12]. Diese Annahme wird durch die Tatsache bestärkt, dass aufgrund mangelnder Infrastruktur, fehlendem Fachpersonal, geringer finanzieller Mittel und relativ aufwändiger Methoden eine flächendeckende Diagnostik gerade in ländlichen Gebieten nicht gewährleistet ist. Zu Beginn der Infektion ist die HAT außerdem nur schwer diagnostizierbar (siehe 1.1.3) und veranlasst wegen unspezifischer Symptome (siehe unten) kaum einen Betroffenen zur Inanspruchnahme ärztlicher Hilfe. Durch anhaltende Kontrollen sank die jährliche Fallzahl zwischen 1997 und 2006 von 36.585 auf 11.382. Dies entspricht einer Reduktion von 69 Prozentpunkten [2]. Die WHO spricht von einem Rückgang von 37.385 auf 17.036 Fälle in den Jahren 1998 bis 2004 und kalkulierte die Anzahl neuer Krankheitsfälle 2004 mit einem Verhältnis von 1:3-4 (50.000 bis 70.000 Fälle pro Jahr) [13]. Die Belastung durch die HAT werde laut Fèvre durch DALYs (disability-adjusted life years) besser abgebildet als durch die Prävalenz und sei viel höher einzustufen, als es die geringe Prävalenz vermuten ließe [14]. Jährlich versterben etwa 48.000 Patienten an der HAT [15] und trotz der guten Entwicklung gehen jedes Jahr immer noch 1,5 Millionen DALYs durch die Schlafkrankheit verloren [15]. Die tatsächliche Belastung bleibt jedoch unbekannt [2].

Durch die Bereitstellung der Medikamente Pentamidin, Melarsoprol und Eflornithin durch Sanofi-Aventis und Suramin durch die Bayer AG [13, 16] konnte die Inzidenz 2009 erstmalig auf unter 10.000 Fälle pro Jahr gesenkt werden. Im

Jahr 2013 wurden sogar nur noch 6314 Fälle gemeldet [5, 10]. Das entspricht einer Prävalenz von etwa 0,01% in den Risikogebieten und zeigt die Wirksamkeit und Notwendigkeit konsequenter Kontrollen und konsequenter medikamentöser Therapie. Dass kostenlose Medikamente die Krankheitsprävalenz beeinflussen, verdeutlicht, dass die Wirtschaft eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der HAT spielt [15].

Die Schlafkrankheit verläuft in zwei Krankheitsstadien. Im hämolymphatischen Stadium, dem ersten, dringen die Trypanosomen in das Lymphsystem und das Blut ein [4]. In der Regel treten unspezifische Symptome, wie zum Beispiel Fieberschübe, geschwollene Lymphknoten („Winterbottom Sign“) [17-19], Myalgie, Arthralgie, Cerebralgie, Pruritus, gastrointestinale und kardiale Beschwerden [20], Anämie, Thrombozythämie und Gewichtsverlust auf [2]. Dies veranlasst die Personen selten zu einem Arztbesuch, sodass die HAT in diesem Stadium nur sporadisch diagnostiziert wird. An der Stelle der Bisswunde kann ein Trypanosomenschanter auftreten [2]. Typisch ist das Auftreten am 2. bis 5. Tag post infectionem in der Form einer Schwellung mit zentralen Bläschen, die sich schuppig ausbreiten. Nach etwa 3 Wochen bildet sich die Schwellung zurück [21, 22]. Diese Schwellung ist bei Infektionen mit *T.b.g.* nur sehr selten zu beobachten und tritt bei Infektionen mit *T.b.r.* in 19% der Fälle auf [2]. Spezifische Symptome treten erst im zweiten Stadium, dem meningoenzephalen Stadium, auf, das sich durch neurologische und neuropsychiatrische Ausfälle des zentralen Nervensystems auszeichnet [23]. Die Trypanosomen gelangen in die Pia mater, die weiche Hirnhaut und lösen dort eine Meningitis und Leukenzephalitis aus [4]. Unter vielen anderen neurologischen Auffälligkeiten finden sich Tremor, Kraftlosigkeit, Dysbasie, visuelle Beeinträchtigungen [20], Paralysen (Hemiparese) und Dyskinesien (zum Beispiel Dysarthrie und Ataxie), Impotenz und Amenorrhoe [19]. Psychiatrisch können eine erhöhte Aggressionsbereitschaft, psychotische Zustände und Verwirrtheit bis hin zu komatösen Bewusstseinszuständen festgestellt werden [2]. Darüber hinaus liegt eine Störung der zirkadianen Rhythmik mit fragmentierten Schlafphasen und einer Auflösung der 24-Stunden-Verteilung von Schlaf- und Wachphasen vor [4]. Eine Hypersomnie tritt nicht auf [4]. In der Regel verläuft die HAT unbehandelt

letal [5]. In endemischen Gebieten Zentralafrikas leben jedoch auch asymptomatische Träger [24]. Dieses Konzept der „trypanosomalen Toleranz“ wurde von Wéry und Burke 1970 vorgestellt [24]. Die chronische Form ermöglicht unbehandelt eine durchschnittliche Überlebenszeit von 3 Jahren, die paritätisch in beide Stadien unterteilt ist [25]. Die akute HAT-Form zeigt eine deutlich schnellere Progression mit einem Übergang in das meningoenzepale Stadium nach wenigen Wochen bis Monaten. Bei dieser Verlaufsform können bereits im ersten Stadium letale Myokarditiden und letale Lungenödeme auftreten [26, 27].

1.1.2 Lebenszyklus der Trypanosomen

Die Trypanosomen durchlaufen während ihrer Wirtwechsel (Säugetiere und Tse-Tse-Fliegen) einen Kreislauf mit verschiedenen morphologischen Zellstadien. Dieser Zyklus dauert etwa 25 bis 50 Tage [28]. Dabei ändert sich nicht nur die Zellmorphologie (Abbildung 2), sondern auch wichtige Stoffwechselprozesse, Oberflächeneigenschaften und ihre Fortbewegungsdynamik [29-32]. Morphologisch lassen sich die Stadien am leichtesten durch die Position des Kinetoplasten, in dessen Nähe das Flagellum entspringt, unterscheiden [31]. Bei den BF-Stadien, die extrazellulär im Blut leben [33], hat das Flagellum seinen Ursprung am Ende der Zelle. Diesen Zustand bezeichnet man als trypomastigot. Auch die prozyklische Form der Tse-Tse-Fliege ist trypomastigot. Der Ursprung des Flagellums liegt hier auf halber Strecke zwischen Zellkern und Zell-Ende. Bei der epimastigoten Form entspringt das Flagellum vor dem Zellkern [31]. Trypanosomen des metazyklischen Typs gelangen bei einem Biss in den Blutkreislauf und werden zu Blutformen (BF, Abbildung 2). Diese werden anhand ihrer Länge in slender (25-36 μ m), intermediate und short stumpy (14-21 μ m) unterteilt [34]. Die Form intermediate galt als Übergangsstadium und war lose definiert [30]. Da die Unterteilung in Zelllängen keinem funktionellen Korrelat entspricht und ein längerer, agiler Typ aus dem Gehirn wiederzukehren scheint, schlägt Mogk folgende Unterteilung vor: long slender 29-37 μ m (Relapsform aus dem Gehirn), intermediate 23-28 μ m (ursprüngliche slender form) und short stumpy 14-22 μ m [34]. Diese Nomenklatur wird im Folgenden verwendet.

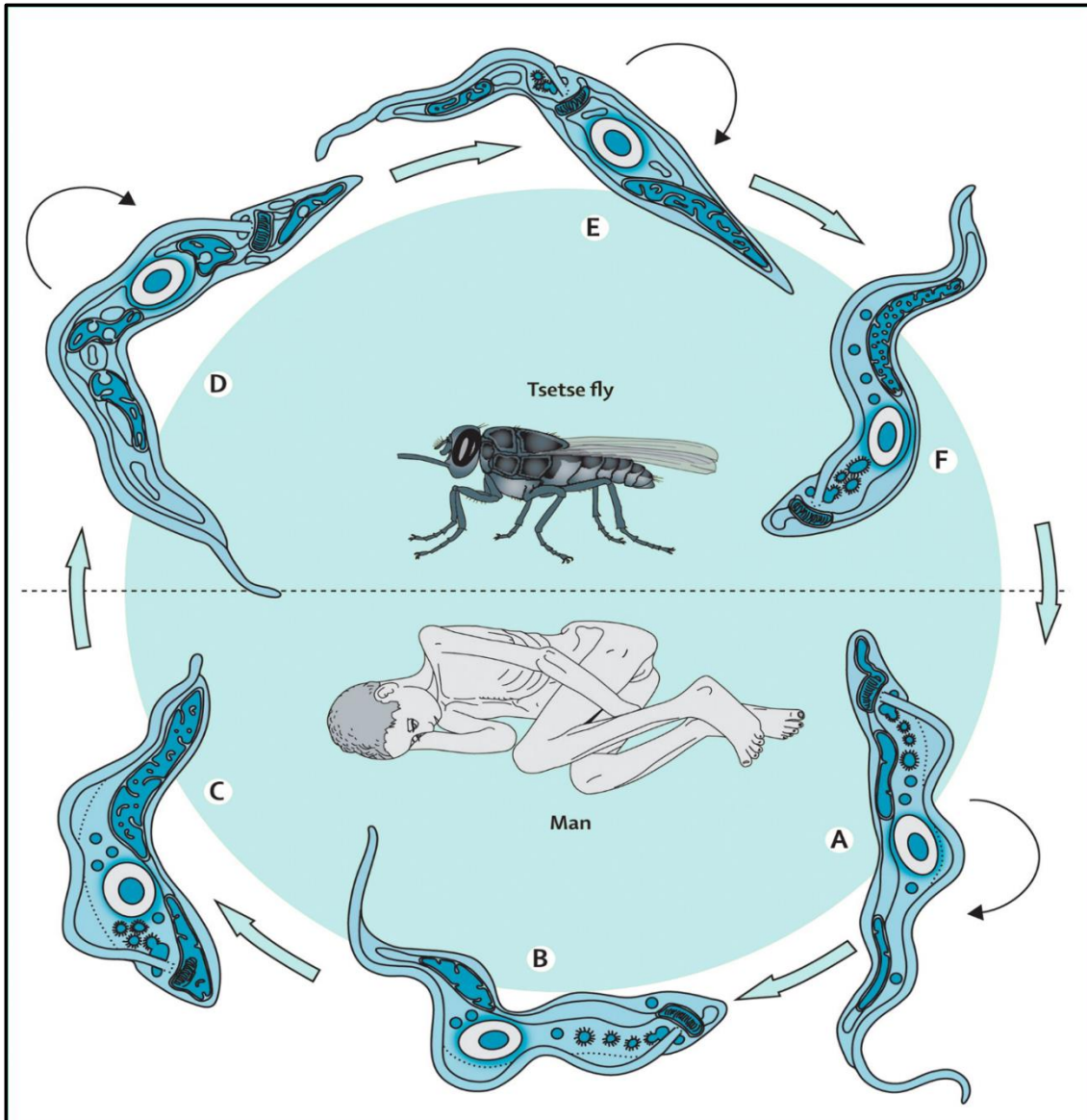


Abbildung 2: Lebenszyklus von *T.b.*

A-C sind Blutformen (blood stream form, BF), die in Säugetieren vorkommen. A = long slender, B = intermediate, C = short stumpy. D-F treten in der Tse-Tse-Fliege auf. D = prozyklisch, E = epimastigot, F = metazyklisch [2]

Alle BF besitzen einen Oberflächenmantel aus *variant surface glycoprotein* (VSG, siehe 1.2.1). Slender sowie intermediate Formen proliferieren im Blut durch binäre Fission. Die short stumpy Form kann sich nicht mehr teilen. Durch das Zusammenspiel aus humoraler Immunantwort (Antikörper) und einem Antigenwechsel der Trypanosomen (1.2.1) entstehen die typischen zyklischen Schwankungen der Zelldichte im Blut. Dieses Muster zeigt sich mit einem Tag Verzögerung auch im Liquor cerebrospinalis [34]. Die long slender Form ist

länger, schlanker und die agilste BF und tritt etwa 10 Tage post infectionem in Blut auf [34]. Bei einer hohen Zelldichte im Blut entsteht die short stumpy Form, die ebenfalls einen VSG-Mantel besitzt, aber nicht teilungsfähig ist [30]. Nachdem diese Form von Tse-Tse-Fliegen aufgenommen wurde, wandeln sich die Trypanosomen in die proliferierende, prozyklische Form um, die ihren VSG-Mantel gegen einen Oberflächenmantel aus Prozyklinen tauscht [31](1.2.1). Die prozyklische Form vermehrt sich im Mitteldarm der Tse-Tse-Fliege und wandert von dort aus in die Speicheldrüse, in der sie über die proliferative epimastigote Form in die metazyklische Form übergeht [31]. Diese proliferiert nicht, besitzt aber wieder einen VSG-Mantel [31], ist dadurch für das Überleben im Blut präadaptiert und der Zyklus kann mit der Zellteilung erneut beginnen.

Mittlerweile sind einige Regulatoren des Zellzyklus bekannt, doch den überwiegenden Teil der regulatorischen Prozesse gilt es noch zu erforschen. Neben pleomorphen Populationen mit heterogenen Zellen haben sich monomorphe Zelllinien in der Forschung durchgesetzt [30]. Ihre Fähigkeit zur Differenzierung in ein anderes Zellstadium ist eingeschränkt und sie sind einfach zu kultivieren [30]. Durch hohe Parasitämien führen sie zum schnellen Wirts-Tod. Die Wechselrate ihrer Oberflächenantigene ist deutlich niedriger, als die der pleomorphen Stämme. Dies reduziert ihre Differenzierungsfähigkeit in vitro [30].

1.1.3 Diagnostik

Im 14. Jahrhundert wurde das Krankheitsbild der HAT im Gebiet des heutigen Niger erstmals nachweislich beschrieben [35]. Weitere Berichte und Beschreibungen finden sich erst im 18. Jahrhundert wieder [36]. Im Jahre 1843 beschrieb Gruby das erste Mal die Einzeller und benannte sie nach ihrer Eigenschaft „tryp“ (griechisch für durchbohren) und „soma“ (griechisch für Körper) [37]. Den kausalen Zusammenhang, dass eine Infektion mit Trypanosomen zur HAT führt, erkannte ein Arzt mit dem Namen David Bruce im Jahr 1903 [38]. Nach ihm ist die Art *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*) benannt. Der gängige Diagnose-Algorithmus (Abbildung 3) beginnt in Endemiegebieten mit der Palpation der Lymphknoten. Diese Methode ist einfach, aber von geringer

Spezifität. Der Trypanosomenschanker tritt zu selten auf, um ihn als sicheren Diagnoseparameter verwenden zu können [2](1).

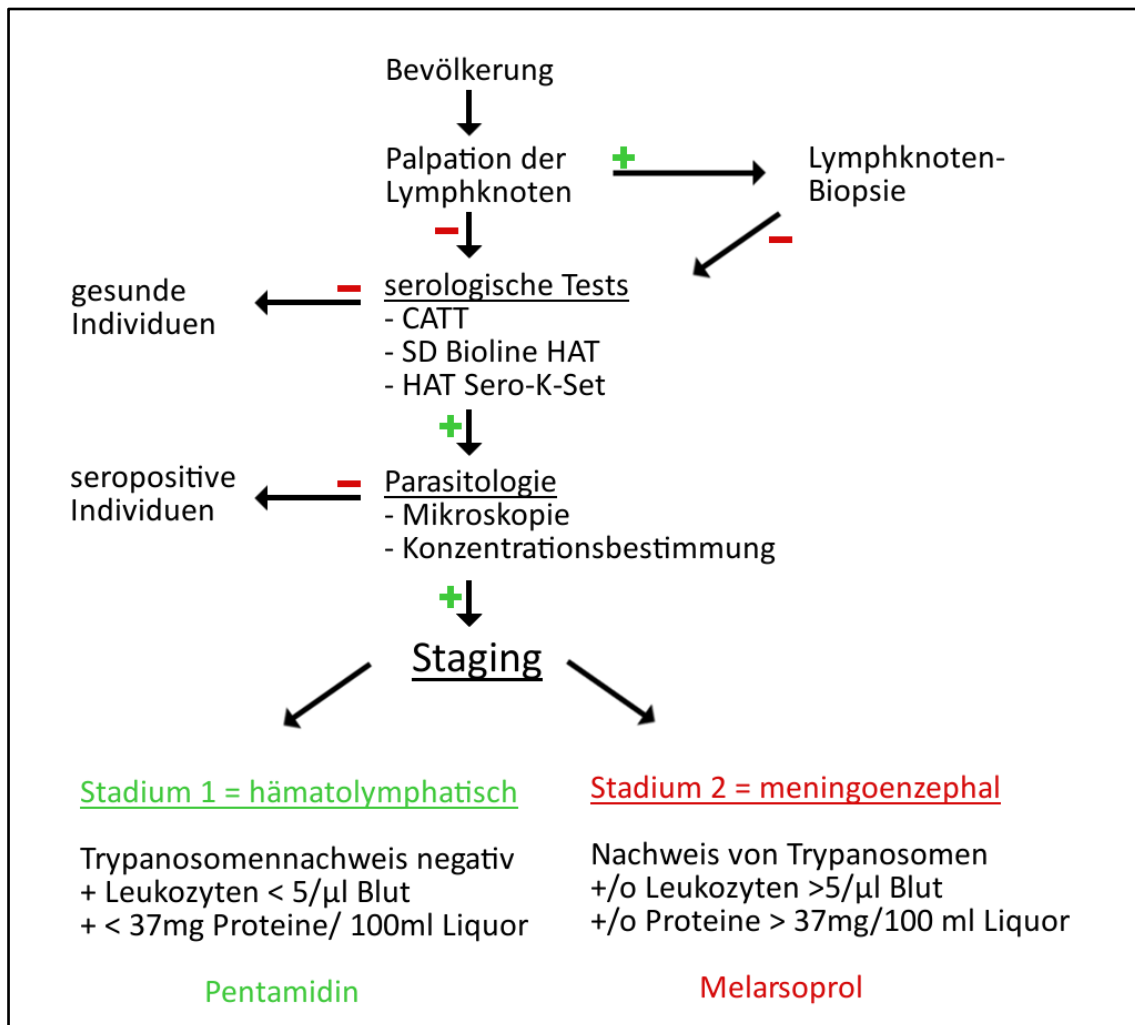


Abbildung 3: Diagnose-Algorithmus der Gambiense-HAT

Grafik aus [12] modifiziert mit GIMP2 [7] nach [39]

Zu den serologischen Tests zählen die immunologische Trypanolyse (TL), der *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT) und zwei Schnelltests (*rapid test for serodiagnosis* = RDT), der SD Bioline HAT und der HAT Sero-K-Set [39]. Der CATT wird am häufigsten verwendet [39]. Er detektiert Antikörper (Ak) gegen Trypanosomen-Antigene, ist durch seine geringe Haltbarkeit und der Lagerung bei 4°C [40] aber abhängig von Strom und aus diesen Gründen nicht überall verfügbar und fehleranfällig [6, 39]. Zudem korreliert die CATT-Seropositivität nicht mit der Prävalenz der HAT. Auf Schlussfolgerungen über die Verbreitung

von *T.b.g.* auf der Grundlage des CATT-Screenings sollte deshalb verzichtet werden [41]. Die Sensitivitäten der RDTs sind mit 99,6% für den SD Bioline HAT und mit 99,1% für den HAT Sero-K-Set annähernd so gut, wie die TL. Mit Spezifitäten von etwa 88% für beide RDTs liegen diese aber deutlich unter der Spezifität der TL. Deren Spezifität schwank regional zwischen 83%, 95,8%, 97,1% [42] und 100% und gilt als Referenz-Methode [39]. Die TL kann nur in technisch ausgerüsteten, meistens fernen Referenz-Laboren [6] durchgeführt werden und bleibt aus diesem Grund eine individuelle Möglichkeit [42]. Zudem dürfen die Sensitivitäten und Spezifitäten der RDTs nicht überschätzt werden, warnt Jamonneau [39].

Der mikroskopische Nachweis von Trypanosomen im Blut ist neben dem klinischen Bild das entscheidende Diagnosekriterium [12, 42-44]. Da der Nachweis von Trypanosomen im frühen Stadium meistens negativ ist und auch bei ausgeprägter Klinik durch eine geringe Zelldichte negativ ausfallen kann, eignen sich parasitologische Methoden aufgrund ihrer geringen Sensitivität nicht als primäre Screening-Methode [24, 42]. Methoden wie die Capillary Centrifugation Technique (CTC), die mini-Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) und die mAECT-BC unter Verwendung des *buffy coats* (BC) sind sensitiver; sind jedoch wie die molekularen Methoden *polymerase chain reaction* (PCR) und die Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) aufwändig, teuer, auf ihre Reproduzierbarkeit nicht oder kaum erforscht oder nicht flächendeckend anwendbar [42]. In den ländlichen Gebieten der betroffenen afrikanischen Länder fehlt es oft an Strom, entsprechenden Geräten oder Fachpersonal, sodass diese Methoden, ebenso wie das Staging (wegen der Lumbalpunktion), in der Realität klinischen Zentren vorbehalten sind. Gegen die klassischen Staging-Verfahren (Lumbalpunktion, Blutbild, parasitologischer Nachweis) haben sich neuere Staging-Marker [45] nicht durchgesetzt. Außerdem verliert das Staging zunehmend an Bedeutung [40]. Bislang gibt es keine Methode mit geringen Kosten, die spezifisch, großflächig und einfach anwendbar ist und keine sensitive Methode, die auch ein frühes Infektionsstadium erfasst [12]. In Nicht-Endemiegebieten sollte eine HAT bei unerklärten neurologischen oder psychiatrischen Auffälligkeiten und chronischer Enzephalitis besonders

nach einem Aufenthalt in Endemiegebieten vermutet werden. Der Aufenthalt kann dabei viele Jahre zurückliegen [46]. Die Prävalenz für Reisende ist gering, durch die große Anzahl der Personen werden in den Industriestaaten dennoch jedes Jahr einzelne HAT-Fälle diagnostiziert [43]. Moderne Techniken, zum Beispiel die Magnetresonanztomografie, sind auch im fortgeschrittenen Stadium unspezifisch [46]. Deshalb ist es notwendig neue Angriffspunkte für sensitive, kostengünstige, einfache und verlässliche Techniken zu finden [12]. Bisher haben sich die Analyse-Methoden überwiegend auf die Genexpression konzentriert. Da sich während des Lebenszyklus der Trypanosomen (1.1.2) aber auch die Genexpression verändert [12], sollte das Proteom, welches zwischen den Zyklus-Stadien geringeren Veränderungen unterliegt [12], als Zielstruktur zunehmend in den Fokus der Forschung rücken. Brun geht davon aus, dass diagnostische Methoden des Proteoms ebenfalls teuer, geräteintensiv und in Gebieten mit geringer Infrastruktur nicht durchführbar sind [5].

1.1.4 Prävention und Therapie

Die präventiven Maßnahmen können in individuelle, Vektor-orientierte, Reservoir-orientierte und gesellschaftliche Maßnahmen unterteilt werden. Bei Privatpersonen beschränkt sich die Prävention auf die Verwendung von Repellentien, das Tragen heller Kleidung, der Verwendung von Moskitonetzen und das Meiden der Endemiegebiete [43]. In den betroffenen Regionen sind Repellentien jedoch nicht üblich, Endemiegebiete zu meiden ist für die Einwohner nicht praktikabel und leichte Kleidung kann von Tse-Tse-Fliegen durchdrungen werden [8]. Eine Chemoprophylaxe mit den gängigen Medikamenten kann wegen den toxischen und teilweise sehr schweren Nebenwirkungen nicht empfohlen werden [12, 43]. HAT-Impfungen gibt es nicht [33, 43], da die Trypanosomen durch ihre wechselnden Antigene der Immunantwort immer wieder entgehen (1.2.1). Vektor-orientierte Maßnahmen streben die Reduktion der Tse-Tse-Fliegen-Populationen und ihrer Verbreitungsgebiete an. Aerosole aus Trypanoziden werden sequenziell, in hohen Dosen und 5 Mal mit Flugzeugen über einer Fläche versprüht [8]. Im Vergleich zu den älteren toxischen Trypanoziden, wie zum Beispiel Diphenyltrichlorethan (DDT), Dieldrin oder

Endosulfan, gibt es neue synthetische Pyrethroide, wie zum Beispiel Cypermethrin oder Deltamethrin die weniger gefährlich sind [19]. Die Sterile-Fliegen-Methode eignet sich in Gebieten mit geringen Fliegen-Populationen und wird daher meistens nach dem Einsatz anderer Techniken angewendet. Bei dieser Methode werden sterile männliche Tse-Tse-Fliegen ausgesetzt um zeugungsfähige Männchen zu verdrängen und die Nachkommenschaft zu reduzieren [8]. Obwohl es mit dieser Technik gelungen ist die Glossina-Spezies auf Sansibar auszurotten, ist die Vektorbekämpfung auf dem afrikanischen Kontinent ineffektiv [19]. Mit dem Versprühen von Insektiziden mit Sprühpumpen und dem Fangen von Tse-Tse-Fliegen mit Fallen [8] können nur lokal beschränkte Flächen geschützt werden. Das Vieh mit Insektiziden zu behandeln hilft in Westafrika zwar nur gegen Nagana, in Ostafrika aber auch gegen HAT, da das Vieh für *T. b. rhodesiense* ein Reservoir darstellt [8]. Unter gesellschaftlichen Ansatzpunkten sind Maßnahmen zu verstehen, die der frühzeitigen Erkennung der HAT oder der Vermeidung von Neuinfektionen dienen. Durch Schulungen und Training erlangt die Bevölkerung Kompetenzen die Symptome der HAT zu erkennen und frühzeitig zu reagieren. Die Symptome der Nagana können durch Farmer auch bei ihren Herden früher und sicherer erkannt werden. Dies stärkt die Entscheidungsfähigkeit und Souveränität der Farmer über ihr Vieh. Darüber hinaus können Farmer ihre Tiere selbst behandeln und der unwirksame Einsatz von Medikamenten kann verringert werden [47]. Die Transmission der Trypanosomen zwischen den Säugetierwirten zu unterbinden ist bisher dennoch die erfolgreichste Kontroll-Methode [30].

Tabelle 1 HAT-Therapeutika

	<i>T. b. g.</i>	<i>T. b. r.</i>
Stadium I	1. Pentamidin	1. Suramin
Stadium II	1. NECT Melarsoprol im Rückfall 2. Eflornithin 3. Fexinidazol / Benzoxaborole	1. Melarsoprol

Die Therapie der HAT erfolgt abhängig vom Stadium und dem Erreger ([19, 44, 48], Tabelle 1). Im hämolympathischen Stadium einer Gambiense-Infektion ist Pentamidin das Mittel der Wahl. Es wird einmal täglich über 7 Tage intramuskulär gespritzt [44]. Man schätzt, dass etwa 1% der Patienten unter einer Pentamidin-Therapie an dieser sterben [8]. Der molekulare Wirkmechanismus ist bislang nicht bekannt [44]. Im fortgeschrittenen Stadium hat sich die Nifurtimox-Eflornithin-Kombinations-Therapie (NECT) durchgesetzt. Diese Therapie besteht aus der intravenösen Gabe von Eflornithin (α -Difluoromethylornithin = DFMO) und der oralen Applikation von Nifurtimox. Beide Medikamente stehen auf der WHO-Liste der unverzichtbaren Medikamente (WHO Model List of Essential Medicines) [49]. Wenn Nifurtimox nicht zur Verfügung steht, wird eine Eflornithin-Monotherapie empfohlen. Diese ist schlechter verträglich und muss 4 Mal täglich mit einer höheren Dosis über 2 Wochen gegeben werden [8, 19]. Neuere Medikamente, wie Fexinidazol oder das Benzoxaborol SCYX-7158, werden oral verabreicht und ermöglichen vielleicht eine Therapie, die unabhängig von medizinischer Infrastruktur ist [44, 48]. Fexinidazol befindet sich aktuell in einer Phase III-Studie und soll, sofern erfolgreich, Ende 2016 zur Therapie beider HAT-Stadien zugelassen werden [48]. Über Oxaborole gibt es bereits erste Erkenntnisse zur Resistenzbildung [50]. Eine Infektion mit *T. b. r.* wird im ersten Stadium mit der Gabe einer 10%-igen Suramin-Lösung [19] über eine Dauer von 30 Tagen behandelt. Suramin ist wirksam, wird aber meistens wegen starker allergischer Reaktionen und der Assoziation mit einer Onchozerkose-Koinfektion (*Onchocerca volvulus*, als Flussblindheit bekannt) gemieden [8, 44]. Da Suramin nicht ZNS-gängig ist, das heißt die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringt, bleibt die Anwendung auf das erste Stadium beschränkt [44]. Für das meningo-enzephal Stadium (Stadium II) der Rhodesiense-HAT steht nur Melarsoprol zur Verfügung. Melarsoprol ist ein Arsen-basiertes hochtoxisches Medikament nach dessen Gabe in etwa 10% eine Arsen-Enzephalopathie auftritt. Diese ist in 10-70% letal [8]. In der Schwangerschaft führt Melarsoprol zum Fetozid. Melarsoprol wirkt durch zunehmende Resistenzen nur noch in 75% der Fälle [19, 44]. Die Wirksamkeit ist auch durch die geringen Konzentrationen im ZNS eingeschränkt, die nur etwa 2% der Serum-Konzentrationen entsprechen [44]. Die gängigen

Medikamente werden nicht vermarktet [8] sondern von einzelnen Pharmafirmen (Pentamidin, Melarsoprol und Eflornithin von Sanofi-Aventis, Suramin von Beyer AG) in Kooperation mit der WHO zur Verfügung gestellt [13]. In die Entwicklung neuer Medikamente wird wenig Geld investiert, da die Pharmaunternehmen darin keinen Profit sehen.

Zum Beispiel wurde die Herstellung von Eflornithin in den 1990er Jahren aus wirtschaftlichen Gründen eingestellt. Wenige Jahre später wurde Eflornithin in einer Anti-Haarwuchs-Creme, einem Kosmetik-Produkt, wieder auf dem Markt platziert. Dies verdeutlicht, dass wirtschaftlicher Profit maßgeblich für die Verfügbarkeit von notwendigen Medikamenten ist [19]. Wie lange Melarsoprol noch für weniger als tausend Fälle pro Jahr produziert werden kann ist ungewiss [44]. Darüber hinaus sind starke Nebenwirkungen (Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, Herzinsuffizienz, Anämie, Hypertension, Hypoglykämie, periphere Neuropathien, Diarrhö, Tremor, Anaphylaxie, Urtikaria) bis hin zum Tode bekannt [44]. Die gängigen Medikamente wurden alle im 20. Jahrhundert eingeführt. Sie gelten als ultima ratio Medikamente und müssen aus diesem Grund nicht die üblichen wissenschaftlichen Standards in punkto Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit erfüllen [44]. Gerade für ländliche Gebiete, in denen keine intravenösen Therapien durchgeführt werden können, müssen Alternativen der oralen Medikation, wie zum Beispiel Fexinidazol, entwickelt und verbreitet werden [48]. Es ist offenkundig, dass es neuer, sicher, effektiver, preiswerter und einfach anwendbarer Medikamente bedarf [48]. Mit verlässlichen, sensitiven und spezifischen Techniken können die dafür notwendigen neuen Angriffspunkte identifiziert werden [12].

1.2 Auswahl wichtiger Pathogenitätsmechanismen

1.2.1 Immunescape durch Antigenvariation

Wenn Trypanosomen der metazyklischen Form (1.1.2) in den menschlichen Blutkreislauf gelangen wird durch fremde Epitope eine Vielzahl an Stoffwechsel- und Immunprozessen ausgelöst. Humanpathogene Trypanosomen besitzen an

ihrer Zelloberfläche eine Schicht mit dicht gepackten VSG-Molekülen. Dieser VSG-Mantel ist 12-15nm dick und wird, abhängig von der Quelle, mit 7×10^6 , $1,2 \times 10^7$ oder 10^8 identischen Glykoproteinen pro Zelle angegeben [19, 51, 52]. Er determiniert den Antigen-Phänotyp [53], schützt vor Komplement vermittelter Lyse [19, 54] und der Lyse durch den humanen Serum-Faktor Apolipoprotein L1 (APOL1) [44]. Glykoproteine sind Homodimere aus 400-500 Aminosäuren mit einer α -helikalen Sekundärstruktur [55], die mit einem GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker) an der Zellmembran befestigt sind [19, 56]. Diese etwa 58kDa großen [55] VSG-Moleküle werden vom Immunsystem erkannt, sodass Plasmazellen über eine T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort passende Antikörper (Ak) bilden [19]. Die Ak binden an die VSG-Moleküle und aktivieren dadurch Makrophagen, die die opsonierten Trypanosomen phagozytieren [57]. Mit einer Mutationsrate der VSG-Moleküle von 10^{-4} bis 10^{-7} pro Teilung entstehen dabei auch Trypanosomen mit verändertem Antigen-Phänotyp [19, 58]. Die VSG-Gene werden an den Chromosomenenden in sogenannten *expression sites* (ESs) transkribiert. Aus diesem Grund ist ein *expression site body*, ein stabiler RNA-Polymerase-1-Transkriptionsfaktor, mit dem Telomer assoziiert [31]. Einzelne Gene und ganze Abschnitte, die mehrere Gene enthalten, werden kopiert und reorganisieren sich in den subtelomeren Bereichen [44, 59]. Die Komplexität der VSG-Regulation ergibt sich neben den VSG *expression sites* (ESs), *ES-associated genes* (ESAGs) und *gene related ESAGs* (GRESAGs) auch durch Mechanismen der RNA-Elongation, abgestimmten Änderungen im Transkriptionsstatus zweier ESs, der Stilllegung einer ES, der Aktivierung einer ES, Rekombinationsvorgängen, DNA-Strangbrüchen, der polycistronischen Organisation und hierarchisch organisierten Austauschprozessen [31, 58-64]. Es ist zwar immer nur eines der etwa 1000 VSG-Gene aktiv, jeder Genotyp kann aber bei *T. b. g.* über 100 VSG-Moleküle und bei *T. b. r.* sogar bis zu 1000 VSG-Moleküle ausprägen [19, 58]. Etwa 30% des Genoms wird für diesen komplexen VSG-basierten Pathomechanismus in Anspruch genommen [62], wobei das VSG-Protein etwa 10% des Gesamtproteins der Zelle ausmacht [65]. Eine Impfung mit Trypanosomen-Antigenen ist wegen der gewaltigen Anzahl der VSG-Variationen und den unvorhersehbaren Geno- und Phänotypen nicht

implementierbar [63]. Zusätzlich sind die VSG-Moleküle auf der Zelloberfläche so dicht gepackt, dass sie andere invariante Oberflächenproteine überdecken [61] und somit die einzige Angriffsfläche für Ak darstellen [19]. Auch die C-terminalen Domänen der VSG-Moleküle, die durch Disulfidbrücken von drei Cystein-Überresten verhältnismäßig hoch konserviert sind, können von den Ak nicht erreicht werden [54, 56, 61].

Bei einer Infektion mit Trypanosomen werden die VSG-Moleküle durch das Immunsystem erkannt und auf diesen VSG-Typ passende Ak gebildet. Die Ak binden an die VSG-Moleküle, sodass Trypanosomen, die diesen VSG-Typ besitzen, von Makrophagen abgebaut werden können. Gleichzeitig entstehen durch Mutationen veränderte VSG-Moleküle, das heißt ein neuer Antigen-Typ. Trypanosomen die den neuen Typ tragen werden nicht mehr von den Ak erkannt und das Überleben der Trypanosomen-Population ist gesichert [54]. Durch diesen Wechsel aus Zellvermehrung und- Untergang entstehen die typischen wellenförmigen Parasitämien [19], die sich in einer periodischen Symptomatik der HAT widerspiegeln. Die charakteristische Bewegung der Trypanosomen führt zu einem hydrodynamischen Fluss der Ak-VSG-Komplexe, wodurch diese zur Flagellumtasche mitgenommen und dort endozytiert werden. Das VSG wird in der Zelle recycelt und der Ak abgebaut [54]. Die Halbwertszeit eines VSG-Typs beträgt in einer Zellpopulation etwa 30h [56]. Kommt es jedoch zu einer Störung der Zellmembran, zum Beispiel durch eine hypotone Lyse, kann der VSG-Mantel durch die GPI-spezifische Phospholipase C (GPI-PLC) innerhalb von 5 Minuten abstoßen werden [56]. Man geht davon aus, dass die Ak auf Epitope des abgestoßenen VSG-Typs gerichtet werden um eine schnelle Ak-Reaktion auf den neuen Typ zu verhindern und um das Immunsystem zu modulieren [54].

Wenn der VSG-Mantel nicht mehr abgebaut werden kann, sind die Trypanosomen der Ak-Reaktion und der komplementaktivierten Lyse des alternativen Weges ausgeliefert [66]. Somit ist der VSG-Mantel ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Die Immunantwort des Körpers wird durch den VSG-Wechsel unterlaufen und moduliert [31, 54]. Zusätzlich senken die Trypanosomen die Aktivität des Immunsystems, sodass die T-Zell-Antwort und

die T-Zell-abhängige B-Zell-Antwort im fortgeschrittenen Stadium massiv beeinträchtigt sind [19]. Diese Immunsuppression wird über den TSIF (*trypanosome-suppressive immunomodulatory factor*) vermittelt [44]. Die Ak-Produktion bleibt zwar erhalten [19], sie reicht als wichtiger Abwehrmechanismus für eine Eliminierung der Trypanosomen jedoch nicht aus. Die HAT nimmt einen chronischen Verlauf.

1.2.2 Differenzierung

Im Zellzyklus differenziert die short stumpy Form der BF-Trypanosomen in der Tse-Tse-Fliege zur prozyklischen Form (1.1.2). Bei diesem Prozess wird der VSG-Mantel (1.2.1) der Trypanosomen durch die trypanosomale *Major surface protease* B (TbMSP-B) abgebaut und durch Prozyklin-Moleküle ersetzt [30]. Man nimmt an, dass die Parasiten im Mitteldarm der Tse-Tse-Fliege durch die Prozykline vor proteolytischer Spaltung geschützt sind [30].

Zu Beginn der Differenzierung erfolgt die Hydrolyse des GPI-Ankers durch die GPI-PLC, die jedoch innerhalb kürzester Zeit durch Differenzierungsprozesse drastisch reduziert wird [65]. Parallel zu diesem Prozess wird die Expression einer Zink-Metalloprotease [67], der TbMSP-B, gesteigert. Erst dadurch kommt es zu einer wesentlichen und schließlich suffizienten Freisetzung des VSGs [40]. Die GPI-PLC ist ausschließlich in BF-Trypanosomen vorhanden [65] und ihre proteolytische Wirkung spielt nur in sterbenden Trypanosomen eine wesentliche Rolle [56]. Bei der Differenzierung von der short stumpy zur prozyklischen Form hat die GPI-PLC nur eine unterstützende Funktion. Die TbMSP-B ist für den VSG-Verlust im Zuge der Differenzierung quantitativ entscheidend [65].

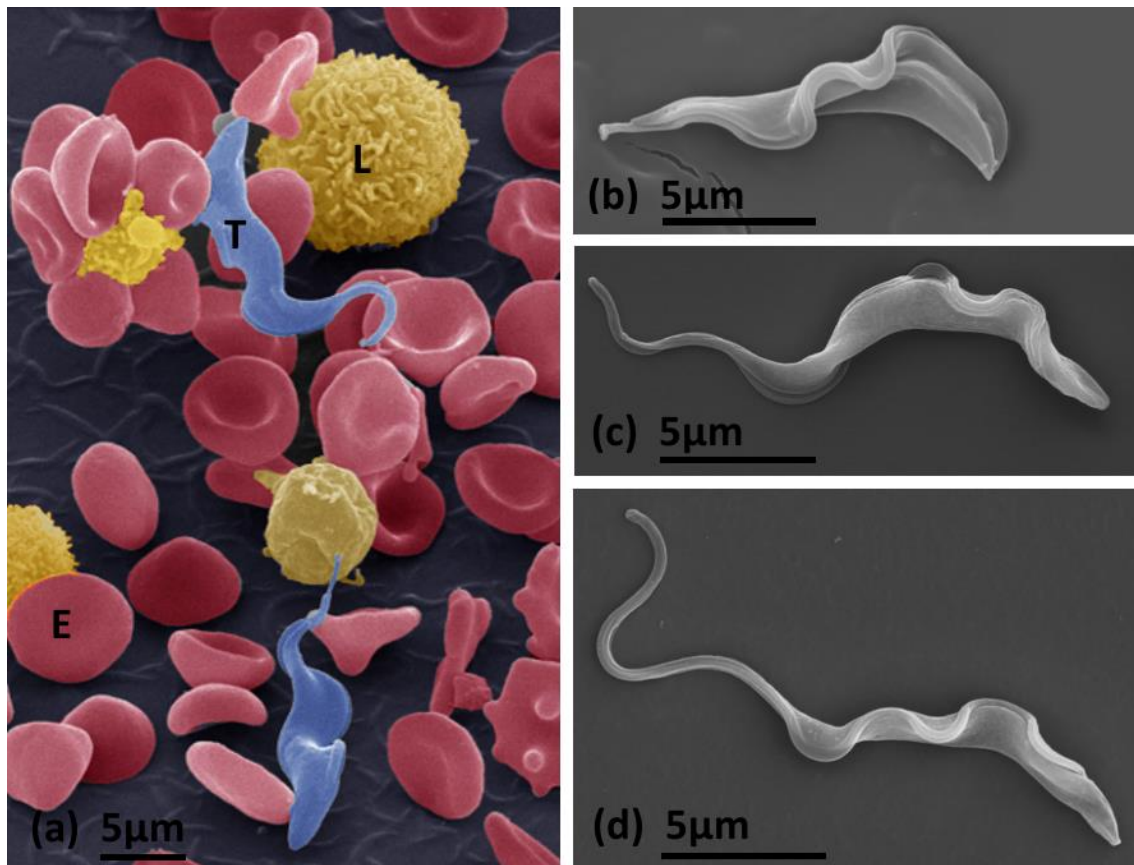


Abbildung 4: BF-Trypanosomen

REM-Aufnahmen von BF-Trypanosomen aus Blutproben (a) eingefärbte Aufnahme, E=Erythrozyt, T=Trypanosom, L=Lymphozyt, (b) short stumpy Form, (c) intermediate Form, (d) long slender Form. Die Bilder wurden freundlicherweise von Michael Duszenko zur Verfügung gestellt.

Die Regulation des VSG-Mantels ist eng mit der Differenzierungsfähigkeit der Trypanosomen verbunden. So führt zum Beispiel die Unfähigkeit zur VSG-Synthese im Tiermodell zum Zelltod und in der Kultur zu einem Wachstums-Arrest und einem Arrest der Translations-Initiation [68]. Wenn Trypanosomen ihren VSG-Mantel nicht ablegen können, führt dies zu einer reduzierten Differenzierungsfähigkeit in vitro obwohl durch einen Temperaturwechsel und die Zugabe von cis-Aconitat die Differenzierung von der short stumpy Form zur prozyklischen Form getriggert wird [30, 69]. Der erste Schritt der Differenzierung kann nicht initiiert werden [30] und der Lebenszyklus (1.1.2) kommt zum Erliegen.

1.2.3 Migration ins extravasale Gewebe

Die typische wellenförmige Parasitämie [19], die durch das Zusammenspiel aus VSG-Wechsel und Ak-Produktion entsteht (1.2.1), ist auch in Organen zu beobachten. Mit einer Verzögerung von einem Tag sind die Parasitämie-Spitzen im Liquor cerebrospinalis zu beobachten [57]. Der Weg, den die Trypanosomen in den Subarachnoidalraum und zur Pia mater nehmen, ist noch nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden ein Weg über die Blut-Liquor-Schranke, das heißt über die Gefäße des Plexus choroideus, Plexus choroideus-Stroma, Plexus-Epithel, Liquor cerebrospinalis beziehungsweise Subarachnoidalraum, Pia mater, eine alternative Abkürzung vom Plexus choroideus-Stroma direkt in die Pia mater und ein Weg über die Blut-Hirn-Schranke über zerebrale Gefäße und den Virchow-Robin-Raum zur Pia mater [70]. Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass die Trypanosomen wahrscheinlich die Blut-Liquor-Schranke durchdringen [34], da die Gefäße des Plexus choroideus im Gegensatz zu den zerebralen Gefäßen fenestriert sind [34, 70]. Das Gehirn ist durch die Blut-Hirn-Schranke sehr gut geschützt und gilt als immunprivilegiert [34]. Dennoch lösen die Trypanosomen eine intrathekale Inflammation aus [19], die mit diversen neurologischen Ausfällen und psychiatrischen Symptomen einhergeht und ohne Therapie unweigerlich zum Tod führt (1). Die Schwere der Entzündung korreliert dabei mit dem TNF- α -Spiegel [19]. Die Blut-Hirn-Schranke ist auch für manche Therapeutika nur geringfügig überwindbar, wodurch in den Leptomeningen (Pia mater) oft einige Trypanosomen verbleiben. Treten diese wieder in die Blutbahn ein kommt es zu einem Relaps und die HAT ist wieder aktiv [34].

In den Organen Leber, Herz, Hoden, Nebenhoden und Augen sind Trypanosomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen am ersten Tag nach dem ersten Zelldichtepeak im Blut zu finden [57]. Obwohl Trypanosomen durch den VSG-Mantel eine effiziente Methode besitzen der Ak-Reaktion zu entgehen, werden sie in den Organen vom Immunsystem erkannt und abgebaut [57]. Auf ihrem Weg in die Organe müssen die Trypanosomen die Basalmembranen der Blutgefäße und bei kontinuierlichen Endothelien wie der Blut-Hirn-Schranke auch diese Zellschicht überwinden. Dieser Prozess könnte durch die Metalloprotease TbMSP-B oder unspezifische Stromaproteasen ermöglicht werden [57, 71].

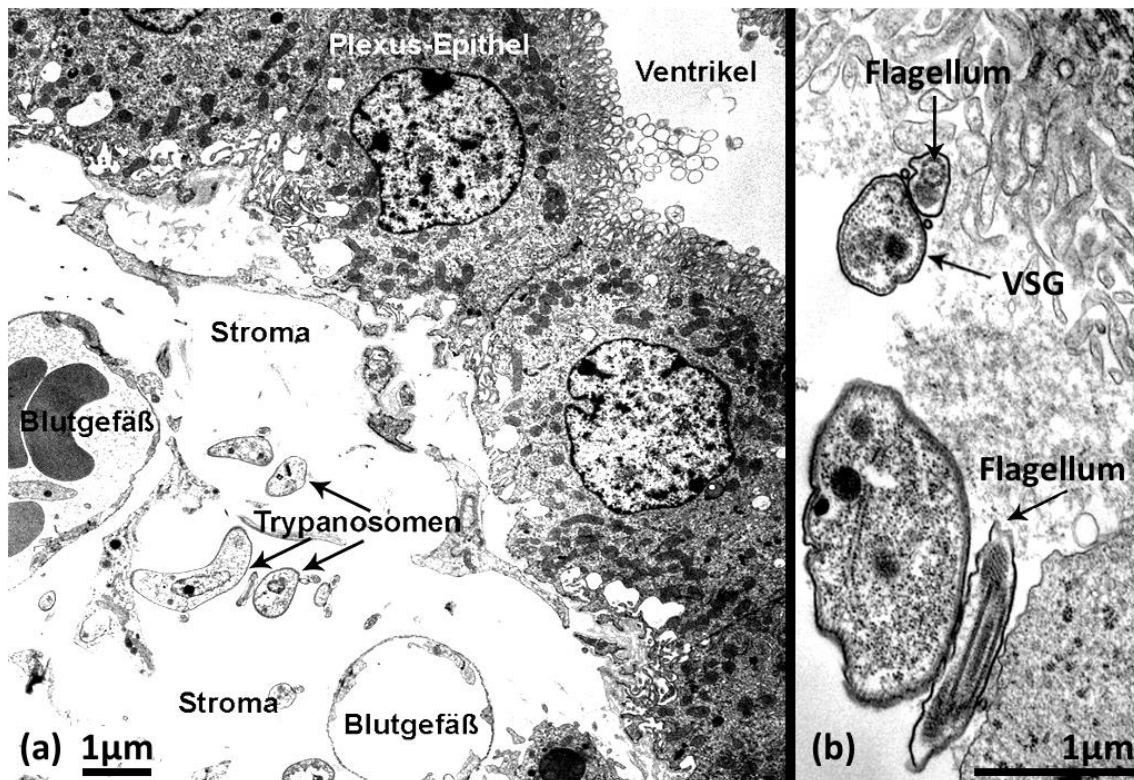


Abbildung 5: Trypanosomen im Plexus choroideus

(a) TEM-Aufnahme des Plexus choroideus, (b) TEM-Aufnahme eines mehrfach angeschnittenen Trypanosoms, beide Aufnahmen wurden von Stefan Mogk zur Verfügung gestellt.

Für den Durchtritt von Leukozyten durch die parenchymale Basalmembran, die Laminin $\alpha 1$ und $\alpha 2$ enthält, wird zum Beispiel die lokale Aktivierung der Metalloproteasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9) benötigt [72]. Im Zuge einer TbMSP-B-Aktivität könnte ein Verlust der VSG-Moleküle von der Zelloberfläche eintreten der erklären würde warum Trypanosomen unter anderem im Plexus choroideus-Stroma ohne VSG-Mantel aufgefunden werden [71] und für die Immunabwehr empfänglich sind. Ein mechanischer Verlust des VSG-Mantels beim Durchtritt durch die Basalmembran ist ebenfalls denkbar [57]. Im Gegensatz zu den bereits genannten Organsystemen sind Trypanosomen in den Hoden und im Herz, ebenso wie die der Pia mater, vital und besitzen eine reguläre Zellmorphologie [57]. Diese Tatsache ist mit dem mechanischen VSG-Verlust nicht in Einklang zu bringen.

Es liegt nahe, dass die Metalloproteasen der Trypanosomen, insbesondere die TbMSP-B, bei der Verbreitung im Wirt ausschlaggebend sein können. Unklar ist

jedoch welche TbMSP an der Invadierung welcher Organsysteme beteiligt ist. Aus diesem Grund ist es notwendig die Funktionen und Wirkweisen der TbMSPs zu verstehen. Für dieses Ziel ist grundlegende Forschung an TbMSPs unerlässlich.

1.3 Metalloproteasen

1.3.1 Funktion und Bedeutung humaner Metalloproteasen

Unter Metalloproteasen, die auch als Metalloproteinasen bezeichnet werden, versteht man eine Gruppe Kationen-abhängiger neutraler Endopeptidasen. Diese Enzyme arbeiten bei einem physiologischen pH und sind an vielfältigen Prozessen beteiligt [23]. Sie werden als inaktive Proformen, sogenannte Zymogene, sezerniert, die etwa 10kDa größer als ihre aktiven Formen sind. Durch limitierte proteolytische Spaltung werden die Zymogene in die aktiven Formen umgewandelt [23]. Die, für die Aktivität benötigten, Kationen werden in der Regel durch Zink- (Zn^{2+}) oder Calcium-Ionen (Ca^{2+}) bereitgestellt [23]. Diese sind für die Tertiärstruktur des Aktiven Zentrums, in dem das Substrat erkannt und umgesetzt wird, entscheidend. Chelatoren verändern durch Bindung an die divalenten Kationen die Konformation des Aktiven Zentrums und hemmen dadurch die enzymatische Funktion oder blockieren sie vollständig [73]. Zu den üblichen Chelatoren zählen EDTA, EGTA, Phenantroline, Tetrazykline und Tetrazyklinderivate [23, 73, 74].

MMPs haben im menschlichen Körper vielfältige Aufgaben. Sie bauen die EZM durch Proteolyse beim physiologischen Umbau von Gewebe ab, modulieren Zellwachstum, sind an der Differenzierung, der Apoptose, der Angiogenese, der Chemotaxis und der Migration von Zellen beteiligt [72, 75]. Ihre Auswirkungen werden makroskopisch zum Beispiel an der Gebärmutterinvolution im Alter und kalkbedingten Aortenstenosen erkennbar [23]. Zudem gelten MMPs als die hauptverantwortlichen Akteure bei der Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese [76]. Viele der humanen 23 MMPs sind mit Tumorprogression assoziiert [75]. Darunter finden sich Brustkrebs, Eierstockkrebs,

Bauchspeicheldrüsenkrebs, das Maligne Melanom und Magenkrebs [77, 78]. Die Expression der beteiligten MMPs (MMP-2, MMP-9, membrane-anchored metalloproteinase-1 = MT1-MMP) korreliert je nach Krebsart positiv mit Lebermetastasen, dem Stadium der Tumor-Nodus-Metastase-Klassifikation (TNM), der Invasion von Krebszellen in Gefäße und Lymphknoten, der Infiltrationstiefe maligner Zellen im gesunden Gewebe und der Infiltration in Stammzellen [78-81]. Darüber hinaus aktivieren die von Tumoren sezernierten MMPs den *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF stimuliert die Proliferation von epithelialen Zellen, ist an der Chemotaxis und der Gefäßpermeabilität beteiligt. Er erhöht die Durchlässigkeit von Blutgefäßen für Flüssigkeit, Plasmaproteine und Immunzellen. Epitheliale Zellen gelangen bei diesem ersten Angiogeneseschritt in die EZM. Da MMPs über die Aktivierung von VEGF zusätzlich die Angiogenese anstoßen [82] und diese ein wichtiger Schritt bei der Metastasierung von Krebszellen [83] darstellt, kommt den MMPs bei der Verbreitung von Krebszellen eine besondere Rolle zu.

1.3.2 Metalloproteasen der Trypanosomen

Wie die humanen MMPs sind auch die TbMSPs kationenabhängige Endopeptidasen, die bei einem physiologischen pH-Wert Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) abbauen [23]. EZM entspricht Bindegewebe und Knorpel und besteht aus Glykosamioglykanen, Peptidoglykanen, Kollagenen, Lamininen und Fibronectinen [84]. Frühere Studien zeigen, dass MMPs eine ausschlaggebende Rolle bei der Ausbreitung von Parasiten im Wirt spielen [85-88]. Durch ihre katalytischen Eigenschaften (Hydrolyse der EZM-Bestandteile und der Basalmembranen) fördern MMPs, ähnlich wie bei der Dissemination von Krebszellen, die Migration von Parasiten im Wirt. Darüber hinaus stellen sie wichtige Aminosäuren bereit [23]. In Leishmanien, sind MMPs lange bekannt.

Leishmanien sind wie Trypanosomen eukaryontische Einzeller, die im Menschen parasitär leben. Im Gegensatz zu Trypanosomen können Leishmanien nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär in Makrophagen überleben. Die *Major surface protease* (MSP) der Leishmanien ist eine auf der Zelloberfläche

gebundene Zink-MMP [89, 90] und ist auch als *glycoprotein 63* (gp63 bzw. p63), *promastigote surface protease* (PSP) oder Leishmanolysin bekannt [91]. Die MSP ist an der Zelladhäsion, dem Eindringen der Protozoen in Makrophagen [92, 93] und am Überleben der Leishmanien in Phagolysosomen von Makrophagen beteiligt [94-96]. Sie schwächt die Entzündungsreaktion des Wirtes, senkt die Translationsleistung im Wirt [91] und ist für die Resistenz gegen Komplement-medierte Lyse verantwortlich [89, 90, 97]. Die dreidimensionale Struktur der *Leishmania*-MSP, ihre Protease-Aktivität, ihre transkriptionale und posttranskriptionale Regulation und posttranslationalen Modifikationen und die unterschiedlichen Expressionsmuster der MSPs im Lebenszyklus sind ausführlich erforscht [90, 91, 98-100]. Die Lebenszyklus-abhängige Expression der MSPs wird durch spezifische Sequenzmotive der 3' *untranslated regions* (3'-UTRs) reguliert anhand derer drei Klassen an MSPs unterschieden werden können [98, 101, 102]. Eine homologe Unterteilung der MSPs findet sich in Trypanosomen, bei denen die TbMSPs (*Trypanosoma brucei Major surface proteases*) ebenfalls in die drei Genfamilien MSP-A, MSP-B und MSP-C eingeteilt werden [90]. Neben den Trypanosomatiden der *Leishmaniae* sind auch in *T.b.*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* und *Herpetomonas samuelpessoai* zellmembranassoziierte MMP-Fähigkeiten belegbar [91]. Bereits 1997 zeigte Santana, dass eine von *T.c.* sezernierte Protease das Typ I Kollagen im Mesenterium von Ratten spezifisch hydrolysiert [86]. Im selben Jahr identifizierte El-Sayed die erste TbMSP in BF-Trypanosomen [103]. Die Aktivitäten der MSPs sind, wie die der humanen MMPs, vom pH-Wert und der Umgebungstemperatur abhängig. Bei pH-Werten von 7 [23] und 8 [104] und Temperaturen von 37°C [23] sind die trypanosomalen MSPs proteolytisch aktiv. Die Voraussetzungen für eine Aktivität im Menschen sind daher optimal. TbMSPs werden durch die üblichen Chelatoren der humanen MMPs ebenfalls blockiert [23, 73, 74]. Die TbMSPs stimmen untereinander und mit der *Leishmania*-MSP zu 33% überein und sind in 20 Cysteinen, 10 Prolinen und einem Motiv mit MMP-katalytischer Funktion konserviert [90]. Innerhalb einer Genfamilie ähneln sich die MSPs verschiedener Arten der Trypanosomatiden mehr, als unterschiedliche Genfamilien innerhalb derselben Art [105]. Man nimmt daher an, dass die TbMSPs nahezu dieselbe

Sekundär- und Tertiär-Struktur haben, wie die MSPs der Leishmanien [90]. Gezielte Deletionsmutagenesen der MSP-Gene in Leishmanien zeigte, dass das Aktive Zentrum der MSPs und die Aktiven Zentren von MMPs gleich sind [91, 100]. Die TbMSP-B ist in ihrer katalytischen Funktion jedoch substratspezifischer [106]. Die Funktionen der TbMSP-A und TbMSP-C sind noch nicht identifiziert.

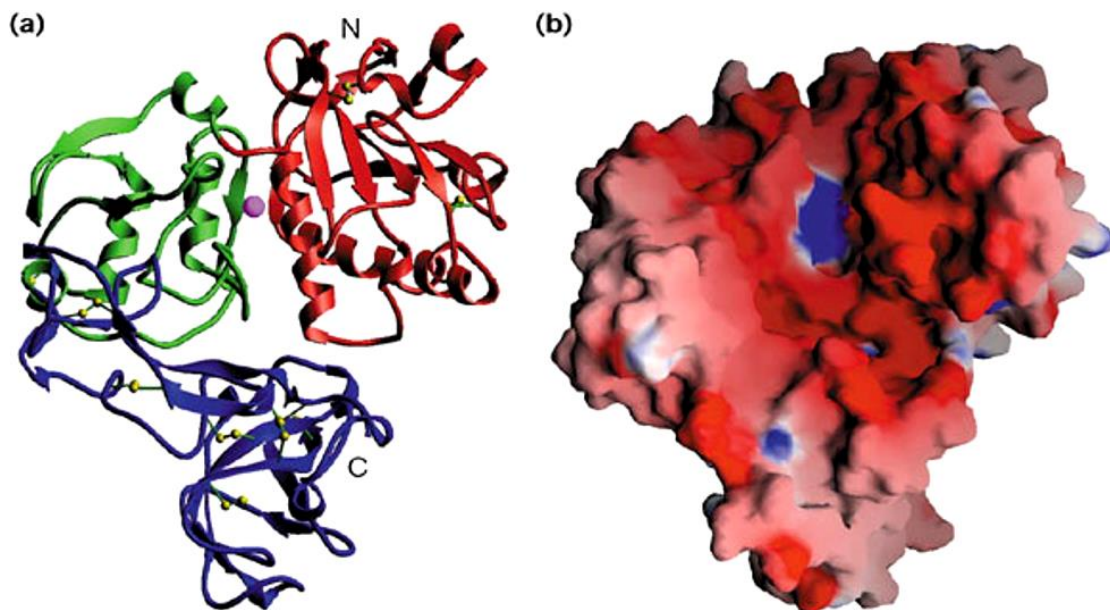


Abbildung 6: Tertiärstruktur der Leishmanien-MSP

(a) Banddarstellung mit N-Terminus = rot, zentraler Domain = grün und C-Terminus = blau, Disulfidbrücken = gelb, Zink-Atom des Aktiven Zentrums = violett (b) Darstellung der Oberfläche mit negativen Potentialen = rot und positiven Potentialen = blau [100]

Zwischen den MSPs und den MMPs bestehen einige Parallelen. Es liegt daher nahe, dass die TbMSPs ähnliche Funktionen, wie die anderer MSPs oder humaner MMPs aufweisen. Da *T.b.* im Gegensatz zu Leishmanien jedoch nicht intrazellulär leben und bei Leishmanien die MSP den Eintritt in die Wirtszelle ermöglicht, müssen für die TbMSP-A und TbMSP-C andere Funktionen in Betracht gezogen werden. Um feststellen zu können welche TbMSP in welchem HAT-Stadium, in welcher morphologischen Form und in welchem Organ verstärkt exprimiert wird und durch welche Mechanismen die Trypanosomen gewebebegängig werden, ist es von entscheidender Bedeutung grundlegende Informationen der in Frage kommenden TbMSPs zu ermitteln. Für ein

weitreichenderes Verständnis dieser Proteine, ihren Strukturen, ihren Funktionen und ihren Konzentrationen im Verlauf der HAT bedarf es einer Methode die Rückschlüsse auf die TbMSPs unabhängig von ihren Aktivitäten zulässt und die in vitro und in vivo anwendbar ist.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

TEM-Aufnahmen von *T.b.b.*-infizierten Gehirnpräparaten von Ratten zeigen Trypanosomen im Plexus choroideus, in zerebralen Blutgefäßen und in der Pia mater [57]. Ob die Trypanosomen dabei zuerst die Blut-Liquor-Schranke oder die Blut-Hirn-Schranke überwinden ist noch nicht endgültig evaluiert. In beiden Szenarien und beim Eindringen in andere Organe müssen Trypanosomen jedoch die Basalmembranen der Gefäße überwinden. Möglicherweise ist dies durch eine gesteigerte Aktivität einer trypanosomalen Metalloprotease, die die EZM destruiert und die Migration der Trypanosomen aus dem Blutgefäßsystem ermöglicht, bedingt. Dies würde auch den VSG-Verlust von Trypanosomen im Plexus choroideus-Stroma erklären [71]. Um darstellen zu können ob die TbMSP-B, welche den VSG-Mantel im Rahmen der Differenzierung abspaltet, in diesem Prozess involviert ist und verstärkt exprimiert wird, bedarf es einer Methode die unabhängig von der Enzymaktivität TbMSP-B ist. Es wird eine Methode benötigt die einfach durchführbar, sensitiv und auf andere TbMSPs übertragbar ist. Zusätzlich zur Anwendung in monomorphen, kulturadaptierten Trypanosomen sollte diese Methode auch den Einsatz in pleomorphen Trypanosomen ermöglichen, um in weiterführenden Untersuchung die Etablierung eines Tiermodells realisieren zu können. Eine geeignete Methode mit diesen Parametern zu entwickeln ist das Ziel dieser Arbeit.

2 Material & Methoden

2.1 Kultivierungstechniken von Organismen

2.1.1 Kultivierung und Selektion von *E. coli* auf solidem Nährmedium

Der chemisch kompetente *Escherichia coli*-Stamm (*E. coli*) One Shot® TOP10 und der *E. coli*-Stamm NEB Turbo (Tabelle 2) wurden auf dem soliden Nährmedium Amp-LB-X-Gal-Agar (Tabelle 4) kultiviert. Der Amp-LB-X-Gal-Agar (Tabelle 4) wurde in der Sterilbank etwa 2mm dick in Petrischalen gegossen und diese, um Kondenswasser zu vermeiden, nicht vollständig zugedeckt. Das Ampicillin wurde in 70% (v/v) Ethanol (Sigma-Aldrich, München) gelöst, das 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) wurde in Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, München) gelöst und beide Lösungen bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Die Zellsuspensionen wurden in der Sterilbank auf Amp-LB-X-Gal-Agar-Platten (Tabelle 5) pipettiert, die bei 37°C im Brutschrank vorgewärmt waren und mit einem ethanolabgeflamtem Glasspatel ausplattiert. Für die Selektion und Kultivierung von transformierten Bakterien wurden zwei bis drei unterschiedliche Volumina (20 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l) der Transformations-Suspensionen ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und im Brutschrank bei 37°C mit der Agar-Fläche nach oben 24h inkubiert. Am Folgetag wurden aus einzelnen Klonen Flüssigkulturen (2.1.2) angesetzt. Amp-LB-X-Gal-Agar-Platten wurden bei 4°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt und mit Kulturen bis zu 2 Wochen.

Tabelle 2: Prokaryontische Zelllinien

	One Shot® TOP10	NEB Turbo
Kompetenz	chemically competent <i>E. coli</i>	competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)
Hersteller	Invitrogen™, Karlsruhe	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Genotyp	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	F' proA+B+ lacIq Δ lacZ M15/ fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)Tets endA1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5

Tabelle 3: LB-Medium 2x [107]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Pepton aus Casein tryptisch verdaut	20g/l	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	10g/l	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	20g/l	Carl Roth, Karlsruhe
HCl 0,5M - 5M und NaOH 0,1M - 10M	Ad pH 7,0	Merck, Mannheim Carl Roth, Karlsruhe
Autoklavieren (Tabelle 6) und Aufbewahrung bei Raumtemperatur		

Tabelle 4: Amp-LB-X-Gal-Agar

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Agar-Agar	20g/l	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium 2x	500 ml/l	Tabelle 3
X-Gal	20mg/l	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	50mg/l	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 5: Material zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Hersteller
Sterilbank LaminAir HLD 2448 GS	Heraeus, Osterode
Petri Dish 94 x 16	Greiner bio one, Frickenhausen
Brutschrank Typ ITE 87435	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
Parafilm "M" Laboratory Film	BEMIS FLEXIBLE Packaging, Soignies, Belgien
Pipettenspitzen Universal	Greiner bio one, Frickenhausen
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturröhrchen PP Tuve sterile 12ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Schüttler DOS 10-L LTF	Labortechnik GmbH&Co.KG, Wasserburg

Tabelle 6: Material für das Autoklavieren

Bezeichnung	Hersteller
Schott Glasflaschen	Fisher Scientific, Steinheim
Comply™ Steam Indicator Tape 3M	3M, St. Paul, MN, USA
Dampfkochtopf	VAREL CS, Solingen
Heizplatte ECO2000	CASO Germany, Arnsberg

Autoklavieren

Zum Autoklavieren (Tabelle 6) wurden die Deckel der Glasflaschen mit einem Streifen Indikatorpapier versehen und unvollständig verschlossen in einen Dampfkochtopf, der 3-4cm hoch mit demineralisiertem Wasser befüllt war, gestellt. Die Heizplatte wurde auf Stufe 7 bis zum Erreichen des maximalen Drucks eingestellt, der durch einen Druckzylinder angezeigt wurde. Für mindestens weitere 40min wurde der Dampfdruck aufrechterhalten und die Sterilisation durch die Schwarzfärbung des Indikatorpapiers kontrolliert.

Verdünnungsausstriche

In der Sterilbank wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen (Tabelle 5), wellenförmig auf etwa ein Drittel einer neuen Amp-LB-X-Gal-Agar-Platte aufgetragen, mit einer neuen Pipettenspitze von der aufgetragenen Fläche Material aufgenommen und ebenfalls wellenförmig über ein weiteres Drittel derselben Platte verstrichen. Dies wurde 2-3 Mal wiederholt. Die Inkubation erfolgte wie beschrieben (siehe oben).

2.1.2 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium

LB-Kulturmedium

3ml Amp-LB-Medium aus 500ml/l LB-Medium 2x und 50mg/l Ampicillin (Tabelle 3 und Tabelle 4) wurden in einem Kulturröhrchen mit einem Klon einer Amp-LB-X-Gal-Agar-Platte oder einem etwa 2-3 mm großen Stück Stabilat (siehe unten) per Pipettenspitze und unter sterilen Bedingungen beimpft (Tabelle 5). Nach einer Inkubationsdauer von 24h auf einem Schüttler mit 225rpm im Brutschrank bei 37°C wurden die Kulturen zur Gewinnung von Plasmiden und LS und zur Herstellung von Stabilaten verwendet. Um aus der Flüssigkultur länger haltbare Kulturen mit einzelnen Kolonien zu erhalten, wurden in der Sterilbank 10µl Flüssigkultur auf Amp-LB-X-Gal-Agar-Platten (2.1.1) pipettiert und der Tropfen mehrfach mit sterilen Pipettenspitzen durchzogen.

Stabilate

Zur Herstellung von Stabilaten wurden in der Sterilbank (Tabelle 5) 9,8ml Amp-LB-Medium, bestehend aus einfachkonzentriertem LB-Medium (Tabelle 3) und 50mg/l Ampicillin (Tabelle 4), mit 0,2ml einer *E. coli*-Kultur beimpft und dadurch eine Verringerung der Zelldichte von 1:50 erreicht. Um die *E. coli*-Kulturen während der log-Phase in Stabilate überführen zu können, wurde die optische Dichte (OD) von 100µl Kultur in UV-Küvetten bei 600nm (OD600) mit dem Spektrophotometer GeneQuant gemessen (Tabelle 7). Bei OD600-Werten zwischen 0,4 und 0,8 wurden unter sterilen Bedingungen zu 700µl einer solchen Log-Phase-Kultur 300µl Glycerin 50% in einem Cryo-Röhrchen addiert, auf dem Vortex gemischt und das Cryo-Röhrchen zur Cryokonservierung sofort in flüssigen Stickstoff überführt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Material für Stabilate

Bezeichnung	Hersteller
Glycerin 50% (1260g/l)	Roth, Karlsruhe
UV-Küvetten micro 100µl	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
GeneQuant 1300	GE Health Care Europe GmbH, Freiburg
Cryo.s™ 2ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Vortex Mixer	neolab, Heidelberg
Sterilbank LaminAir HLD 2448 GS	Heraeus, Osterode

2.1.3 In-vitro-Kultivierung und Selektion von Trypanosomen

Kultivierung von Trypanosomen in vitro

BF-Trypanosomen der Art *Antwerp Trypanozoon antigen type 1.1* (AnTat1.1) und *Molteno Institute Trypanozoon antigenic type, VSG 221* (MiTat1.2, Tabelle 8) wurden in *Hirumi's modified Iscove's medium* (HMI-9-Medium, [108], Tabelle 9) axenisch kultiviert. Das Kälberserum und Serum Plus™ optimieren die Wachstumsbedingungen. Das HMI-9-Medium wurde bei 4°C bis zu 2 Monaten aufbewahrt. Die Kultivierung der Art AnTat1.1 (Tabelle 8) erfolgte in 24-Well-

Platten und zusätzlich auf 200µl semisoliden Agarose je Well ([109], Tabelle 10). Die low melting Agarose wurde dampfsterilisiert (2.1.1) und vor jeder Verwendung, wie auch das HMI-9-Medium (Tabelle 9) auf 50°C im Wasserbad erwärmt. Die Well-Platten wurden abgedeckt im Brutschrank für etwa 24h unter Kultivierungsbedingungen, bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre [110], bis zur Verwendung gelagert (Tabelle 11).

Tabelle 8: Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
AnTat1.1	Prof. Dr. Christine Clayton, ZMBH, Heidelberg
MiTat1.2 antigenic type 221	Prof. Dr. Peter Overath, MPI, Tübingen

Tabelle 9: HMI-9-Medium [111]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
IMDM Mix	890ml	Invitrogen™, Karlsruhe
Hypoxanthin1	1mM	Sigma-Aldrich, München
L-Cystein	1,5mM	Sigma-Aldrich, München
Na-Pyruvat	1mM	Carl Roth, Karlsruhe
Thymidin	0,16mM	Sigma-Aldrich, München
Bathocuproindisulfonat2	0,05mM	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol	14µl/l	Sigma-Aldrich, München
Penicillin	50mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Streptomycin	50mg/ml	Sigma-Aldrich, München
pH auf 7,4 eingestellt und steril filtriert 0,22µm (Tabelle 19)		
Fötale Kälberserum3	100ml/l	Pan Systems, Aidenbach
Serum Plus™ 4	100ml/l	SAFC, Lenexa, USA
1 in 0,1M NaOH gelöst, 2 mit wenigen Tropfen 0,5mM HCl in H ₂ O bidest. gelöst, 3 30min bei 56°C inaktiviert, 4 nicht erhitzt		

Tabelle 10: Semisoliden Agarose [109]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
HMI-9-Medium 50°C	10ml	Siehe Tabelle 10
6,5% (w/v) low melting Agarose Typ VII 50°C	1ml	Carl Roth, Karlsruhe

Ansetzten von Kulturen

Tabelle 11: Material zur Kultivierung von Trypanosomen

Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad TYP 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
24-well-Platte	Greiner bio one, Frickenhausen
Brutschrank HERA Cell	Heraeus, Osterode
Sterilbank LaminAir HLD 2448 GS	Heraeus, Osterode
Falcon-Tube 15ml, 50ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen T-12,5, T-25	Greiner bio one, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,02mm	Brand, Wertheim
Mikroskop AxioStar Plus	Zeiss, Oberkochen
Pipettor Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
serologischen Pipetten 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Invertmikroskop ID 02	Zeiss, Oberkochen

Kulturen wurden aus unmittelbar zuvor isolierten und gereinigten Trypanosomen aus in-vivo-Kulturen (2.1.4) oder aus Stabilaten unter sterilen Bedingungen angesetzt (Tabelle 11). Stabilate aus dem Stickstoff-Tank wurden unter warmem, fließendem Wasser zügig aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem HMI-9-Medium in einer Falcon-Tube suspendiert. Um das Glycerin der Stabilate auszuwaschen wurde die Zellsuspension 10min bei 4°C [111] und 3000rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (Tabelle 11). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3ml 37°C warmem HMI-9-Medium suspendiert und abhängig von der Zelldichte ggf. in einer 1:10, 1:20 oder 1:100 Verdünnung ausgezählt (siehe unten). Die Kulturen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml, in einer Kulturflasche mit Membran zum Gasaustausch bei MiTat1.2 oder auf semisoliden Agarose bei AnTat1.1 (1ml je Well), über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre [110] im Brutschrank inkubiert (Tabelle 11). Die Zelldichte wurde täglich kontrolliert und auf 2×10^5 Zellen/ml HMI-9-Medium eingestellt [108, 111].

Ermittlung der Wachstumskurven

Zur Erfassung des Wachstumverhaltens wurde 1ml HMI-9-Zellkultur in jedem Well einer 24-Well-Platte derselben Zelldichte kultiviert. Die Art AnTat1.1 wurde zusätzlich auf semisolider Agarose kultiviert ([109], Tabelle 10). Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit 3-4µl Zellkultur in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Tabelle 11) nach der in Abbildung 7 angegebenen Formel [112]. Für jede Einzelmessung wurde eine neue Well-Kultur und für jeden Messzeitpunkt wurden mindestens drei verschiedene Well-Kulturen ausgezählt. Im Abstand von 12h erfolgten täglich zwei Messungen.

$$C(\text{Tryp}) = \frac{\text{Zellen}}{A \times KF \times V}$$

Abbildung 7: Formel zur Berechnung der Zelldichte

$C(\text{Tryp})$ = Zelldichte der Trypanosomen in Zellen/µl, A = ausgezählte Fläche in mm², KF = Kammerfaktor in mm, V = Verdünnungsfaktor, nach dem Handbuch für Neubauer-Zählkammern von Brand [112]

Stabilate

Für die langfristige Aufbewahrung der Trypanosomen durch Cryokonservierung wurden Stabilate mit Trypanosomen aus in-vitro-Kulturen oder in vivo-Kulturen (2.1.4) angelegt [111]. Zunächst wurden in Cryo-Röhrchen unter sterilen Bedingungen 0,5ml Einfriermedium vorgelegt (Tabelle 7, Tabelle 11, Tabelle 13). Die Trypanosomen wurden aus HMI-9-Kulturen durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 1000rpm über 10min isoliert (Tabelle 11), anschließend in *Trypanosome dilution buffer* (TDB, Tabelle 12, [51]) resuspendiert und stets auf Eis gekühlt. Hierbei wurde die doppelte Zelldichte, als im Stabilat angestrebt, mindestens aber 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Je 0,5ml dieser Zellsuspension wurden in der Sterilbank zum Einfriermedium pipettiert, das Cryo-Röhrchen verschlossen, mehrfach invertiert und im Cryo-Safe™ Cooler (Bel-Art Products, Wayne, USA) mit -1K/min bis -80°C eingefroren und dann in Stickstoff überführt. Die Stabilate enthielten Zelldichten von 4×10^5 bis $1,1 \times 10^8$ Trypanosomen/ml.

Tabelle 12: Trypanosome dilution buffer pH7,7 [51]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
KCl	5 mM	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
NaCl	80 mM	Carl Roth, Karlsruhe
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mM	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	20 mM	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	2 mM	Carl Roth, Karlsruhe
D-Glukose	20 mM	Sigma-Aldrich, München
Sterile Filtration 0,22µm (Tabelle 19)		

Tabelle 13: Einfriermedium

Bezeichnung	Menge	Hersteller
TDB	80 ml	Tabelle 12
Glycerin (100%)	20 ml	Carl Roth, Karlsruhe

Das Antibiotika-Resistenz-Verfahren

Die elektroporierten Trypanosomen wurden unter sterilen Bedingungen in eine Kulturflasche mit 36ml vorgewärmtem (37°C) HMI-9-Medium überführt (Tabelle 11). Nach 24h Inkubation im Brutschrank mit wassergesättigter Atmosphäre, 5% CO₂ und 37°C [110] wurde Phleomycin (Tabelle 14) in einer Endkonzentration von 2,5µg/ml unter sterilen Bedingungen addiert. 1 ml dieser Kultur wurde in ein Well einer 24-Well-Platte mit einer automatischen Pipette pipettiert und die Kulturen wieder bei wassergesättigter Atmosphäre, 5% CO₂ und 37°C inkubiert [110]. Ab dem sechsten Tag wurden die Kulturen täglich unter dem Invertmikroskop (Tabelle 11) auf vitale Trypanosomen überprüft [111]. Die Art AnTat1.1 wurde zusätzlich auf semisolider Agarose kultiviert ([109], Tabelle 10). Die Toxizität von Phleomycin auf die AnTat1.1-Trypanosomen wurde mit den Konzentrationen 0,25µg/ml, 1µg/ml und 2,5µg/ml (Tabelle 14) durchgeführt. Für jede Konzentration wurden in 48 Wells 1ml einer HMI-9-Kultur mit 1x10⁶ Trypanosomen angesetzt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte zweimal täglich im Abstand von je 12h. Für jeden Messzeitpunkt wurden 3 neue Well-Kulturen überprüft.

Tabelle 14: Phleomycin

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Phleomycin 5x1ml	20mg/ml H ₂ O	Boston BioProducts, Ashland, MA, USA
Stocklösung	2,5mg/ml	

2.1.4 In-vivo-Kultivierung von Trypanosomen

Kultivierung von Trypanosomen in vivo zur Regenerierung der Stabilate

Die Kultivierung von Trypanosomen im Tiermodell diente der Aufrechterhaltung der Stabilate-Pools nativer Trypanosomen der Arten MiTat1.2 und AnTat1.1 (Tabelle 8). Ratten und Mäuse (Tabelle 15) wurden in 2-4 Tieren je Käfig gehalten und mit R7M-H Alleinfutter (ssniff Spezialitäten GmbH, Soest) gefüttert. Mäuse wurden in Käfigen vom Typ III mit Streu und Unterschlupf gehalten, Ratten in Käfigen vom Typ IV. Die Applikation von etwa 1×10^4 Zellen, erfolgte intraperitoneal mit einer 30 gauge Kanüle und einer 1ml Spritze unter Isofluran-Narkose und Aspirations-Kontrolle (Tabelle 16). Die Isofluran-Narkose wurde mit einem Verdampfer kontrolliert durchgeführt und das Tier bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins überwacht. Die Zelldichte im Blut wurde durch Schwanzspitzenbiopsien (siehe unten) regelmäßig kontrolliert. Diese erfolgten bei Ratten unter CO₂-Ultrakurzzeit-Narkose (<1min) mit einem O₂-CO₂-Gemisch von 8:2 (v/v). Aufgrund der CO₂ bedingten Vasokonstriktion erfolgte die Schwanzbiopsie bei Mäusen ohne kurzzeitige Narkose. Mit einer desinfizierten chirurgischen Schere wurde etwa 1mm der Schwanzspitze biopsiert, sodass durch Ausstreifen des Schwanzes wenige Tropfen Blut auf einer Folie aufgefangen werden konnten. Unverzüglich wurden 5µl Blut mit einer Mikropipette in ein Reaktionsgefäß mit 95µl CGA (Tabelle 17) überführt um die Blutgerinnung zu verhindern. Die dadurch erfolgte Verdünnung im Verhältnis 1:20 erleichterte die mikroskopische Auswertung mit der Neubauer-Zählkammer (2.1.3). Um die Gesundheit der Tiere zu gewährleisten wurde täglich auf das Erscheinungsbild des Fells, Gewichtsveränderungen, Aktivität, Verhalten und Vigilanz geachtet.

Tabelle 15: Tiere

Bezeichnung	Herkunft
Wistar Han™ Ratten	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande
HsdWin: NMRI Mäuse	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande

Tabelle 16: Materialien zur in-vivo-Kultivierung von Trypanosomen

Bezeichnung	Hersteller
30 gauge Kanüle	BBraun, Melsungen
Luer Lok™ Spritze 1ml	BD Biosciences®, Heidelberg
Isofluran	Sigma-Aldrich, München
Isofluran Vapor 19.1	Dräger, Lübeck
Slight curved scissor, 30mm	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Parafilm "M" Laboratory Film	BEMIS FLEXIBLE Packaging, Soignies, Belgien
Micro tube 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht

Exsanguination

Die Entnahme von Trypanosomen erfolgte bei Zelldichten $>1e^7/ml$ Blut und unter letaler Anästhesie mit 400µl Chloralhydrat 50% (w/v) bei Ratten und 400µl Chloralhydrat 10% (w/v) bei Mäusen. Die intraperitoneale Injektion unter CO₂-Ultrakurzzeitnarkose erfolgte, wie oben beschrieben, in einen der unteren abdominalen Quadranten. Es wurde abgewartet bis der Stellreflex, der Reflex auf Schmerzreize der Schwanzbasis, der Reflex auf Schmerzreize zwischen den Zehen, der Lidreflex und der Kornealreflex erloschen waren, das Herz aber noch schlug. Alle chirurgischen Werkzeuge wurden mit Ethanol 70% (v/v) (Tabelle 19) desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einer chirurgischen Schere und einer anatomischen Pinzette das thorakoabdominale Fell entfernt und anschließend, unter anheben des Sternums mit einer Klemme, durch einen kaudokranialen Schnitt im Epigastrium die Bauchhöhle eröffnet (Tabelle 11, Tabelle 19). Die Eröffnung des Thorax erfolgte durch bilaterale Schnitte, orthogonal zum Verlauf der Rippen nach kranial, sodass das Diaphragma vollständig durchtrennt wurde. Um eine vorzeitige Koagulation des Blutes zu verhindern, wurde 1ml CGA (Tabelle 17) in die thorakoabdominale Höhle mit einer sterilen Pasteurpipette gegeben. Daraufhin wurde die Vena cava inferior

mit einer feinen Schere durchtrennt und das, die thorakoabdominale Höhle ausfüllende, Blut wurde mit sterilen Pasteurpipetten unverzüglich in Falcon Tubes mit 3-4 ml CGA überführt (Tabelle 17, Tabelle 19). Für eine maximale Ausbeute wurden 10-20ml CGA mit einer und einer 17 gauge Kanüle in den linken Ventrikel des Herzens appliziert (Tabelle 19). Das Gefäßsystem wurde perfundiert bis eine deutliche Leberschwellung, Entfärbung der Leber und generalisierte, tonische Kontraktionen der Extremitäten eintraten. Das CGA-Blut-Gemisch wurde in Falcon Tubes überführt, diese verschlossen und bei 4°C, 10min mit 3000rpm zentrifugiert (Tabelle 11). Anschließend wurde der BC, in dem die Trypanosomen akkumulieren, mit möglichst wenig anderen Blutzellen abgenommen, in 10ml gekühltem Cytomix-Puffer (Tabelle 18) suspendiert und stets auf Eis gekühlt. Für die Herstellung von Stabilaten ohne weitere Aufreinigung wurde die Zelldichte und die absolute Zellzahl bestimmt (2.1.3). Die Suspension wurde bei 4°C, 10min und 3000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in TDB (Tabelle 12) aliquotiert.

Tabelle 17: Citrat-Glukose-Antikoagulanzen pH7,7 (CGA)

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Natriumcitrat	102mM	Sigma-Aldrich, München
Glukose	40mM	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 18: Cytomix pH7,6 [111, 113]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Hypoxanthin	1mM	Sigma-Aldrich, München
EGTA	2mM	Sigma-Aldrich, München
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	5mM	Sigma-Aldrich, München
HEPES pH7,6	25mM	Sigma-Aldrich, München
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH7,6	10mM	Sigma-Aldrich, München
KCl	120mM	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂ * H ₂ O	0,15mM	Sigma-Aldrich, München
Bovine Serum Albumin	100µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Glukose	0,5%	Sigma-Aldrich, München
sterile Filtration 0,22µm (Tabelle 19)		

Tabelle 19: Materialien zur Gewinnung von Trypanosomen aus Blut

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol 70% (v/v)	Sigma-Aldrich, München
Slight curved scissor 18mm, 30mm	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
anatomischen Pinzette	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Klemme 30mm	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
sterilen Pasteurpipette	Greiner bio one, Frickenhausen
Falcon Tubes 15ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Luer Lok™ Spritze 10ml	BD Biosciences®, Heidelberg
17 gauge Kanüle	BBraun, Melsungen
Filterpapier 9cm	VWR International GmbH, Darmstadt
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, München
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
Spritzenvorsatzfilter 0,22µm	Merck Millipore, Darmstadt

Aufreinigung von Trypanosomen aus Blut

Um die Trypanosomen von restlichen Blutbestandteilen zu separieren, wurde die Zellsuspension mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt [114]. Das verwendete Material inklusive des Filterpapiers wurde zuvor mit Ethanol 70% desinfiziert (Tabelle 19). Aus 70-100ml DEAE-Sephacel (Tabelle 19) wurde eine Säule auf eine doppelte Lage zurechtgeschnittenen Filterpapiers gegossen und diese, um vorhandene Reste des Regenerationspuffers (Tabelle 21) auszuwaschen, mit 50-100ml Separationspuffer (Tabelle 20) gespült. Mit einer Wasserstrahlpumpe (Tabelle 19) wurde das Waschen und Setzen des Säulenmaterials beschleunigt. Die in Cytomix suspendierten und gekühlten Trypanosomen des BCs wurden auf die Säule gegeben und mit eiskaltem Separationspuffer gespült. Bis zu 150ml des trüben Filtrats wurden in einem Auffanggefäß gesammelt, in 50ml Falcon Tubes überführt und bei 4°C und 1000rpm 10min zentrifugiert (Tabelle 11). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets suspendiert. Für die Elektroporation (2.3.3) wurden die Trypanosomen in Cytomix (Tabelle 18) und für die Herstellung von gereinigten

Stabilaten (2.1.3) in TDB (Tabelle 12) suspendiert und die Zelldichte bestimmt (2.1.3). Das DEAE wurde anschließend regeneriert (Tabelle 21) [115].

Tabelle 20: Separationspuffer pH8,0 [111]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	57mM	Sigma-Aldrich, München
KH ₂ PO ₄	3mM	Sigma-Aldrich, München
NaCl	44mM	Sigma-Aldrich, München
D-Glukose	55mM	Sigma-Aldrich, München
sterile Filtration 0,22µm (Tabelle 19)		

Tabelle 21: Regenerationspuffer pH3,0 [115]

Bezeichnung	Menge	Hersteller
NaCl	292.2g/5l	Sigma-Aldrich, München
NaN ₃	eine Spatelspitze	Sigma-Aldrich, München

2.2 Molekulargenetische Verfahren

2.2.1 Amplifizierung von Nukleinsäuren

Aufbereitung von gDNA und Plasmiden für das PCR-Verfahren

Aus *T.b.b.*, Art MiTat1.2 des Lister Strains 427, wurde genomische DNA (gDNA) mit Hilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit isoliert und aus rekombinanten *E. coli* wurden Plasmide mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit isoliert (Tabelle 22). Sowohl die gewonnene gDNA als auch die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Reinheit und die Ausbeute photometrisch bestimmt (siehe unten).

Tabelle 22: Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)	QIAGEN®, Hilden [116]
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN®, Hilden [117]
QIAGEN® Plasmid Purification Mini Kit	QIAGEN®, Hilden [118]
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN®, Hilden [119]
Omniscript® Reverse Transkription Kit	QIAGEN®, Hilden [120]
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen™, Karlsruhe [121]
QIAquick® Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN®, Hilden [122]

Primerdesign

Die Primer wurden mit dem Programm DNA Man [123] oder dem im Internet frei verfügbaren Programm Primer3 [124-126] konstruiert. Die Oligonukleotide wurden von GATC Biotech AG (Konstanz) oder Invitrogen™ (Karlsruhe) synthetisiert. Für alle Primer wurden Stammlösungen von 100µM angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Primer wurden bei Polymerasekettenreaktionen (PCRs, siehe unten) und bei Sequenzierungen (2.2.3) mit einer 1:10 Verdünnung (10 µM) der Stammlösungen eingesetzt. Die *Trypanosoma brucei gene data base* (TriTrypDB) [127, 128] diente als Referenz für trypanosomale Gensequenzen. Die Nukleotidsequenz des Subklonierungsplasmids pCR®2.1-TOPO wurde von der Addgene Vector Database [129] bezogen. Die Sequenz des Zielvektors pLEW20 wurde der Website TrypsRockefeller [130] entnommen.

Vervielfältigung der Ligations-Sequenzen (LS-B, LS-C, LS-mC)

2-4µl gDNA wurden 1:50 verdünnt. Mindestens 100µl dieses Aliquots wurden in eine UV-Küvette pipettiert und bei einem Extinktionskoeffizienten von 50 für DNA gegen eine Eichküvette im Spektrophotometer gemessen (Tabelle 7), um die Reinheit (A_{260}/A_{280} -Wert=1,8-2,0 [131]) und die Ausbeute (A_{260} -Wert=0,1-0,2) zu ermitteln. Um die LS zu generieren, wurde das PCR-Protokoll in Tabelle 24 mit den Primern aus Tabelle 40 und den Reaktionsansätzen aus Tabelle 23 verwendet. Da eine Punktmutation im Primer mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR

das Annealing erschwerte, wurde ein Touch-down-Programm [132], bei dem die Annealing-Temperatur um 1K bei jedem Zyklus gesenkt wurde, durchgeführt.

Tabelle 23: PCR-Ansatz zur Herstellung der LS

Bezeichnung	Menge	Hersteller
HotStarTaq® Master Mix	25 µl	QIAGEN®, Hilden [133]
Sense-Primer	5µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 40
Antisense-Primer	5µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 40
gDNA	2µl	
Ampuwa®	ad 50µl	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Mini Cyclor PTC-150		MJ Research, Waltham, USA
UnoCycler		VWR, Leuven, Belgien

Tabelle 24: PCR-Protokoll zur Herstellung der LS

Schritt	LS-B	LS-C	LS-mC
Heizdeckel	112°C, durchgehend		
1. Aktivierung	95°C, 15min		
2. Denaturierung	94°C, 1min		
3. Annealing	53°C, 1min	56°C, 1min	59°C, 1min, 1 Zyklus 58°C, 1min, 1 Zyklus 57°C, 1min, 1 Zyklus 56°C, 1min, 1 Zyklus 55°C, 1min, 1 Zyklus 54°C, 1min, 1 Zyklus 53°C, 1min, 1 Zyklus 52°C, 1min, 1 Zyklus 51°C, 1min, 1 Zyklus 56°C, 1 min, 20 Zyklen
4. Elongation Zyklusanzahl ab 2.	72°C, 30s 30	72°C, 1min 30	72°C, 1min insgesamt 30
5. Endelongation	72°C, 10min		
Lagerung	4°C bis zur Verwendung		

PCR-Protokolle zur Überprüfung der Transformationen in *E. coli*

Für die Colony-PCR, zur Überprüfung der Transformationen, wurden einzelne *E. coli*-Klone mit einer Pipettenspitze (Tabelle 5) aufgenommen und im PCR-Ansatz (Tabelle 25) geschwenkt. Die PCRs wurden nach den Empfehlungen des Herstellers QIAGEN® [133] für die Taq-Polymerase angesetzt und mit den Annealing-Temperaturen der entsprechenden Primer (Tabelle 41) in Thermocyclern durchgeführt (Tabelle 23).

Tabelle 25: Reaktionsansatz Colony-PCR

Bezeichnung	Menge	Hersteller
HotStarTaq® Master Mix	10 µl	QIAGEN®, Hilden [133]
Sense-Primer	1 µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 41
Antisense-Primer	1 µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 41
Template	<i>E. coli</i>	
Ampuwa®	ad 20µl	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Tabelle 26: Protokoll Colony-PCR

Schritt	LS-B	LS-C / LS-mC
Deckel	112°C, durchgehend	
1. Aktivierung	95°C, 15min	
2. Denaturierung	94°C, 1min	
3. Annealing	53°C, 1min	56°C, 1min
4. Elongation	72°C, 30s	72°C, 1min
Zyklusanzahl ab 2.	30	30
5. Endelongation	72°C, 10min	
Lagerung	4°C bis zur Verwendung	

PCR-Protokoll zu Überprüfung der Transfektionen in Trypanosomen

Da sich die NotI-linearisierten pLEW20-Vektoren in das eukaryontische Genom der Trypanosomen integrieren, wurde zunächst die genomische DNA der rekombinanten Trypanosomen isoliert (siehe oben). Das Protokoll in Tabelle 28 wurde mit den Reaktionsansätzen in Tabelle 27 und den Oligonukleotiden in

Tabelle 42 für den Nachweis der LFP-Transfektionen in Trypanosomen mit Thermocyclern (Tabelle 23) laut dem HotStarTaq® PCR Handbook [133] durchgeführt. Dieses Protokoll wurde auch bei der Kontrolle der cDNA (2.2.4) verwendet.

Tabelle 27: PCR-Ansatz zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in *T. b. b.*

Nachweis der Luciferase	Nachweis der TbAOX	Volumen	Hersteller
HotStarTaq® Master Mix	HotStarTaq® Master Mix	10 µl	QIAGEN®, Hilden [133]
se-pLEW20-Luc	se-TbAOX	1µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 42
as-pLEW20-Luc	as-TbAOX	1µl	Siehe 3.1.2, Tabelle 42
gDNA	gDNA	1µl	
Ampuwa®	Ampuwa®	ad 20µl	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Tabelle 28: PCR-Protokoll zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in *T. b. b.*

Schritt	für alle Proben
Deckel	112°C, durchgehend
1. Aktivierung	95°C, 15min
2. Denaturierung	94°C, 1min
3. Annealing	56°C, 1min
4. Elongation Zyklusanzahl ab 2.	72°C, 1min 30
5. Endelongation	72°C, 10min
Lagerung	4°C, bis zur Verwendung

2.2.2 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die Längen bestimmter Nukleinsäuren qualitativ bestätigt. Die Herstellung des 1%igen Agarose-Gels (Tabelle 30) erfolgte in einem Glas-Erlenmeyerkolben unter Erhitzen und Schwenken. 50ml Agarose-Gel wurde in die Gelkammer des Gelelektrophorese-Gerätes gegossen (Tabelle 31).

Tabelle 29: TAE-Puffer 50x pH8,0

Bezeichnung	Menge	Hersteller
TRIS	242g/l	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	37,2g/l	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	57,1ml/l	Merck Eurolab GmbH, Mannheim
pH-Wert mit Essigsäure eingestellt. Aufbewahrung bei Raumtemperatur.		

Tabelle 30: Agarose-Gel 1 %

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Agarose Standard	10g/l	Carl Roth, Karlsruhe
Midori Green Advanced	40-60µl/l	Nippon Genetics Europe, Dueren
In einfachkonzentriertem TAE-Puffer gelöst		

Tabelle 31: Materialien für die Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller
Blue Marine100	Serva Electrophoresis, Heidelberg
DNA Loading Dye 6x	ThermoScientific, St. Leon-Rot [134]
GeneRuler 1kb DNA Ladder	ThermoScientific, St. Leon-Rot [135]
des FastGene LED Transilluminator	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Dueren
Skalpell Nr. 23	BBraun, Melsungen
Micro tube 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
QIAquick® Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN®, Hilden [122]

Die Größen der Geltaschen wurden durch Verbinden der Kammborsten variiert. Das erkaltete Gel wurde auf dem Schlitten in das Gelelektrophorese-Becken platziert und das Becken, bis das Gel vollständig bedeckt war, mit einfachkonzentriertem TAE-Puffer befüllt. 20µl der Probe wurden mit 4µl DNA Loading Dye versetzt und wie die 10µl des 1kb DNA Ladders in die Geltaschen pipettiert (Tabelle 31). Die Gelelektrophorese wurde bei einem Gleichstrom von 200mA und 80 bis 90V über eine Dauer von 45 bis 60min durchgeführt und anschließend unter UV-Licht betrachtet (Tabelle 31). Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem kostenfrei und öffentlich frei verfügbaren GNU Image Manipulation Programm (GIMP [7]) im Ganzen nachkontrastiert. Für die

Weiterverwendung der Nukleinsäuren wurde die gewünschte Bande identifiziert, mit einem Einwegskalpell präpariert und in ein Reaktionsgefäß überführt (Tabelle 31). Die Aufreinigung dieser Gelstücke erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Tabelle 31). Gele, aus denen Nukleinsäuren isoliert wurden, wurden bis zu 3min belichtet.

2.2.3 Sequenzierung

Für die Sequenzierung durch GATC Biotech AG (Konstanz) wurden die Proben auf Konzentrationen von 30 bis 100ng DNA/ml verdünnt und davon 30µl in einem Reaktionsgefäß (Tabelle 31) verschickt. 2µl Primerlösung (10mM), die von GATC synthetisiert wurden (Tabelle 41), wurden addiert. An Eurofins Genomics Europe (Ebersberg) wurden 15µl der Sequenzierungsproben mit 50-100ng DNA/µl und 2µl Primerlösung (10mM) verschickt. Die Nukleotidsequenzen wurden durch das Programm BLAST®2 Sequences [136] mit Vergleichssequenzen aus den 3'UTR-, pCR®2.1-TOPO-, pLEW20-, Luciferase- und Restriktionssequenzen verglichen (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 23, 3.2.1, 3.2.3, Tabelle 32).

2.2.4 Reverse Transkription

Die aus Trypanosomen mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Tabelle 22) isolierte mRNA wurde, um durch ubiquitäre RNAsen nicht zerstört zu werden, direkt im Anschluss nach dem Handbuch des Omniscript® Reverse Transkription Kits (Tabelle 22) revers transkribiert. Unmittelbar danach wurde die erhaltene cDNA mit Hilfe des PCR-Verfahrens (2.2.1, Tabelle 28 und Tabelle 27) vervielfältigt. Als Positiv-Kontrolle für das Vorliegen von cDNA wurde die *Trypanosoma brucei* Allgemeine Oxidase (TbAOX) mit den Primern se-TbAOX und as-TbAOX nachgewiesen (Tabelle 42) [111].

2.2.5 Restriktionsverdau

Die Restriktionssequenzen der BamHI- und PstI-Enzyme wurden an die entsprechenden Primer angefügt (3.1.2). Dies erlaubte die Ligation in den

Zielvektor pLEW20 (3.2.3, 3.2.4) an den BamHI- und PstI-Erkennungssequenzen. Vor der Transfektion in Trypanosomen wurden die LFPs mit NotI linearisiert (2.3.3). Die entsprechenden Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind in Tabelle 32 aufgelistet. In Reaktionsgefäßen (Tabelle 31) wurden bis zu 2µg DNA in 20µl überverdaut (3- bis 20-fach). Für Reaktionen mit NotI wurden Ansätze mit bis zu 230µl verwendet. Für optimale Reaktionsbedingungen wurden entsprechende Puffer nach Herstellerangaben addiert (Tabelle 32) und das Reaktionsgemisch im Brutschrank (Tabelle 5) nach Herstellerangaben bei 37°C inkubiert. Vor einem zeitgleichen Verdau zweier verschiedener Enzyme in derselben Probe wurde mit dem Programm Double Digest Calculator (ThermoScientific) [137] überprüft, ob die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsenzyme miteinander kompatibel sind. Die geringere Aktivität von PstI beim Doppelverdau mit BamHI wurde mit einer Erhöhung der Konzentration um den Faktor 2 kompensiert. Alle Enzyme wurden laut Hersteller bei 80°C für 20min im Wasserbad (Tabelle 11) inaktiviert.

Tabelle 32: Enzyme und Puffer für Restriktionsverdaue

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
BamHI	5'-G / GATCC-3'	BamHI-Puffer 1x
PstI	5'-CTGCA / G-3'	Buffer O 1x
NotI	5'-GC / GGCCGC-3'	Buffer O 1x
BamHI + PstI		BamHI-Puffer 1x
Alle Enzyme von ThermoScientific, St. Leon-Rot		

2.3 Transfektion der Plasmide in *T.b.b.*

2.3.1 Herstellung der Fusions-Plasmide

Aus je 100ml *E. coli*-Flüssigkulturen (2.1.2) wurden die Plasmide pCR®2.1-TOPO und pLEW20 (Tabelle 33) mit Hilfe des Plasmid Purification Mini Kits (Tabelle 22) isoliert. Das Backbone (BB) des pLEW20 wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und PstI (2.2.5) und einer

Gelelektrophorese (2.2.2) gewonnen. Die Bande des pLEW20-BB wurde, wie in 2.2.2 beschrieben, identifiziert und aus dem Gel isoliert. Die blunt-end-Ligation der LS in den pCR®2.1-TOPO-Vektor erfolgte an der *multiple cloning site* (MCS, 3.2.1) und wurde nach dem TOPO TA Cloning® Kit (Tabelle 22) angesetzt (Tabelle 34). Die Reaktionsansätze für den Zielvektor pLEW20 (Tabelle 35) wurden nach dem Handbuch der T4 DNA-Ligase 1U/μl [138] mit einem Massenverhältnis der Ligations-Sequenzen (LS) zum Vektor von 3:1 eingestellt (Abbildung 8).

$$m(LS) = \frac{m(\text{Vektor}) \times l(LS) \times 3}{l(\text{Vektor})}$$

Abbildung 8 Formel zur Berechnung des Ligations-Ansatzes

Masse m=[ng], Länge l=[bp]

Die Inkubationsdauer für die Ligation der LS-C und der LS-mC in den Vektor pCR®2.1-TOPO nach dem Ligationsprotokoll des TOPO TA Cloning® Kit wurde von 5min auf 30min, wie für Inserts >1kb empfohlen, verlängert [121]. Um die Klonierungseffizienz zu verbessern, wurden die LFPs nach dem optimierten Reaktionsverfahren von Lund [139] hergestellt. Unter Berücksichtigung der Reaktionstemperatur der T4 DNA Ligase, wurde das Protokoll aus Tabelle 36 im Thermocycler (Tabelle 23) durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden nach entsprechender Inkubationszeit direkt für die Transformation in *E. coli* weiterverwendet (2.3.2).

Tabelle 33: Plasmide

Bezeichnung	Herkunft
pCR®2.1-TOPO	Invitrogen™, Karlsruhe
pLEW20	Theo Baltz, Bordeaux Cedex, Frankreich

Tabelle 34: Ligationsansätze der pCR®2.1-TOPO-3'UTR-Plasmide

Bezeichnung	LS-B	LS-C / -mC	Hersteller
Ligations-Sequenz	4µl	4µl	Siehe 3.1
Salt Solution	1µl	1µl	Invitrogen™, Karlsruhe
Ampuwa®	ad 5µl	ad 5µl	Fresenius Kabi, Bad Homburg
pCR®2.1-TOPO	1µl	1µl	Invitrogen™, Karlsruhe [121]
Gesamtvolumen	6µl	6µl	
Inkubationszeit bei Raumtemperatur	5min	30min	

Tabelle 35: Ligationsansätze für die Herstellung der LFPs

Bezeichnung	LS-B / LS-mC	Hersteller
Ligations-Sequenz	LS:Vektor = 3:1	Siehe 3.1
pLEW20-Luc-BB	bis 100ng	Siehe oben und Tabelle 33
10x T4 DNA Ligase Buffer	2µl	ThermoScientific, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase 1U/µl	2µl	ThermoScientific, St. Leon-Rot
Water, nuclease-free	Ad 20µl	ThermoScientific, St. Leon-Rot

Tabelle 36: Ligationsprotokoll zur Herstellung der LFPs

Schritte erstellt nach [138, 139]	alle Ansätze
1. Aktivierung der T4 DNA Ligase	22°C, 10min
2. Schritt	22°C, 60min
3. Schritt	16°C, 60min
4. Schritt	4°C, 60min
5. 6 Zyklen ab 2.	
6. Inaktivierung der T4 DNA Ligase	65°C, 10min
Lagerung	4°C, bis Verwendung

2.3.2 Transformation der Fusions-Plasmide in *E. coli*

Die Transformationen der Vektoren pCR®2.1-TOPO und pLEW20, sowie deren modifizierte Formen mit den Ligations-Sequenzen B, C und mC (pCR®2.1-TOPO-3'UTR- bzw. Luciferase-Fusions-Plasmide), in chemisch kompetente

Escherichia coli (Tabelle 2) wurde nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning® Reagents Manual (Tabelle 22) [121] durchgeführt. 1 bis 6 µl der bereits inkubierten Ligationsansätze (2.3.1) wurden in einem Reaktionsgefäß (Tabelle 31) zu 50µl einer chemisch kompetenten *E. coli*-Kultur addiert und 5min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C über genau 30s im Wasserbad (Tabelle 11) wurden die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gelagert. 250µl an 37°C warmem S.O.C-Medium (New England BioLabs, Frankfurt a.M.) wurden addiert und die Transformationsansätze auf einem Schüttler bei 225rpm, im Brutschrank bei 37°C, 1h lang inkubiert (Tabelle 5). Auf 37°C vorgewärmte Amp-LB-X-Gal-Agar-Platten wurden bis zu 300µl Transformationsansatz ausplattiert (2.1.1) und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden einzelne Klone mittels PCR (2.2.1) und Gelelektrophorese (2.2.2) überprüft.

2.3.3 Elektroporation der LFPs in *T.b.b*

Für die Transfektion der Luciferase-Fusions-Plasmide (LFPs) wurden jeweils 100ml Flüssigkultur (2.1.2) der entsprechenden rekombinanten *E. coli*-Bakterien angesetzt. Die LFPs wurden nach dem Plasmid Purification Midi Kit (Tabelle 22) isoliert und mit dem Restriktionsenzym NotI (2.2.5) linearisiert. Trypanosomen der Art MiTat1.2 wurden aus HMI-9-Kulturen durch Zentrifugation bei 1000rpm, 10min und 4°C gewonnen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 5ml Cytomix (Tabelle 18) suspendiert, die Zelldichte ermittelt (2.1.3) und durch erneutes Zentrifugieren und Suspendieren die Zelldichte von $5,7 \times 10^7$ /ml [111] in Cytomix eingestellt. Trypanosomen der Art AnTat1.1 wurden wie in 2.1.4 beschrieben isoliert und gereinigt und in Cytomix ebenfalls auf $5,7 \times 10^7$ /ml eingestellt. Laut dem Elektroporationsverfahren nach Mogk [111] wurden, für eine optimierte Transformationseffizienz, in Elektroporationsküvetten (2mm, BioRad Laboratories, München) zu 440µl Trypanosomen-Suspension ($2,5 \times 10^7$ Trypanosomen) 10µl DNA (10µg NotI-linearisierte LFPs) addiert. Die Küvetten wurden bis zur Elektroporation verschlossen auf Eis gekühlt und dann mit dem GenePulser XCell (Bio-Rad, München) nach den Protokollen in Tabelle 37 elektrischen Impulsen ausgesetzt.

Tabelle 37: Elektroporationsprotokolle

Parameter	MiTat1.2 [111]	AnTat1.1 [140]
Trypanosomen abs.	$2,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7 - 1,3 \times 10^8$
DNA	10 μ g	20-30 μ g
Volumen	450 μ l	
Pulszahl	1x	1x/2x
Spannung	1,4kV	
Kapazität	25 μ F	
Widerstand	∞	
Pulsdauer	0,3ms	
Pulsprofil	Exponentiell	

2.4 Luciferase-Assay

2.4.1 Extraktion der Luciferase

Zunächst wurden Vorkulturen mit rekombinanten Trypanosomen in HMI-9-Medium (Tabelle 9) mit 2,5 μ g/ml Phleomycin (Tabelle 14) angesetzt. Die Zelldichte wurde gemessen (2.1.3) und das Kulturvolumen, das die gewünschte Zellzahl enthielt, in ein 50ml-Falcon pipettiert und bei 1000rpm und 4°C 10min in der Kühlzentrifuge (Tabelle 11) zentrifugiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Handbuch des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (DLRAS, Tabelle 38). Der Überstand wurde verworfen und je 1×10^6 Trypanosomen in 50 μ l Lyse-Puffer des DLRAS in einem Reaktionsgefäß (Tabelle 38) suspendiert. Um für jede Einzelmessung das Zell-Lysat aus 1×10^6 Trypanosomen zu gewährleisten, wurden für 10 Messungen $1,2 \times 10^7$ Trypanosomen in 600 μ l Lyse-Puffer verwendet. Durch leichtes Schwenken und einer Inkubationsdauer von 15min auf Eis wurden die Trypanosomen lysiert und die Luciferase gelöst. Das klare Lysat wurde vom Zelldetritus durch eine Zentrifugation bei 14000rpm bei 4°C über 1min (Tabelle 38) abgeschieden, sodass durch Abnahme des Überstandes mit einer Pipette die gelöste Luciferase gewonnen wurde. Die Luciferase wurde für die Luminometrie (2.4.2) stets frisch isoliert.

Tabelle 38: Materialien für den Luciferase-Assay

Bezeichnung	Hersteller
Falcon Tube 50ml	Greiner bio one, Frickenhausen
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Mannheim [141]
Zentrifuge PICO 17	Heraeus, Osterode
Micro tube 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mehrzweckröhrchen, 4ml, runder Boden	Greiner bio one, Frickenhausen
Lumat LB 9507	EG&G Berthold Technologies, Bad Wildbad

2.4.2 Luminometrie

Die luciferinhaltige Lösung des DLRAS wurde auf Eis aufgetaut, das benötigte Volumen in ein Reaktionsgefäß (Tabelle 38) pipettiert und dieses lichtgeschützt auf Eis gestellt. 50µl Zell-Lysat (2.4.1) wurden in einem Mehrzweckröhrchen zu 50µl Luciferase Assay Buffer II des DLRAS addiert (Tabelle 38). Anschließend wurden 10µl der luciferinhaltigen Lösung addiert, zügig pipettiert und die Messung im Luminometer (Tabelle 38) sofort gestartet. Die Dauer zwischen der Zugabe der Luciferin-Lösung und dem Messzeitpunkt wurde manuell mit etwa 2s konstant gehalten. Die Messdauer betrug 2s. Gemessen wurden die emittierten Photonen der *firefly*-Luciferase als Counts.

2.4.3 Statistik

Alle statistischen Parameter und Bewertungen wurden eigenständig mit der Software Statistics Viewer der Marke SPSS [142] ermittelt und sind in Tabelle 44, Tabelle 45 und Tabelle 46 dargestellt. Frau Aline Naumann, Diplom-Statistikerin und Wissenschaftliche Angestellte des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen [143], stand bei der statistischen Analyse ausschließlich beratend zur Seite. Die Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler der Mittelwerte, Minima, Maxima und die Konfidenzintervalle für 99,9% und 95% wurden ermittelt. Die Normalverteilung der Daten wurde überprüft und durch Frau Naumann bestätigt. Frau Naumann schlug vor auf einen

t-Test und auf die Angabe der Signifikanz zu verzichten, da diese keine stärkeren Aussagen über die Relevanz von Unterschieden zuließen als Konfidenzintervalle, da keine Fallzahlberechnung vorläge.

Vor der Durchführung der statistischen Analyse mit dem Welch-Test, als Anwendung eines t-Tests bei ungleichen Varianzen, und dem one-way analysis of variances (ANOVA)-Test, als Anwendung eines t-Tests mit unabhängigen Stichproben zum Vergleich von mehr als zwei Versuchsreihen, wurden die Stichproben auf die Normalverteilung, die Unabhängigkeit und die Homoskedastizität überprüft [144]. Die Homoskedastizität wurde mit dem Levene-Test der Varianzgleichheit [145] überprüft und war nicht gegeben. Aus diesem Grund wurden nach dem ANOVA-Test zusätzliche post-tests durchgeführt: Der Dunnett-T3-Test und der Games-Howell-Test. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit p-Werten $<0,05$ gewertet. Diese wurden mit „*“ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Ligations-Sequenzen LS-B, LS-C und LS-mC

3.1.1 Identifizierung der 3'UTRs im trypanosomalen Genom

Die von Helm [146] identifizierten 3'UTR-Sequenzen der Metalloproteasen TbMSP-A, TbMSP-B und TbMSP-C unterscheiden sich in ihren Nukleotid-Sequenzen, ihren AS-Sequenzen und ihren Längen und werden durch unterschiedliche Sequenzmotive in ihrer Expression reguliert. Die Sequenz der TbMSP-A-3'UTR umfasst 870bp (grün), die TbMSP-B-3'UTR umfasst 389bp (rot), die Sequenz der TbMSP-C-3'UTR 1036bp (blau, siehe Abbildung 9). Downstream dieser Gene liegen, die durch schwarze Balken dargestellten intercoding Regions (ICR). Am jeweiligen Anfang dieser ICRs liegen die 3'UTR-Bereiche (in Abbildung 9). Über die verbleibenden Bereiche der ICRs sind bisher keine MSP-regulatorischen Funktionen bekannt. Die Länge der ICR ist auf der rechten Seite der schwarzen Balken in Basenpaaren (bp) angegeben (Abbildung 9). Die Bestimmung der 3'UTRs wurde an BF-Trypanosomen der Zelllinie T7RNAPol TetR NEO durchgeführt [146].

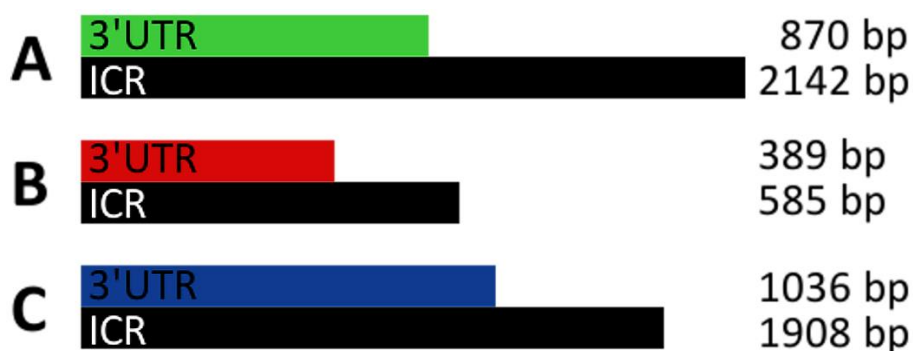


Abbildung 9: Längen der TbMSP-3'UTRs

TbMSP-A-3'UTR = grün, TbMSP-B-3'UTR = rot, TbMSP-C-3'UTR = blau, intercoding Regions (ICRs) = schwarz, Länge in Basenpaaren (bp) auf der rechten Seite, erstellt und modifiziert mit GIMP2 [7] nach Helm [146]

Darüber hinaus konnte Helm [146] eine 23bp lange Sequenz innerhalb der TbMSP-B-3'UTR identifizieren, die die Expression der TbMSP-B in BF-Trypanosomen bedeutend supprimiert. Dieser Abschnitt mit der Basenfolge 5'-UCGUCUGUUAUUUCUUAGUCCAG-3' entspricht einem Teil der *adenine and uracil rich elements* (AURE, Abbildung 10). Um den Regulationsmechanismus der TbMSP-B durch ihre 3'UTR möglichst getreu abzubilden, wurde die vollständige TbMSP-B-3'UTR verwendet. Regulatorische Sequenzmotive, die innerhalb der TbMSP-B-3'UTR aber außerhalb der 23-bp-Sequenz liegen, wurden mit dieser Methode berücksichtigt. Die regulatorische 3'UTR der TbMSP-C wurde anhand der Länge [146] und der TbMSP-C-Position im trypanosomalen Genom identifiziert (siehe unten).

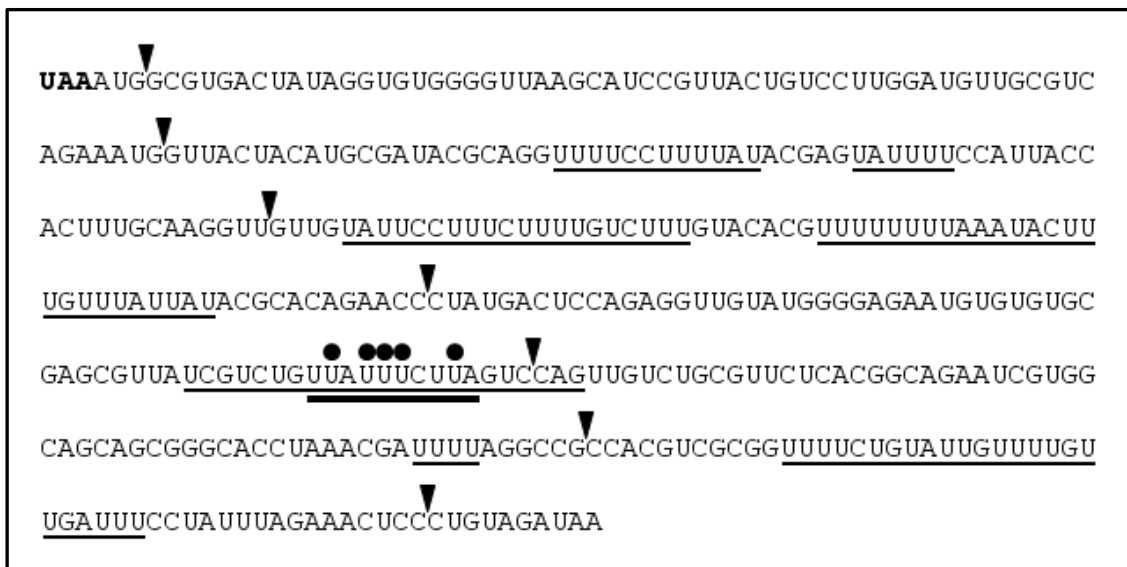


Abbildung 10: Nukleotid-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR nach Helm

Terminations-Codon („UAA“) = fett, *uracil rich elements* (URE) = unterstrichen, Dreiecke und Punkte markieren Sequenzen bzw. Basen durch deren Deletion bzw. Mutation Helm die Funktionsweise dieser Elemente in der 3'UTR analysiert hat, *adenine and uracil rich element* (AURE) = fett, erstellt mit Windows 7 Textdokument und GIMP2 [7] nach [146]

Tabelle 39: Identifizierung der TbMSP-B und TbMSP-C und ihrer 3'UTRs im trypanosomalen Genom

	Gen-ID	Position	Länge	Referenz
TbMSP-B	Tb427.08.1610	Tb427_08_v4: 537165...538910	1746bp	[128, 147]
TbMSP-C	Tb427.10.2410	Tb427_10_v5: 620973...622748	1776bp	[147]
TbMSP-B-3'UTR		Tb427_08_v4: 538911...539300	390bp	[147]
TbMSP-C-3'UTR		Tb427_10_v5: 619937...620972	1036bp	[147]

Die TbMSP wurden in der *Trypanosoma brucei* gene data base (TriTrypDB) [127, 128] im Genom des *Trypanosoma brucei* Lister strain 427 aufgesucht und ihre 3'UTR identifiziert (Tabelle 39). Beim Vergleich der von Helm identifizierten 389bp langen TbMSP-B-3'UTR mit der TriTrypDB ergab sich eine numerische Differenz in der Höhe einer Base. Zwischen den Positionen 169 und 170 der TbMSP-B-3'UTR von Helm befand sich in der Sequenz aus der TriTrypDB eine zusätzliche Thymin-Base. Für die weiteren Untersuchungen wurde die TbMSP-B-3'UTR mit 390bp aus der TriTrypDB verwendet (siehe Abbildung 11).

Die TbMSP-C wird im trypanosomalen Genom in antisense-Richtung abgelesen und ist auf entscheidende regulatorische Elemente unzureichend erforscht. Aus diesem Grund wurde ein 2500bp umfassender Abschnitt vor dem TbMSP-C-Gen mit dem Programm DNA Man [123] in eine reverse und komplementäre Sequenz übersetzt. Die TbMSP-C-3'UTR wurde auf eine Gesamtlänge von 1180bp ergänzt. Die Nukleotid-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR, die für die Klonierung verwendet wurde, ist in Abbildung 11 dargestellt, die der TbMSP-C-3'UTR in Abbildung 12. Die TbMSP-B-3'UTR und die TbMSP-C-3'UTR wurden mit BLAST®2 Sequences [136] auf die Erkennungssequenzen der für die Klonierung benötigten Restriktionsenzyme BamHI, PstI und NotI (Tabelle 32) untersucht. Die TbMSP-B-3'UTR enthält keine Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI, PstI oder NotI. Die Erkennungssequenz des BamHI-Enzyms wurde in

der Sequenz der TbMSP-C-3'UTR lokalisiert. In Abbildung 12 sind die entsprechenden Basen rot hervorgehoben.

```

1 ATGGCGTGAC TATAGGTGTG GGGTTAAGCA TCCGTTACTG TCCTTGATG TTGCGTCAGA
61 AATGGTTACT ACATGCGATA CGCAGGTTTT CCTTTTATAC GAGTATTTTC CATTACCACT
121 TTGCAAGGTT GTTGTATTCC TTTCTTTTGT CTTTGTACAC GTTTTTTTTT AAATACTTTG
181 TTTATTATAC GCACAGAACC CTATGACTCC AGAGGTTGTA TGGGGAGAAT GTGTGTGCGA
241 GCGTTATCGT CTGTTATTTT TTAGTCCAGT TGCTGCGTT CTCACGGCAG AATCGTGGCA
301 GCAGCGGGCA CCTAAACGAT TTTAGGCCGC CACGTCGCGG TTTTCTGTAT TGTTTTGTTG
361 ATTTCTTATT TAGAACTCC CTGTAGATAA

```

Abbildung 11: Nukleotid-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR aus der TriTrypDB

Darstellung der TbMSP-B-3'UTR des sense-Stranges in 5'-3'-Richtung aus der TriTrypDB [147]

```

1 ATGGTGCCAC CTCAGCTGGA TCCGCGCCTC CGTCTGGAAA GAGCAGAAAA CGCAAAGGCA
61 CTGGAGAGCA AAAAGATCCA CAGGGGAAGT GCGTAGGGAC TGGGAGGGTC CGTGCTGACT
121 TTATGTGACC GAGTTTCCAA AACTCCGGAT GTATTGCGAA GGTGCTCGGT GATGCGTAGA
181 TAAATGTACA TAATGGGGGA TGATACAACT CCGCCAGCAG CGACTGTGCA AACCTTAATC
241 TGCACGAAGC AGGCACGGG AGCTGTTGCN AGGGGTCACN GACTTACAA GCACGGGACC
301 TCGGTGCAGA AGCGAGGGGG ATTCAACATT TTAANCCCTT TAGGGGGAAT GTTGTCAAAT
361 GTGGTGAATC TCAGTGTCTT TGTGTGTTGT TTTTGNNGG GCGAGGGGTT ATGAGTGGAG
421 ATAATCCTCC CATGGAACAA TAAC TAGCAA GGCAACGTCT CNTTTATACA TTGAACCGC
481 CTGCATTAAC GTGCTGAAAG TGACGCACCT CTCTCGTAGA GGTTTCTTAA GCTAAGCTAT
541 GGGTATGAAT TATAGGACCG CAAGAAAGCA TTAGGATGTT CGAAGTGACA TAAACCCCCC
601 TTTTGCTTCT GTGGAGGATT ATNTTATTAT TATTNAAAAG CATTCAATGC TATTTGGTAAA
661 GGGTATGAAA ACCTGAAATG CCTCTCGTAG GTCGGGGGAA AGGCAGTATA CCTTTATTGA
721 TGCATTCGCT TATATTAAGT CTGAGGTAAT GACTATAAGT ACGCCTGTGG GCATTTTTGA
781 ATATAAGTTC TTGCTGNTTT TACCAATTT TCATTTGTGG GTGCCAGAAC TTTGTTTTAC
841 TGCGGTCGTG TTACACAGCA ATGCAACTAA CGTGCACATC AAAATGTGCA TGTGTGTCAG
901 GAAGGGATGC ACGAGAAATA AGAAAAAAA AACTGGAGGC ACCGGTGAAA GTTATATAGT
961 TACACTTTTG TTTTCAAGT TACGGATTGT CCATTTGCTT CTTTTTATAC CCCCTTTACA
1021 ATTTTTTTTT TTGCTC

```

Abbildung 12: Nukleotid-Sequenz der TbMSP-C-3'UTR aus der TriTrypDB

Darstellung der TbMSP-C-3'UTR komplementär und revers zum trypanosomalen Genom in 5'-3'-Richtung, Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes BamHI = rot, aus der TriTrypDB [147]

3.1.2 Konstruktion und Herstellung von Primern

Primer zur Herstellung der Ligations-Sequenzen

Die Konstruktion und Herstellung der Primer erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben. Durch die Vervielfältigung der 3'UTRs mit dem PCR-Verfahren (Tabelle 23, Tabelle 24) und unter Verwendung der Primer aus Tabelle 40, wurden die 3'UTRs um die Restriktionssequenzen der Enzyme BamHI und PstI (Tabelle 32)

verlängert. Die Restriktionssequenzen wurden dadurch Teil der entstehenden Ligations-Sequenzen (LS) und erlaubten im Zuge der Klonierung eine Ligation der 3'UTRs in den Subklonierungsvektor pCR®2.1-TOPO (3.2.2) und den Zielvektor pLEW20 (3.2.4). Die Basenzahl, der in Tabelle 40 gelisteten Primer lag zwischen 26 und 32. Um die Restriktionssequenz des Enzyms BamHI in der TbMSP-C-3'UTR (Abbildung 12) zu eliminieren, wurde der mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR-Primer (Tabelle 40) konstruiert. Dieser überlagert einen Teil der Restriktionssequenz und enthält in diesem Anteil, durch den Austausch der Base Guanin gegen die Base Adenin an der 24. Stelle des Primers, eine Punktmutation. Die angegebene Annealing-Temperatur berücksichtigt die Mutation des mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR nicht.

Tabelle 40: Primer zur Herstellung der Ligations-Sequenzen (LS-B, LS-C, LS-mC)
 bp = Basenpaar, tm = Annealing-Temperatur in °C = Grad Celsius, se = sense-Primer, as = antisense-Primer, Konstruktion nach 2.2.1 mit Primer3 [124], Herstellung durch Invitrogen™, Karlsruhe, Punktmutation des mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR = rot

Name	Sequenz	Länge	tm
Primer für Expression der TbMSP-B-3'UTR in <i>T. b.</i>			
se-BamHI-TbMSP-B-3'UTR	5'-GGATCCTAAATGGCGTGA TAGGTGT-3'	28 bp	64,1 °C
as-PstI-TbMSP-B-3'UTR	5'-CTGCAGTTATCTACAGGGAGT TTCTAAATAGG-3'	32 bp	63 °C
Primer für Expression der TbMSP-C-3'UTR in <i>T. b.</i>			
se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR	5'-GGATCCCCCTCGTCAAATGTG AATGG-3'	26 bp	65,5 °C
as-PstI-TbMSP-C-3'UTR	5'-CTGCAGAAACAAGACGAAGC CAGTCG-3'	26 bp	66,4 °C
Primer mit Mutation für Expression der TbMSP-C-3'UTR in <i>T. b.</i>			
mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR	5'-GGATCCATGGTGCCACCTCA GCTAGAT-3'	27 bp	67,7 °C
as-PstI-TbMSP-C-3'UTR	5'-CTGCAGAAACAAGACGAAGC CAGTCG-3'	26 bp	66,4 °C

Primer zu Überprüfung der Fusions-Plasmide

Für die Überprüfung der Fusions-Plasmide wurden die in Tabelle 41 aufgelisteten Primer konzipiert. Diese Oligonukleotide beinhalten keine der verwendeten Restriktionssequenzen und hatten Annealing-Temperaturen zwischen 49°C und 60°C und waren 16 bis 32bp lang. Mit den Standard-Primern M13 Forward und M13 Reverse wurde die Integration der Ligations-Sequenzen (LS-B, LS-mC) in das Subklonierungs-Plasmid pCR®2.1-TOPO kontrolliert. Die Primer GATC-se-725-pLEW20, GATC-se-1694-pLEW20, GATC-se-2781-pLEW20 und GATC-as-3238-pLEW20 wurden von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) hergestellt. Die Nummer im Namen gibt die Position des Basenpaares der pLEW20-Sequenz an, an dem die Primer in 5'-3'-Richtung beginnen. Die Primer umgeben einen Abschnitt in dem die Luciferase-Sequenz und die Restriktionsstellen BamHI und PstI liegen. Der Primer GATC-se-2781-pLEW20 lagert sich direkt an einen Teil der Luciferase-Sequenz an. Mit dem GATC-as-3238-pLEW20-Primer und einem sense-Primer wurden die Luciferase-Fusions-Plasmide (LFP = pLEW20 mit LS-B oder LS-mC) überprüft (3.2.4).

Tabelle 41: Primer zur Überprüfung der Vektoren und Fusions-Plasmide

bp = Basenpaar, tm = Annealing-Temperatur in °C = Grad Celsius, se = sense-Primer, as = antisense-Primer, Konstruktion mit Primer3 [124] und Herstellung durch GATC (2.2.1)

Name	Sequenz	Länge	tm
Primer für Sequenzierung der 3'UTRs/LS in pCR®2.1-TOPO			
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	16 bp	52,4 °C
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	17 bp	49,1 °C
Primer für Sequenzierung des pLEW20 und der LFPs			
GATC-se-725-pLEW20	5'-GGGTAAAGCGGAAAGGTG-3'	18 bp	55,7 °C
GATC-se-1694-pLEW20	5'-CGATGTACACGTTTCGTCACA-3'	20 bp	58,3 °C
GATC-se-2781-pLEW20	5'-CTTACCGGAAAACCTCGACGC-3'	20 bp	59,3 °C
GATC-as-3238-pLEW20	5'-AAACTAAATAAGAGCGGAGACTGC-3'	24 bp	59,1 °C

Primer zur Überprüfung der Transfektion

Die Primer se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc (Tabelle 42) wurden zur Bestätigung der Transfektionen, von Luciferase-Fusions-Plasmiden (LFPs) in Trypanosomen, entwickelt. Der se-pLEW20-Luc-Primer bindet 30bp vor dem Luciferase-Gen. Der Primer as-pLEW20-Luc lagerte sich direkt an einen Teil der Luciferase-Sequenz an und initiierte eine PCR daher nur, wenn das Luciferase-Gen vorhanden war. Mit den Oligonukleotiden se-TbAOX und as-TbAOX (Tabelle 42) wurde das Gen der *Trypanosoma brucei* Alternativen Oxidase (TbAOX) amplifiziert. Die Alternative Oxidase wird in Trypanosomen konstitutiv exprimiert [111]. Der Nachweis der TbAOX-Sequenz, nach einer Isolierung von mRNA und reverser Transkription in cDNA (2.2.4), diente als Positiv-Kontrolle für den qualitativen Nachweis von mRNA, wodurch falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten.

Tabelle 42: Primer zur Überprüfung der LFP-Transfektionen in Trypanosomen

Bp = Basenpaar, tm = Annealing-Temperatur in °C = Grad Celsius, se = sense-Primer, as = antisense-Primer, Konstruktion von se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc mit Primer3 [124] und Herstellung durch Invitrogen™ (2.2.1), se-TbAOX und as-TbAOX von Stefan Mogk [111]

Name	Sequenz	Länge	tm
Primer für Nachweis der LFP-Transfektionen in Trypanosomen			
se-pLEW20-Luc	5'-TTCTTGAATGTCGCTCGCAG-3'	20 bp	58,9 °C
as-pLEW20-Luc	5'-GGACTTTCCGCCCTTCTTG-3'	19 bp	58,4 °C
Primer zum Nachweis der TbAOX [111]			
se-TbAOX	5'-AAACGGCCTCGTTGATACAC-3'	21 bp	60°C
as-TbAOX	5'-TGCTGAGGTTCCAGTACACG-3'	21 bp	60°C

3.1.3 Herstellung der Ligations-Sequenzen

Aus einer HMI-9-Kultur (2.1.3) mit MiTat1.2-Trypanosomen wurde, wie in 2.2.1 beschrieben, genomische DNA isoliert. Es wurden etwa 1µg DNA mit einer Konzentration von 9,7ng DNA/µl in hoher Reinheit (A260/A280-Wert = 1,83) eluiert. Durch die Verwendung von Primern, die um die Restriktionssequenzen

der Enzyme BamHI und PstI ergänzt wurden, entstanden durch die PCR verlängerte 3'UTRs, die Ligations-Sequenzen B, C und mC (LS-B, LS-C und LS-mC). Die Vervielfältigung der 3'UTRs (2.2.1) gestaltete sich für die Primer se-BamHI-TbMSP-B-3'UTR und as-PstI-TbMSP-B-3'UTR, als auch für die Primer se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR und as-PstI-TbMSP-C-3'UTR problemlos. Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese (2.2.2, Abbildung 13), zeigte die Ligations-Sequenzen B, C und mC. Um die Basenpaarlängen der Banden abschätzen zu können, wurde der 1kb DNA Ladder GeneRuler (2.2.2) verwendet. Für die Gelelektrophorese wurde 45min lang ein Gleichstrom bei 200mA und 80V angelegt. Dadurch entstanden deutliche Banden (Abbildung 13) mit Längen von 350 bis 450bp für die Ligations-Sequenz der TbMSP-B-3'UTR (LS-B), von 1000 bis 1300 für die Ligations-Sequenz der TbMSP-C-3'UTR (LS-C) und von 1000 bis 1250bp für die Ligations-Sequenz der TbMSP-C-3'UTR mit mutiertem Primer (LS-mC).

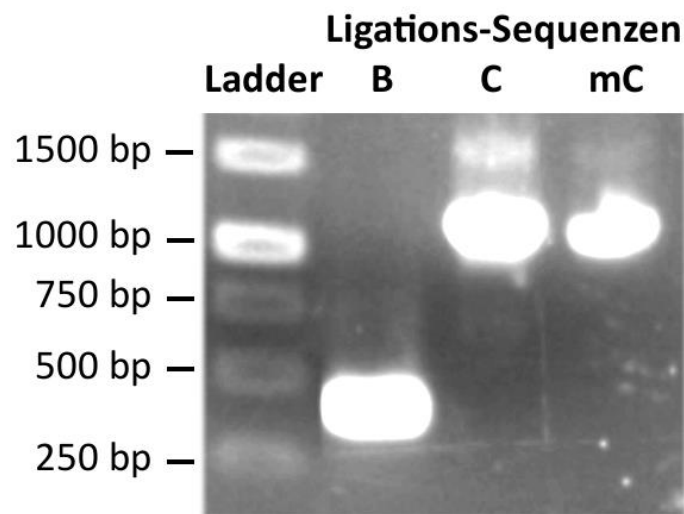


Abbildung 13: Herstellung der Ligations-Sequenzen LS-B, LS-C und LS-mC

Herstellung unter Verwendung von trypanosomaler gDNA bei 200mA, 80V, 45min, Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], B = LS-B, C = LS-C, mC = LS-mC, Durchführung nach 2.2.2

Die Bande der LS-mC stellte sich mit bloßem Auge unter UV-Licht schwächer, als die Banden der anderen Ligations-Sequenzen, dar. Dies war den schlechteren Anlagerungsbedingungen des mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR-Primers geschuldet, der durch eine Punktmutation (3.1.2) zum entsprechenden

Abschnitt der genomischen DNA nicht mehr vollständig komplementär war. Um ausreichende Mengen der LS-mC für die Klonierung zu erhalten, wurden die LS-mC-Nukleinsäuren nach der Touch-down-PCR (2.2.1) und der Gelelektrophorese (2.2.2) aus dem Agarose-Gel isoliert und als Template einer weiteren PCR verwendet.

3.1.4 Sequenzierung der Ligations-Sequenzen

Die Sequenzierungen der LS wurden im Zuge der Überprüfung der pCR®2.1-TOPO-3'UTR-Plasmide, mit den Primern M13 Forward und M13 Reverse nach der in Abschnitt 2.2.3 angegebenen Prozedere, durchgeführt. Die Überprüfung auf Mutationen erfolgte somit nach der Konstruktion der Subklonierungsvektoren (3.2.2) und nach der Transformation in *E. coli* (2.3.2). Für die Variablen B, C und mC wurden jeweils mehrere Klone auf ihre Sequenzen überprüft. Davon ist für jede Variable jeweils nur ein Resultat in den folgenden Abbildungen (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16) angegeben. Diese zeigen in den mit „Soll“ beschrifteten Zeilen die Sequenz aus der TriTrypDB (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12). Sofern die ermittelte Basenabfolge mit der erwarteten Sequenz übereinstimmte, wurden keine weiteren Angaben gemacht. Unterschiede im Vergleich zum „Soll“ sind rot markiert. Die rote Base darunter gibt das Ergebnis der Sequenzierung an. Basen, die in der Soll-Sequenz aus der TriTrypDB unbestimmt waren, sind mit einem „N“ bezeichnet und grün hervorgehoben. Die Annealing-Positionen der Primer, die zur Herstellung der entsprechenden Ligations-Sequenz verwendet wurden, sind durch einen schwarzen Unterstrich hervorgehoben (Tabelle 40). Die Positionen der Primer, die bei der Sequenzierung eingesetzt wurden, sind in den Grafiken nicht angegeben. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben und in Blöcke von 10bp unterteilt. Auf der linken Seite befindet sich die Nummerierung. Sie gibt die Position der linksseitig stehenden Base an. Abbildung 14 zeigt die Nukleotid-Sequenz der LS-B, die mit Hilfe des PCR-Verfahrens aus Trypanosomen der Art *MiTa1.2* generiert wurde. Aus diesem Grund ist die Sequenz, im Vergleich zu der Sequenz in Abbildung 11, um die verwendeten Primer *se-BamHI-TbMSP-B-3'UTR* und *as-PstI-TbMSP-B-3'UTR* verlängert (schwarz unterstrichen). An den

Basenpositionen mit den Nummerierungen 52, 60 und 94 liegen nicht die erwarteten Basen vor (rot markiert). Der gesamte vervielfältigte Abschnitt umfasst 405 Basenpaare. Durch den Verdau der Restriktionsenzyme verkürzt sich die Gesamtlänge des Sense-Stranges um 2, die des Antisense-Stranges um 10 Basenpaare.

```

So11  1  GGATCCTAAA  TGGCGTGACT  ATAGGTGTGG  GGTTAAGCAT  CCGTTACTGT  CCTTGGATGT
So11  61  TGCCTCAGAA  ATGGTTACTA  CATGCGATAC  GCAGGTTTTTC  CTTTTATACG  AGTATTTTCC
So11 121  ATTACCACTT  TGCAAGGTTG  TTGTATTCTT  TTCTTTTGTC  TTTGTACACG  TTTTTTTTTA
So11 181  AATACTTTGT  TTATTATACG  CACAGAACCC  TATGACTCCA  GAGGTTGTAT  GGGGAGAATG
So11 241  TGTGTGCGAG  CGTTATCGTC  TGTTATTTCT  TAGTCCAGTT  GTCTGCGTTC  TCACGGCAGA
So11 301  ATCGTGGCAG  CAGCGGGCAC  CTAACGATT  TTAGGCCGCC  ACGTCGCGGT  TTTCTGTATT
So11 361  GTTTTGTTGA  TTTCCTATTT  AGAAACTCCC  TGTAGATAAC  TGCAG

```

Abbildung 14: Sequenzierung der LS-B

Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz, mit den Primern M13 Forward und M13 Reverse, Positionen der Primer se-BamHI-TbMSP-B-3'UTR und as-PstI-TbMSP-B-3'UTR = schwarz unterstrichen, Mutationen = rot, in 5'-3'-Richtung abgebildet

Die Ligations-Sequenzen der TbMSP-C-3'UTR sind in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt. Abbildung 15 zeigt die Ligations-Sequenz, die mit den Primern se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR und as-PstI-TbMSP-C-3'UTR hergestellt wurde. Sie bestand aus 1110bp. Die natürlich enthaltene BamHI-Erkennungssequenz war darin noch enthalten. Sie ist blau hervorgehoben und liegt an den Stellen 40 bis 45. An 7 Stellen entsprach das Sequenzierungsergebnis nicht der zu erwartenden Base. Dies betraf die Positionen 33, 197, 419, 844, 910 und 953 bis 955 (rot). Berücksichtigt man den Basenverlust, der durch die natürliche BamHI-Restriktionsstelle entsteht, muss man einen zusätzlichen Verlust von 24bp kalkulieren. Insgesamt ergaben sich daraus für die in Abbildung 15 dargestellte LS-C 31 Mutationen. Die unbestimmten Basen an den Stellen 293, 303, 358, 420, 485, 646, 658 und 820 waren auch in allen anderen LS-C-Klonen (nicht dargestellt) und LS-mC-Klonen (ein Klon ist in Abbildung 16 dargestellt) vorhanden.

So11	1	<u>GGATCCCCCT</u>	<u>CGTCAAATGT</u>	<u>GAATGGTGCC</u>	ACCTCAGCTG	GATCCGCGCC	TCCGTCTGGA
So11	61	AAGAGCAGAA	AACGCAAAGG	CACTGGAGAG	CAAAAAGATC	CACAGGGGAA	GTGCGTAGGG
So11	121	ACTGGGAGGG	TCCGTGCTGA	CTTTATGTGA	CCGAGTTTCC	AAAACCTCCG	ATGTATTGCG
So11	181	AAGGTGCTCG	GTGATGCGTA	GATAAA-TGT	ACATAATGGG	GGATGATACA	ACTCCGCCAG
So11	241	CAGCGACTGT	GCAAACCTTA	ATCTGCACGA	AGCAGGGCAC	GGGAGCTGTT	GCNAGGGGTC
So11	301	ACNGTACTTA	CAAGCACGGG	ACCTGCGTGC	AGAAGCGAGG	GGGATTCAAC	ATTTTAA ^N CC
So11	361	CTTTAGGGGG	AATGTTGTCA	AATGTGGTGA	ATCTCAGTGT	CTTTGTGTGT	TGTTTTTT ^G N
So11	421	GGGGCGAGGG	GTTATGAGTG	GAGATAATCC	TCCCATGGAA	CAATAACTAG	CAAGGCAACG
So11	481	TCTCN ^T TTTTAT	ACATTCTGAAC	CGCCTGCATT	AACGTGCTGA	AAGTGACGCA	CCTCTCTCGT
So11	541	AGAGGTTTCT	TAAGCTAAGC	TATGGGTATG	AATTATAGGA	CCGCAAGAAA	GCATTAGGAT
So11	601	GTTCGAAGTG	ACATAAACCC	CCCTTTTGCT	TCTGTGGAGG	ATTATN ^T TAT	TATTATT ^N AA
So11	661	AAGCATTCAA	TGCTATTGGT	AAAGGGTATG	AAAACCTGAA	ATGCCTCTCG	TAGGTCGGGG
So11	721	GAAAGGCAGT	ATACCTTTAT	TGATGCATT	GCTTATATTA	AGTCTGAGGT	AATGACTATA
So11	781	AGTACGCCTG	TGGGCATTTT	TGAATATAAG	TTCTTGCTGN	TTTTACCCAA	TTTTCATTTG
So11	841	TGG ^G TGCCAG	AACTTTGTTT	TACTGCGGTC	GTGTTACACA	GCAATGCAAC	TAACGTGCAC
So11	901	ATCAAAATGT	GCATGTGTGT	CAGGAAGGGA	TGCACGAGAA	ATAAGAAAAA	AAA ^A ACTGGA
So11	961	GGCACCGGTG	AAAGTTATAT	AGTTACACTT	TTGTTTTTCA	AGTTACGGAT	TGTCCATTTG
So11	1021	CTTCTTTTTA	TACCCCTTTT	ACAATTTTTT	TTTTTGCTCT	TGAAGATGGT	GGTTGCTACC
So11	1081	ATCGCGACTG	GCTTCGTCTT	GTTTCTGCAG			

Abbildung 15: Sequenzierung der LS-C

Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz mit den Primern M13 Forward und M13 Reverse, die Positionen der Primer se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR und as-PstI-TbMSP-C-3'UTR = schwarz unterstrichen, Mutationen = rot, Deletionen = rote Querstriche, nicht überprüfbare Positionen = grün, natürliche BamHI-Restriktionssequenz = blau, in 5'-3'-Richtung abgebildet

Abbildung 16 zeigt die LS-mC die an Position 24 im BamHI-Palindrom Adenin statt Guanin besitzt. Die Sequenz ist 1093bp lang und besitzt neben der Punktmutation der BamHI-Erkennungssequenz (blau) 9 weitere Mutationen (rot). Damit besitzt die LS-mC mit 10 Mutationen wesentlich weniger Veränderungen, als die LS-C mit 31 (inklusive des Basenverlustes durch die BamHI-Restriktionssequenz bei einem enzymatischen Verdau). Drei der LS-mC-Klone wurden sequenziert und miteinander verglichen. Die in Abbildung 16 dargestellte

Sequenz besaß unter diesen die geringste Anzahl an Modifikationen und wurde aus diesem Grund für die Herstellung der Fusions-Plasmide verwendet.

So11	1	<u>GGATCCATGG</u>	<u>TGCCACCTCA</u>	<u>GCTAGATCCG</u>	CGCCTCCGTC	TGGAAAGAGC	AGAAAACGCA
So11	61	AAGGCACTGG	AGAGCAAAAA	GATCCACAGG	GGAAGTGCCT	AGGGACTGGG	AGGGTCCGTG
So11	121	CTGACTTTAT	GTGACCGAGT	TTCCAAAAC	CCGGATGTAT	TGCGAAGGTG	CTCGGTGATG A
So11	181	CGTAGATAAA	TGTACATAAT	GGGGGATGAT	ACAACCTCCG	CAGCAGCGAC	TGTGCAAACC
So11	241	TTAATCTGCA	CGAAGCAGGG	CACGGGAGCT	GTTGCNAGGG	GTCACNGTAC	TTACAAGCAC
So11	301	GGGACCTGCG	TGCAGAAGCG	AGGGGGATTC	AACATTTTAA	NCCCTTTAGG	GGGAATGTTG
So11	361	TCAAATGTGG	TGAATCTCAG	TGTCCTTGTG	TGTTGTTTTT	TGNGGGGCGA	GGGGTTATGA
So11	421	GTGGAGATAA	TCCTCCCATG	GAACAATAAC	TAGCAAGGCA	ACGTCTCNTT	TATACATTCG
So11	481	AACCGCCTGC	ATTAACGTGC	TGAAAGTGAC	GCACCTCTCT	CGTAGAGGTT	TCTTAAGCTA C
So11	541	AGCTATGGGT	ATGAATTATA	GGACCGCAAG	AAAGCATTAG	GATGTTCGAA	GTGACATAAA
So11	601	CCCCCTTTT	GCTTCTGTGG	AGGATTATNT	TATTATTATT	NAAAAGCATT	CAATGCTATT
So11	661	GGTAAAGGGT	ATGAAAACCT	GAAATGCCTC	TCGTAGGTCG	GGGGAAAGGC	AGTATACCTT
So11	721	TATTGATGCA	TTCGCTTATA	TTAAGTCTGA	GGTAATGACT	ATAAGTACGC	CTGTGGGCAT
So11	781	TTTTGAATAT	AAGTTCTTGC	TGNTTTTACC	CAATTTTCAT	TTGTGGGTGC	CAGAACTTTCG
So11	841	TTTTACTGCG	GTCGTGTTAC	ACAGCAATGC	AACTAACGTG	CACATCAAAA	TGTGCATGTG
So11	901	TGTCAGGAAG	GGATGCACGA	GAAATAAGAA	AAAAAAACT	GGAGGCACCG	GTGAAAGTTA
So11	961	TATAGTTACA	CTTTTGTTTT	TCAAGTTACG	GATTGTCCAT	TTGCTTCTTT	TTATACCCCC
So11	1021	TTTACAATTT	TTTTTTTTC	TCTTGAAGAT	GGTGGTTGCT	ACCATCGCGA	CTGGCTTCGT
So11	1081	<u>CTTGTTTCTG</u>	<u>CAG</u>				

Abbildung 16: Sequenzierung der LS-mC

Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz mit den Primern M13 Forward und M13 Reverse, die Positionen der Primer mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR und as-PstI-TbMSP-C-3'UTR = schwarz unterstrichen, Mutationen = rot, Deletionen = roter Querstrich, nicht überprüfbare Positionen = grün, Punktmutation in der BamHI-Restriktionssequenz = blau, in 5'-3'-Richtung abgebildet

3.2 Herstellung 3'UTR-tragender Plasmide

3.2.1 Konstruktion der pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide

Eigenschaften des Subklonierungsvektors pCR®2.1-TOPO

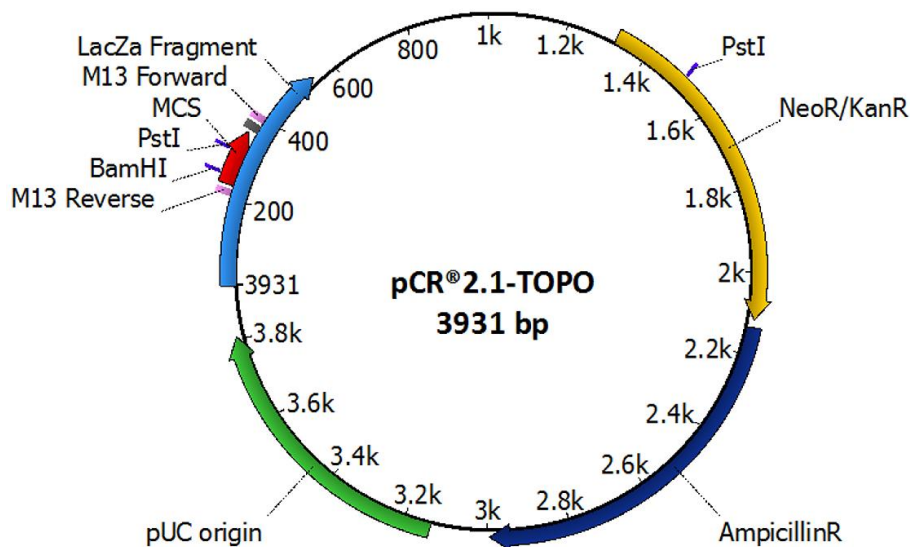


Abbildung 17: pCR®2.1-TOPO

NeoR/KanR = Neomycin-/Kanamycin-Resistenzgen (gelb), AmpicillinR = Ampicillin-Resistenzgen kodiert für eine β -Laktamase (dunkelblau), pUC origin = origin of replication (grün), M13 Reverse = antisense-Primer und M13 Forward = sense-Primer (Tabelle 41, pink), BamHI und PstI = Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsenzyme (Tabelle 32, violett), LacZ α Fragment = kodiert für β -Galaktosidase (hellblau), MCS (rot), T7 Promoter (grau), erstellt mit den Angaben aus [121] und [129] mit UGENE [148, 149].

Der Subklonierungsvektor benötigt mindestens ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum, das in Prokaryonten abgelesen wird. Durch die Resistenz des pCR®2.1-TOPO gegen Ampicillin (Basenpaare 2131 bis 2991), konnten alle Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, überleben, während nicht-transformierte Bakterien bei einer Konzentration von 50 μ g/ml untergingen. Das Ampicillin-Resistenz-Gen wurde durch die T7-Polymerase der *E. coli*-Bakterien transkribiert. Der pCR®2.1-TOPO besaß mit dem lacZ α -Gen eine Möglichkeit positive Klone von negativen Klonen makroskopisch an der Farbe zu unterscheiden. Der pCR®2.1-TOPO-Vektor wurde linearisiert geliefert und besaß an der MCS, die die Basen 234 bis 357 umfasst, einen Überhang aus

Desoxythymidin (T). Diese *sticky ends* erleichterten die Integration der LS-B, der LS-C und der LS-mC in den Subklonierungsvektor (2.3.1).

Der pCR®2.1-TOPO-Vektor hatte eine Länge von 3931bp. Dadurch besaßen die Fusions-Plasmide, bestehend aus dem pCR®2.1-TOPO-Plasmid und einer Ligations-Sequenz, eine Länge von 4336 bp für die LS-B, eine Länge von 5041 bp für die LS-C und eine Länge von 5024 bp für die LS-mC. Abbildung 18 zeigt einen Ausschnitt des pCR®2.1-TOPO. Die Insertionsstelle der LS lag zwischen den Basen der Stellen 294 und 295.

So11	1	AGCGCCCAAT	ACGCAAACCG	CCTCTCCCCG	CGCGTTGGCC	GATTCATTAA	TGCAGCTGGC
So11	61	ACGACAGGTT	TCCCGACTGG	AAAGCGGGCA	GTGAGCGCAA	CGCAATTAAT	GTGAGTTAGC
So11	121	TCACTCATT	GGCACCCCAG	GCTTTACTACT	TTATGCTTCC	GGCTCGTATG	TTGTGTGGAA
So11	181	TTGTGAGCGG	ATAACAATTT	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCC AAGCTTG
So11	241	GTACCGAGCT	CGGATCCACT	AGTAACGGCC	GCCAGTGTGC	TGGAATTCGC	CCTT/AAGGGC
So11	301	GAATTCTGCA	GATATCCATC	ACACTGGCGG	CCGCTCGAGC	ATGCATCTAG	AGGGCCCAAT
So11	361	TCGCCCTATA	GTGAGTCGTA	TTACAATTCA	CTGGCCGTCG	TTTTACAACG	TCGTGACTGG
So11	421	GAAAACCCTG	GCGTTACCCA	ACTTAATCGC	CTTGCAGCAC	ATCCCCCTTT	CGCCAGCTGG
So11	481	CGTAATAGCG	AAGAGGCCCG	CACCGATCGC	CCTTCCCAAC	AGTTGCGCAG	CCTGAATGGC

Abbildung 18: Nukleotid-Sequenz des pCR®2.1-TOPO

Insertionsstelle der Ligations-Sequenzen = roter slash, MCS = fett, Primer M13 Forward und M13 Reverse = unterstrichen, in 5'-3'-Richtung abgebildet, Sequenz aus Addgene Vector Database [129]

3.2.2 Herstellung der pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide

Überprüfung der Fusions-Plasmide mittels Gelelektrophorese

Nach der Ligation der 3'UTR-tragenden LS in den pCR®2.1-TOPO (2.3.1) und der Transformation in *E.coli* (2.3.2), wurden die Ampicillin-resistenten Klone aufgrund ihrer Blaufärbung identifiziert (3.2.1) und kultiviert (2.1.1), um mit Hilfe des Colony-PCR-Verfahrens (2.2.1) und der Gelelektrophorese (2.2.2) die Ligation zu bestätigen und die Sequenzen zu überprüfen. Um ein falsch-positives Ergebnis durch Kontamination auszuschließen, zum Beispiel durch das Wiederaufnehmen ausplattierter Nukleinsäuren, wurden die Fusions-Plasmide erneut aus Flüssigkulturen isoliert und die LS durch die Restriktionsenzyme BamHI und PstI (2.2.5) vom pCR®2.1-TOPO-Gerüst getrennt. Die darauffolgende Gelelektrophorese bestätigte die Ergebnisse der ersten Gelelektrophorese. Hierfür wurden die Fusions-Plasmide erneut aus

Flüssigkulturen isoliert und die LS durch die Restriktionsenzyme BamHI und PstI (2.2.5) vom pCR®2.1-TOPO-Gerüst getrennt. Auch in diesem Fall wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Aufnahmen dieser Gele sind in Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Die Gelelektrophorese nach der Colony-PCR ist jeweils mit „PCR“, die Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau ist mit dem Zusatz „Verdau“ gekennzeichnet. Als Vergleichsmarker diente der als „Ladder“ bezeichnete GeneRuler 1kb DNA Ladder von ThermoScientific [135]. Die an den Bildseiten angegebenen Basenpaarlängen beziehen sich auf den „Ladder“. In den Abbildungen ist die Laufrichtung der Nukleinsäuren stets von oben nach unten angegeben. Daher ist die Anode (Minuspol) am oberen Bildrand und die Kathode (Pluspol) am unteren Bildrand vorzufinden.

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse für die Gelelektrophoresen nach der Colony-PCR und nach dem Restriktionsverdau eines Klons der LS-B-Klonierung mit dem Vektor pCR®2.1-TOPO (Tabelle 33) in One Shot® TOP10 *E. coli*-Bakterien (Tabelle 2) exemplarisch dar. Die Klonierung wurde mit 6µl des Ligations-Ansatzes (2.3.1) und 750µl SOC-Medium (2.3.2) modifiziert durchgeführt. Alle 5 randomisiert gewählten Klone wiesen in der gelelektrophoretischen Überprüfung das gleiche Resultat, wie der exemplarisch dargestellte Klon der Abbildung 19 auf. Die Banden der LS-B-Klone (Abbildung 19) lagen zwischen 350 und 450bp.

Diese Ergebnisse stimmten mit der zu erwartenden Basenpaarlänge von 405 bp (Abbildung 14) sehr gut überein. Gele die nach dem Restriktionsverdau erstellt wurden wiesen keine entsprechenden Banden auf. Stattdessen zeigte sich eine Bande zwischen 4000 und 5000bp. Dennoch wurde an der Stelle, der erwarteten Basenpaarlänge von etwa 405bp, ein Stück aus dem Agarose-Gel der „Verdau“-Gelelektrophorese, nach dem Protokoll in 2.2.3, isoliert und sequenziert. Überprüft wurden die Ligations-Stellen der LS-B im pCR®2.1-TOPO (siehe unten) sowie die LS-B-Nukleotid-Sequenz (3.1.4).

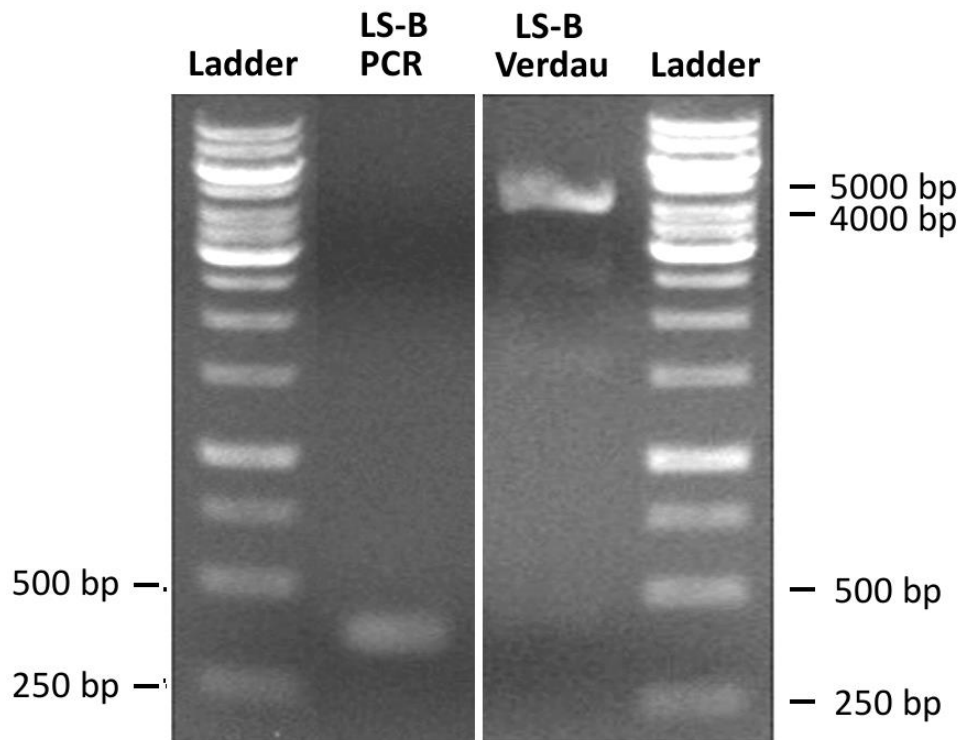


Abbildung 19: Gelelektrophorese der LS-B aus *E. coli*

Ergebnis nach Colony-PCR = LS-B PCR, Ergebnis nach dem Restriktionsverdau = LS-B Verdau, Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

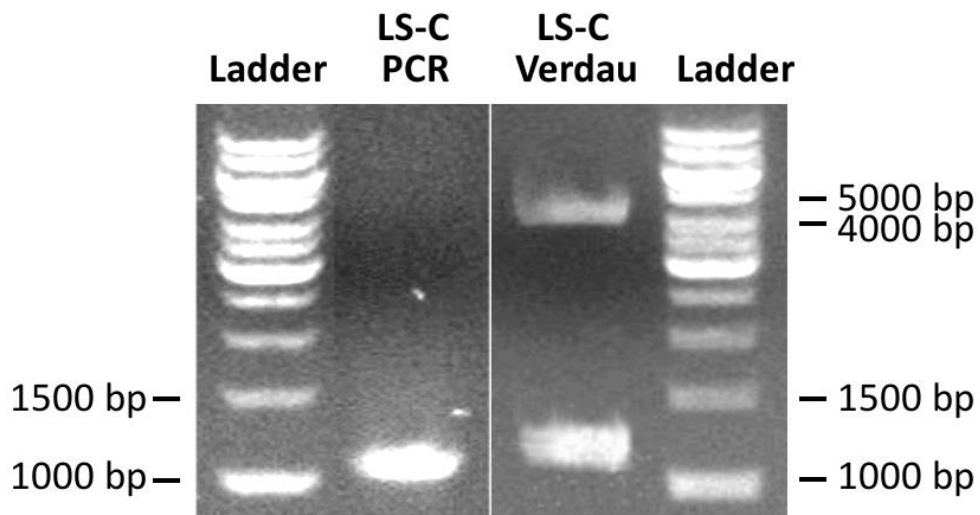


Abbildung 20: Gelelektrophorese der LS-C aus *E. coli*

Ergebnis der Colony-PCR = LS-C PCR, Ergebnis nach dem Restriktionsverdau = LS-C Verdau, Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Die Klonierung der LS-C mit dem Vektor pCR®2.1-TOPO (Tabelle 33) in One Shot® TOP10 *E. coli*-Bakterien (Tabelle 2) wurde mit 6µl Ligations-Ansatz (2.3.1) durchgeführt. Zwei der Klone ergaben bei den Gelelektrophoresen „PCR“ und „Verdau“ die Ergebnisse in Abbildung 20. Die Gelelektrophorese „PCR“ wies Nukleinsäuren mit Längen zwischen 1100 und 1200bp und damit eine Bande auf. Die Länge der LS-C mit 1110bp ist in dieser Bande wiederzufinden. Die Gelelektrophorese „Verdau“ weist zwei Banden auf, von denen die untere Nukleinsäuren mit 1100 bis 1350bp enthält. Die LS-C liegt mit ihrer Länge in dieser Bandbreite. Die zweite Bande beinhaltet Nukleinsäuren zwischen 4000 und 5000bp. Aus den Agarose-Gelen der „Verdau“-Gelelektrophoresen wurden die Nukleinsäuren der 1100- bis 1350bp-Banden nach dem Protokoll in 2.2.3 isoliert und sequenziert. Überprüft wurden die Ligations-Stellen der LS-C im pCR®2.1-TOPO (siehe unten) sowie die LS-C-Nukleotid-Sequenz im Vergleich zur NCBI Datenbank (3.1.4).

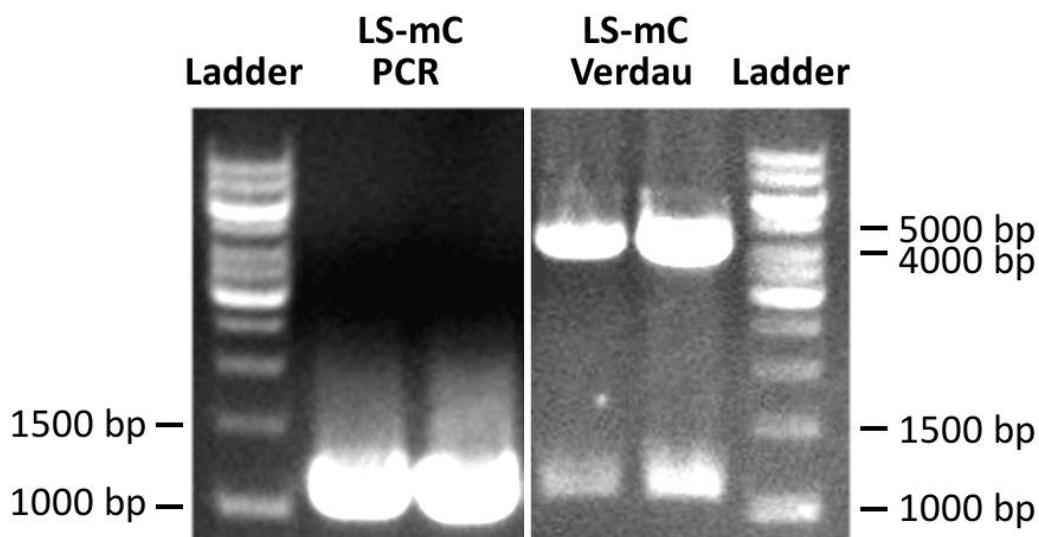


Abbildung 21: Gelelektrophorese der LS-mC aus *E. coli*

Ergebnis der Colony-PCR=LS-mC PCR, Ergebnis nach dem Restriktionsverdau = LS-mC Verdau, Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse von zwei Klonen der LS-mC-Klonierung mit dem Vektor pCR®2.1-TOPO (Tabelle 33). Da mit Bakterien der Art One Shot® TOP10 keine Klone erzielt wurden, erfolgte die Klonierung mit NEB Turbo *E. coli*-

Bakterien (Tabelle 2). Die Inkubationszeit für die Ligations-Reaktion (2.3.1) wurde auf 30min verlängert. Darüber hinaus wurden 6µl Ligations-Ansatz (2.3.1) für die Transformation verwendet (2.3.2). Für die LS-mC wurden ebenfalls mehrere Kolonien getestet. Deutliche Banden mit einer Länge von 1000 bis 1200bp lassen vermuten, dass die LS-mC, die eine Länge von 1093bp besitzt, erfolgreich in den pCR®2.1-TOPO ligiert war (Abbildung 21).

Überprüfung der Fusions-Plasmide mittels Sequenzierung

Für die in der Gelelektrophorese auf LS-B, LS-C und LS-mC positiv getesteten Klone (siehe oben) wurden die pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide erneut aus *E. coli*-Flüssigkulturen isoliert und sequenziert (2.2.3). Die Sequenzierungen bestätigten, dass die Ligations-Sequenzen (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16) zwischen den Basenpaaren 294 und 295 des pCR®2.1-TOPO, an der MCS (Abbildung 18), korrekt eingebaut waren.

3.2.3 Konstruktion der Luciferase-Fusions-Plasmide

Eigenschaften des pLEW20

Das Plasmid pLEW20 [130] wurde freundlicherweise von Théo Baltz (Université Victor Segalen, Bordeaux, Frankreich) zur Verfügung gestellt und trägt das *firefly*-Luciferase-Gen. Die Plasmid-Karte in Abbildung 22 ist auf wichtige, für die Klonierung relevante, Elemente vereinfacht und zeigt die Abfolge und Leserichtung der Gene. Die Erkennungssequenz des NotI-Enzyms lag im Sequenzbereich des rRNA Spacers (3.2.3) und ermöglichte durch Linearisierung des Plasmids die Integration in das trypanosomale Genom.

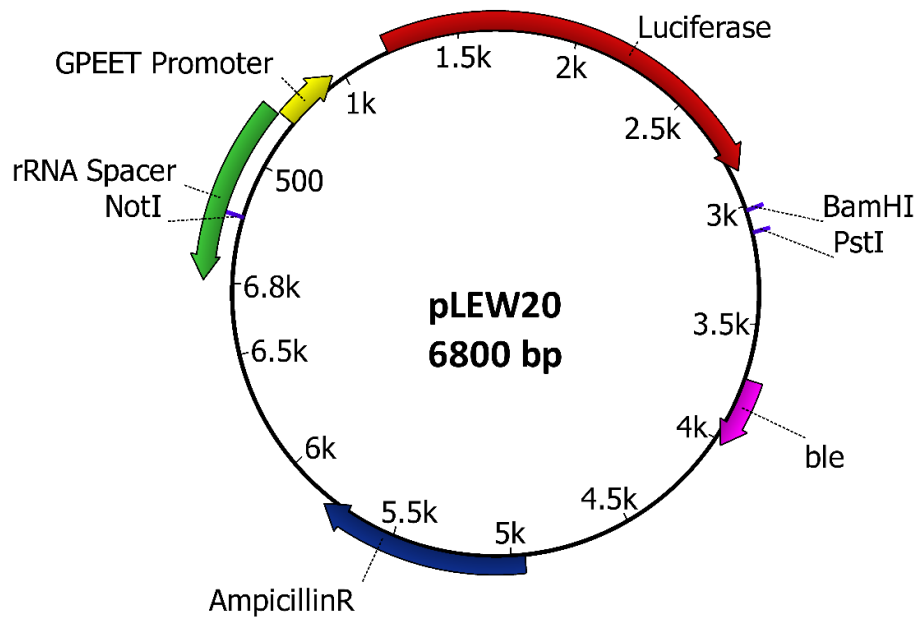


Abbildung 22: pLEW20

ble = Bleomycin-Resistenzgen befähigt zur Phleomycin-Resistenz (violett), AmpicillinR = Ampicillin-Resistenzgen kodiert für eine β -Laktamase (dunkelblau), rRNA Spacer auf komplementärem Strang (grün), Luciferase = Gen der *firefly*-Luciferase (rot), GPEET Promoter steuert das *ble*-Resistenzgen und das Luciferase-Gen (gelb), Tetrazyklin-Operatoren nicht dargestellt, aus TrypsRockefeller [130] modifiziert und erstellt mit UGENE [148, 149]

Der rRNA Spacer wurde in 3'-5'-Richtung abgelesen und ist daher mit einem gegenläufigen Pfeil (grün) markiert. Die LS, die zwischen die Erkennungssequenzen der Enzyme BamHI und PstI (lila) ligiert wurden und damit am 3'-Ende der Luciferase-Sequenz lagen, regulierten die Transkription der Luciferase-Sequenz im selben Maße, wie die entsprechende 3'UTR ihrer Metalloprotease im trypanosomalen Genom. Mit diesem Prinzip wurde die Expression der Metalloprotease auf die Luciferase abgebildet. Die Luciferase wurde im pLEW20, wie das *ble*-Gen, durch den GPEET Promoter (gelb) gesteuert. Das Ampicillin-Resistenzgen (AmpicillinR, dunkelblau) kodiert für eine β -Laktamase und wird in prokaryontischen Organismen exprimiert. Das *ble*-Gen (pink) wird in eukaryontischen Organismen exprimiert. Der Organismus wird durch Expression dieses Gens gegen Antibiotika der Bleomycin-Familie resistent. Für die Selektion rekombinanter Trypanosomen wurde das Antibiotikum Phleomycin verwendet, welches zur Gruppe der Bleomycin-Antibiotika zählt.

Nukleotid-Sequenz des pLEW20

Der pLEW20-Vektor wurde, wie in 2.2.3 dargelegt, zunächst sequenziert und anschließend, nach dem in 2.3.2 beschriebenen Protokoll, in *E.coli* transformiert. Die Sequenzierung wurde mit den Primern GATC-se-725-pLEW20, GATC-se-1694-pLEW20, GATC-se-2781-pLEW20 und GATC-as-3238-pLEW20 (Tabelle 41) durchgeführt. Mit dem Programm BLAST®2 Sequences [136] wurde das Sequenzierungsergebnis mit der von TrypsRockefeller [130] bereitgestellten pLEW20-Sequenz (Abbildung 23) verglichen, um so die Position der Luciferase zu bestätigen. Das Luciferase-Gen lag, wie erwartet, zwischen der 1205. und 2859. Position des pLEW20 und war damit durch die Basenpaare 1206 bis 2858 definiert. Insgesamt bestand das Luciferase-Gen aus 1653bp. Die gesamte Nukleotid-Sequenz des pLEW20 umfasste 6800 bp. Eine Deletion des Nukleotids 1738 konnte bei einer erneuten Sequenzierung nicht bestätigt werden. In Abbildung 23 ist ein Ausschnitt der pLEW20-Sequenz abgebildet, die aus TrypsRockefeller [130] entnommen ist. Die linksseitige Nummerierung entspricht der Nummerierung von TrypsRockefeller und dient als Referenz für die Sequenzen der Luciferase-Fusions-Plasmide (LFPs). Das Luciferase-Gen ist in der Abbildung 23 fett hervorgehoben. Die Restriktionssequenzen der Enzyme BamHI und PstI (Tabelle 32), die für die Ligation der Ligations-Sequenzen benötigt wurden, sind rot hervorgehoben. Die Sequenzierung mit den GATC-Primern (siehe oben) deckte die Basen 778 bis 3186 ab.

241	ACGGAGATCA	TCGTATCATT	TTTATCGATA	GCGGCCGC TA	TCGATGTATG	CCTTGGCCCT
301	GATGGCATGC	CAATTTCACT	ACAACGGACT	ATGTGGACCC	CGTTATCATG	GAAATGCGCT
361	AGTTGGAGGA	AGTTAGACCG	CGCCGGAAAA	GAGAGGGGTA	GAGAAAATGA	CAACTTGGAA
421	GATATCCACA	CACGCACGGT	GAAACGTTAG	CAACAATTAT	TAGGGAAGCA	CGCTTGCCT
481	AGTCCCACGA	GTAACCAAGA	CTCCAAAAGC	CTTTCTGGCA	CAGAGAGCGA	GCCGAAAATGG
541	AAAAGAGAAA	CAATGCCTGC	ACTAACACTA	CTGAGCGATT	CGCCTCGCCG	CGGAGGACCG
601	AATACTAATA	ACGACACTTG	CGGTCAAAAA	GTAGAAGAAC	AAATGCTCAA	CGATGAGTGA
661	ATCAGGTTAG	GGTAGTTGGA	AAATATATA	GAATGTCTTT	GGCAACACAC	CGGTACCGTC
721	ATTGGGGTTA	<u>AGCGGAAAGG</u>	<u>TGTGTGTCAG</u>	TAGGTTGTGA	GGTGAAAAGCG	TTTTCAGATG
781	CATAGTGAGC	TTAATGTCTT	TTTACAGTA	TATCGTGTCT	GATAGGTATC	TCTTATTAGT
841	ATAGTCGAAT	ACTAGTCAAT	AGTGCCTTTT	GTGCAAAATG	TCCATTTTGT	GGCAGTGATG
901	GGGTTGTTTT	ATGCTATTCC	GTGTCTCTGG	GTGGGCGTGC	ATTGAAAATA	GGGGTTATCG
961	GGTAGGGATC	TCCCTATCAG	TGATAGAGAT	CTCCCTATCA	GTGATAGAGA	TCCCTGAGTA
1021	CTGAGTTTAA	CATGTTCTCG	TCCCGGGCTG	CACGCGCCTT	CGAGTTTTTT	TTCCTTTTCC
1081	CCATTTTTTT	CAACTTGAAG	ACTTCAATTA	CACCAAAAAG	TAAAATTCAC	AAGCTTGGAA
1141	TTCCTTTGTG	TTACATTCTT	<u>GAATGTCGCT</u>	<u>CGCAGTGACA</u>	TTAGCATTCC	GGTACTGTTG
1201	<u>GCAAAAATGA</u>	<u>AGACGCCAAA</u>	<u>AACATAAAGA</u>	<u>AAGGCCCGGC</u>	<u>GCCATTCTAT</u>	<u>CCTTAGAGG</u>
1261	<u>ATGGAAACCG</u>	<u>TGGAGAGCAA</u>	<u>CTGCATAAAG</u>	<u>CTATGAAGAG</u>	<u>ATACGCCCTG</u>	<u>GTTCCTGGAA</u>
1321	<u>CAATTGCTTT</u>	<u>TACAGATGCA</u>	<u>CATATCGAGG</u>	<u>TGAACATCAC</u>	<u>GTACGCGGAA</u>	<u>TACTTCGAAA</u>
1381	<u>TGTCCGTTTC</u>	<u>GTTGGCAGAA</u>	<u>GCTATGAAAC</u>	<u>GATATGGGCT</u>	<u>GAATACAAAT</u>	<u>CACAGAATCG</u>
1441	<u>TCGTATGCAG</u>	<u>TGAAAACCTC</u>	<u>CTTCAATTCT</u>	<u>TTATGCCGGT</u>	<u>GTTGGGCGCG</u>	<u>TTATTTATCG</u>
1501	<u>GAGTTGCAGT</u>	<u>TGCGCCCGCG</u>	<u>AACGACATTT</u>	<u>ATAATGAACG</u>	<u>TGAATTGCTC</u>	<u>AACAGTATGA</u>
1561	<u>ACATTTGCGA</u>	<u>GCCTACCGTA</u>	<u>GTGTTTGTTT</u>	<u>CCAAAAGGGG</u>	<u>GTTGCAAAA</u>	<u>ATTTTGAACG</u>
1621	<u>TGCAAAAAAA</u>	<u>ATTACCAATA</u>	<u>ATCCAGAAAA</u>	<u>TTATATCAT</u>	<u>GGATTCTAAA</u>	<u>ACGGATTACC</u>
1681	<u>AGGGATTTC</u>	<u>GTCGATGTAC</u>	<u>ACGTTCTGTC</u>	<u>CATCTCATCT</u>	<u>ACCTCCCGGT</u>	<u>TTTAATGAAT</u>
1741	<u>ACGATTTTGT</u>	<u>ACCAGAGTCC</u>	<u>TTTGATCGTG</u>	<u>ACAAAACAAT</u>	<u>TGCACTGATA</u>	<u>ATGAATTCCT</u>
1801	<u>CTGGATCTAC</u>	<u>TGGGTTACCT</u>	<u>AAGGTGTGG</u>	<u>CCCTCCGCA</u>	<u>TAGAACTGCC</u>	<u>TGCGTCAGAT</u>
1861	<u>TCTCGCATGC</u>	<u>CAGAGATCCT</u>	<u>ATTTTTGGCA</u>	<u>ATCAAATCAT</u>	<u>TCCGGATACT</u>	<u>GCGATTTTAA</u>
1921	<u>GTGTTGTGTT</u>	<u>ATTCCATCAC</u>	<u>GGTTTTGGAA</u>	<u>TGTTTACTAC</u>	<u>ACTCGGATAT</u>	<u>TTGATATGTT</u>
1981	<u>GATTTGAGT</u>	<u>GCTCTTAATG</u>	<u>TATAGATTTG</u>	<u>AAGAAGAGCT</u>	<u>GTTTTTACGA</u>	<u>TCCCTTCAGG</u>
2041	<u>ATTACAAAAT</u>	<u>TCAAAGTCCG</u>	<u>TTGCTAGTAC</u>	<u>CAACCCTATT</u>	<u>TTCAATTCTTC</u>	<u>GCCAAAAGCA</u>
2101	<u>CTCTGATTGA</u>	<u>CAAATACGAT</u>	<u>TTATCTAATT</u>	<u>TACACGAAAT</u>	<u>TGCTTCTGGG</u>	<u>GGCGCACCTC</u>
2161	<u>TTTCGAAAGA</u>	<u>AGTCGGGGAA</u>	<u>GCGGTTGCAA</u>	<u>AACGTTCCA</u>	<u>TCTTCCAGGG</u>	<u>ATACGACAAG</u>
2221	<u>GATATGGGCT</u>	<u>CACAGAGACT</u>	<u>ACATCAGCTA</u>	<u>TTCTGATTAC</u>	<u>ACCCGAGGGG</u>	<u>GATGATAAAC</u>
2281	<u>CGGGCGCGGT</u>	<u>CGGTAAAAGT</u>	<u>GTTCCATTTT</u>	<u>TTGAAGCGAA</u>	<u>GGTTGTGGAT</u>	<u>CTGGATACCG</u>
2341	<u>GGAAAACGCT</u>	<u>GGGCGTTAAT</u>	<u>CAGAGAGGCG</u>	<u>AATTATGTGT</u>	<u>CAGAGGACCT</u>	<u>ATGATTATGT</u>
2401	<u>CCGTTTATGT</u>	<u>AAACAATCCG</u>	<u>GAAGCGACCA</u>	<u>ACGCCTTGAT</u>	<u>TGACAAGGAT</u>	<u>GGATGGCTAC</u>
2461	<u>ATTCTGGAGA</u>	<u>CATAGCTTAC</u>	<u>TGGGACGAAG</u>	<u>ACGAACACTT</u>	<u>CTTCATAGTT</u>	<u>GACCGCTTGA</u>
2521	<u>AGTCTTTAAT</u>	<u>TAAATACAAA</u>	<u>GGATATCAGG</u>	<u>TGGCCCCGCG</u>	<u>TGAATTGGAA</u>	<u>TCGATATTGT</u>
2581	<u>TACACACCC</u>	<u>CAACATCTTC</u>	<u>GACGCGGGCG</u>	<u>TGGCAGGTCT</u>	<u>TCCGACGAT</u>	<u>GACCCGGGTG</u>
2641	<u>AACTTCCCGC</u>	<u>CGCCGTTGTT</u>	<u>GTTTTGGAGC</u>	<u>ACGGAAAAGC</u>	<u>GATGACGGAA</u>	<u>AAAGAGATCG</u>
2701	<u>TGGATTACGT</u>	<u>CGCCAGTCAA</u>	<u>GTAACAACCG</u>	<u>CGAAAAGTT</u>	<u>GCGCGGAGGA</u>	<u>GTTGTGTTTG</u>
2761	<u>TGGACGAAGT</u>	<u>ACCGAAAGGT</u>	<u>CTTACCGGAA</u>	<u>AACTCGACGC</u>	<u>AAGAAAATC</u>	<u>AGAGAGATCC</u>
2821	<u>TCATAAAGGC</u>	<u>CAAGAAGGGC</u>	<u>GGAAAGTCCA</u>	<u>AATTGTAAAA</u>	<u>TGTAACGTGA</u>	<u>TTCAGCGATG</u>
2881	ACGAAATCTT	TAGCTATTGT	AATATTATAT	GCAAATTGAT	GAATGGTAAT	TTTGTAATTG
2941	TGGGTCACTG	TACTATTTTA	ACGAATAATA	AAATCAGGTA	TAGGTAACTA	AAAAGGAATT
3001	CGAGCTCGGA	TCC TGCCCAT	TTAGTTGGCT	TTTCCCTTGT	CTCGTGTCTT	TTCCGTGGAA
3061	AGGTTCCCGG	AGTAATCTGA	TGGCACAGCA	GGGAGGTGCG	CTG CAGGTT	GGTTAGGAAG
3121	GGGGGATGAT	GTAAAAGAAG	AAAATGGGGG	GATTTCGAGCC	CGGGCACAGC	AAGGTCTTCT
3181	AAAATTCATG	TTTTTTTTTT	TTTTACTCTG	CATTGCAGTC	TCCGCTCTTA	TTTAGTTTTG
3241	CTTTACGTAA	GGTCTCGTTG	CTGCCATAAA	ATAAGCTATA	TCACCATGGC	CAAGTTGACC
3301	AGTGCCGTTT	CGGTGCTCAC	CGCGCGCGAC	GTCGCCGGAG	CGGTGAGGTT	CTGGACCGAC

Abbildung 23: Nukleotid-Sequenz des pLEW20

Sequenz aus TrypsRockefeller [130], die Basen 778 bis 3186 wurden durch die Sequenzierung erfasst und entsprechen dieser Soll-Sequenz, Sequenzierung durch GATC Biotech AG mit den Primern GATC-se-725-pLEW20 und GATC-as-3238-pLEW20, Erkennungssequenzen der Restriktionsenzym BamHI, PstI und NotI (Tabelle 32) = rot, Luciferase-Gen = fett, Primer: GATC-se-1694-pLEW20, GATC-se-2781-pLEW20 (Tabelle 41), se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc (Tabelle 42) = unterstrichen, Darstellung in 5'-3'-Richtung

Der zwischen diesen Basen liegende Sequenzabschnitt wurde mit der Soll-Sequenz verglichen und zeigte zu dieser keine Abweichungen. Um beurteilen zu können, ob das Plasmid für die Klonierung verwendet werden konnte, wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI und PstI, die für die Ligationen der LS-B und LS-mC in den pLEW20 benötigt wurden, identifiziert (Tabelle 32). An den Positionen 3008 bis 3013 befand sich das Palindrom 5'-GGATCC-3' des BamHI-Enzyms. Die Erkennungssequenz 5'-CTGCAG-3' des PstI-Enzyms lag an den Positionen 3102 bis 3107. Die Erkennungssequenzen beider Enzyme waren frei von Mutationen und lagen an den vorgesehenen Positionen. Um den Vektor innerhalb der Sequenz des rRNA-Spacers (Abbildung 22) durch das Enzym NotI linearisieren zu können, musste dessen Erkennungssequenz 5'-GCGGCCGC-3' identifiziert werden. Diese Restriktionsstelle war an den Positionen 261 bis 268 lokalisiert und ist in Abbildung 23 rot hervorgehoben. Damit waren wichtige Voraussetzungen des pLEW20 erfüllt.

3.2.4 Herstellung der Luciferase-Fusions-Plasmide

Vervielfältigung der Ligations-Sequenzen

Die Sequenzen, die in den pLEW20 zur Herstellung der LFPs ligiert wurden, wurden aus Kulturen rekombinanter *E. coli*-Bakterien (2.1.2), die die pCR®2.1-TOPO-Fusions-Plasmide enthielten (3.2.2), gewonnen. Die Subklonierungsvektoren wurden, wie in 2.3.1 beschrieben, isoliert, um aus diesen durch einen zeitgleichen Restriktionsverdau der Enzyme BamHI und PstI (2.2.5), die Ligations-Sequenzen zu gewinnen. Mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.2.2) wurden die Ligations-Sequenzen vom Backbone (BB) des pCR®2.1-TOPO (pCR®2.1-TOPO-BB) getrennt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse für die Ligations-Sequenzen B und mC dargestellt und entsprechend beschriftet. Als Vergleichsmarker diente der mit „L“ bezeichnete GeneRuler 1kb DNA Ladder von ThermoScientific [135]. Die an den Bildseiten angegebenen Basenpaarlängen beziehen sich auf diesen Vergleichsmarker.

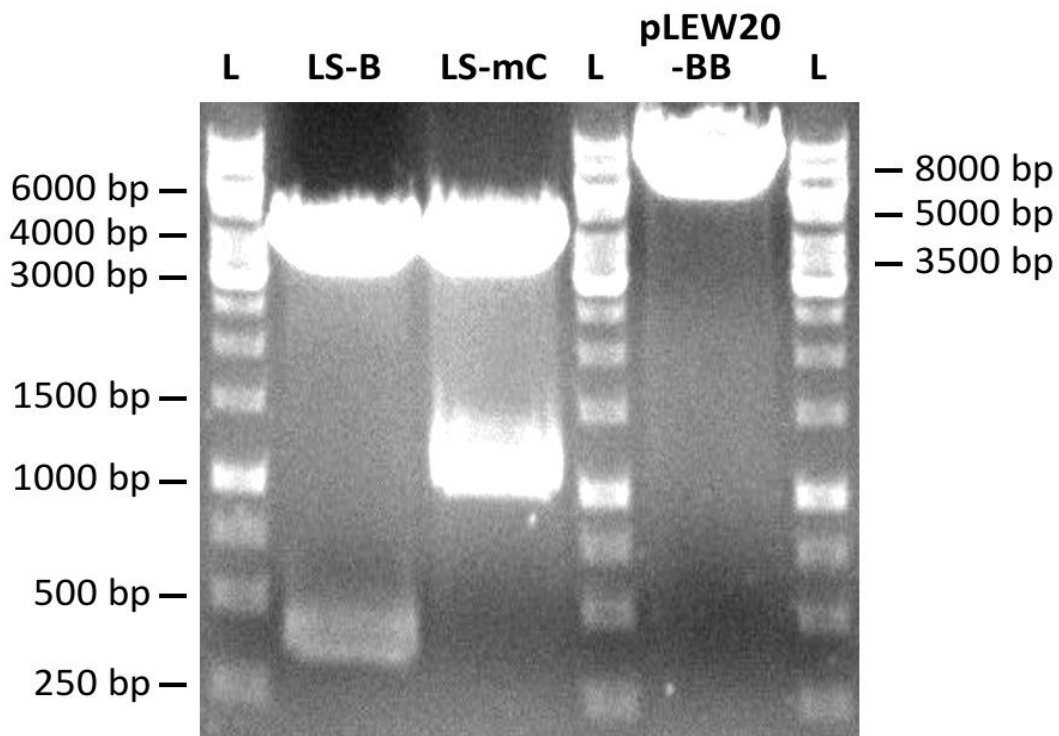


Abbildung 24: Gelelektrophorese LS-B, LS-mC und pLEW20-BB

LS-B = Ligations-Sequenz B, LS-mC = Ligations-Sequenz mC und pLEW20-BB = pLEW20-Backbone nach Restriktionsverdau (2.2.5) mit BamHI und PstI (Tabelle 32), L = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Die sehr hell erscheinenden Banden der Proben LS-B und LS-C, die im oberen Bildbereich zu finden sind, liegen zwischen 3400 und 5000 Basenpaaren. Die Probe der LS-B wies eine weitere Bande zwischen 350 und 450 Basenpaaren auf. Die Probe der LS-mC wies eine zweite Bande mit Nukleinsäuren von 1000 bis 1250 Basenpaaren auf. Die kürzeren Nukleinsäuren wurden für beide Proben aus dem Gel, wie in 2.2.2 beschrieben, isoliert und deren Konzentrationen photometrisch ermittelt (siehe 2.2.1). In Tabelle 43 sind die Ergebnisse der Photometrie angegeben. Für die A260- und A260/A280-Werte und die Konzentration ist das arithmetische Mittel aus vier Messungen angegeben.

Herstellung des pLEW20-Backbones (pLEW20-BB)

Das pLEW20-Plasmid wurde ebenfalls, wie in 2.3.2 beschrieben, in *E.coli*-Bakterien transformiert. Aus Kolonien, die durch das Antibiotika-Resistenzverfahren mit Ampicillin selektiert wurden, wurden Flüssigkulturen

angesetzt um den pLEW20 in ausreichenden Mengen zu extrahieren. Durch einen Restriktionsverdau der Enzyme BamHI und PstI (2.2.5) wurde das pLEW20-Backbone (pLEW20-BB) hergestellt.

Das pLEW20-BB lag aufgrund des Verdau linearisiert vor und konnte anschließend gelelektrophoretisch isoliert werden (2.2.2). Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abbildung 24 dargestellt und zeigt eine Bande zwischen 6000 und 10000bp. Das pLEW20-BB wurde aus dem Gel isoliert (2.2.2) und die Konzentration und die Reinheit der Probe photometrisch kontrolliert (2.2.1). In Tabelle 43 sind die Messergebnisse angegeben. Die angegebenen Beträge der A260- und A260/A280-Werte und der Konzentration wurden aus vier Messungen gemittelt.

Tabelle 43 : Photometrie der LS-B, LS-mC und des pLEW20-BB nach Gelextraktion
Photometrische Messung (2.2.1) nach Restriktionsverdau mit BamHI und PstI (2.2.5, Tabelle 32) und Gelextraktion (2.2.2), angegeben ist der Mittelwert aus vier Messungen

	LS-B	LS-mC	pLEW20-BB
A260	0,21	0,28	0,83
A260/A280	2,07	1,84	1,91
Konzentration (ng/μl)	7,6	11,5	39,6
Volumen (μl)	77	76	75
Masse (ng)	586	877	2968

Überprüfung der Luciferase-Fusions-Plasmide (LFPs)

Nach dem Einfügen der Ligations-Sequenzen B und mC in das pLEW20-BB (2.3.1) und der Transformation der dadurch entstandenen LFPs in *E. coli* (2.3.2) wurden die hergestellten Klone überprüft. Sowohl die Ligation der LS-B und der LS-mC in den Zielvektor pLEW20, als auch die Transformationen der LFPs in *E. coli* wurden kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden einzelne *E. coli*-Kolonien mit der Colony-PCR (2.2.1) und der Gelelektrophorese überprüft. Diese Ergebnisse wurden durch einen Restriktionsverdau mit BamHI und PstI (2.2.5) und einer weiteren gelelektrophoretischen Analyse bestätigt. In Abbildung 25 und in

Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Gelelektrophoresen dargestellt (nach der Colony-PCR mit „PCR“, nach dem Restriktionsverdau mit dem Zusatz „Verdau“ gekennzeichnet). Als Vergleichsmarker diente der als „Ladder“ bezeichnete GeneRuler 1kb DNA Ladder von ThermoScientific [135]. Die an den Bildseiten angegebenen Basenpaarlängen beziehen sich auf diesen „Ladder“.

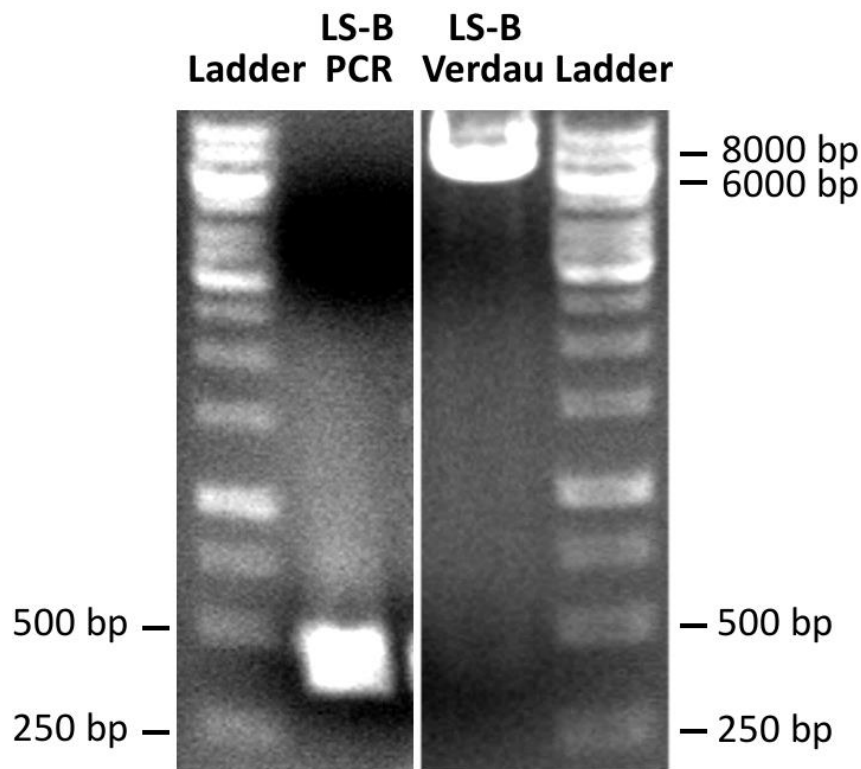


Abbildung 25: LS-B des LFP-B aus *E. coli*

LFP-B = Luciferase-Fusions-Plasmid-B, LS-B PCR = Ergebnis nach Colony-PCR (2.2.1), LS-B Verdau = Ergebnis nach Restriktionsverdau mit BamHI und PstI (2.2.5), Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Die Banden in den Gelelektrophorese-Aufnahmen (Abbildung 25) für die LS-B-Klone waren vorhanden, aber relativ blass. Im PCR-Ansatz zeigte sich eine breite Bande zwischen 300 und 500bp. Eine entsprechende Bande in der Gelelektrophorese LS-B Verdau war mit dem Auge schwach erkennbar. Eine weitere Bande zwischen 6000 und 8000 bp zeigte sich deutlich. Alle fünf überprüften Klone wiesen diese Eigenschaften auf. Die Überprüfung von zwei willkürlich gewählten LS-mC-Klone ergab für beide Ansätze, LS-mC PCR und

LS-mC Verdau, eine Bande zwischen 1000 und 1300bp. Mit 6000 bis 8000bp zeigte sich im Ansatz LS-mC Verdau eine weitere Bande (Abbildung 26).

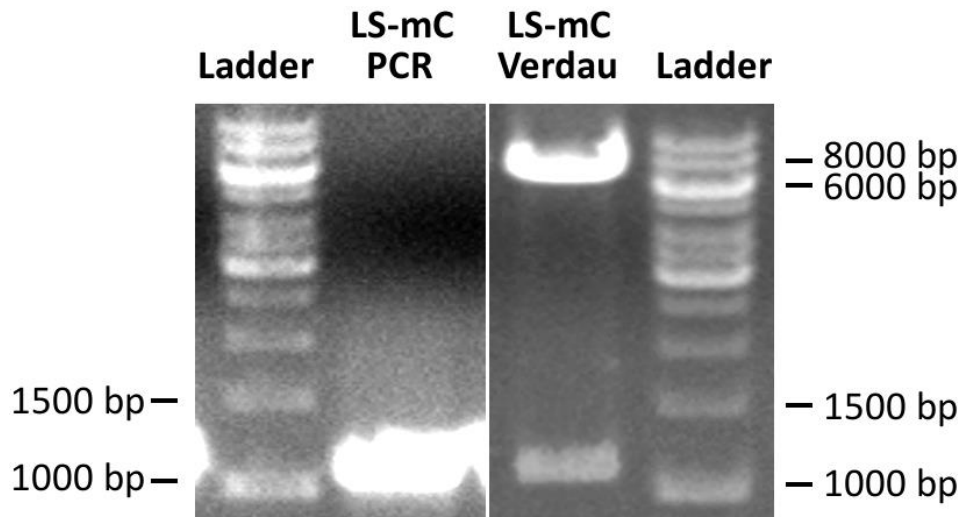


Abbildung 26: LS-mC des LFP-mC aus *E. coli*

LFP-mC = Luciferase-Fusions-Plasmid-mC, LS-mC PCR = Ergebnis nach Colony-PCR (2.2.1), LS-mC Verdau = Ergebnis nach Restriktionsverdau mit BamHI und PstI (2.2.5), Ladder = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Um den regelrechten Einbau der Ligations-Sequenzen LS-B und der LS-mC in das pLEW20-BB zu bestätigen, wurde für die Variablen B und mC je eine Probe zur Sequenzierung (2.2.3) eingeschickt. Die Überprüfung erfolgte mit den Primern GATC-se-2781-pLEW20 und GATC-as-3238-pLEW20 (Tabelle 41) um die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI und PstI in den LFPs mit einzubeziehen.

Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des Programms BLAST@2Sequences [136] mit den Soll-Sequenzen verglichen und sind in Abbildung 27 für das LFP-B und in Abbildung 28 für das LFP-mC dargestellt. Die Soll-Sequenzen wurden aus bereits ermittelten Nukleotidsequenzen (Abbildung 14, Abbildung 16, Abbildung 23) zusammengestellt. Die Ergebnisse der LS-B-Sequenzierung sind in Abbildung 24, die Ergebnisse der LS-mC-Sequenzierung in Abbildung 25 dargestellt.

2982	AGGTA	ACTAA	AAAGGA	AATTC	GAGCTC	<u>GGAT</u>	<u>CCTAA</u>	ATGGC	GTGACT	TATAG	GTGTGGGG	TT	34
	AAGCAT	CCGT	TACTGT	CCTT	GGATGCT	GC	TCAGAA	TGG	TTACTAC	ATG	CGATACG	CAA	94
	GTTTT	CCTT	TATACG	AGTA	TTTTCC	ATTA	CCACTT	TGCA	AGGTTG	TGT	ATTCC	TTTCT	154
	TTTGT	CCTT	TACACG	TTTT	TTTTAA	ATA	CCTTGT	TTAT	TATACG	CACA	GAACC	CTATG	214
	ACTCC	AGAG	TTGTAT	GGGG	AGAATG	TGTG	TGCGAG	CGTT	ATCGT	CTGT	ATTTCT	TAGT	274
	CCAGT	TGCT	GCGTT	CTCAC	GGCAGA	AATCG	TGGCAG	CAGC	GGGCAC	CTAA	ACGAT	TTTAG	334
	GCCGC	CACGT	CGCGG	TTTT	TGTATT	GTTT	TGTTG	ATTC	CTATT	TAGAA	ACTCC	CTGTA	394
3108	<u>GATAA</u>	<u>CTGCA</u>	GTTGG	TAG	GAAGGG	GGGA	TGATG	TAAAA	GAAGAAA	ATG	GG		405

Abbildung 27: Sequenzierung des LFP-B

Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz, mit den GATC-Primern (Tabelle 41), LS-B = fett, Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI und PstI = rot (Abbildung 14), Positionen der Primer se-BamHI-TbMSP-B-3'UTR und as-PstI-TbMSP-B-3'UTR (Tabelle 40) = unterstrichen, in 5'-3'-Richtung abgebildet, Nummerierung links gibt die Position der linksseitigen schlank gedruckten Base im pLEW20 an, Nummerierung rechts gibt Position der rechtsseitigen fett gedruckten Base in der LS-B an

2946	CACTGT	ACTA	TTTTAA	CGAA	TAATAAA	AATC	AGGTAT	AGGT	AACTAAA	AAG	GAATTC	GAGC		
3006	<u>TC</u>	<u>GGAT</u>	<u>CCAT</u>	<u>GGTGCC</u>	<u>ACCT</u>	<u>CAGCTAG</u>	<u>ATC</u>	<u>CGCGCCT</u>	<u>CCG</u>	<u>TCTGGAA</u>	<u>AGA</u>	<u>GCAGAAA</u>	<u>ACG</u>	58
	CAAAGG	CACT	GGAGAG	CAAA	AAGAT	CCACA	GGGGA	AGTGC	GTAGGG	ACTG	GGAGGG	TCCG	118	
	TGCTG	ACTTT	ATGTG	ACCGA	GTTT	CCAAA	CTCCG	GATGT	ATTGCG	AAG	TGCTCG	GTA	178	
	TGCGT	AGATA	AATGT	ACATA	ATGGG	GATG	ATACA	ACTCC	GCCAG	CAGCG	ACTGT	GCAA	238	
	CCTTA	ATCTG	CACGA	AGCAG	GGCAC	GGGAG	CTGTT	GCTAG	GGGTC	CACGG	ACTTACA	AGC	298	
	ACGGG	ACCTG	CGTGC	AGAAG	CGAGAG	GGAT	TCAAC	ATTTT	AAACC	TTTTA	GGGGAA	TGT	358	
	TGTCAA	ATGT	GGTGA	AATCTC	AGTGT	CCTT	TGTG	TTGTTT	TTTGG	GGGG	GAGGG	GTTAT	418	
	GAGTGG	AGAT	AATCC	TCCCA	TGGA	ACAATA	ACTAG	CAAGG	CAACG	TCTCA	TTTATA	CATT	478	
	CGAAC	CCCT	GCATTA	ACGT	GCTGA	AAGTG	ACGCAC	TCT	CTCGT	AGAG	TTCC	TAA	538	
	TAAGC	TATGG	GTATG	AATTA	TAGG	ACCGCA	AGAA	AGCATT	AGGAT	GTT	CG	AAGT	598	
	AACCC	CCCT	TTGCT	TCTGT	GGAGA	AATTAT	TTTAT	TATTA	TTAAA	AAGCA	TTCA	TGCTA	658	
	TTGGT	AAAAG	GTATG	AAAAC	CTGAA	ATGCC	TCTCG	TAGGT	CGGGG	GAAAG	GCAGT	ATACC	718	
	TTTAT	TGATG	CATT	CGCTTA	TATTA	AGTCT	GAGG	TAA	TA	AGTAC	GCCTG	TGGG	778	
	ATTTT	TGAAT	ATAAG	TCTT	GCTG	TTTTA	CCCA	ATTTT	ATTTG	TGGG	GCCAGA	ACTT	838	
	TGTTTT	ACTG	CGGTC	GTGTT	ACAC	AGCAAT	GCAAC	TAA	TGCAC	ATCAA	AATGT	G	898	
	TGTGT	CAGGA	GGGAT	GCAC	GAGAA	TAAG	AAAAA	ACTG	GAGGC	ACCGG	TGAA	AGTTAT	958	
	ATAGT	TACAC	TTTTG	TTTTT	CAAGT	TACGG	ATTGT	CCATT	TGCTT	CTTTT	TATAC	CCCT	1018	
	TTACA	ATTTT	TTTTT	TGCTC	TTGA	AGATGG	TGTT	TGCTAC	CATCG	CGGACT	GGCTT	CGTCT	1078	
3108	<u>TGTTT</u>	<u>CTGCA</u>	GTTGG	TAG	GAAGGG	GGGA	TGATG	TAAAA	GAAGAAA	ATG	GGGGGA		1089	

Abbildung 28: Sequenzierung des LFP-mC

Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz, mit den GATC-Primern (Tabelle 41), LS-mC = fett, Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI und PstI = rot (Abbildung 14), Positionen der Primer mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR und as-PstI-TbMSP-C-3'UTR (Tabelle 40) = unterstrichen, in 5'-3'-Richtung abgebildet, Nummerierung links gibt die Position der linksseitigen schlank gedruckten Base im pLEW20 an, Nummerierung rechts gibt Position der rechtsseitigen fett gedruckten Base in der LS-mC an

Im Vergleich dieser Sequenzen mit den LS nach der Ligation in den Subklonierungsvektor pCR®2.1-TOPO (Abbildung 14, Abbildung 16) ergaben

sich keine Unterschiede. Die schlang gedruckten Nummerierungen auf der linken Seite geben die Positionen der am weitesten links stehenden Base an und beziehen sich auf den pLEW20 (siehe Abbildung 23). Die fett gedruckten Nummerierungen der rechten Seite geben die Position der fett gedruckten Basen an, die am weitesten rechts steht. Diese Nummerierungen beziehen sich auf die jeweilige LS (siehe Abbildung 14, Abbildung 16). Wie in Abbildung 27 ersichtlich, wurden die LS-B und die LS-mC (Abbildung 28) korrekt in das pLEW20-BB eingebaut.

3.3 Herstellung rekombinanter Trypanosomen-Stämme durch Transfektion der LFPs mit dem Elektroporations-Verfahren

3.3.1 Transfektion der LFPs in MiTat1.2

Elektroporation genuiner MiTat1.2 und Selektion rekombinanter MiTat1.2 mit dem Antibiotika-Resistenz-Verfahren

Die LFPs wurden mit dem Elektroporations-Verfahren (2.3.3) in monomorphe Trypanosomen der Art MiTat1.2 eingebracht. Bei der Transfektion des LFP-B überlebten 11,88 % der Trypanosomen nach einem elektrischen Puls von 1,164kV über 0,4ms. Der Reaktionsansatz enthielt $2,3 \times 10^7$ Zellen und 10,15µg DNA. Der Reaktionsansatz des LFP-mCs enthielt $2,32 \times 10^7$ Zellen und 10,512µg DNA. Die Überlebensrate betrug nach einem elektrischen Puls von 1,14kV über 0,4ms 47%. Die Selektion und Kultivierung erfolgte nach 2.1.3. In 4 (LFP-B) bzw. 6 (LFP-mC) Fällen der jeweils 36 beimpften Wells wiesen die Trypanosomen eine Phleomycin-Resistenz auf und vermehrten sich (2.1.3).

3.3.2 Nachweis des Luciferase-Gens in rekombinanten MiTat1.2

Molekulargenetische Überprüfung

Die genomische DNA (gDNA) und RNA wurde isoliert und die RNA zu komplementärer DNA (cDNA) revers transkribiert (2.2.4). Anschließend wurde eine PCR und eine Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.1, 2.2.2). Die Ergebnisse

sind für das LFP-B in Abbildung 29 und für das LFP-mC in Abbildung 30 dargestellt. Der als Vergleichsmarker dienende GeneRuler 1kb DNA Ladder von ThermoScientific [135] ist in den Abbildungen mit „Ladder“ bezeichnet und definiert die seitlich angegebenen Basenpaarzahlen. Die Kulturen wurden mit den Primern se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc (Tabelle 42) zum Nachweis der Luciferase überprüft und mit den Alternative-Oxidase-Primern se-TbAOX und as-TbAOX (Tabelle 42) auf falsch-positive Ergebnisse getestet. Die Trypanosomale Allgemeinen Oxidase (TbAOX) wird in Trypanosomen konstitutiv exprimiert und diente als Nachweis für DNA.

Die Überprüfung der LFP-B-Transfektion mit den Alternative-Oxidase-Primern (TbAOX) ergab für die gDNA und die cDNA deutliche Banden mit 450 bis 600bp (Abbildung 29). Bei der Überprüfung durch die Luciferase-Primer (Luc) entwickelte sich bei der gDNA eine Bande mit 1400 bis 2000bp und bei der cDNA eine Bande mit etwa 1700bp. Alle, der vier phleomycinresistenten Kulturen, zeigten diese Ergebnisse.

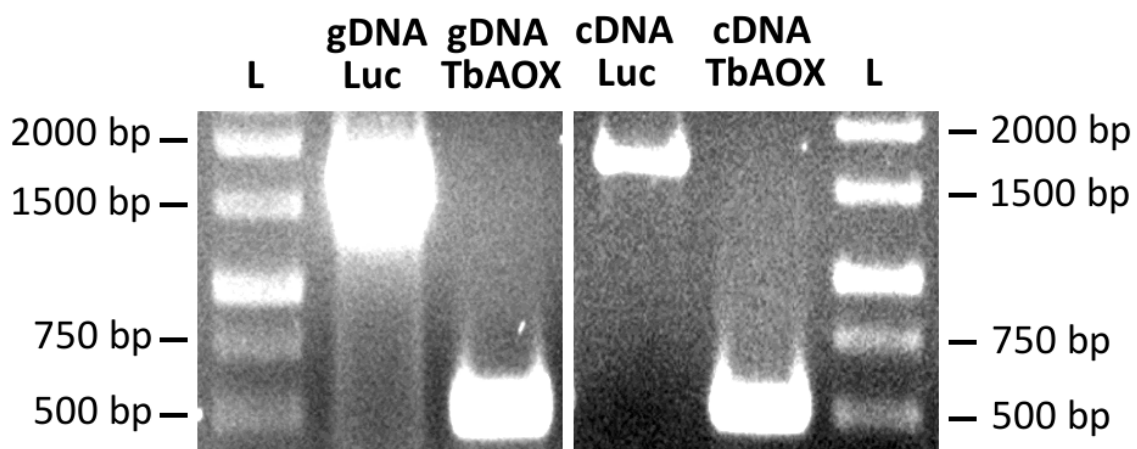


Abbildung 29: Gelelektrophorese der LS-B aus LFP-B-MiTat1.2

gDNA = Analyse der genomischen DNA, cDNA = Analyse der revers transkribierten mRNA, Luc = Verwendung der Primer se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc zum Nachweis der Luciferase (Tabelle 42), TbAOX = Verwendung der TbAOX-Primer zum Nachweis der Trypanosomalen Alternativen Oxidase (Tabelle 42), L = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

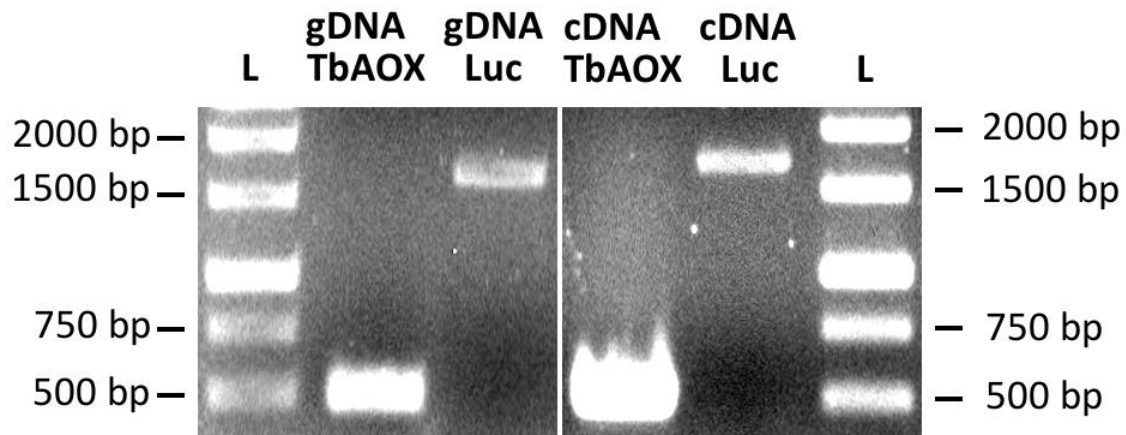


Abbildung 30: Gelelektrophorese der LS-mC aus LFP-mC-MiTat1.2

gDNA = Analyse der genomischen DNA, cDNA = Analyse der revers transkribierten mRNA, Luc = Verwendung der Primer se-pLEW20-Luc und as-pLEW20-Luc zum Nachweis der Luciferase (Tabelle 42), TbAOX = Verwendung der TbAOX-Primer zum Nachweis der Trypanosomalen Alternativen Oxidase (Tabelle 42), L = 1kb DNA Ladder GeneRuler [135], Durchführung nach 2.2.2 mit $I = 200\text{mA}$, $U = 90\text{V}$, $t = 45\text{min}$

Ähnliche Ergebnisse ergab auch die Überprüfung der LFP-mC-Transfektion (Abbildung 30). In Ansätzen mit den Alternative-Oxidase-Primern fanden sich Banden mit etwa 500bp, in Ansätzen mit den Luciferase-Primern entwickelten sich Banden mit 1650 bis 1750bp. Auch in diesem Fall zeigten alle überprüften phleomycinresistenten Kulturen diese Ergebnisse.

3.3.3 Transfektion der LFPs in AnTat1.1

Evaluierung der Toxizität von Phleomycin auf AnTat1.1

Die Höhe für Phleomycin-Konzentrationen zur Selektion von Trypanosomen divergiert in der Literatur mindestens um den Faktor 200. Es finden sich Konzentrationen von $0,2\mu\text{g/ml}$ [150], $1\mu\text{g/ml}$ [151, 152], $2,5\mu\text{g/ml}$ [153-155], $10\mu\text{g/ml}$ [156] und $40\mu\text{g/ml}$ [157]. Aufgrund dieser Informationslage wurden die drei gängigen Phleomycin-Konzentrationen $0,25\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ und $2,5\mu\text{g/ml}$ zunächst auf ihre toxische Wirkung für Trypanosomen der Art AnTat1.1 überprüft. Die höchste getestete Konzentration entsprach dem Hundertfachen der niedrigsten Konzentration. Abbildung 31 zeigt den Verlauf von AnTat1.1-Kulturen bei unterschiedlichen Phleomycin-Konzentrationen. Auf der Ordinate ist die

Zelldichte in Anzahl/ml aufgetragen. Die Abszisse zeigt den zeitlichen Verlauf in Stunden (h). In 12h-Abständen wurden die Zelldichten in drei neuen Well-Kulturen einer Konzentration bestimmt. Die daraus berechneten Mittelwerte wurden als Messpunkte, die Standardabweichungen als Antennen dargestellt.

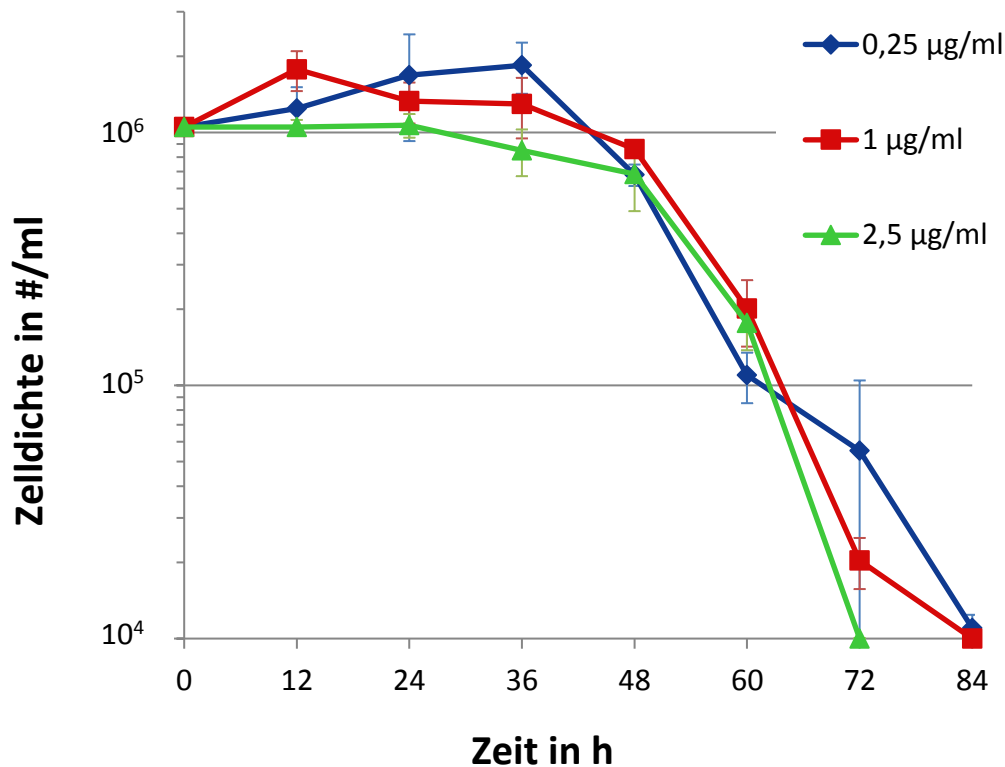


Abbildung 31: Toxizität von Phleomycin auf AnTat1.1

Kultivierung von AnTat1.1 laut 2.1.3 auf Semisoliden Agarose [109] in HMI-9-Medium mit 0,25µg, 1µg oder 2,5µg Phleomycin je ml HMI-9-Medium, Antennen geben +/- eine Standardabweichung an, die Datenpunkte stehen für Mittelwerte aus 3 Messungen unabhängiger Kulturen

Zum Zeitpunkt Null wurde in allen Well-Kulturen eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und Phleomycin mit der entsprechenden Endkonzentration addiert. Die Grafen der unterschiedlichen Phleomycin-Konzentrationen zeigen einen ähnlichen Verlauf mit einem starken Abfall der Zelldichte ab 48h nach der Phleomycin-Zugabe. Am vierten Tag sank die Zelldichte unter die Nachweisgrenze. Um die Ergebnisse einordnen zu können wurde zusätzlich das Wachstumsverhalten von AnTat1.1-Kulturen ohne Phleomycin erhoben (Tabelle 32). Jeder Messpunkt dieser Grafik entspricht dem Mittelwert der Zelldichten aus

sechs unabhängigen Kulturen (2.1.3). Die Ordinate gibt die Zelldichte in Anzahl/ml an, die Abszisse die Zeit in Stunden (h). Zum Zeitpunkt Null wurden die Kulturen auf eine Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml eingestellt und in einem Intervall von 12h ausgezählt. Die eingezeichneten Antennen geben die Standardabweichung wider. Der hierdurch ermittelte Graf in Abbildung 32 zeigt zwischen 12 und 48h einen exponentiellen Verlauf. Diese logarithmische Wachstumsphase weist eine durchschnittliche Generationszeit von 11h auf. Anschließend nimmt die Kurve einen beschränkten Verlauf und fällt ab 108h bei einem Wert von etwa $1,6 \times 10^6$ /ml parabelförmig ab. Die Wachstumskurve der Abbildung 32 wurde in Zusammenarbeit mit Christian Boßelmann erhoben.

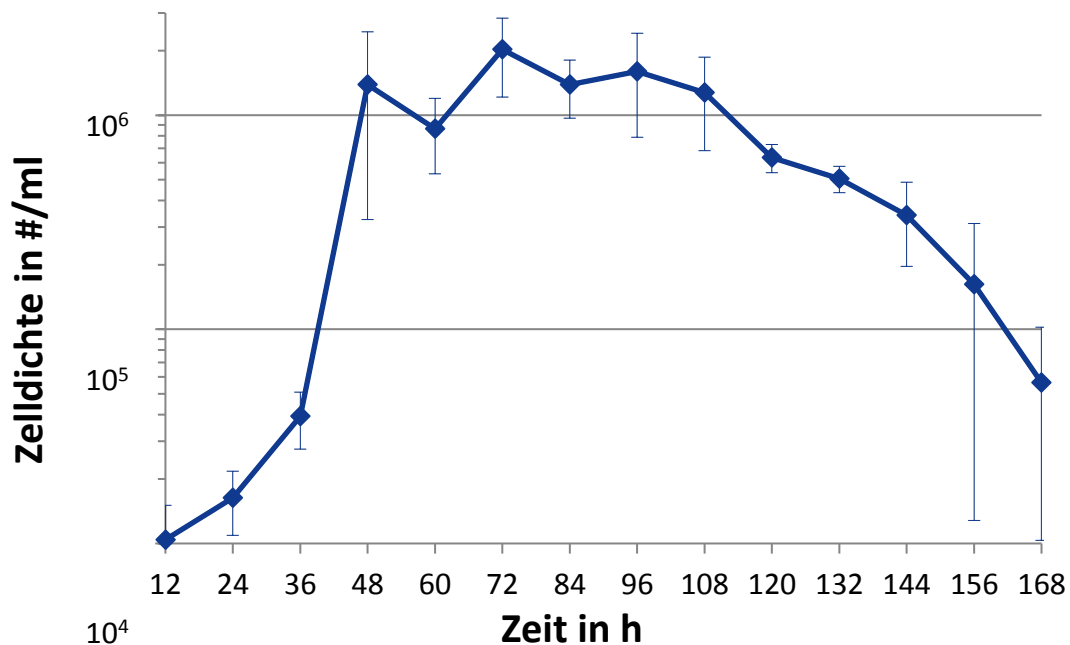


Abbildung 32: Wachstumskurve von AnTat1.1

Kultivierung von AnTat1.1 laut 2.1.3 auf Semisoliden Agarose [109] in HMI-9-Medium ohne Antibiotikum, Antennen geben +/- eine Standardabweichung an, die Datenpunkte stehen für Mittelwerte aus 6 Messungen unabhängiger Kulturen, in Zusammenarbeit mit Christian Boßelmann erhoben

Elektroporation genuiner AnTat1.1 und Selektion rekombinanter AnTat1.1 mit dem Antibiotika-Resistenz-Verfahren

Die Transfektion des LFP-B und des LFP-mC in Trypanosomen der Art AnTat1.1 laut dem Protokoll von Sven Acker [140] wurde insgesamt elf Mal durchgeführt

(2.3.3). Da unter dem Selektionsdruck von Phleomycin keine Trypanosomen wuchsen, wurden die Parameter der Elektroporation variiert. Es wurden 10µg, 20µg und 30µg DNA verwendet, der elektrische Puls mit 0,3ms bis 0,6ms Dauer angewendet, zwischen $1,3 \times 10^7$ Zellen/ml und $1,3 \times 10^8$ Zellen/ml angesetzt und Spannungen zwischen 1,02kV und 1,234kV angelegt. In zwei Fällen wurden zwei Pulse abgegeben. Die Überlebensrate der Trypanosomen betrug zwischen 1,82% und 45,42% mit einem Mittelwert von 14,84% für elf Versuche. Trotz vieler Wiederholungen und Variationen konnte dieses Verfahren nicht erfolgreich etabliert werden.

3.4 Überprüfung der rekombinanten Trypanosomen-Stämme

3.4.1 Implementierung eines Luciferase-Assays zur Validierung der Luciferase-Expression der LFP-MiTat1.2-Stämme

Von den rekombinanten Trypanosomen wurde jeweils eine Kultur der LFP-B-MiTat1.2-Trypanosomen (MSP-B) und eine Kultur der LFP-mC-MiTat1.2-Trypanosomen (MSP-mC) unter Selektionsdruck erhalten (2.1.3). Nicht-transfizierte Trypanosomen der Art MiTat1.2 (Kontrolle) wurden ohne Selektionsdruck kultiviert. Die Trypanosomen wurden in der stationären Phase aus dem HMI-9-Medium mittels Zentrifugation geerntet und nach dem Handbuch des Dual-Luciferase® Reporter Assay System (DLRAS) von Promega lysiert (2.4.1). Für jede Einzelmessung wurden 1×10^6 Trypanosomen lysiert und die Lumineszenz des Lysats, wie in 2.4.2 beschrieben, bestimmt. Für jede Kategorie (Kontrolle, MSP-B, MSP-mC) wurden 10 Einzelmessungen erhoben und diese auf ihre Verteilung mit dem Statistics Viewer der Marke SPSS [142] überprüft (siehe 2.4.3). Innerhalb jeder Kategorie folgten die Messwerte der Normalverteilung. Bei der Bewertung der Verteilung und der statistischen Analyse stand Frau Aline Naumann, Diplom-Statistikerin und Wissenschaftliche Angestellte des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen [143], beratend zur Seite. Die Tabelle 44 enthält neben allen Einzelmesswerten weitere statistische Angaben zu den Mittelwerten, Standardabweichungen, Standardfehlern der Mittelwerte, Konfidenzintervallen,

Minima, Maxima und Variationskoeffizienten. Die Ergebnisse der Levene-Tests sind in Tabelle 45, die der Welch-Tests sind in Tabelle 46 aufgelistet. Signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ sind mit „*“ markiert.

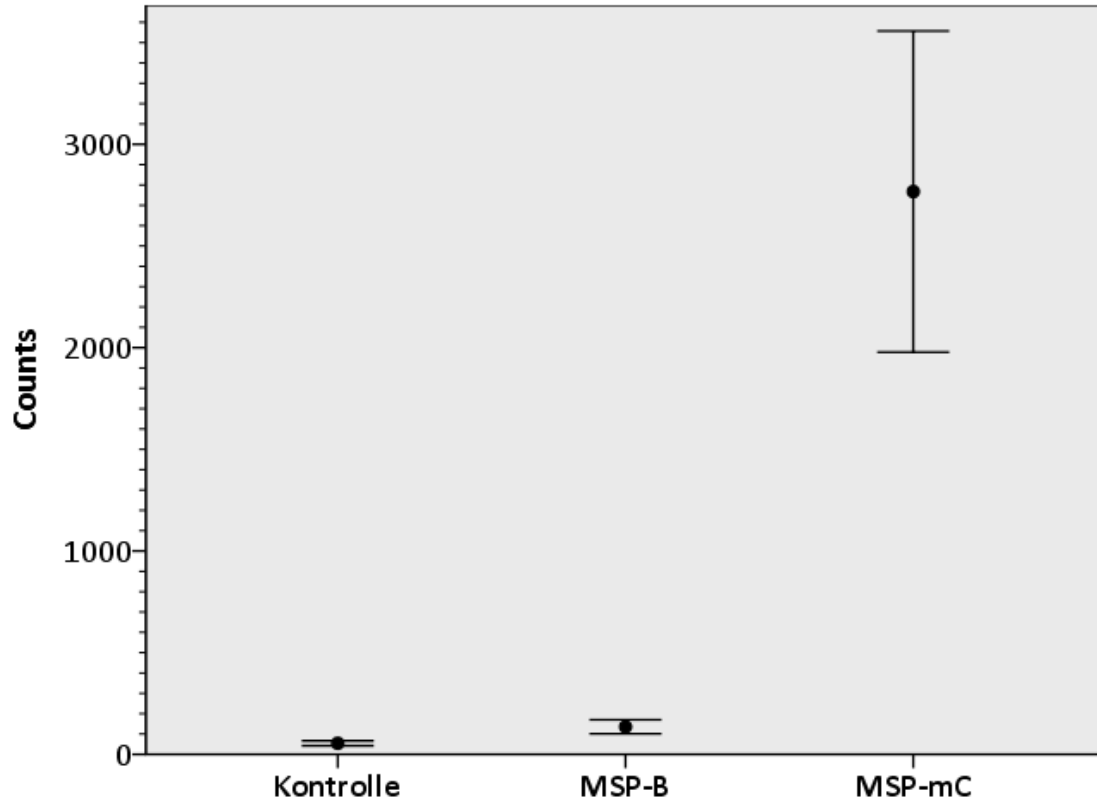


Abbildung 33: Luciferase-Assay der LFP-MiTa1.2-Trypanosomen, linear

Abzisse: Kontrolle = Messung der MiTa1.2, MSP-B = Messung der LFP-B-MiTa1.2, MSP-mC = LFP-mC-MiTa1.2, Ordinate: linear in Counts, die Datenpunkte stehen für die Mittelwerte aus 10 Messungen, Antennen stehen für das Konfidenzintervall mit 99,9%, Durchführung und Auswertung laut 2.4

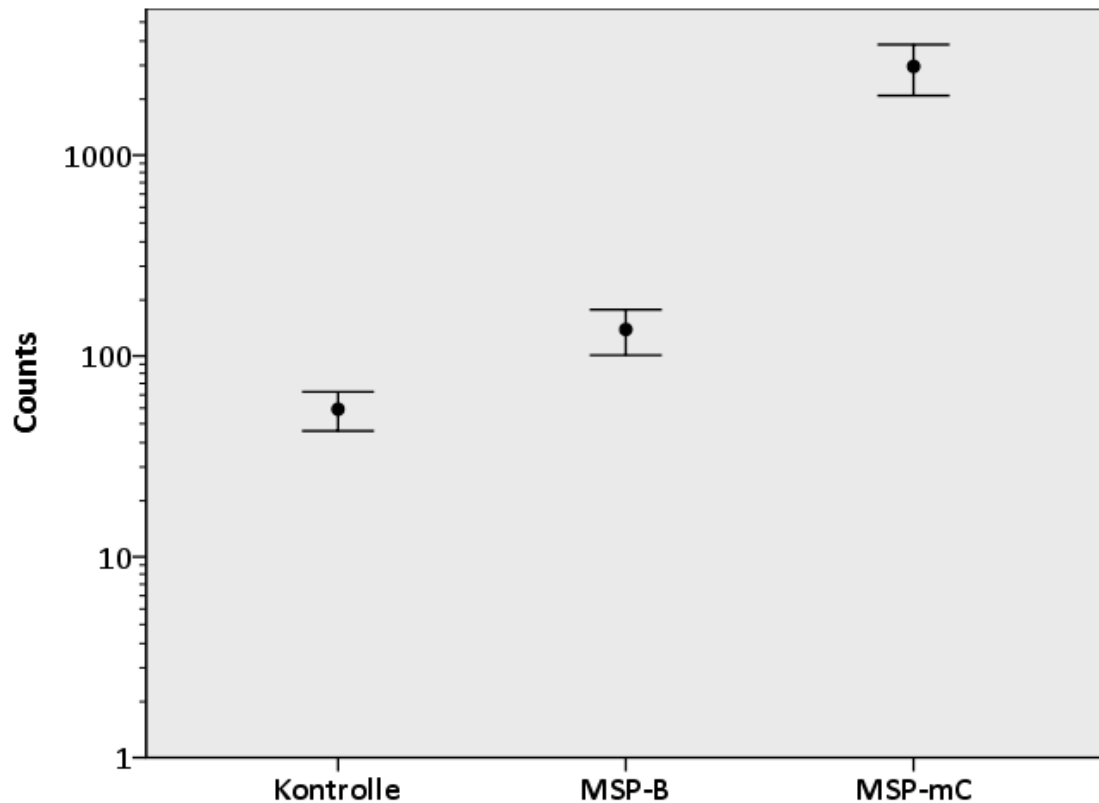


Abbildung 34: Luciferase-Assay der LFP-MiTa1.2-Trypanosomen, logarithmisch

Abzisse: Kontrolle = Messung der MiTa1.2, MSP-B = Messung der LFP-B-MiTa1.2, MSP-mC = LFP-mC-MiTa1.2, Ordinate: logarithmisch in Counts, die Datenpunkte stehen für die Mittelwerte aus 10 Messungen, Antennen stehen für das Konfidenzintervall mit 99,9%, Durchführung und Auswertung laut 2.4

Die Datenpunkte der Abbildung 33 und der Tabelle 34 stehen für die Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen. Die Antennen geben das 99,9%ige Konfidenzintervall des Mittelwertes an. Auf der Ordinate sind die detektierten Lichtquanten als Counts entweder linear, wie in Abbildung 33, oder logarithmisch, wie in Tabelle 34, angegeben. Die Abszisse benennt jeweils die Kategorie. In der Tabelle 34 ist deutlich zu erkennen, dass sich die 99,9%igen Konfidenzintervalle der Kategorien nicht überschneiden. Aus den Mittelwerten der Ansätze MSP-B und MSP-mC ergibt sich für den Ansatz MSP-mC ein 20-facher Wert im Vergleich zum Ansatz der MSP-B. Mit definierten Mittelwerten (Tabelle 44), das heißt bei einem definierten Mittelwert der Kontrolle von Null, ergibt sich ein Faktor von etwa 33.

Tabelle 44: Messwerte des Luciferase-Assays

Kontrolle = Messung der MiTat1.2, MSP-B = Messung der LFP-B-MiTat1.2, MSP-mC = LFP-mC-MiTat1.2, KI = Konfidenzintervall, statistische Analyse in 2.4.3 beschrieben

	Kontrolle	MSP-B	MSP-mC
	61	165	2865
	42	142	3185
	61	163	3488
	48	138	2956
	60	123	2670
	49	124	1906
	67	163	2413
	47	97	2895
	56	123	3278
	52	117	2018
Mittelwert	54	136	2767
Standardabweichung	8	23	522
Standardfehler des Mittelwertes	3	7	165
Minimum	42	97	1906
Maximum	67	165	3488
Mittelwert definiert	0	82	2713
Variationskoeffizient	0,15	0,17	0,19
95% KI des Mittelwertes	49-60	119-152	2394-3141
99,9% KI des Mittelwertes	42-66	101-170	1978-3557

Tabelle 45: Levene-Test-Ergebnisse

Vergleichspaar	p-Wert	F-Wert
Kontrolle und MSP-B	0,006*	9,825
Kontrolle und MSP-mC	<0,001*	19,689
MSP-B und MSP-mC	<0,001*	18,515

Tabelle 46: Welch-Test-Ergebnisse

Vergleichspaar	p-Wert	T-Wert	Freiheitsgrade
Kontrolle und MSP-B	<0,001*	10,617	11,129
Kontrolle und MSP-mC	<0,001*	16,427	9,004
MSP-B und MSP-mC	<0,001*	15,922	9,034

Die Levene-Testung auf Varianzgleichheit [145] ergab für alle Vergleichspaare (Tabelle 45) einen p-Wert von $<0,05$ und damit ein signifikantes Ergebnis, sodass die Homoskedastizität in allen Fällen abzulehnen war. Statt eines Student's t-Tests wurde daher der Welch-Test als 2-Stichproben-Test angewendet. Dieser setzt die Homoskedastizität der zu prüfenden Stichproben nicht voraus. Die p-Werte, die Freiheitsgrade „N“ und die T-Werte sind der Tabelle 46 zu entnehmen. Um eine Verstärkung des α -Fehlers durch einzelne Signifikanzen zu minimieren wurde zusätzlich der ANOVA-Test mit den post-tests Dunnett-T3-Test und dem Games-Howell-Test durchgeführt (2.4.3). Ebenso wie der ANOVA-Test in Kombination mit dem Dunnett-T3-Test, ergab der ANOVA-Test in Kombination mit dem Games-Howell-Test für alle drei Testgruppen und alle Vergleichspaare (Kontrolle + MSP-B, Kontrolle + MSP-mC, MSP-B + MSP-mC) signifikante p-Werte mit $<0,05^*$. Das Ergebnis des ANOVA-Tests kann mit $F(2/27)=261,514$ mit $p<0,001^*$ zwischen allen Testgruppen beschrieben werden.

3.4.2 Überprüfung der Wachstumseigenschaften rekombinanter LFP-MiTat1.2-Stämme

Die in 3.3 hergestellten LFP-MiTat1.2-Klone LFP-B-MiTat1.2 (B MiTat) und LFP-mC-MiTat1.2 (C MiTat) und genuine MiTat1.2-Trypanosomen (MiTat Kontrolle) wurden, wie in 2.1.3 beschrieben, kultiviert und die Zelldichten in zeitlichen Abständen von 12h regelmäßig erhoben. Die Datenpunkte der Kurven in Abbildung 35 geben den Mittelwert an, der aus drei unabhängigen Kulturen erhoben wurde. Auf der Ordinate ist die Zelldichte in Zellen/ml angegeben. Auf der Abszisse sind die Messzeitpunkte in Stunden (h) angegeben. Diese beziehen sich auf den Zeitpunkt Null, an dem die Kulturen auf eine Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml HMI-9-Medium eingestellt wurden. Die Antennen geben +/- eine Standardabweichung an. Alle Kurven (Abbildung 35) zeigen zunächst einen exponentiellen Verlauf, der dann in ein beschränktes Wachstum übergeht und ab 96h beginnt zu fallen. Die Mittelwerte erreichen für MiTat Kontrolle ein Maximum von $8,2 \times 10^6$ /ml, für B MiTat $1,01 \times 10^7$ /ml und für C MiTat $8,28 \times 10^6$ /ml. Die Berechnung der Generationszeiten erfolgte anhand der Mittelwerte der Messzeitpunkte 24h, 36h, 48h, 60h und 72h. Für B MiTat und C MiTat wurden

zusätzlich die Mittelwerte bei 84h berücksichtigt. Die Bestimmung erfolgte manuell und ergab Generationszeiten von 7h für MiTat Kontrolle, von 7,7h für B MiTat und von 6,5h von C MiTat.

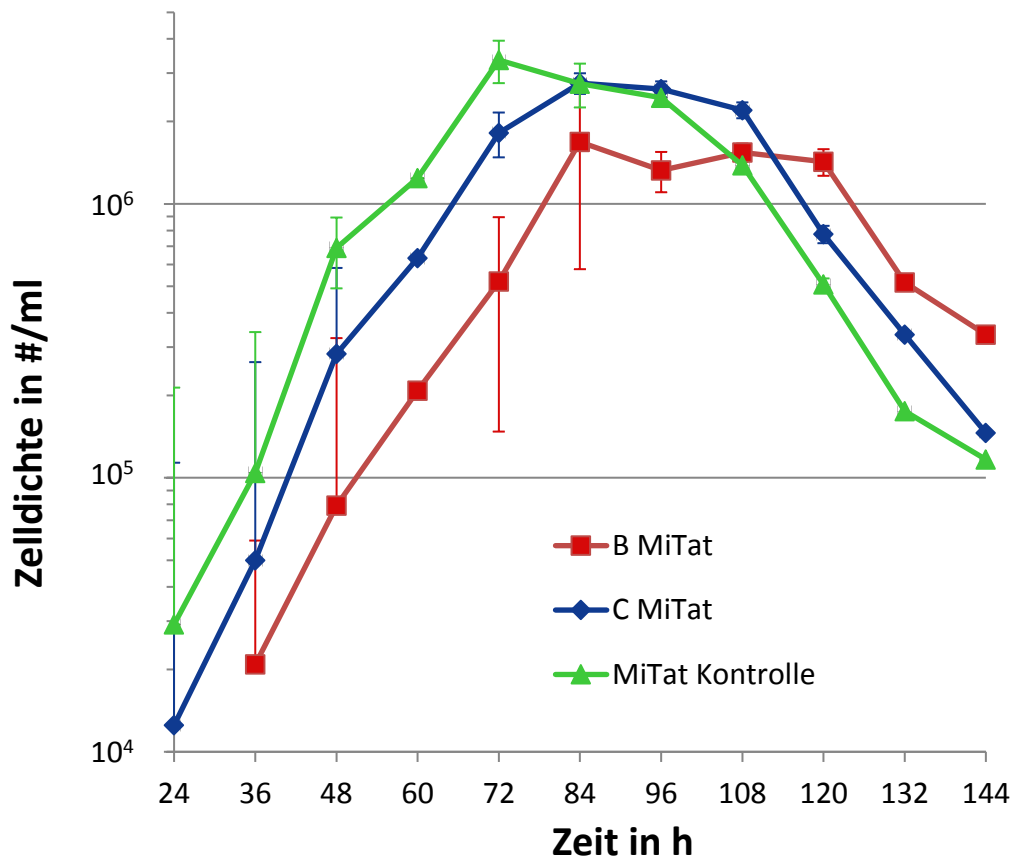


Abbildung 35: Wachstumskurven genuiner und rekombinanter MiTat1.2

MiTat Kontrolle = MiTat1.2-Trypanosomen, B MiTat = LFP-B-MiTat1.2 und C MiTat = LFP-mC-MiTat1.2 zusätzlich mit 2,5µg/ml Phleomycin kultiviert, Beginn der Kultivierung mit einer Zelldichte von 1x10⁴/ml, Datenpunkte entsprechen Mittelwerten aus 3 Messungen unabhängiger Kulturen, Antennen geben +/- eine Standardabweichung an.

4 Diskussion

4.1 Konzept zur Analyse der TbMSPs mit dem Luciferase-Reporter-System

Aus dieser Arbeit resultieren zwei Klone monomorpher MiTat1.2, die es möglich machen die in Trypanosomen vorhandenen Protein-Level der TbMSP-C und einer TbMSP-B in vitro zu vergleichen. Dieses Konzept ist auf alle anderen TbMSPs übertragbar, sodass durch die Klonierung weiterer TbMSP-3'UTRs nach dem angegebenen Schema alle dazugehörigen Protein-Level anhand des einfach durchzuführenden Luciferase-Assays vergleichbar werden. Darüber hinaus erlaubt das Konstrukt eine Transfektion in pleomorphe Trypanosomen der Art AnTat1.1. Mit entsprechenden rekombinanten AnTat1.1 eröffnet sich die Möglichkeit das Procedere in ein Tiermodell zu übertragen und Aufschlüsse über die mRNAs in vivo zu erhalten. Die Möglichkeit einer in-vivo-Selektion besteht durch die Verwendung des *ble*-Gens ebenfalls. Kombinationen aus verschiedenen Parametern, zum Beispiel dem Krankheitsstadium, dem Zeitpunkt der Analyse, der Zelldichte, der Auswahl des Entnahmeorts und des Entnahmemediums (Blut oder Liquor cerebrospinalis) ermöglichen neue Erkenntnisse über die TbMSPs zu gewinnen und Anhaltspunkte für weitere Funktionen zu finden. Die Voraussetzungen für umfassende, authentische und weitreichende Untersuchungen sind geschaffen.

Das charakteristische Pathogenitätsmerkmal der Trypanosomen ist ihre Eigenschaft Organgrenzen zu überwinden. Sie durchdringen die Basalmembranen von Gefäßen und invadieren verschiedenartige Kompartimente inklusive dem Subarachnoidalraum (bzw. Liquor cerebrospinalis) und dem Myokard [57]. Die Folgen dieser trepanierenden Eigenschaft führen zum Tod des infizierten Individuums. Wie bereits genannt, besitzen zahlreiche Trypanosomatiden, zu denen auch die Trypanosomen zählen, an der Plasmamembran lokalisierte MMPs, die sogenannten MSPs. Die Funktionen und Mechanismen der TbMSPs sind größtenteils unbekannt. Bislang kann nur der TbMSP-B eine Funktion zugeordnet werden. Diese wird bei *T.b.* auch in vitro an

monomorphen Formen erforscht. Monomorphe Kulturen eignen sich wegen ihrer leichten Handhabung für in-vitro-Verfahren [30] und wurden aus diesem Grund zur Herstellung und Überprüfung des Konstruktes verwendet. Da monomorphe Trypanosomen im Gegensatz zu pleomorphen Trypanosomen die Stadien des Lebenszyklus nicht durchlaufen, können jedoch keine Aussagen über stadienabhängige Unterschiede der TbMSPs in BF getroffen werden. Eine Differenzierung monomorpher Trypanosomen zur prozyklischen Form durch Zugabe von cis-Aconitat und einer Absenkung der Temperatur auf 27°C [32, 69], ist durchführbar und ermöglicht zumindest eine Analyse procyclischer Formen. Pleomorphe Zelllinien wie AnTat1.1 hingegen besitzen eine natürliche Zelldynamik und durchlaufen den Lebenszyklus unter gegebenen Voraussetzungen vollständig. Prinzipiell ist die in dieser Arbeit publizierte Methodik auch in pleomorphen Trypanosomen anwendbar (4.4 und 4.5) und eröffnet damit die Perspektive Analysen in BF differenziert durchzuführen. Es gibt zahlreiche Methoden Zellen zu sortieren: Mikromanipulation, Chromatografie und Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting = FACS). Dennoch mangelt es an der Durchführung. Die Mikromanipulation wird bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), einem in-vitro-Fertilisations-Verfahren (IVF), erfolgreich verwendet [158], ist aber nur für die manuelle Sortierung einzelner Zellen geeignet [159]. Dagegen ist die Durchflusszytometrie quantitativ deutlich überlegen. Der relative Anteil von epimastigoten Trypanosomen in einer pleomorphen Kultur kann bereits approximiert werden [160]. Für BF-Formen müssen geeignete Protokolle jedenfalls noch entwickelt werden. Mit einer chromatografischen Auftrennung der BF-Formen können voraussichtlich ausreichend viele Zellen umgesetzt werden. Doch diese Methode erlaubt bisher lediglich eine Anreicherung und keine reinen Kulturen (unveröffentlichte Ergebnisse von Christan Boßelmann und Eva Dreßen). Eine Analyse würde sich daher auf den Vergleich von angereicherten Mischpopulationen stützen.

Die Wechselwirkungen zwischen Trypanosomen und ihrem Wirtsorganismus sind vielfältig. Wichtige Elemente, die Wachstum und Differenzierung beeinflussen, sind jedoch das Immunsystem des Wirts und die Medien Blut und

Liquor [34, 54, 66, 108]. Um eine naturgetreue Abbildung der Realität in einem Experiment zu erhalten ist es notwendig, diese Parameter bestmöglich zu etablieren, was in einem in-vivo-Verfahren umgesetzt werden kann. Dies führt jedoch zu einer Einschränkung der verwendbaren Antibiotika, da für einen suffizienten Selektionsdruck der rekombinanten Trypanosomen hohe Dosen appliziert werden müssen und die Letalität, zum Beispiel bei Geneticin und Hygromycin, nicht vertretbar ist [161]. Die Entscheidung fiel daher auf den Vektor pLEW20 (Abbildung 22). Dieser trägt das Bleomycin-Resistenzgen *ble* welches den pLEW20 zur Phleomycin-Resistenz befähigt und in einem in-vivo-Selektions-Verfahren bereits erfolgreich getestet wurde. Allerdings wurde bei diesem Verfahren, um eine erforderliche Leistungsfähigkeit der Tiere zu erreichen, additiv zum Phleomycin täglich Koffein verabreicht [161]. Koffein ist ein natürliches und weitverbreitetes Alkaloid, das neben seiner zentralnervös stimulierenden Wirkung auch leistungssteigernd wirkt [162-164].

Die Mehrheit der trypanosomalen Gene wird durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, über die bislang keine Regulationsmechanismen der Transkription bekannt sind, konstitutiv exprimiert [165, 166]. Die Transkription der Prozyklin-Gene, der rRNA-Gene und VSG-Gene erfolgt dagegen durch die RNA-Polymerase I, die bei Prozyklin-Genen durch den GPEET-Promotor organisiert ist [165] und in prozyklischen Trypanosomen ein höheres Expressionsniveau bereitstellt [146]. Ergo ist die Expressionsrate des Luciferase-Gens des pLEW20 in BF, im Vergleich zur prozyklischen Form, geringer. Der Vergleich zwischen BF-Trypanosomen ist davon trotzdem unbeeinträchtigt. Unbestimmt bleibt jedoch der Einfluss der Transkriptionsregulation der RNA-Polymerase I. Diese ist bekanntlich die bisher einzige, in *T.b.* vorkommende RNA-Polymerase, für die Regulationsmechanismen der Transkription nachgewiesen wurden [165]. Eine Beeinflussung der mRNA-Level durch intrinsische Regulationsmechanismen ist daher wahrscheinlich und die Verwendung eines RNA-Polymerase II-Promoters eine Alternative.

Das Genom von *T.b.* besteht aus einem diploiden Chromosomensatz. Die Gene sind in polycistronischen Transkriptionseinheiten organisiert und werden in ihrer

Expression abhängig vom Zellstadium (1.1.2) exprimiert [31]. Nach der Transkription erfolgen stadienabhängige komplexe Modifikationen der mRNA, das sogenannte posttranskriptionale Editing. RNA-Editing ist eine Eigenschaft von Kinetoplasten, ohne die BF-Trypanosomen und die prozyklische Form nicht überleben [31]. Die regulatorischen Zusammenhänge zwischen der polycistronischen mRNA und der daraus resultierenden Proteinexpression vollständig zu verstehen wird angestrebt. Von der vorliegenden mRNA-Menge kann jedoch nicht unbedingt auf die Proteinmenge geschlossen werden [12]. Nach dem derzeitigen Wissensstand sind die 3'UTRs für die Regulierung der Translation oder die Stabilisierung der mRNA oder beides verantwortlich [146, 167-169] (4.2). Eine 3'UTR-abhängige Regulierung wird durch die Verknüpfung mit dem Luciferase-Gen im pLEW20 theoretisch im selben Maße die Luciferase-Expression und die TbMSP-Expression beeinflussen. Einschränkungen bestehen daher vorwiegend durch abweichende 3'UTR-Sequenzen (4.3). Eine Beeinflussung durch die Translation der Luciferase-mRNA ist sehr unwahrscheinlich, da die Luciferase ohne weitere posttranslationale Modifikationen in das aktive Protein übersetzt wird [141]. Dennoch erlaubt, das in dieser Arbeit publizierte Konstrukt, keine Rückschlüsse auf absolute TbMSP-Konzentrationen.

4.2 Auswahl der TbMSP-regulierenden Sequenzmotive

Protein-kodierende Gene sind in afrikanischen Trypanosomen und anderen Trypanosomatiden hintereinander aufgereiht. Diese Gen-Ketten werden zu langen polycistronischen Vorläufer-RNAs transkribiert aus denen anschließend durch Spleißen, Addition des mini-Exons und Polyadenylierung mRNAs gebildet werden [168]. In vielen Fällen hat sich herausgestellt, dass die Präsenz großer Mengen mRNA jedoch nicht durch Regulationsmechanismen des Spleißens oder der Polyadenylierung festgelegt wird, sondern durch umschriebene Sequenzmotive in 3'UTRs bestimmt wird [167, 170]. Dies gilt auch für die TbMSPs [105].

Die TbMSPs werden, wie auch andere MSPs der Trypanosomatiden, anhand ihres Expressionsmusters im Lebenszyklus und der Länge ihrer 3' untranslated regions (3'UTRs) in die fünf Genfamilien MSP-A, MSP-B, MSP-C, MSP-D und MSP-E eingeteilt. *Trypanosoma brucei* verfügt über MSPs aus drei Genfamilien [105, 171]. Der Genfamilie TbMSP-A werden 6 Gene zugeordnet [146], die auf die Chromosomen 7, 8 und 11 verteilt sind [147]. *Trypanosoma brucei* werden weitere 4 Gene der TbMSP-B auf Chromosom 8 und ein Gen der TbMSP-C auf Chromosom 10 zugeordnet [90, 146]. Die Anzahl der Gene bezieht sich jeweils auf einen haploiden Chromosomensatz [146].

Um die mRNA-Mengen von allen TbMSP-Genen in vivo vergleichen zu können, bedarf es der Klonierung aller entsprechenden 3'UTRs. Bei dieser Untersuchung wurden exemplarisch zwei 3'UTRs kloniert. Von den TbMSP-B-Genen wurde eine bereits im Detail analysierte 3'UTR ausgewählt (Tabelle 39). Frühere Untersuchungen zeigen, dass die TbMSP-C-mRNA in BF-Trypanosomen in höherem Ausmaß als die mRNA der TbMSP-A vorliegt und in beiden Familien in BF deutlich mehr mRNA vorhanden ist als in der prozyklischen Form [146]. Bei der TbMSP-C-3'UTR wurden daher eher deutliche Ergebnisse zur Bestätigung des Konstruktes erwartet als bei der TbMSP-A-3'UTR. Die TbMSP-C-3'UTR ist in geringerem Ausmaß erforscht, als die gewählte 3'UTR der TbMSP-B. Die Ergänzung der TbMSP-C-3'UTR mit einem weiteren Abschnitt der ICR auf eine Gesamtlänge von 1180bp ermöglichte eine größere Sicherheit alle wichtigen regulatorischen Elemente zu erfassen. Letztendlich kann das Fehlen regulatorischer Elemente und eine Manipulation der Luciferase-Expression nicht endgültig ausgeschlossen werden, weil es an detailliertem Wissen über wichtige Abschnitte und stark regulierende 3'UTR-Bereiche der TbMSP-C mangelt.

4.3 Auswahl der LS-Klone

Die PCR ist ein gängiges und zuverlässiges Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und wird routinemäßig bei Klonierungen eingesetzt [172]. Abhängig von der gewählten Polymerase verbleibt jedoch wie bei humanen, bakteriellen und parasitären Polymerasen eine Fehlerwahrscheinlichkeit, die zu

Mutationen, Deletionen und Expansionen der Nukleotidsequenz führen kann [173]. Die Auswirkungen umfassen ein Spektrum von unbemerkten Veränderungen (stumm) bis zu funktionsunfähigen Proteinen oder Unterbrechungen der Transkription. Um den Einfluss veränderter Basen auf die Expression der Luciferase zu minimieren wurden die LS mehrerer *E. coli*-Klone überprüft.

Die zusätzliche Restriktionsstelle der BamHI-Endonuklease in der TbMSP-C-3'UTR führt bei der Anwendung eines Restriktionsverdau, der für die Klonierung notwendig ist, zu 24 Deletionen. Um diesen erheblichen Basenverlust der LS-C zu vermeiden, ist die Erkennungssequenz der BamHI-Endonuklease durch die Anwendung des Primers mut-se-BamHI-TbMSP-C-3'UTR (Tabelle 40) zur LS-mC modifiziert. Die Anzahl der Mutationen wurde dadurch von 31 der LS-C auf 9 der LS-mC gesenkt (3.1.4) und die Wahrscheinlichkeit einer modifizierten Luciferase-Expression reduziert. Bei der Gegenüberstellung von Sequenzen der LS-C- und LS-mC-Klone wurden drei übereinstimmende Deletionen, die an den Positionen 953-955 in der LS-C (Abbildung 15) und an den Positionen 936-938 in der LS-mC liegen (Abbildung 16), erfasst. Diese Deletionen waren in allen sequenzierten Klonen, die die TbMSP-C-3'UTR beinhalten, konsistent. Vor diesem Hintergrund können sie als physiologische Mutationen im Rahmen der regulären Replikation einer Trypanosomen-Population betrachtet werden und man kann annehmen, dass sie weder trypanozide noch trypanostatische Auswirkungen haben.

Die LS-B in Abbildung 14 beinhaltet an den Positionen 52, 60 und 94 drei rot markierte Punktmutationen, die nicht eindeutig als neu aufgetretene Mutationen durch die PCR und nicht eindeutig als physiologische Mutationen der zugrundeliegenden MiTat1.2 interpretiert werden können. Ihr Einfluss auf die Expressionsniveaus der Luciferase kann jedoch vernachlässigt werden, da keine der drei Positionen in einem URE oder dem AURE liegt (vgl. Abbildung 9).

Die PCR wurde mit dem HotStarTaq® Master Mix von QIAGEN® durchgeführt, der die HotStarTaq DNA Polymerase enthält. Die HotStarTaq DNA Polymerase ist eine modifizierte Variante einer aus *Thermus aquaticus* isolierten Polymerase

und besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität [174], die für eine *proofreading*-Funktion notwendig wäre. Mit *proofreading* bezeichnet man eine Korrekturfunktion biochemischer Prozesse [175], die von John Hopfield und Jacques Ninio unabhängig voneinander 1974 bzw. 1975 vorgestellt wurde [176]. Die HotStarTaq DNA Polymerase bringt, dem technischen Kundenservice von QIAGEN® zufolge, trotzdem nur eine Fehlerrate von $2-3 \times 10^{-5}$ mit sich und ist daher mit *proofreading*-Polymerasen, die Fehlerraten von 1×10^{-5} bis 1×10^{-6} aufweisen, vergleichbar.

4.4 Elektroporation von Trypanosomen

Die Elektroporation ist ein bewährtes und vielfach erprobtes Mittel welches die Transfektion von Oligo- und Polynukleotiden in eukaryontische Organismen erlaubt und bei molekularbiologischen Untersuchungen von monomorphen Trypanosomen eine Transfektionseffizienz von $1:10^7$ bis $1:10^8$ erreicht [177]. Für eine erfolgreiche Integration der transfizierten Sequenzen in das trypanosomale Genom müssen der Zellzyklus und eine weitere Zellteilung vollzogen werden. Die genomische Integration konnte durch die Linearisierung der LFPs an der NotI-Restriktionsstelle um das 250-fache erleichtert werden. Entscheidend ist dafür der im rRNA Spacer liegende site specific DNA double-strand break (DSB).

Pleomorphe Trypanosomen zu transfizieren gilt als schwierig [178]. Die Transfektionseffizienz ist etwa um den Faktor 100 niedriger als bei monomorphen Populationen [177] und mit üblichen Elektroporatoren ineffizient. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Protokoll zur stabilen Transfektion pleomorpher Stämme veröffentlicht, das eine effizientere Transfektion mit $1:10^6$ bis $1:10^7$ verspricht [179]. Das Protokoll beruht auf einem Verfahren der Firma Amaxa bei dem die transfizierte DNA direkt in den Zellkern gelangen soll. Der Erfolg sei daher nicht von der Zellteilung abhängig [180]. In einem eigens von der Firma Amaxa entwickelten Elektroporator werden auf die Zellen abgestimmte Programme angewendet. Deren Parameter sind jedoch ebenso unbekannt, wie die Zusammensetzung der Nucleofactor-Lösung, die für das Verfahren benötigt

wird. Dennoch ist das Verfahren von Amaxa eine aussichtsreiche Methode um pleomorphe Trypanosomen erfolgreich und effizient transfizieren zu können.

4.5 Kultivierung pleomorpher Trypanosomen

Grundsätzlich reagieren pleomorphe Trypanosomen sensibler auf Umgebungsbedingungen als monomorphe Stämme und sind daher aufwändiger zu kultivieren. Trotz der Ablösung von *feeder layern* aus Fibroblasten durch L-Cystein oder Mercaptoethanol angereicherte Medien benötigen pleomorphe Trypanosomen für eine stabile Zellkultur immer noch einen organischen Stimulus [181, 182]. Dieser Stimulus kann durch die Zugabe von Methylcellulose oder einer Matrix aus semisolider Agarose gewährleistet werden [109, 183]. Eine Kultivierung mit Methylcellulose erfordert jedoch vor jeder Verwendung der Trypanosomen eine zeitaufwändige Filtration. Diese reduziert die Viskosität des Mediums und erschwert die Kultivierung der sensiblen Zellen. Das Wachstumsverhalten genuiner AnTat1.1 (Abbildung 32) wurde deshalb unter Verwendung einer Agarose-Matrix studiert und das Protokoll nach Vassella [109] mit Semisolider Agarose erfolgreich implementiert.

Abbildung 32 demonstriert einen typischen Kulturverlauf aus Adaptation (*lag*-Phase), Wachstum (*log*-Phase), stationärer Phase und Zelluntergang. Die mittlere Generationszeit wurden zwischen 12 und 48h ermittelt und beträgt 11h.

Die Kultivierung mit semisolider Agarose eignet sich auch zur Erprobung der toxischen Wirkung von Phleomycin auf Trypanosomen, wie in Abschnitt 3.3.3 demonstriert wurde. In der Literatur findet man, voneinander stark abweichende, Angaben zu selektionswirksamen Phleomycin-Konzentrationen (3.3.3). Untersucht wurde daher die häufig und im mittleren Bereich liegende Konzentration von 2,5µg/ml. Zur Abschätzung der Differenz zu unwirksamen Konzentrationen wurde eine um den Faktor 10 geringere Konzentration (0,25µg/ml) und eine dazwischenliegende Konzentration (1µg/ml) getestet. Alle Kulturen wiesen einen ähnlichen Verlauf der Zelldichte auf und sind als toxisch einzustufen. Für die Selektion wurden dennoch eine Konzentration von 2,5µg Phleomycin/ml verwendet.

4.6 Kultivierung rekombinanter LFP-MiTat1.2

Die axenische in-vitro-Kultivierung monomorpher Trypanosomen ist eine verlässliche und durch viele Untersuchungen optimierte Methode für die keine *feeder layer* mehr benötigt werden [182]. In HMI-9-Medium, einem modifizierten IMDM, werden dadurch Zelldichten von bis zu 2×10^6 /ml erreicht. Ohne einen Austausch des Kulturmediums sinkt die Zelldichte nach 3 Tagen wieder [108]. Die ermittelten Wachstumskurven der Abbildung 35 gleichen diesem Verlauf. Die Wachstumskurven der rekombinanten Trypanosomen zeigen eine leichte Verzögerung der Maxima. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die verlängerten *lag*-Phasen zurückzuführen. *lag*-Phasen entstehen durch eine Anpassung der Zellkultur und treten bei der axenischen Kultivierung monomorpher Trypanosomen natürlicherweise auf. Diese können durch die Zugabe von Phleomycin, um den Selektionsdruck zu erhalten, verlängert sein. Insgesamt ist festzustellen, dass sich die rekombinanten MiTat1.2, wenn auch nicht wesentlich, dennoch langsamer anpassen.

Grundsätzlich weisen monomorphen MiTat1.2 eine Generationszeit von etwa 7 bis 8h in axenischer Kultivierung auf. Die Kontroll-Kultur mit genuinen MiTat1.2 (MiTat Kontrolle) wies in dieser Arbeit eine Generationszeit von 7h auf (Abbildung 35). Im Vergleich liegen die Generationszeiten der rekombinanten LFP-B-MiTat1.2 (B MiTat) mit 7,7h und der rekombinanten LFP-mC-MiTat1.2 (C MiTat) mit 6,4h für eine manuelle Bestimmung daher in einem tolerablen Bereich. Die Dynamik der rekombinanten MiTat1.2-Kulturen kann gegenüber der Kontroll-Kultur als unverändert betrachtet werden.

4.7 Luciferase-Assay

Die *firefly*-Luciferase ist ein 61kDa großes Enzym, das bereits 1985 beschrieben wurde [184] und durch weiterführende Untersuchungen zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Newton Harvey [185] nun zu dem am besten erforschten Luciferin-Luciferase-System zählt. Die *firefly*-Luciferase ist ein Enzym der amerikanischen Leuchtkäfer, *Photinus pyralis*, das die Reaktion von D-Luciferin mit ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin katalysiert. Dieses Oxyluciferin liegt in

einem energetisch angeregten Zustand vor und gibt bei der Rückkehr in den Grundzustand ein Photon ab [186]. Die Quantenausbeute (*quantum yield*), die die Anzahl der emittierten Lichtquanten aus einem eingesetzten Luciferin-Moleküle angibt, beträgt für die *firefly*-Luciferase bei einem pH-Wert von 8,0 0,48 [187]. Dies ermöglicht unter optimalen Bedingungen die Detektion von nur 10fg Luciferase. Das entspricht 10^5 Luciferase-Molekülen. Das *firefly*-Luciferin-Luciferase-System ist damit 100 bis 1000-fach sensitiver als das Chloramphenicol-Acetyltransferase-System (CAT) [186].

Alternative Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel Untersuchungen der mRNA mit Northern Blots, liefern reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse, lassen jedoch keine Aussagen über die Translation zu und die Interpretation kann bei Autoradiogrammen stark eingeschränkt sein [90, 146]. Da Zymogramme die katalytischen und substratspezifischen Aktivitäten von Enzymen erfassen sind auch diese Ergebnisse durch unterschiedliche Aktivitätsniveaus der Enzyme beeinflusst. Einzelne hohe Enzymaktivitäten können das Vorliegen anderer Enzyme zudem verschleiern [23]. Biolumineszenz ist im Gegensatz zu proteolytischen und glykolytischen Prozessen kein gewöhnlicher Prozess [186] und kann daher von zelleigenen Vorgängen der Trypanosomen klar getrennt werden. Um die Proteolyse von Casein durch die TbMSP-B in einem Zymogramm detektieren zu können wird zudem eine verstärkte Genexpression benötigt [106]. Antikörper für einen Western-Blot können aus dem Serum TbMSP-infizierter Tiere isoliert werden [106]. Diese Methode ist jedoch aufwändig und muss für jede TbMSP einzeln durchgeführt werden. Bestrebungen die TbMSP-B in der Immunfluoreszenzmikroskopie zu detektieren scheiterten und Western-Blots wiesen nur unter einer Überexpression Banden auf [106]. In Anbetracht der Tatsache, dass bei der Entnahme von Trypanosomen aus einem Tiermodell, insbesondere aus Liquor cerebrospinalis, hohe Zellzahlen nicht gewährleistet werden können und eine Überexpression der TbMSPs das Ergebnis beeinflusst, ist das Reporter-System der *firefly*-Luciferase ideal.

Der in Abschnitt 3.4.1 dargestellte Luciferase-Assay zur Überprüfung der Luciferase-Expression und Luciferase-Funktion zeigt für den Ansatz MSP-mC

einen 33-fach höheren normalisierten Mittelwert an, als für den Ansatz MSP-B. Ein ähnliches Reporter-System gibt die relative Luciferase-Aktivität als Verhältnis der *firefly*-Luciferase-Aktivität zur Aktivität der *renilla*-Luciferase an. In BF-Trypanosomen weist die relative Luciferase-Aktivität für MSP-C einen etwa 7 bis 8-fach höheren Wert (einer Grafik entnommen) als für MSP-B auf [146]. Die ursprünglichen Messwerte sind jedoch nicht angegeben und die Angaben der Grafik sind durch eine Normalisierung, Darstellung als Vielfaches des Hintergrundes und als prozentualen Anteil eines Referenzproteins für einen Vergleich nur bedingt aussagekräftig. Übereinstimmend sind die jeweils vielfach höheren Werte für MSP-C in BF-Trypanosomen im Vergleich zu MSP-B. Um möglichst naturgetreue Ergebnisse zu erhalten wurde in dieser Arbeit auf eine Verstärkung der Expression durch Tetrazyklin verzichtet. Die Projekte unterscheiden sich in den Promotern, den transkribierenden Polymerasen, den Zelllinien und den Antibiotika und nehmen sicherlich Einfluss auf die Ergebnisse. Dennoch erscheint die ungewöhnliche Diskrepanz dadurch nicht vollständig begründet. Für den Bezug der TbMSP-C-mRNA zur TbMSP-B-mRNA wird ein Verhältnis von 4 zu 1 angenommen [90].

Die in 3.4.1 dargestellten Konfidenzintervalle überschneiden sich nicht. Die Nullhypothese, dass sich die Luciferase-Expressionen nicht unterscheiden, ist daher abzulehnen. Man kann annehmen, dass sich die Expressionsniveaus unterscheiden. Darüber hinaus wiesen die Stichproben signifikante ($p < 0,05^*$) Unterschiede im Welch-Test, im ANOVA-Test und den post-tests Dunnett-T3 und Games-Howell auf (Tabelle 46, 3.4.1). Dies gilt für alle Vergleichspaare und für die Testung mit allen drei Vergleichsgruppen. Der Welch-Test wurde statt des Student's t-Tests angewendet. Der Student's t-Test kann zwar trotz Verletzungen seiner Voraussetzungen als robust betrachtet werden wenn die Stichproben unabhängig sind [188], prinzipiell entstehen durch Verletzungen der Voraussetzungen jedoch höhere Fehler [189], sodass der Welch-Test, der die Varianzgleichheit nicht annimmt, ideal ist. Der ANOVA-Test ermöglicht den Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten und ist sogar bei Verstößen gegen die Normalverteilung recht robust [190]. Um den ungleichen Varianzen auch hier Rechnung tragen zu können wurden post-tests durchgeführt (2.4.3). Der

Dunnett-T3-Test ist robust bei ungleichen Varianzen, konservativ und für kleine Stichproben geeignet. Der Games-Howell-Test ist bei ungleichen Varianzen ebenfalls robust, weniger konservativ und wird eher empfohlen [191].

Neben der grün-gelb fluoreszierenden *firefly*-Luciferase bei einer Wellenlänge von 561nm gibt es auch grün, orange, rot und blau [186, 192]. Unter bestimmten Bedingungen verlängert sich die Wellenlänge der natürlichen *firefly*-Luciferase auf 617nm und erfährt eine Rotverschiebung. Dieses Phänomen ist bei einem pH unter 7,5, bei Temperaturen über 20°C, bei Schwermetallen und bei Harnstoff zu beobachten [193, 194]. Beim in vivo *bioluminescence imaging* (in vivo BLI) haben sich höhere Wellenlängen als sensitiver und kontrastreicher bezüglich unterschiedlichen Kompartimenten herausgestellt, da die Absorption durch das Gewebe geringer ist. Daher werden Luciferasen verwendet, die eine dauerhafte Rotverschiebung aufweisen. Dazu zählen die *click beetle red*-Luciferase (CBR) und die rotverschobene *firefly*-Luciferase (*Photinus pyralis* RE9-Luciferase = PpyRE9) [192]. Die in dieser Arbeit verwendete grünelbe fluoreszierende *firefly*-Luciferase ist auch beim BLI gebräuchlich und gilt als Richtmaß anderer Luciferasen. Die in vivo BLI ist eine Methode die auf den Verlust von Tieren nicht angewiesen und damit schon aus ethischen Gründen anzustreben ist. Ob die natürliche Expression der TbMSPs für ein aussagekräftiges BLI genügt ist noch nicht erprobt. Doch dieses Reporter-System erlaubt die Dokumentation von Zeitverläufen mit hoher Auflösung [195]. Die Untersuchungsmethoden durch Luciferin-Luciferase-Reporter-Systeme sind vielfältig und ermöglichen facettenreiche Konzepte die TbMSPs zu ergründen. Die unterschiedliche Anreicherung von Trypanosomen in Kompartimenten sollte dabei stets berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Humane Afrikanische Trypanosomiasis (HAT), die auch als Schlafkrankheit bekannt ist, wird durch Infektion mit Protozoen der Artengruppe *Trypanosoma brucei* hervorgerufen. Diese einzelligen Parasiten werden durch Tse-Tse-Fliegen übertragen. Die HAT betrifft Menschen in den tropischen Regionen Afrikas und dort insbesondere die ländlichen und wirtschaftlich armen Gebiete. Trotz erheblicher Fortschritte in der Medizin ist die medikamentöse Therapie der HAT nicht zufriedenstellend. Für die langwierigen und invasiven Therapien fehlt es an Infrastruktur und medizinischem Personal. Zudem erfüllen die vorhandenen Medikamente nicht die gängigen Sicherheitsstandards und sind mit ernsthaften Nebenwirkungen verbunden. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist für Pharmaunternehmen unrentabel. Dennoch werden neue, suffiziente und problemlos zu verabreichende Medikamente dringend benötigt. Um diese Entwicklung voranzutreiben und um neue Zielstrukturen zu finden, ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Trypanosomen unerlässlich.

Die trypanosomale *Major surface protease B* (TbMSP-B) spielt eine wichtige Rolle beim Wechsel der Oberflächenproteine während der Differenzierung und ist möglicherweise auch beim Verlassen der Blutgefäße und der Ausbreitung der Trypanosomen in andere Kompartimente des Wirts von Bedeutung. Um diesen Sachverhalt weiterführend untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Konstrukt konzipiert und kloniert, welches durch die Anwendung eines Luciferase-Assays Rückschlüsse auf die Expressionsverhältnisse der TbMSPs zulässt. Der Luciferase-Assay ist äußerst sensitiv und die Ergebnisse sind von der Aktivität der TbMSPs unabhängig. Das Konzept wurde an rekombinanten Trypanosomen der monomorphen Art MiTat1.2 *in vitro* erfolgreich getestet und beinhaltet die notwendigen Voraussetzungen für eine Anwendung in pleomorphen Trypanosomen und Tiermodellen. Das befähigt zum Erlangen neuer Erkenntnisse und eröffnet möglicherweise Perspektiven für fortschrittliche HAT-Therapien.

Ort, Datum

Prof. Dr. rer. nat. Michael Duszenko

Abstract

The Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as *sleeping sickness*, is caused by the protozoan infection with *Trypanosoma brucei*. These unicellular parasites are transmitted by bites of tsetse flies. Particularly people living in rural and poor regions of Africa are impacted by HAT and despite significant improvements in medicine the pharmaceutical therapies lack efficiency. The absence of an appropriate infrastructure and medical staff confines the implementation of enduring and invasive therapies. Moreover, the available drugs do not meet common safety standards, are linked to severe side effects and pharmaceutical companies consider the development of new active agents as unprofitable. Nevertheless, new, sufficient and convenient drugs are urgently needed. To urge this progress and to find new drug targets, studies of the molecular mechanisms of trypanosomes are indispensable.

The trypanosomal *Major surface protease B* (TbMSP-B) plays an important role in changing of surface proteins during differentiation and is possibly also involved in the ability of trypanosomes to leave blood vessels, invading additional compartments in the hosts body. The presented work displays a designed and cloned DNA construct to enable further investigations of this issue. By performing a luciferase assay which is very sensitive and independent of the TbMSPs activities, predictions of the relative expression levels can be made. This concept was successfully verified on the monomorphic strain MiTat1.2 in an in vitro experiment. Beyond, the construct provides conditions for the implementation of animal model systems and studies of TbMSPs in pleomorphic strains. It enables new insights and possibly even advanced HAT therapies.

Ort, Datum

Prof. Dr. rer. nat. Michael Duszenko

6 Literaturverzeichnis

1. **Sistrom M, Evans B, Benoit J, et al.** (2016) *De Novo Genome Assembly Shows Genome Wide Similarity between Trypanosoma brucei brucei and Trypanosoma brucei rhodesiense*, PloS one 11 (2):p. e0147660
2. **Brun R, Blum J, Chappuis F, et al.** (2010) *Human african trypanosomiasis*, The Lancet 375 (9709):p. 148-159
3. **Wamwiri FN and Changasi RE** (2016) *Tsetse Flies (Glossina) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review*, BioMed Research International 2016
4. **Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, et al.** (2001) *The duality of sleeping sickness: focusing on sleep*, Sleep medicine reviews 5 (2):p. 139-153
5. **Brun R and Balmer O** (2006) *New developments in human African trypanosomiasis*, Current opinion in infectious diseases 19 (5):p. 415-420
6. **Kalonji WM** (2014) *Implementation of studies in remote areas in countries with limited regulatory and ethics experience*, Vortrag auf dem Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) Meeting der American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), Symposium: Towards elimination of HAT, Internet, http://www.dndi.org/images/stories/events2014/14astmh/WMutombo_RemoteStudiesHAT_ASTMH_2014.pdf, 03.04.2016
7. **GIMP2**, GNU Image Manipulation Programm, 2.8.14, open-source-Lizenz, Kimball S and Mattis P, <https://www.gimp.org/>
8. **Keating J, Yukich JO, Sutherland CS, et al.** (2015) *Human African trypanosomiasis prevention, treatment and control costs: A systematic review*, Acta tropica 150 4-13
9. **Reinhardt E** (2002) *Travailler ensemble: la mouche tsé-tsé et la pauvreté rurale*, Internet, http://www.un.org/french/pubs/chronique/2002/numero2/0202p17_la_mouche_tsetse.html, 15.06.2015
10. **WHO** (2013) *Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)*, factsheet 259 der World Health Organization, Genf, Schweiz, Internet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en>, 03.04.2016
11. **Cattand P, Jannin J and Lucas P** (2001) *Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination*, Tropical medicine & international health 6 (5):p. 348-361
12. **Geiger A, Simo G, Grébaut P, et al.** (2011) *Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives*, Journal of proteomics 74 (9):p. 1625-1643
13. **WHO** (2006) *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, Weekly epidemiological record 81 (8):p. 69-80

14. **Fèvre EM, Odiit M, Coleman PG, et al.** (2008) *Estimating the burden of rhodesiense sleeping sickness during an outbreak in Serere, eastern Uganda*, BMC Public Health 8 (1):p. 96
15. **Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, et al.** (2009) *Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases*, The Lancet 373 (9674):p. 1570-1575
16. **Barth T** (2013) *Untersuchungen zum Apoptosemechanismus bei Trypanosoma brucei: Effekte von Staurosporin im Vergleich zu Prostaglandin D2 und die Rolle der Endonuklease G*, Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen
17. **Winterbottom T** (1803) *An account of the native Africans in the neighbourhood of Sierra Leone*,
18. **Winterbottom TM** (2010) *An Account of the Native Africans in the Neighbourhood of Sierra Leone: To which is Added an Account of the Present State of Medicine Among Them; with a New Introd. by John D. Hargreaves and E. Maurice Backett*, 2, Cambridge University Press,
19. **J. W and H.A. S** (2010) *Tsetse-Fliegen, Trypanosomen und Schlafkrankheit – die tödlichste Parasitose*, Krank durch Arthropoden, Denisia, Biologiezentrum Linz, Österreich, p. 637-654
20. **Fevre EM, Wissmann B, Welburn SC, et al.** (2008) *The burden of human African trypanosomiasis*, PLoS Negl Trop Dis 2 (12):p. e333
21. **La Roche A** *Trypanosomenschanker*, Rochelexikon Medizin, Internet, <http://www.gesundheit.de/lexika/medizin-lexikon/trypanosomenschanker>, 30.06.2015
22. **Bücken EW and Mohr W** (2013) *Protozoenkrankheiten durch Trypanosomen: Schlafkrankheit, Rickettsiosen und Protozoenkrankheiten*, E. Asshauer, O. Gsell and W. Mohr, Springer Berlin Heidelberg, p. 249-288
23. **de Sousa K, Atouguia J and Silva M** (2010) *Partial Biochemical Characterization of a Metalloproteinase from the Bloodstream Forms of Trypanosoma brucei brucei Parasites*, The Protein Journal 29 (4):p. 283-289
24. **Wery M and Burke J** (1972) *Human "healthy carriers" of Trypanosoma (brucei type) discovered by immunofluorescence test in the Republique Democratique du Congo*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 66 (2):p. 332-333
25. **Checchi F, Filipe JA, Haydon DT, et al.** (2008) *Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness*, BioMed Central infectious diseases 8 (1):p. 16
26. **Beers MH and Berkow R** (1999) *The Merck manual of diagnosis and therapy*, 17th edition, Merck and Co. Inc., Rahway, USA

27. **Pschyrembel W** (2011) *Pschyrembel Klinisches Woerterbuch*, 262. Auflage, De Gruyter Verlag, Berlin
28. **Despommier D, Gwadz R and Hotez P** (1995) *Chapter 31 African Trypanosomes: Trypanosoma brucei gambiense (Dutton 1902) and Trypanosoma brucei rhodesiense (Stephens and Fantham 1910)*, Parasitic Diseases, Springer, New York, p. 196-203
29. **Creek DJ, Anderson J, McConville MJ, et al.** (2012) *Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa*, Molecular and Biochemical Parasitology 181 (2):p. 73-84
30. **Matthews KR, Ellis JR and Paterou A** (2004) *Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes*, Trends in Parasitology 20 (1):p. 40-47
31. **Matthews KR** (2005) *The developmental cell biology of Trypanosoma brucei*, Journal of Cell Science 118 (2):p. 283-290
32. **Hunt M, Brun R and Köhler P** (1994) *Studies on compounds promoting the in vitro transformation of Trypanosoma brucei from bloodstream to procyclic forms*, Parasitology research 80 (7):p. 600-606
33. **Lejon V, Bentivoglio M and Franco JR** (2013) *Human African trypanosomiasis*, Handb Clin Neurol 114 169-181
34. **Mogk S, Meiwes A, Boßelmann CM, et al.** (2014) *The lane to the brain: how African trypanosomes invade the CNS*, Trends in parasitology 30 (10):p. 470-477
35. **Khaldun I, Slane WM, Casanova P, et al.** (1925) *Histoire des Berbères et des dynasties musulmanes de l'Afrique septentrionale*, Imprimerie du Gouvernement, Alger
36. **Kean BH, Mott KE and Russell AJ** (1978) *Tropical medicine and parasitology. Classic investigations.*, I and II, Cornell University Press, London
37. **Gruby D** (1843) *Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, Trypanosoma sanguinis*, Comptes rendus de l'Académie des Sciences 17 1134-1136
38. **Davies JNP** (1962) *The Cause of Sleeping-Sickness? Entebbe 1902-03. Part II*, East African Medical Journal 4 145-160
39. **Jamonneau V, Camara O, Ilboudo H, et al.** (2015) *Accuracy of individual rapid tests for serodiagnosis of gambiense sleeping sickness in West Africa*, PLoS Negl Trop Dis 9 (2):p. e0003480
40. **Lejon V** (2014) *Advances and challenges in current diagnostics for HAT*, Vortrag auf dem Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) Meeting der American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), Internet, http://www.dndi.org/images/stories/events2014/14astmh/VLejon_DiagnosisHAT_ASTMH_2014.pdf, 04.04.2016

41. **Jamonneau V, Bucheton B, Kaboré J, et al.** (2010) *Revisiting the immune trypanolysis test to optimise epidemiological surveillance and control of sleeping sickness in West Africa*, PLoS Negl Trop Dis 4 (12):p. e917
42. **Ngoyi DM, Ekangu RA, Kodi MFM, et al.** (2014) *Performance of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and surveillance of gambiense sleeping sickness*, PLoS Negl Trop Dis. 8 (6):p. e2954
43. **Kirchhoff L** (1990) *Agents of African trypanosomiasis (sleeping sickness)*, Chapter 279, Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, G. Mandell, R. Douglas Jr and J. Bennett, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 2085-2090
44. **Giordani F, Barrett M and Mwenechanya R** (2014) *Advances in understanding and treatment of human African trypanosomiasis: divergent diseases caused by distinct parasites*, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine, S. Padmanabhan, Academic Press, London, p. 901-917
45. **Hainard A, Tiberti N, Robin X, et al.** (2011) *Matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule 1 are powerful staging markers for human African trypanosomiasis*, Tropical Medicine & International Health 16 (1):p. 119-126
46. **Wengert O, Kopp M, Siebert E, et al.** (2014) *Human African trypanosomiasis with 7-year incubation period: Clinical, laboratory and neuroimaging findings*, Parasitology international 63 (3):p. 557-560
47. **Machila N, Emongor R, Shaw AP, et al.** (2007) *A community education intervention to improve bovine trypanosomiasis knowledge and appropriate use of trypanocidal drugs on smallholder farms in Kenya*, Agricultural Systems 94 (2):p. 261-272
48. **Tarral A** (2012) *New Treatments for Sleeping Sickness*, Vortrag auf dem Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) Meeting der American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), Symposium: Towards elimination of HAT, Internet, http://www.dndi.org/images/stories/events2014/14astmh/Tarral_TreatmentsHAT_ASTMH_2014.pdf, 04.04.2016
49. **WHO** (2011) *WHO model list of essential medicines: 17th list*, World Health Organization Medicines web site, Internet, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70640/1/a95053_eng.pdf, 04.04.2016
50. **Jones DC, Foth BJ, Urbaniak MD, et al.** (2015) *Genomic and Proteomic Studies on the Mode of Action of Oxaboroles against the African Trypanosome*, PLoS Negl Trop Dis 9 (12):p. e0004299
51. **Cross G** (1975) *Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei*, Parasitology 71 (03):p. 393-417
52. **Miller EN, Allan LM and Turner MJ** (1984) *Topological analysis of antigenic determinants on a variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei*, Molecular and biochemical parasitology 13 (1):p. 67-81

53. **Olenick JG, Travis RW and Garson S** (1981) *Trypanosoma rhodesiense: chemical and immunological characterization of variant-specific surface coat glycoproteins*, *Molecular and biochemical parasitology* 3 (4):p. 227-238
54. **Schwede A, Jones N, Engstler M, et al.** (2011) *The VSG C-terminal domain is inaccessible to antibodies on live trypanosomes*, *Molecular and biochemical parasitology* 175 (2):p. 201-204
55. **Manna PT, Boehm C, Leung KF, et al.** (2014) *Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG*, *Trends in Parasitology* 30 (5):p. 251-258
56. **Sunter J, Webb H and Carrington M** (2013) *Determinants of GPI-PLC localisation to the flagellum and access to GPI-anchored substrates in trypanosomes*, *PLoS Pathog* 9 e1003566
57. **Mogk S, Meiwes A, Shtopel S, et al.** (2014) *Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS*, *PloS one* 9 (3):p. e91372
58. **Cross GA** (1996) *Antigenic variation in trypanosomes: Secrets surface slowly*, *Bioessays* 18 (4):p. 283-291
59. **Pays E, Lips S, Nolan D, et al.** (2001) *The VSG expression sites of Trypanosoma brucei: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts*, *Molecular and biochemical parasitology* 114 (1):p. 1-16
60. **Morrison LJ, Marcello L and McCulloch R** (2009) *Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity*, *Cellular microbiology* 11 (12):p. 1724-1734
61. **Pays E and Nolan DP** (1998) *Expression and function of surface proteins in Trypanosoma brucei*, *Molecular and biochemical parasitology* 91 (1):p. 3-36
62. **Alsford S, Horn D and Glover L** (2009) *DNA breaks as triggers for antigenic variation in African trypanosomes*, *Genome Biol* 10 (6):p. 223
63. **Morrison LJ, Majiwa P, Read AF, et al.** (2005) *Probabilistic order in antigenic variation of Trypanosoma brucei*, *International journal for parasitology* 35 (9):p. 961-972
64. **Boothroyd CE, Dreesen O, Leonova T, et al.** (2009) *A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in Trypanosoma brucei*, *Nature* 459 (7244):p. 278-281
65. **Gruszyński AE, van Deursen FJ, Albareda MC, et al.** (2006) *Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes*, *Molecular and biochemical parasitology* 147 (2):p. 211-223
66. **Ferrante A and Allison A** (1983) *Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat*, *Parasite immunology* 5 (5):p. 491-498
67. **Gruszyński AE, DeMaster A, Hooper NM, et al.** (2003) *Surface coat remodeling during differentiation of Trypanosoma brucei*, *Journal of Biological Chemistry* 278 (27):p. 24665-24672

-
68. **Smith TK, Vasileva N, Gluenz E, et al.** (2009) *Blocking variant surface glycoprotein synthesis in Trypanosoma brucei triggers a general arrest in translation initiation*, PLoS One 4 (10):p. e7532-e7532
 69. **Czichos J, Nonnengaesser C and Overath P** (1986) *Trypanosoma brucei: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro*, Experimental parasitology 62 (2):p. 283-291
 70. **Wolburg H and Mack AF** (2014) *Comment on the topology of mammalian blood–cerebrospinal fluid barrier*, Neurology, Psychiatry and Brain Research 20 (4):p. 70-72
 71. **Wolburg H, Mogk S, Acker S, et al.** (2012) *Late Stage Infection in Sleeping Sickness*, PLoS ONE 7 (3):p. e34304
 72. **Masocha W and Kristensson K** (2012) *Passage of parasites across the blood-brain barrier*, Virulence 3 (2):p. 202-212
 73. **Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, et al.** (1991) *Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs*, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 2 (3):p. 297-321
 74. **Proescher F** (1951) *Anti-coagulant properties of ethylene bis-iminodiacetic acid*, Experimental Biology and Medicine 76 (4):p. 619-620
 75. **Acharyya S, Matrisian L, Welch DR, et al.** (2015) *18 - Invasion and Metastasis*, The Molecular Basis of Cancer, 4th ed., J. Thompson, J.W. Mendelsohn, P.M. Gray, et al., Saunders, Philadelphia, p. 269-284.e262
 76. **Stamenkovic I** (2000) *Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*, Seminars in Cancer Biology 10 (6):p. 415-433
 77. **Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, et al.** (2015) *Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis*, Cancer and Metastasis Reviews 34 (4):p. 775-796
 78. **Xu Y, Li Z, Jiang P, et al.** (2015) *The co-expression of MMP-9 and Tenascin-C is significantly associated with the progression and prognosis of pancreatic cancer*, Diagnostic Pathology 10 (1):p. 1-8
 79. **Wang YH, Sui XM, Sui YN, et al.** (2015) *BRD4 induces cell migration and invasion in HCC cells through MMP-2 and MMP-9 activation mediated by the Sonic hedgehog signaling pathway*, Oncology letters 10 (4):p. 2227-2232
 80. **Verma S, Kesh K, Gupta A, et al.** (2014) *An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk*, Asian Pacific journal of cancer prevention 16 (17):p. 7393-7400
 81. **Heo S-H, Lee J-Y, Yang K-M, et al.** (2015) *ELK3 Expression Correlates With Cell Migration, Invasion, and Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells*, Gene expression 16 (4):p. 197-203
-

82. **Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, et al.** (2015) *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, 17 - Tumor Angiogenesis, Fourth Edition, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, PA
 83. **Fidler IJ** (1990) *Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture*, *Cancer research* 50 (19):p. 6130-6138
 84. **Lüllmann-Rauch R** (2012) *Taschenlehrbuch Histologie*, 4. vollständig überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart
 85. **McKerrow JH, Brindley P, Brown M, et al.** (1990) *Strongyloides stercoralis: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae*, *Experimental parasitology* 70 (2):p. 134-143
 86. **Santana J, Grellier P, Schrevel J, et al.** (1997) *A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV*, *Biochem. J* 325 129-137
 87. **Nikolskaia OV, Lima APCdA, Kim YV, et al.** (2006) *Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease*, *Journal of Clinical Investigation* 116 (10):p. 2739
 88. **Goodwin L** (1971) *Pathological effects of Trypanosoma brucei on small blood vessels in rabbit ear-chambers*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65 (1):p. 82-88
 89. **Bordier C** (1987) *The promastigote surface protease of Leishmania*, *Parasitology Today* 3 (5):p. 151-153
 90. **LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, et al.** (2003) *Expression and function of the Trypanosoma brucei major surface protease (GP63) genes*, *Journal of Biological Chemistry* 278 (27):p. 24658-24664
 91. **Olivier M** (2013) *Leishmanolysin*, Chapter 276, *Handbook of proteolytic enzymes*, Vol. 1, N.D. Rawlings and G. Salvesen, Academic Press, Heidelberg, p. 1231–1237
 92. **Chang C and Chang K** (1986) *Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (1):p. 100-104
 93. **Wilson ME and Pearson R** (1988) *Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes*, *Infection and immunity* 56 (2):p. 363-369
 94. **Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, et al.** (1989) *Surface acid proteinase (gp63) of Leishmania mexicana. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages*, *Journal of Biological Chemistry* 264 (13):p. 7483-7489
-

95. **Chen D-Q, Kolli BK, Yadava N, et al.** (2000) *Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in Leishmania amazonensis: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro*, Infection and immunity 68 (1):p. 80-86
96. **Seay MB, Heard PL and Chaudhuri G** (1996) *Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of Leishmania mexicana amazonensis promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes*, Infection and immunity 64 (12):p. 5129-5137
97. **Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, et al.** (1995) *Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis*, The Journal of Immunology 155 (6):p. 3102-3111
98. **Myung KS, Beetham JK, Wilson ME, et al.** (2002) *Comparison of the Post-transcriptional Regulation of the mRNAs for the Surface Proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of Leishmania chagasi*, Journal of Biological Chemistry 277 (19):p. 16489-16497
99. **Joshi PB, Sacks DL, Modi G, et al.** (1998) *Targeted gene deletion of Leishmania major genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63)*, Molecular microbiology 27 (3):p. 519-530
100. **Schlagenhauf E, Etges R and Metcalf P** (1998) *The crystal structure of the Leishmania major surface proteinase leishmanolysin (gp63)*, Structure 6 (8):p. 1035-1046
101. **Ramamoorthy R, Donelson J, Paetz K, et al.** (1992) *Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of Leishmania donovani chagasi promastigotes to an infectious form*, Journal of Biological Chemistry 267 (3):p. 1888-1895
102. **Kelly BL, Nelson TN and McMaster WR** (2001) *Stage-specific expression in Leishmania conferred by 3' untranslated regions of L. major leishmanolysin genes (GP63)*, Molecular and biochemical parasitology 116 (1):p. 101-104
103. **El-Sayed NM and Donelson JE** (1997) *African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the Leishmania GP63 surface protease*, Journal of Biological Chemistry 272 (42):p. 26742-26748
104. **Nwagwu M, Okenu D, Olusi T, et al.** (1988) *Trypanosoma brucei releases proteases extracellularly*, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 82 (4):p. 577
105. **Marcoux V, Wei G, Tabel H, et al.** (2010) *Characterization of major surface protease homologues of Trypanosoma congolense*, Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010, 418157
106. **Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, et al.** (2007) *A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes*, PLoS Pathog 3 (10):p. 1432-1445

107. **Bertani G** (1951) *Studies on Lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli*, Journal of bacteriology 62 (3):p. 293
108. **Hirumi H and Hirumi K** (1989) *Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers*, The Journal of parasitology 985-989
109. **Vassella E and Boshart M** (1996) *High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic Trypanosoma brucei strains in axenic culture*, Molecular and biochemical parasitology 82 (1):p. 91-105
110. **Carruthers VB and Cross G** (1992) *High-efficiency clonal growth of bloodstream-and insect-form Trypanosoma brucei on agarose plates*, Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (18):p. 8818-8821
111. **Mogk S** (2015) *Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection von Trypanosoma brucei und Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem: Dissertation*, Inauguraldissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen, epubli, Holtzbrinck Digital Content Group
112. **Brand Zählkammern**, Handbuch Neubauer-Zählkammern von Brand, Internet, http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_d.pdf, 08.05.2016
113. **Van den Hoff M, Moorman A and Lamers WH** (1992) *Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival*, Nucleic acids research 20 (11):p. 2902
114. **Godfrey D and Lanham SM** (1971) *Diagnosis of Gambian trypanosomiasis in man by isolating trypanosomes from blood passed through DEAE-cellulose*, Bulletin of the World Health Organization 45 (1):p. 13
115. **Sigma-Aldrich REGENERATION OF DEAE-CELLULOSE**, Product Information D3764 3709/3715/3797 - FEB, Internet, https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d3764pis.pdf, 08.05.2016
116. **QIAGEN®** (2006) *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf, 08.05.2016
117. **QIAGEN®** (2004) *QIAprep® Miniprep Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, https://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf, 08.05.2016
118. **QIAGEN®** (2012) *QIAGEN® Plasmid Purification Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjCqF6srMAhVCNxQKHR9TBnIQFggxMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3D46205595-0440-459e-9d93-50eb02e5707e%26lang%3Den&usg=AFQjCNF8m_Tr_xKa1C7TcYF1NOOr0Xdlf, 08.05.2016

-
119. **QIAGEN®** (2012) *RNeasy® Mini Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, <https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjrier46srMAhVBohQKH8IAHMQFggsMAI&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D56f047f63d7f4b0be04d5ef2%26assetKey%3DAS%253A342155508895745%25401458587638276&usg=AFQjCNFW20GldNj7OClJp2ulutrX2wq6Q&bvm=bv.121421273,d.d24,08.05.2016>
 120. **QIAGEN®** (2010) *Omniscript® Reverse Transcription Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjXsdfU68rMAhVDwBQKHRgCBdYQFgggMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3D7f8feb09-5115-40cd-a6a7-cf72149e172a%26lang%3Den&usg=AFQjCNF2v7xzsOhKtHwFyEDViHtC0sd4_w&bvm=bv.121421273,d.d24,08.05.2016
 121. **Corporation I** (2006) *Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products, Transforming One Shot® DH5α™-T1R, TOP10, and TOP10F Competent Cells, One Shot® Chemical Transformation Protocol*, Manual für TOPO TA Cloning®, Version U, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA, p. 4-6, 9-13
 122. **QIAGEN®** (2015) *QIAquick® Gel Extraction Kit*, Instruktionshandbuch, Internet, https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj-n5HAmMvMAhXK6RQKHekaDIgQFgggMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.qiagen.com%2Fresources%2Fdownload.aspx%3Fid%3Df4ba2d24-8218-452c-ad6f-1b6f43194425%26lang%3Den&usg=AFQjCNE97XaVThbfzvWJoZwc3i_xCVReGQ&bvm=bv.121421273,d.d24,08.05.2016
 123. **DNA Man**, v4.15, Institution License, LynnonBiosoft <http://www.lynnon.com/>
 124. **Primer3**, web version 4.0.0, GNU General Public License, Rozen S, Untergasser A, Remm M, et al., <http://primer3.ut.ee/>
 125. **Koressaar T and Remm M** (2007) *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*, *Bioinformatics* 23 (10):p. 1289-1291
 126. **Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al.** (2012) *Primer3 - new capabilities and interfaces*, *Nucleic Acids Research* 40 (15):p. e115
 127. **TriTrypDB - Trypanosoma brucei Gene Database**, <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>
 128. **Aslett** (2010) *TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae*, *Nucleic acids research* 38 (Database issue):p. D457-D462
 129. **Addgene - The nonprofit plasmid repository**, <https://www.addgene.org/>, https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2285/
-

-
130. **Rockefeller Universität**, New York, <http://tryps.rockefeller.edu/>,
http://tryps.rockefeller.edu/trypsr2_plasmids.html,
<http://tryps.rockefeller.edu/Plasmids/pLEW20.txt>
 131. **Glasel J** (1995) *Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios*, *Biotechniques* 18 (1):p. 62-63
 132. **Korbie DJ and Mattick JS** (2008) *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*, *Nature protocols* 3 (9):p. 1452-1456
 133. **QIAGEN®** (2010) *HotStarTaq® PCR Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, <https://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=53e71936-cf64-4a9b-a9d2-fccee4868aa7&lang=en>, 08.05.2016
 134. **ThermoScientific** (2012) *6X DNA Loading Dye*, Produktinformation, Internet, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012965_6X_DNA>Loading_Dye_R0611_UG.pdf, 08.05.2016
 135. **ThermoScientific** *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Produktinformation
 136. **BLAST®2 Sequences**, Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq
 137. **DoubleDigestCalculator**, ThermoScientific, <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>
 138. **ThermoScientific** *T4 DNA Ligase 1 U/µl*, Produktinformation
 139. **Lund AH, Duch M and Pedersen FS** (1996) *Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation*, *Nucleic acids research* 24 (4):p. 800-801
 140. **Acker S** (2013) *Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv monomeres Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung von Trypanosoma brucei brucei im Gewebe des zentralen Nervensystems*, Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen
 141. **Promega** (revised 2011) *Dual-Luciferase® Reporter Assay System Technical Manual*, Instruktionshandbuch, Internet, <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/dual%20luciferase%20reporter%20assay%20system%20protocol.pdf>, 11.05.2016
 142. **Statistics Viewer der Marke SPSS (Statistical Package of the Social Sciences)**, Version 22 und 23, Netzwerk-Lizenz der Universität Tübingen für Studenten der Humanmedizin, IBM, <http://www-01.ibm.com/software/de/analytics/spss/>
 143. **Aline Naumann**, *Diplom-Statistikerin und Wissenschaftliche Angestellte des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen*,
-

-
144. **Tamhane AC** (1977) *Multiple comparisons in model I one-way ANOVA with unequal variances*, Communications in Statistics-Theory and Methods 6 (1):p. 15-32
 145. **Levene H** (1960) *Robust tests for equality of variances*¹, Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling 2 278-292
 146. **Helm JR, Wilson ME and Donelson JE** (2009) *Differential expression of a protease gene family in African trypanosomes*, Molecular and biochemical parasitology 163 (1):p. 8-18
 147. **The EuPathDB Project Team**, <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>, http://tritrypdb.org/cgi-bin/gbrowse/tritrypdb/?name=Tb427_08_v4:522165..553910;h_feat=tb427.08.1610@yellow, http://tritrypdb.org/cgi-bin/geneSrt?project_id=TriTrypDB&ids=Tb427.08.1610&ignore_gene_alias=0&type=CDS&upstreamAnchor=Start&upstreamOffset=0&downstreamAnchor=End&downstreamOffset=0&go=Get+Sequences
 148. **Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M** (2012) *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*, Bioinformatics 28 (8):p. 1166-1167
 149. **Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit**, v1.19.0, GNU General Public License, Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M, <http://ugene.net/>
 150. **Loureiro I, Faria J, Clayton C, et al.** (2013) *Knockdown of asparagine synthetase A renders Trypanosoma brucei auxotrophic to asparagine*, PLoS Negl Trop Dis 7 (12):p. 10.1371/annotation/eb1374faa1332-fc1378d-1343aeba1392-f1334c1370c1374e5052
 151. **Kim H-S, Park SH, Günzl A, et al.** (2013) *MCM-BP is required for repression of life-cycle specific genes transcribed by RNA polymerase I in the mammalian infectious form of Trypanosoma brucei*, PLoS one 8 (2):p. e57001
 152. **Jefferies D, Tebabi P, Le Ray D, et al.** (1993) *The ble resistance gene as a new selectable marker for Trypanosoma brucei: fly transmission of stable procyclic transformants to produce antibiotic resistant bloodstream forms*, Nucleic acids research 21 (2):p. 191-195
 153. **Helms MJ, Ambit A, Appleton P, et al.** (2006) *Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes*, Journal of cell science 119 (6):p. 1105-1117
 154. **Clayton AM, Guler JL, Povelones ML, et al.** (2011) *Depletion of mitochondrial acyl carrier protein in bloodstream-form Trypanosoma brucei causes a kinetoplast segregation defect*, Eukaryotic cell 10 (3):p. 286-292
 155. **Boucher N, Dacheux D, Giroud C, et al.** (2007) *An essential cell cycle-regulated nucleolar protein relocates to the mitotic spindle where it is involved in mitotic progression in Trypanosoma brucei*, Journal of Biological Chemistry 282 (18):p. 13780-13790
 156. **Graham SV, Wymer B and Barry JD** (1998) *Activity of a trypanosome metacyclic variant surface glycoprotein gene promoter is dependent upon life cycle stage and chromosomal context*, Mol Cell Biol 18 (3):p. 1137-1146
-

157. **Ulbert S, Chaves I and Borst P** (2002) *Expression site activation in Trypanosoma brucei with three marked variant surface glycoprotein gene expression sites*, Molecular and biochemical parasitology 120 (2):p. 225-235
158. **Palermo G, Joris H, Devroey P, et al.** (1992) *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*, The Lancet 340 (8810):p. 17-18
159. **El-Badry HM** (1963) *Micromanipulators and micromanipulation*, 3, Academic Press, New York
160. **Valadares HMS, Pimenta JR, Segatto M, et al.** (2012) *Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal Trypanosoma cruzi Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping*, PLoS Neglected Tropical Diseases 6 (7):p. e1722
161. **Uzureau P, Felu C, De Muylder G, et al.** (2007) *G418, phleomycin and hygromycin selection of recombinant Trypanosoma brucei parasites refractory to long-term in vitro culture*, Molecular and biochemical parasitology 154 (1):p. 90-94
162. **Nehlig A, Daval J-L and Debry G** (1992) *Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects*, Brain Research Reviews 17 (2):p. 139-170
163. **Conger SA, Warren GL, Hardy MA, et al.** (2011) *Does caffeine added to carbohydrate provide additional ergogenic benefit for endurance?*, International journal of sport nutrition and exercise metabolism 21 (1):p. 71-84
164. **Astorino TA and Roberson DW** (2010) *Efficacy of acute caffeine ingestion for short-term high-intensity exercise performance: a systematic review*, The Journal of Strength & Conditioning Research 24 (1):p. 257-265
165. **Pena AC, Pimentel MR, Manso H, et al.** (2014) *Trypanosoma brucei histone H1 inhibits RNA polymerase I transcription and is important for parasite fitness in vivo*, Molecular microbiology 93 (4):p. 645-663
166. **Grondal E, Evers R, Kosubek K, et al.** (1989) *Characterization of the RNA polymerases of Trypanosoma brucei: trypanosomal mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III*, The European Molecular Biology Organization Journal 8 (11):p. 3383
167. **Coughlin BC, Teixeira SM, Kirchhoff LV, et al.** (2000) *Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein*, J Biol Chem 275 (16):p. 12051-12060
168. **Clayton C and Shapira M** (2007) *Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias*, Molecular and biochemical parasitology 156 (2):p. 93-101
169. **Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, et al.** (2001) *Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated Leishmania chagasi*, Molecular and biochemical parasitology 112 (1):p. 51-59

170. **Benz C, Nilsson D, Andersson B, et al.** (2005) *Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei*, Molecular and biochemical parasitology 143 (2):p. 125-134
171. **Grandgenett P, Coughlin B, Kirchhoff L, et al.** (2000) *Differential expression of GP63 genes in Trypanosoma cruzi*, Molecular and biochemical parasitology 110 (2):p. 409-415
172. **Müller H-J and Prange DR** (2016) *PCR als Klonierungsmethode*, PCR-Polymerase-Kettenreaktion, Springer, p. 17-20
173. **Müller H-J and Prange DR** (2016) *PCR zur Mutationsanalyse*, PCR-Polymerase-Kettenreaktion, Springer, p. 81-83
174. **QIAGEN®** (2010) *HotStarTaq® PCR Handbook*, Instruktionshandbuch, Internet, <https://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=53e71936-cf64-4a9b-a9d2-fccee4868aa7&lang=en>, 08.05.2016
175. **Murugan A, Huse DA and Leibler S** (2012) *Speed, dissipation, and error in kinetic proofreading*, Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (30):p. 12034-12039
176. **Ninio J** (1975) *Kinetic amplification of enzyme discrimination*, Biochemie 57 (5):p. 587-595
177. **Boßelmann CM** (2015) *Herstellung von eGFP exprimierenden Stämmen von Trypanosoma brucei brucei und Darstellung des Infektionsverlaufs im zentralen Nervensystem*, Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen
178. **McCulloch R, Vassella E, Burton P, et al.** (2004) *Transformation of monomorphic and pleomorphic Trypanosoma brucei*, Methods Mol Biol. 262 (Genetic Recombination):p. 53-86
179. **MacGregor P, Rojas F, Dean S, et al.** (2013) *Stable transformation of pleomorphic bloodstream form Trypanosoma brucei*, Molecular and biochemical parasitology 190 (2):p. 60-62
180. **Hamm A, Krott N, Breibach I, et al.** (2002) *Efficient transfection method for primary cells*, Tissue engineering 8 (2):p. 235-245
181. **Hirumi H, Doyle J and Hirumi K** (1977) *African trypanosomes: cultivation of animal-infective Trypanosoma brucei in vitro*, Science 196 (4293):p. 992-994
182. **Duszenko M, Ferguson M, Lamont GS, et al.** (1985) *Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of Trypanosoma brucei bloodstream forms in vitro*, The Journal of experimental medicine 162 (4):p. 1256-1263
183. **Van Reet N, Pyana P, Deborggraeve S, et al.** (2011) *Trypanosoma brucei gambiense: HMI-9 medium containing methylcellulose and human serum supports the continuous axenic in vitro propagation of the bloodstream form*, Experimental parasitology 128 (3):p. 285-290
184. **Dubois R** (1885) *Fonction photogenique des Pyrophores*, CR Soc. Biol 37 559-562

-
185. **Harvey EN** (1917) *Studies on bioluminescence*, American Journal of Physiology 42 (2):p. 342-348
 186. **Wood KV, Lam YA and McElroy WD** (1989) *Introduction to beetle luciferases and their applications*, Journal of bioluminescence and chemiluminescence 4 (1):p. 289-301
 187. **Niwa K, Ichino Y, Kumata S, et al.** (2010) *Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases*, Photochemistry and photobiology 86 (5):p. 1046-1049
 188. **Bortz J** (2006) *Statistik: Für Human-und Sozialwissenschaftler*, Springer-Verlag,
 189. **Ruxton GD** (2006) *The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test*, Behavioral Ecology 17 (4):p. 688-690
 190. **Schmider E, Ziegler M, Danay E, et al.** (2010) *Is it really robust?*, Methodology
 191. **Field A** (2013) *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*, Sage,
 192. **Van Reet N, Van de Vyver H, Pyana PP, et al.** (2014) *A Panel of Trypanosoma brucei Strains Tagged with Blue and Red-Shifted Luciferases for Bioluminescent Imaging in Murine Infection Models*, PLoS Negl Trop Dis 8 (8):p. e3054
 193. **Seliger H and McElroy W** (1964) *The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity*, Proceedings of the National Academy of Sciences 52 (1):p. 75-81
 194. **Seliger HH and McElroy WD** (1960) *Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence*, Archives of biochemistry and biophysics 88 (1):p. 136-141
 195. **Southern MM, Brown PE and Hall A** (2006) *Luciferases as Reporter Genes*, Arabidopsis Protocols, J. Salinas and J.J. Sanchez-Serrano, Humana Press, Totowa, NJ, p. 293-305
-

7 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit versichere ich, dass diese, von mir vorgelegte Inauguraldissertation, mit dem Titel „**Klonierung und heterologe Expression zur Analyse der Metalloproteasen TbMSP-B und TbMSP-C aus *Trypanosoma brucei brucei***“ von mir eigenständig verfasst wurde und andere, als die angegebenen Hilfsmittel, nicht verwendet wurden. Alle Inhalte die aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen wurden sind kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis aufgelistet. Im Rahmen des 20. Forschungskolloquiums 2014 der Medizinischen Fakultät Tübingen wurden Teile dieser Arbeit als Poster präsentiert. Ich versichere, dass diese Arbeit darüber hinaus bisher weder in gleicher noch ähnlicher Form veröffentlicht wurde und auch nicht Gegenstand eines Prüfungsverfahrens war.

Ort, Datum

Julia Lorenz

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Michael Duszenko, der auch Leiter der Arbeitsgruppe ist, bedanke ich mich für das spannende Thema meiner Arbeit, die gute fachliche Betreuung und das exzellente Betreuungsverhältnis.

Dem Team der AG Duszenko danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und das gute kollegiale Verhältnis. An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei Dr. rer. nat. Stefan Mogk für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und den fachlichen Diskurs bedanken. Cand. med. Christian Boßelmann gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit bei der Kultivierung pleomorpher Trypanosomen.

Cand. med. Sebastian Hörber danke ich für die Einweisung in die Luminometrie.

Prof. Dr. Christine Clayton vom Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg danke ich für Trypanosomen der Art AnTat1.1.

Prof. em. Peter Overath des Max-Planck-Instituts Tübingen danke ich für Trypanosomen der Art MiTat1.2 antigenic type 221.

Prof. Dr. Théo Baltz der Université Victor Segalen in Bordeaux, Frankreich danke ich für das Plasmid pLEW20.

Prof. Dr. Marlies Knippers und Dr. Inka Montero vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Tübingen danke ich für die Betreuung im Rahmen des Promotionskollegs 2013/2.

Aline Naumann, Diplom-Statistikerin und Wissenschaftliche Angestellte des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen danke ich für Ihre kompetente fachliche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt meinem geliebtem Ehemann Dominik Lorenz BA BWL-Bank und zertifizierter Spezialist im Regulatory Reporting, für seine stete Unterstützung und die schönen Momente jenseits der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein Dank ebenso.
