

**Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven
antitrypanosomalen Komponente des Viperngiftes von
Eristocophis macmahoni und ihre Effekte auf
*Trypanosoma brucei***

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von
Patrick Merkel

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Februar 2007

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wolfgang Voelter

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

Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich besonders für die Themenstellung, die kollegiale Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit, außerdem sein offenes Ohr und seine Ratschläge auch abseits von fachlichen Dingen.

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wolfgang Voelter gebührt mein Dank nicht nur für die Erstellung des Zweitgutachtens, sondern auch für die Diskussionsbereitschaft bezüglich gemeinsamer Projekte.

Dr. Alexander „Beckham“ Beck möchte ich für seinen großen fachlichen und persönlichen Einsatz bei der Zusammenarbeit und Betreuung im Rahmen des analytischen Teils des Projektes danken. Als kompetenter Kooperationspartner und Freund hat er einen erheblichen Anteil an der vorliegenden Arbeit.

Dr. Syed Abid Ali danke ich für seine Kooperation und die Bereitstellung des Schlangengiftes als wichtigste Ressource meiner Doktorarbeit.

Roland Klaffschenkel gilt mein Dank für die geduldige Unterstützung bei den am Universitätsklinikum im Arbeitskreis von Dr. Nicolas Lempert durchgeführten FACS-Analysen.

Karl-Heinz Hellmer im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Betz (Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten der Universität Tübingen) sei gedankt für seine Kooperation bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Ich danke meinen wackeren Mitstreitern in der Arbeitsgruppe, die stets für ein hervorragendes Arbeitsklima sorgten. Un montón de gracias a Didac “El Schiggo Diduco” Carmona-Gutiérrez por su amistad y sus chistes de menor calidad, y gracias también a Katherine Figarella y Néstor Uzcátegui, que me enseñaban elementos importantes del venezolano. Ευχαριστώ πολύ τον Κωνσταντίνο Νούσκα για τη διδασκαλία των ελληνικών και για τη βοήθεια και τη φιλία του. Khalid Muhammad ki madad aur dosti ka buhat buhat shukrya. Besten Dank meinem alten Freund,

Studienkollegen und *roommate* Holger „Holgus“ Mielenz, der für gemeinsame heitere Bemühungen um Experimente und Manuskripte sogar manche Feiertage opferte. Danke auch an Caroline Schönfeld für ihre tatkräftige Unterstützung bei vielen meiner Projekte und ihre unerschütterliche Geduld und Hilfsbereitschaft dabei. Я тоже благодарю Владлену Каизер за помощь на работе и конечно с русским языком. Tack så mycket också till Rudolf Koopmann för att han pratade svenska med mig och dessutom för ljusande kulturerna. Herzlichen Dank meiner Tischnachbarin Viola Denninger für die freundliche musikalische Untermalung und ihre kreativen Geschenke. Vielen Dank an Björn „Merrill“ Buchholz, der so manches Ding weghaute, und seinen Namensvetter Björn Bassarak, dessen unrealer Bot mir die Stirn bot und dessen Frosch verschiedenste Sternstunden der Innovation er- und durchlebte. Gordon „Гордонский“ Eske danke ich für die vielfache experimentelle Unterstützung und seine felsenfeste Zuverlässigkeit bei allen obligatorischen Fußballerevents. Nina Weller sei gedankt für ihre erfrischenden Kommentare und die Aufklärung linguistischer und anatomischer Details. Besten Dank an Rudolf Engelke für seinen geistreichen Humor, Martin Schmidt für seinen Einsatz bei elektronenmikroskopischen und rollenspielerischen Aktivitäten und Alexandra „Kuckuck“ Thor für ihre schlagkräftige Mitarbeit. Vielen Dank an Leonard Ehigie, immer offen für kompetente fußballerische Fachdiskussionen, und unseren Hefeexperten Alexander Szallies. Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Praktikanten Надежда „Надето“ Вълчева (Благодаря!), Simon Pfisterer, Carolin „Steinderl“ Steinl und Berit „Bäärit“ Lochmann.

Besonders am Herzen liegt mir der Dank an meine Eltern, ohne deren lebenslange und bedingungslose Unterstützung in allen Belangen weder eine akademische noch irgendeine sonstige Ausbildung möglich gewesen wäre – 감사 합니다!

Von ganzem Herzen kommt auch der Dank an meine Freundin Brigitte Pfeifle, die durch ihre aufopferungsvolle moralische Unterstützung und ihre Hilfe in allen Lebenslagen einen beträchtlichen Anteil an dieser Arbeit hat. Die Beziehung zu ihr hat mich auch durch schwierige Zeiten getragen und wird es auch weiterhin tun.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

I.	<i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.	Trypanosomen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger	1
2.	Verlauf der afrikanischen Schlafkrankheit	2
3.	Morphologie der Trypanosomen	5
4.	Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	7
5.	Biochemische Besonderheiten	8
5.1.	<i>Variant Surface Glycoprotein</i> (VSG)	8
5.2.	Energiestoffwechsel	9
5.3.	Genetische Besonderheiten bei <i>Trypanosoma brucei</i>	11
5.4.	Polycistronische Transkription und <i>trans splicing</i>	13
II.	Polyaminstoffwechsel	13
1.	Polyaminmetabolismus in Trypanosomen und Trypanothion	13
2.	Polyaminmetabolismus in höheren Eukaryonten	17
III.	Autophagie	19
IV.	Stand der Therapiemethoden für Schlafkrankheit	20
V.	<i>Eristocophis macmahoni</i>	22
VI.	Zielsetzung der Arbeit	24

B. Material und Methoden

I.	Material	25
1.	Trypanosomen	24
2.	Versuchstiere	24

3.	Zellkultur	24
4.	Elektronenmikroskopie	25
5.	Licht-/Fluoreszenzmikroskopie	25
6.	HPLC	25
7.	Geräte	26
	7.1. Zentrifugen	26
	7.2. Zellkultur	27
	7.3. Sonstige Geräte	27
8.	Chemikalien	28
	8.1. Laborchemikalien	28
	8.2. Enzyme	29
	8.3. Chemikalien für die Elektronenmikroskopie	30
9.	Medien, Puffer und Lösungen	30
	9.1. Anzucht und Isolierung von Trypanosomen	30
	9.2. Enzymassays	31
	9.2.1. LDH-Cytotoxizitätstest für WISH-Zellen	31
	9.2.2. Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstest für Trypanosomen	32
	9.3. Trypsinierung von WISH-Zellen	32
	9.4. FACS-Analysen	33
	9.5. Giemsa-Färbung	34
	9.6. Puffer für die Elektronenmikroskopie	34
	9.7. Zellkulturmedien	35
	9.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
	9.8.1. Puffer für die Gelherstellung und Elektrophorese	37
	9.8.2. Coomassie-Färbung	38
	9.8.3. Silberfärbung	39
	9.8.4. Trocknungslösung	40
10.	Eluenten für die HPLC	40
	10.1. Gelfiltration	40
	10.2. <i>Reversed Phase</i>	40
	10.3. HILIC	41
	10.4. On-line μ LC/ESI-MS (<i>Reversed Phase</i>)	41

II.	Methoden	
1.	Anzucht und Isolierung von Trypanosomen	42
2.	<i>In vitro</i> Kultivierung von prozyklischen Trypanosomen	42
3.	<i>In vitro</i> Kultivierung von Blutformtrypanosomen	43
4.	Herstellung von Trypanosomenstabilaten	43
4.1.	Rattenstabilate	43
4.2.	Stabilate für axenische Kultur	44
5.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	44
5.1.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	44
5.2.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	45
6.	SDS-PAGE	46
7.	FACS-Analyse	47
7.1.	Nekrosetest	47
7.2.	Zellzyklusbestimmung	48
7.3.	Annexin-V-Apoptosetest	48
8.	Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstest für Trypanosomen	49
9.	Giemsa-Färbung	50
10.	LDH-Cytotoxizitätstest für WISH-Zellen	50
11.	HPLC	51
12.	Bestimmung der trypanoziden Aktivität von HPLC-Fractionen	52
13.	Massenspektrometrie	52

C. Ergebnisse

I.	Schlangengift von <i>Eristocophis macmahoni</i>	54
1.	Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration	54
2.	Effekt des Schlangengiftes auf den Wachstumsverlauf von Trypanosomen	55
3.	Lichtmikroskopische Aufnahmen	57
4.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	58
4.1.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	58
4.2.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	60

5.	Auftrennung der Proteinkomponenten des Gifts durch SDS-PAGE	62
II.	Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven Komponente	63
1.	Auftrennung des kompletten Schlangengiftes per Gelfiltration	63
2.	Massenspektrometrische Untersuchung der Gelfiltrationsfraktionen	64
3.	Auftrennung der aktivsten Fraktion per RP-HPLC	68
4.	Massenspektrometrische Untersuchung der aktiven RP-HPLC-Fraktion	69
5.	Auftrennung der aktivsten Fraktion per HILIC	70
6.	Massenspektrometrische Analyse der trypanoziden Hauptkomponente	72
7.	Verifizierung der Identifikation von Spermin	74
8.	Quantifizierung von Spermin in Schlangengift	75
III.	Effekte von reinem Spermin auf <i>Trypanosoma brucei</i>	78
1.	Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration	78
2.	Effekt von Spermin auf den Wachstumsverlauf von Trypanosomen	79
3.	Lichtmikroskopische Aufnahmen	80
4.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	81
4.1.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	81
4.2.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	82
4.3.	TEM unter Einsatz von Autophagieinhibitoren	84
5.	Reversibilität der Effekte von Spermin auf Trypanosomen	86
6.	Temperaturabhängigkeit des Effektes von Spermin	88
7.	FACS-Analyse	89
7.1.	Nekrosetest	89
7.2.	Externalisierung von Phosphatidylserin	91
7.3.	Bestimmung der Zellzyklusphase	93
8.	Cytotoxizitätstest mit WISH-Zellen	95
9.	Kontrolle der Beteiligung von Serumkomponenten	96
10.	Hemmung der Bildung toxischer Oxidationsprodukte	98

durch Katalase

D. Diskussion	
I. Effekte des reinen Schlangengiftes auf <i>Trypanosoma brucei</i>	101
II. Isolierung von Spermin aus komplettem Schlangengift	103
III. Bedeutung von Spermin als antitrypanosomale Komponente	107
IV. Resümee und Ausblick	110
E. Summary	112
F. Literatur	113
G. Akademische Lehrer	123
H. Curriculum Vitae	124

Abkürzungen

AnTat	<i>Antwerpen Trypanozoon antigenic type</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CGA	Citrat-Glucose-Anticoagulans
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	<i>Dulbecco's modified minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FACS	<i>fluorescence-associated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
HILIC	<i>hydrophilic interaction chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LDH	Lactatdehydrogenase
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MITat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigenic type</i>
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
ODC	Ornithindecaboxylase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAO	Polyaminoxidase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur

Abkürzungen

SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SSAT	Spermin/Spermidin-N-Acetyltransferase
TDB	<i>trypanosome dilution buffer</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VSG	<i>Variant Surface Glycoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

A. Einleitung

I. *Trypanosoma brucei*

I.1. Trypanosomen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger

Die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Trypanosomen sind einzellige eukaryontische Parasiten, die sich im Laufe der Evolution ein außergewöhnlich großes Spektrum verschiedener Wirtsorganismen erschlossen haben. Zusammen mit Leishmanien und Crithidien bilden die etwa 200 Trypanosomenarten die Ordnung Kinetoplastida. Im Interesse wissenschaftlicher Forschung stehen diese Parasiten besonders auf Grund ihrer Rolle als bedeutende Krankheitserreger bei Menschen und Nutztieren. Von den vor allem in Lateinamerika vorkommenden *Trypanosoma cruzi* wird die Chagas-Krankheit ausgelöst, während *Trypanosoma brucei* die Nagana-Seuche bei Rindern und die afrikanische Schlafkrankheit beim Menschen verursacht. Letztere stellt eine ernstzunehmende Bedrohung der in den betroffenen Gebieten ansässigen Bevölkerung dar, wobei die World Health Organization (WHO) von einer Bedrohung von über 60 Millionen Menschen in 36 Ländern ausgeht. Obwohl diese tödlich verlaufende Krankheit in den sechziger Jahren kurzzeitig praktisch als besiegt galt, wurden 45.000 neue Fälle allein im Jahre 1999 gemeldet. Die Dunkelziffer liegt laut Schätzungen der WHO allerdings bei etwa dem zehnfachen Wert (www.who.com). Der Grund für das erneute starke Aufkommen der afrikanischen Schlafkrankheit in den letzten gut 30 Jahren ist mitunter im Rückzug der ehemaligen Kolonialmächte und den im Anschluss verstärktem aufkommenden sozialen Unruhen bzw. kriegerischen Auseinandersetzungen zu suchen, die z.B. gesundheitliche Kontrollen von Personen in Risikogebieten erschwerten. Einen wichtigen Faktor bei der Bekämpfung der Krankheit stellt allerdings auch die Kontrolle des Vektors dar: Der Lebenszyklus afrikanischer Trypanosomen umfasst neben einem Säugewirt, in dem sie als Blutformen bezeichnet werden, ein Stadium als prozyklische Parasiten in der Tsetse-Fliege (Gattung *Glossina*). Das Auftreten der Pathogene korreliert mit der Verbreitung dieses blutsaugenden Insekts, das die Schlafkrankheitserreger bei einer Blutmahlzeit mit seinem Speichel in die Blutbahn des Wirts injizieren kann. Das Habitat der Tsetse-Fliege wird mit dem Begriff des *fly belt* umschrieben, der sich etwa zwischen 15° nördlicher und 15-18°

südlicher Breite erstreckt (Abb.1). In diesem Bereich sind die Lebensbedingungen nicht nur durch die Krankheitsbedrohung erheblich erschwert, denn *T. brucei* stellt auf Grund der Verursachung von Nagana in Rindern auch ein enormes volkswirtschaftliches Problem dar. Große Flächen von Vieh- und Weideland sind somit faktisch nicht nutzbar.



Abb. 1.: Heutige geographische Verbreitung der Tsetse-Fliege als Überträger der Schlafkrankheit (<http://www.indiana.edu/~origins/images/tsetsemap.jpg>)

I.2. Verlauf der afrikanischen Schlafkrankheit

Prinzipiell existieren beim Menschen zwei verschiedene Formen der afrikanischen Schlafkrankheit, nämlich die chronische westafrikanische (verursacht durch *Trypanosoma brucei gambiense*) und die akut verlaufende ostafrikanische (*Trypanosoma brucei rhodesiense*). Der Verlauf dieser beiden Krankheitsformen ist schematisch in Tabelle 1 dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Formen, *Trypanosoma brucei brucei*, sind dagegen verantwortlich für die Nagana-Seuche und

für Menschen nicht pathogen, da sie von einem HDL-assoziierten Serumfaktor im Blut lysiert werden [Pays *et al.*, 2006]. Bei einer Blutmahlzeit einer mit Trypanosomen infizierten Tsetse-Fliege werden bis zu 40.000 infektiöse Parasiten über einen Umweg durch subkutanen Gewebe in den Blutkreislauf des Betroffenen injiziert. Man geht davon aus, dass eine Mindestzahl von ca. 400 Trypanosomen erforderlich ist, um eine Infektion auszulösen. An der Einstichstelle entwickelt sich nun zunächst ein Geschwür, der so genannte Trypanosomenschanter. Während dieser nach einigen Wochen praktisch vollständig abheilt, vermehren sich die nun zu Blutformen differenzierten Trypanosomen durch binäre Fission. Die Parasitämie nimmt nun einen wellenförmigen Verlauf, wofür verschiedene Gründe diskutiert werden: Zum einen unterliegt der Parasit an sich einer Zelldichteregulation, einem *quorum sensing*, welches ein übermäßiges Anwachsen der Population und damit eine nicht zu kompensierende Schädigung des Wirts verhindert, zum anderen wird der Parasit auf Grund seines speziellen Oberflächenmantels vom Immunsystem des Wirts zeitweise erfolgreich bekämpft [Duszenko *et al.*, 2006]. Zu einem gegebenen Zeitpunkt tragen Trypanosomen ca. 10^7 Moleküle einer Form des *Variant Surface Glycoprotein* (VSG) auf ihrer Oberfläche. Dieses verhindert auf Grund seiner dichten Packung die Erkennung anderer membranständiger Komponenten des Parasiten durch das Immunsystem [Cross, 1975]. Nach einigen Tagen entstehen Antikörper gegen die gegenwärtig exprimierte Form des VSG, wobei es nun bei einem kleinen Teil der Parasitenpopulation zum so genannten *antigenic switching* kommt. Hier gerät ein zuvor nicht exprimiertes VSG-Gen durch Rekombinationsprozesse in eine telomerständige *VSG expression site*, und das Produkt dieses Gens löst in der Folge die zuvor exprimierte VSG-Variante ab [Borst & Fairlamb, 1998]. Da das Immunsystem zwar nun einen Großteil der Parasitämie eliminieren kann, aber erst wieder einen Antikörper gegen die neue VSG-Variante produzieren muss, kann sich ein Teil der Trypanosomen wieder relativ ungestört vermehren, so dass es zu einem insgesamt oszillierenden Verlauf der Parasitämie kommt. Entsprechend diesen Umständen kommt es beim Patienten zu mehr oder weniger periodisch verlaufenden Fieberschüben. Im weiteren Verlauf der Krankheit durchtreten die Parasiten schließlich nach einigen Wochen (akute Form) oder nach mehreren Monaten oder Jahren (chronische Form) die Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke und infiltrieren das Zentrale Nervensystem. Der Mechanismus des Durchtritts ist bis heute nicht eindeutig geklärt, man kann jedoch davon ausgehen, dass ein parazellulärer Weg beschritten wird, wie es u.a. in einem *in vitro*-Modell beobachtet

wurde [Grab *et al.*, 2004]. In der Folge entwickeln die betroffenen Individuen die für die afrikanische Schlafkrankheit typischen Verhaltensmuster. Es kommt beispielsweise zu tiefgreifenden Störungen des Wach-Schlaf-Rhythmus: Die Patienten schlafen überwiegend tagsüber und zeigen dafür nachts Hyperaktivität. Dieses Verhalten korreliert mit der Tagaktivität der Tsetse-Fliege, deren Opfer den Insekten im Schlaf wesentlich leichter zugänglich sind, was wiederum zur weiteren Verbreitung der Trypanosomen beiträgt. Darüber hinaus treten verschiedene psychische Veränderungen auf, die von leichter Reizbarkeit bis hin zu Lethargie reichen können. Unbehandelt führen afrikanische Trypanosomiasen praktisch unweigerlich zum Tod.

Infektionsverlauf und Krankheitsbild der beiden Formen der afrikanischen Schlafkrankheit		
Stadium, Verlauf und Symptome	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
1. Stadium: Febril-glanduläre oder hämolympathische Phase:		
Trypanosomen-schanker:	bei Afrikanern unter 5%, bei Europäern um 20%	um 50%
Beginn der Parasitämie:	2-3 Wochen nach Infektion	1-2 Wochen nach Infektion
Art der Parasitämie:	niedrig, intermittierend	hoch, oft anhaltend
Parasitämie-assoziierte Symptome:	Fieber, Schüttelfrost, Kopf-, Gelenk- und Muskelschmerzen, Ödeme, Gewichtsverlust, Jucken, endokrine Probleme, Schwellung der Lymphknoten am Nacken; Störungen der Herzfunktion (v.a. bei <i>T. b. rhodesiense</i>), Anämie, Thrombozytopenie, erhöhte IgM-Spiegel im Blut	
Verlauf:	chronisch	akut
2. Stadium: Neurologische oder Meningoenzephalitische Phase (nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke):		

Eindringen der Erreger in das ZNS:	4-6 Monate nach Infektion oder später	oft bereits nach wenigen Wochen
Symptome:	Verwirrungszustände, Koordinationsschwierigkeiten, Sinnesstörungen, gestörter Schlafzyklus, Abmagerung, epileptiforme Krämpfe, Apathie, Koma. Pleozytose im Liquor, erhöhte Gesamtprotein- und IgM-Spiegel.	
Krankheitsdauer beider Stadien:	Monate bis >6 Jahre	selten >3-7 Monate

Tab. 1: Verlauf der Schlafkrankheit bei Infektionen mit *Trypanosoma brucei gambiense* bzw. *Trypanosoma brucei rhodesiense* [nach http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/trypanosoma/steckbrief_tryps.html]

I.3. Morphologie der Trypanosomen

Der Begriff „Trypanosomen“ ist dem Altgriechischen entlehnt und bedeutet ursprünglich in etwa „Bohrkörper“, was auf die charakteristische spindelförmige Morphologie dieser Parasiten zurückzuführen ist. Die genannte Bezeichnung beschreibt vor allem die *long slender* Blutform, wie sie im Säugerwirt vorkommt. Prinzipiell ist festzuhalten, dass sich die äußere Form der Trypanosomen je nach Stadium des Lebenszyklus deutlich verändert, während der Aufbau im Inneren der Zelle weitgehend konstant bleibt. In Abb. 2 ist eine vereinfachte Darstellung eines *long slender* Trypanosoms zu sehen, in der die Organellen schematisch dargestellt sind. Zusätzlich zu den bekannten eukaryontischen subzellulären Bestandteilen wie Nucleus etc. weisen Trypanosomen eine Reihe von Besonderheiten auf: Die Glycosomen stellen beispielsweise eine spezialisierte Form von Peroxisomen dar, in denen der größte Teil der Glycolyse stattfindet. Ebenso ins Auge fällt das einzelne langgestreckte

Mitochondrium, das sich im Laufe des Lebenszyklus den äußeren Gegebenheiten leicht anpasst. Neben der Geißel, welche am Hinterende der Zelle in der so genannten Flagellumtasche entspringt, ist natürlich der namensgebende Kinetoplast zu nennen, der vor allem die mitochondriale DNA umfasst. Auch das Cytoskelett der Parasiten hebt sich von dem der meisten anderen Eukaryonten ab: Statt Strukturen, welche die Zelle mit zahlreichen dreidimensionalen Verzweigungen durchziehen, liegt das mikrotubuläre Cytoskelett der Trypanosomen als dynamisches Netzwerk aus Längsverstrebungen direkt unterhalb der Plasmamembran und durchläuft parallel zu ihr die gesamte Länge des Zellkörpers. Das Flagellum der Trypanosomen ist über *maculae adhaerentes* an der Zellmembran angeheftet. Die Motilität der Geißel hat sich kürzlich als essentiell für die Überlebensfähigkeit der Parasiten herausgestellt [Broadhead *et al.*, 2006]. Zudem bildet der Ansatzpunkt des Flagellums, die so genannte Flagellumtasche, einen zentralen Verteilungspunkt für ein- oder austransportierte Substanzen. Exo- oder Endocytoseprozesse der Trypanosomen finden ausschließlich über die Flagellumtasche statt [Landfear & Ignatshchenko, 2001]. Die subzelluläre Lokalisation dieser Struktur variiert abhängig vom Stadium des Lebenszyklus: In der trypomastigoten Form liegt die Flagellumtasche hinter dem Nucleus, während sie bei der in der Tsetse-Fliege vorkommenden epimastigoten Form vor den Kern rückt.

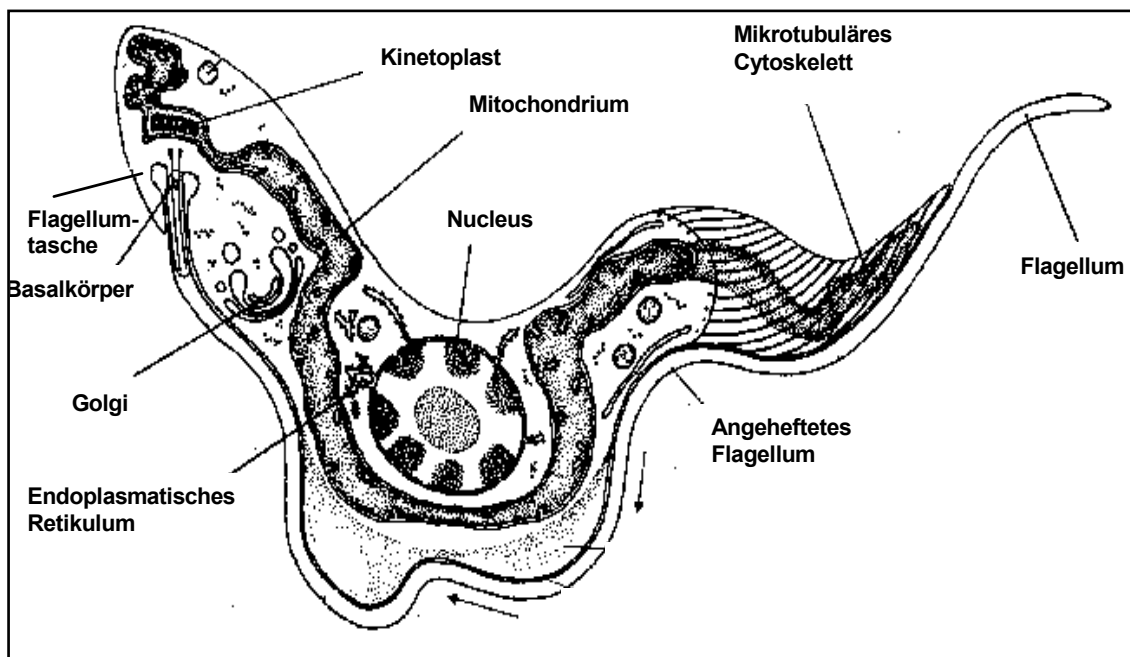


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer *T. brucei*-Zelle [Vickerman, 1969]

I.4. Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

Die drei Formen von *Trypanosoma brucei* weisen innerhalb ihres Lebenszyklus lediglich zwei verschiedene Wirte auf, wobei es sich bei einem immer um eine Fliege des Genus *Glossina* und bei dem anderen um einen Säuger handelt.

Im Fliegendarm entwickelt sich die so genannte prozyklische Form der Parasiten, welche sich rasch teilt und ein voll ausgebildetes Mitochondrium mit den Enzymen des Citratzyklus bzw. der Atmungskette besitzt. Als Nahrungsquelle fungieren hier besonders die in der Fliege reichlich vorkommenden Aminosäuren, insbesondere Prolin. Im Laufe der Infektion gelangen die Parasiten auch zur Speicheldrüse, wo sie zu epimastigoten Formen differenzieren. Wie unter Punkt I.3. beschrieben, unterscheiden sich diese morphologisch von den anderen, trypomastigoten, Formen hinsichtlich der Lage von Flagellumtasche und Kinetoplast. Aus den epimastigoten Trypanosomen entstehen nun teilweise metazyklische Formen, die nicht mehr zur Teilung befähigt, aber infektiös für den Säugewirt sind. Bei einer Blutmahlzeit können diese Parasiten in den Blutstrom des letzteren gelangen und somit das zweite Stadium des Lebenszyklus einleiten. Aus den metazyklischen Insektenformen entstehen hier spontan *long slender* Blutformen, die sich von der Lebensform in der Fliege besonders metabolisch maßgeblich unterscheiden. *Long slender* Blutformen besitzen nur ein weitgehend degeneriertes Mitochondrium mit wenigen Cristae. Als einzige Energiequelle verwenden sie Glucose, die in der offenbar nicht regulierten Glycolyse zu Pyruvat abgebaut wird. Letzteres wird als Endprodukt aus der Zelle ausgeschleust und ins Blut abgegeben. In der Folgezeit entstehen aus einem Teil der *long slender* die gedrungenen *short stumpy* Formen, die sich nicht mehr teilen und für die Transmission in die Tsetse-Fliege präadaptiert sind. Sie exprimieren bereits einige Enzyme der Atmungskette und haben dementsprechend ein weiter entwickeltes Mitochondrium als die *long slender* Formen. Diejenigen *short stumpy* Trypanosomen, die nicht in die Fliege übertragen werden, gehen wohl apoptotisch zu Grunde, wobei Prostaglandine und deren Metabolite eine wichtige Rolle einnehmen könnten [Figarella *et al.*, 2005, Figarella *et al.*, 2006]. Werden sie jedoch von einer Tsetse-Fliege bei einer Blutmahlzeit aufgenommen, differenzieren sie wiederum zu prozyklischen Trypanosomen, während ebenfalls aufgenommene *long slender* Formen im Fliegendarm zu Grunde gehen.

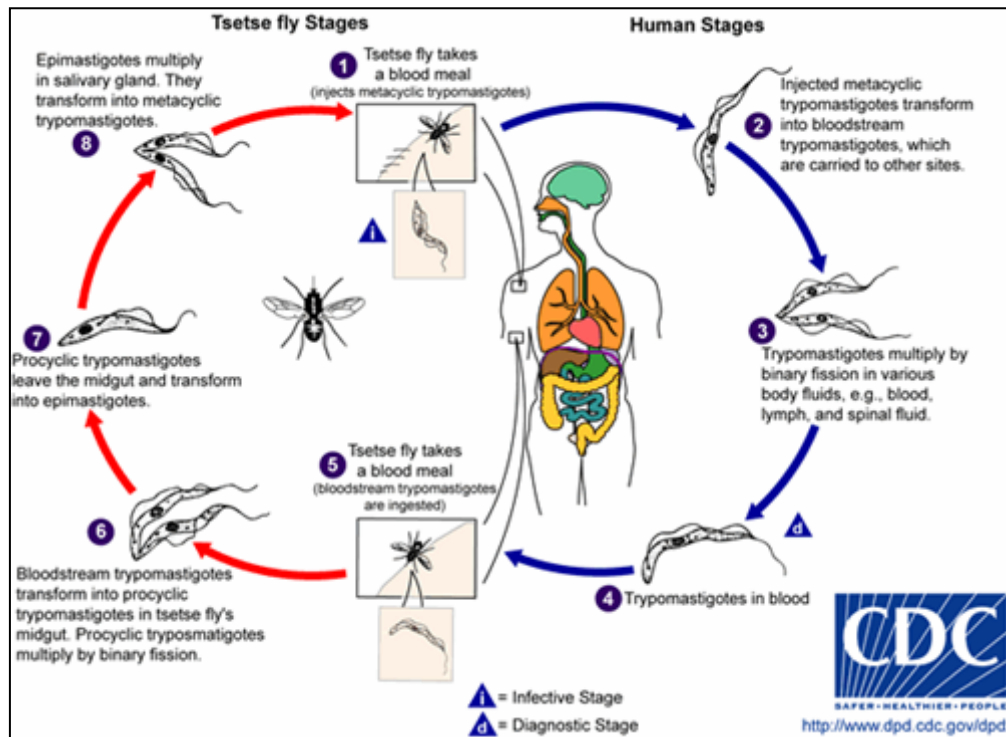


Abb. 3: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* (nach www.dpd.cdc.gov/dpdx)

I.5. Biochemische Besonderheiten

I.5.1. Variant Surface Glycoprotein (VSG)

Wie unter Punkt I.2. beschrieben, stellt das *Variant Surface Glycoprotein* (VSG) einen wirksamen Schutz der Trypanosomen vor dem Immunsystem des Wirtes dar. Der dichte Oberflächenmantel bildet eine im Elektronenmikroskop sichtbare Schicht von etwa 12-15 nm Dicke, so dass das zu einem gegebenen Zeitpunkt exprimierte VSG das einzige zugängliche Antigen auf der Oberfläche der Trypanosomen bildet [Cross, 1975]. Das so genannte *antigenic switching*, also der komplette Wechsel eines bestimmten VSG-Typs zu einer anderen Variante, kann nach mindestens drei verschiedenen molekularen Mechanismen erfolgen. Dabei kommt es, unabhängig von der Immunantwort des Wirtes, etwa 10^{-6} mal pro Generation vor [Lamont *et al.*, 1986]. Der Parasit verfügt mit etwa 1000 Genen über ein enormes Spektrum an verschiedenen VSG-Varianten, und innerhalb einer Population können unterschiedliche Ausführungen präsent sein.

Allerdings existiert im Blut des Säugerwirtes zu einem bestimmten Zeitpunkt stets eine prädominante Form, gegen die jeweils ein Antikörper produziert wird. Die Unterschiede innerhalb der einzelnen VSG-Moleküle begründen sich in der dem Lumen des Blutgefäßes zugewandten variablen N-terminalen Region, während der C-terminale Bereich recht konserviert ist. Letzterer ist für die Verankerung des Proteins in der Plasmamembran über einen Glycosylphosphatidylinositolrest (GPI-Anker) verantwortlich, so dass hier eine hohe Variabilität nicht vonnöten ist. Man kann die VSG-Varianten auf Grund ihrer unterschiedlichen Primärstrukturen drei verschiedenen Typen zuordnen, wobei auffällig ist, dass Proteine des Typ 3 insgesamt weniger Aminosäuren, aber dennoch eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur wie die anderen Typen aufweisen [Blum *et al.*, 1993]. Dieses Phänomen liegt zu einem großen Teil in der quantitativ stärkeren Präsenz von Glycosylresten bei Typ 3 begründet, die das Fehlen der betreffenden Aminosäuren kompensieren.

In der Tsetse-Fliege verlieren die Trypanosomen ihren für die Blutform typischen VSG-Mantel, an dessen Stelle bei den prozyklischen Formen eine Hülle aus Procyclin bzw. PARP (*Procylic Acidic Repetitive Protein*) tritt [Roditi & Clayton, 1999]. Diese ist weniger kompakt als ihr VSG-Pendant und stellt in erster Linie einen Schutz vor den Verdauungsenzymen im Fliegendarm dar.

I.5.2. Energiestoffwechsel

Während die prozyklischen Insektenformen der Trypanosomen ein voll ausgebildetes Mitochondrium besitzen und vor allem Aminosäuren wie Prolin [Tielens & Van Hellemond, 1998] via Citratcyclus bzw. Atmungskette metabolisieren, sind die Blutformen ausschließlich auf die Glucose im Blut des Säugerwirtes angewiesen, welche in der Glycolyse zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Soweit bekannt ist, wird die Glycolyse in Trypanosomen nicht reguliert, so dass die dem Parasiten zur Verfügung stehende Glucose stets mit der höchstmöglichen Geschwindigkeit umgesetzt wird. Dafür ist eine Kompartimentierung der Glycolyseenzyme (Abb. 4) von Vorteil, wie sie zu einem beträchtlichen Teil bei Trypanosomen realisiert ist: Angefangen bei der Hexokinase, befinden sich sämtliche Enzyme bis hin zur Phosphoglyceratkinase innerhalb des Glycosoms. Letzteres stellt eine für Kinetoplastiden typische

spezialisierte Form von Peroxisomen dar, in der Glucose bis zur Stufe des 3-Phosphoglycerat metabolisiert wird. Dieses Produkt wird schließlich im Cytosol zu Pyruvat umgesetzt, das anschließend ins Medium (bzw. ins Wirtsblut) abgegeben wird. Damit das in der GAPDH-Reaktion entstehende NADH innerhalb des Glycosoms reoxidiert werden kann, bedient sich der Parasit eines besonderen Shuttle-Systems: Das in der Aldolasereaktion entstehende Dihydroxyacetonphosphat wird zunächst im Glycosom durch die Glycerinphosphat-Dehydrogenase unter NAD-Bildung zu Glycerin-3-phosphat reduziert. Anschließend wird letzteres aus dem Glycosom austransportiert, zum Mitochondrium befördert und dort durch die Trypanosomale Alternative Oxidase (TAO) wiederum zu Dihydroxyacetonphosphat reoxidiert. Als Endakzeptor der Elektronen fungiert molekularer Sauerstoff, wodurch man auch im Medium von Blutformtrypanosomen trotz nicht vorhandener Atmungskette einen gewissen Sauerstoffverbrauch nachweisen kann [Clarkson *et al.*, 1989].

Der Energiestoffwechsel der prozyklischen Trypanosomen ist deutlich weniger glucoseabhängig, da sie wie bereits erwähnt ATP durch oxidative Phosphorylierung gewinnen können. Beim Glucosestoffwechsel der Insektenformen entstehen vor allem CO₂, H₂O und Acetat. Das in den Glycosomen anfallende NADH wird in diesem Lebensstadium durch einen anderen Mechanismus als bei den Blutformen oxidiert: Eine NADH-abhängige Fumaratreductase sorgt unter Succinatproduktion für die Bereitstellung von NAD [Besteiro *et al.*, 2002].

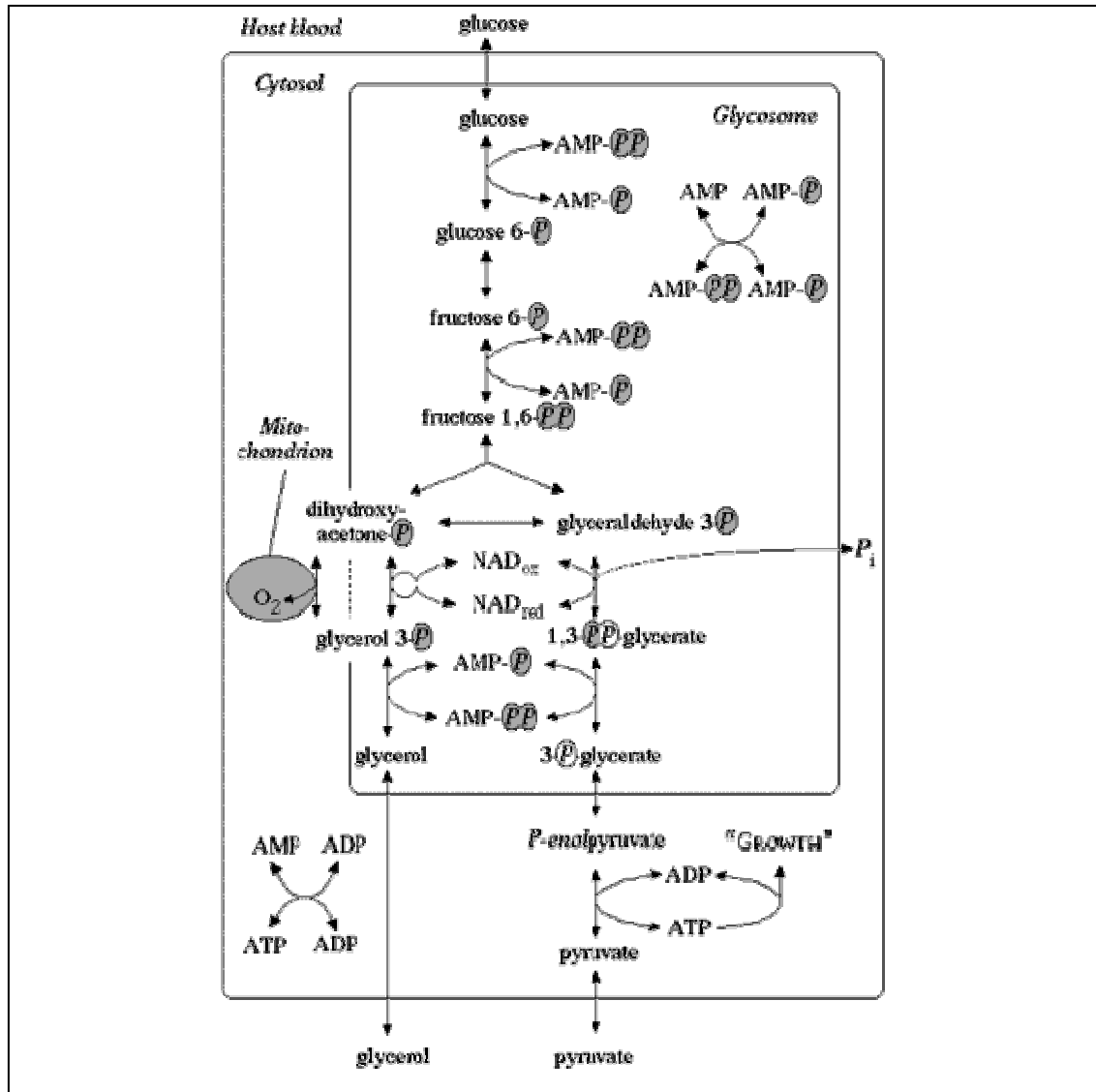


Abb. 4: Kompartimentierung der Glycolyse in Blutformen von *Trypanosoma brucei* (<http://www.beilstein-institut.de/bozen2002/proceedings/cornish/images/Cornish5.gif>)

I.5.3. Genetische Besonderheiten bei *Trypanosoma brucei*

Zusätzlich zu den beschriebenen Besonderheiten in Stoffwechsel und zellulärer Struktur weisen Trypanosomen auch bei der Organisation des Genoms einige spezifische Merkmale auf, wie sie bei anderen Eukaryonten nicht vorkommen. Die komplette Sequenzierung des Genoms wurde im Jahre 2005 im Rahmen einer weltweiten

Kooperation abgeschlossen [Berriman *et al.*, 2005]. Es umfasst etwa 7×10^7 Basenpaare, wobei eine klassische Unterteilung in Chromosomen durch die geschlossene Mitose der Trypanosomen praktisch unmöglich ist: Neben der nicht zu beobachtenden Auflösung der Kernhülle kommt es auch in keiner Phase zu einer Kondensation der Chromosomen [Duszenko, 1998]. Die Kategorisierung erfolgte daher über das Verhalten trypanosomaler DNA bei Pulsfeld-Gelelektrophorese, wobei 11 Fragmente mit Größen zwischen 1 und 6 Mb als Chromosomen definiert wurden [Van der Ploeg *et al.*, 1984], außerdem eine nicht genau definierte Anzahl von kleinen und intermediären „Chromosomen“ [El-Sayed *et al.*, 2000]. Dabei geht man von der Präsenz von ca. 9.000 Genen bei etwa 900 Pseudogenen aus, womit die rund 1.000 Gene für VSG über 10% des gesamten Genoms ausmachen und die immense Wichtigkeit der entsprechenden Genprodukte für Trypanosomen unterstreichen. Dagegen fällt das Fehlen von 9 der 10 notwendigen Gene für die Synthese von Inosinmonophosphat aus Phosphoribosylpyrophosphat ins Auge, was mit der Unfähigkeit der Trypanosomen korreliert, Purine bzw. Purinnucleotide *de novo* zu synthetisieren. Das einzige vorhandene Gen dieses Syntheseweges, die Adenylosuccinatlyase, spielt eine bedeutende Rolle in der Reutilisierung von Purinen des jeweiligen Wirtes.

Die DNA des trypanosomalen Mitochondriums (kDNA), die ca. 10-20% der GesamtdNA des Parasiten ausmacht, besitzt ebenfalls eine sehr spezielle Anordnung: Statt eines ringförmigen Chromosoms finden sich hier zahlreiche DNA-Catenate (*circles*), deren Größe bis zu knapp 40 kb beträgt. Die 5.000 bis 10.000 *minicircles* kodieren dabei vor allem für die *guide* RNA (gRNA), die zusammen mit anderen Komponenten für das RNA *editing* verantwortlich zeichnet. Letzteres ist ein Prozess, der im Verhältnis zu anderen Organismen eine übergeordnete Rolle einnimmt: Bis zu 70% der fertigen mRNA eines mitochondrialen Gens wird durch *editing* bereitgestellt. Die Proteine des Editosoms werden dabei von genomischer DNA kodiert [Madison-Antenucci *et al.*, 2002].

I.5.4. Polycistronische Transkription und *trans splicing*

Die Gene von Trypanosomen sind in polycistronischen Einheiten zusammengefasst und besitzen praktisch keine Introns. Diese für Eukaryonten sehr ungewöhnliche Konstellation verlangt alternative Möglichkeiten zur Regulation spezifischer Gene, und tatsächlich findet besagte Regulation hauptsächlich auf posttranskriptionaler Ebene statt [Bringaud & Baltz, 1993]. Dadurch können verschiedene Gene derselben polycistronischen Transkriptionseinheit ein unterschiedliches Expressionsverhalten zeigen. Da klassische Introns fehlen, kommt es in Trypanosomen ferner nicht zu den für Eukaryonten üblichen *cis*-Spleißvorgängen, sondern es findet an deren Stelle ein so genanntes *trans splicing* statt. Wie der Name bereits impliziert, wird ein zweites RNA-Molekül für einen solchen Vorgang benötigt, wobei es sich um *miniexon-derived* RNA (medRNA) handelt. Von dieser mit einem 5'-cap versehenen Nucleinsäuresequenz werden 35 Nucleotide an das 5'-Ende sämtlicher trypanosomaler hnRNAs angefügt, was zu einer konservierten Anfangssequenz (*spliced leader sequence*) aller gereiften mRNAs führt.

II. Polyaminstoffwechsel

II.1. Polyaminmetabolismus in Trypanosomen und Trypanothion

Wie praktisch alle Organismen besitzen auch Trypanosomen einen Polyaminmetabolismus, wobei dieser bei ihnen allerdings aus verschiedenen Gründen eine besonders wichtige Rolle spielt. Eine Inhibition dieses Stoffwechselweges wurde bereits 1980 von Bacchi und Kollegen als Möglichkeit zur Bekämpfung von *Trypanosoma brucei* beschrieben [Bacchi *et al.*, 1980]. Als Ausgangspunkt für die Biosynthese der endogenen Polyamine in Trypanosomen dient die Aminosäure Ornithin, aus der durch Decarboxylierung Putrescin entsteht (Abb.5). Hier greift der Wirkstoff Difluormethylornithin (DFMO) an, indem er nach dem Prinzip der *suicide inhibition* eine kovalente Bindung mit dem Enzym eingeht, die unter physiologischen Bedingungen nicht mehr aufgebrochen werden kann. Unter normalen Umständen entsteht aus Putrescin in der Folge der Biosynthese Spermidin, welches zentrale Bedeutung u.a. im Redoxstoff-

wechsel der Parasiten besitzt. Dafür wird zunächst S-Adenosylmethionin (SAM) decarboxyliert, wobei auch das verantwortliche Enzym S-Adenosylmethionin-Decarboxylase Bedeutung als *drug target* besitzt. Vom entstehenden Molekül wird ein Aminopropylrest auf Putrescin übertragen, wobei Spermidin und Methylthioadenosin synthetisiert werden. Während letzteres über den Methionin *recycling pathway* zu SAM regeneriert wird, wird Spermidin als integraler Bestandteil von Trypanothion verwendet, dem Glutathion-Analogon der Kinetoplastiden. *De facto* handelt es sich hierbei um N¹,N⁸-bis(L-γ-glutamyl-L-hemicystinyl-glycyl)spermidin, also um zwei Moleküle Glutathion, die von der Glutathionylspermidinsynthetase und die Trypanothionsynthetase über einen Spermidinrest kovalent miteinander verknüpft werden (Abb. 6a). Glutathion stellt im menschlichen Organismus z.B. einen Konjugatbildner für die Phase II der Biotransformation oder einen Ausgangsstoff für Biosynthesereaktionen (Peptidoleukotriene etc.) dar. Eine weitere außerordentlich wichtige Aufgabe ist daneben der Schutz des Organismus vor Oxidation beispielsweise durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die durch das Glutathionperoxidase-System entschärft werden. Das trypanosomale Pendant stellt das Trypanothionperoxidase-System dar, bei dem die Elektronen der beiden Thiolgruppen eines Trypanothionmoleküls unter Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zur Entgiftung von Oxidantien genutzt werden. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass Spermidin ein Molekül mit einer flexiblen dreidimensionalen Struktur darstellt und sich die beiden Thiolgruppen deshalb ausreichend annähern können, um eine kovalente Bindung zu knüpfen. Die sterische Problematik wird bereits in der zweidimensionalen Darstellung in Abb. 6b deutlich. Die Trypanothionreductase gewährleistet die Regeneration von oxidiertem zu reduziertem Trypanothion mit freien Thiolgruppen (Abb. 6b). Wichtige Reaktionen, an denen Trypanothion maßgeblich beteiligt ist, sind in Abb. 6c zusammengefasst. Hervorzuheben ist hierbei neben der Detoxifikation von Hydroperoxiden zu Alkoholen die Umwandlung von Ribo- zu den entsprechenden Desoxyribonucleotiden im Zusammenspiel mit dem Dithiolprotein Tryparedoxin und der Ribonucleotidreductase. Ebenso werden 2-Ketoaldehyde wie das cytotoxische Methylglyoxal zu 2-Hydroxyaciden reduziert. Ist Spermidin im Parasiten nicht in ausreichender Menge vorhanden, kann die Trypanothionsynthetase auch Spermin verwenden und katalysiert in einem solchen Falle die Bildung von Mono- und Bisglutathionylspermin [Oza *et al.*, 2003]. Interessanterweise ist die Synthese von Spermin in Trypanosomen oder anderen Kinetoplastiden bis heute nicht nachgewiesen

worden, wobei exogenes Spermin mit einer geringen Rate eintransportiert werden kann [Bacchi *et al.*, 1979]. Dies stellt einen klaren Kontrast gegenüber der Situation in so gut wie allen anderen Eukaryonten dar, bei denen Spermin durch die Übertragung eines Aminopropylrests auf Spermidin hergestellt wird.

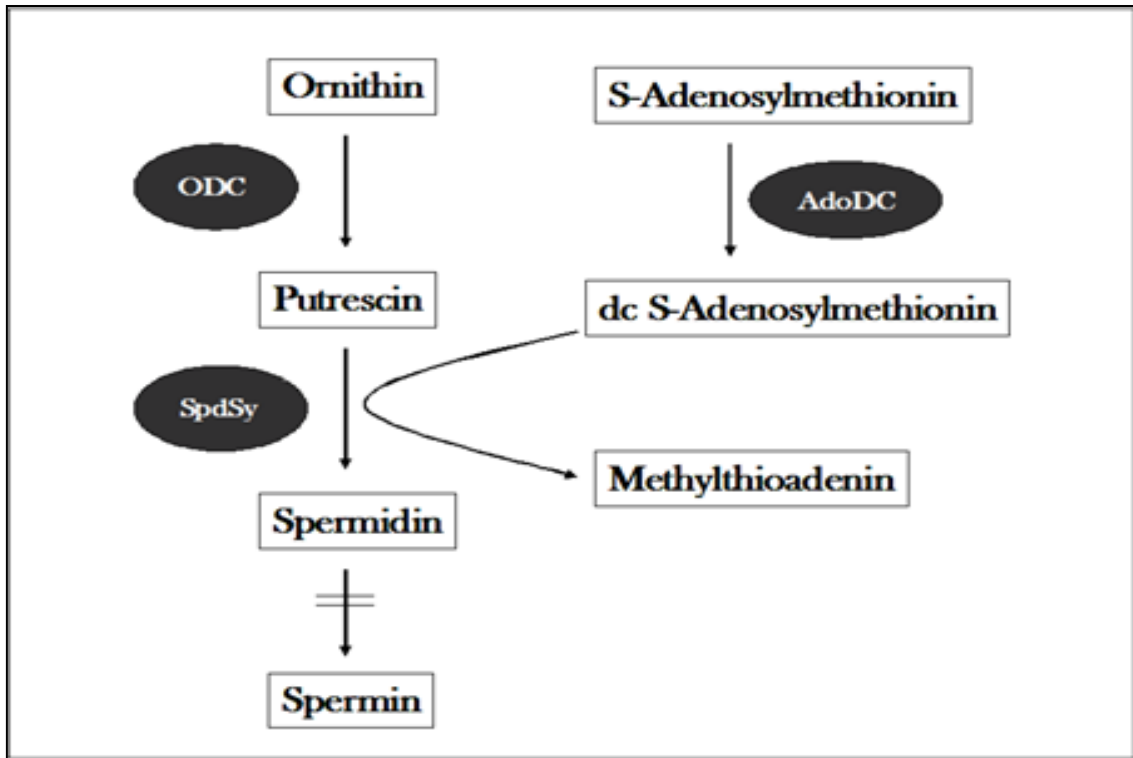


Abb. 5: Polyaminmetabolismus in *T. brucei*. ODC = Ornithindecarboxylase; AdoDC = S-Adenosylmethionindecarboxylase; SpdSy = Spermidinsynthase

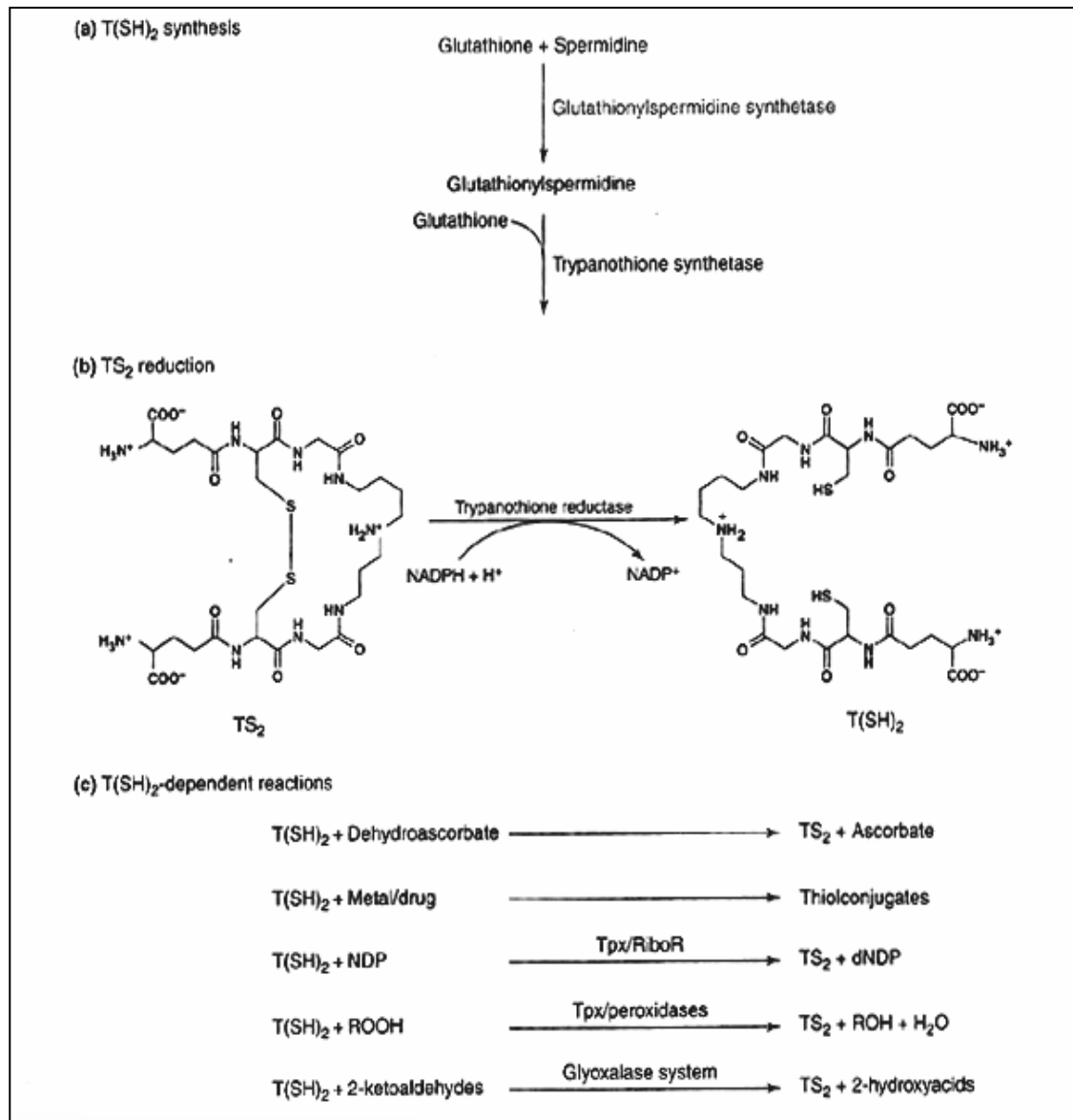


Abb. 6: Biosynthese und Reaktionen von Trypanothion in Trypanosomatiden [Muller *et al.*, 2003]

T(SH)₂ = Reduziertes Trypanothion; TS₂ = Oxidiertes Trypanothion; Tpx = Tryparedoxin; RiboR = Ribonucleotidreductase

II.2. Polyaminmetabolismus in höheren Eukaryonten

Im Vergleich zu Trypanosomen fällt bei der Betrachtung des Polyaminstoffwechsels höherer Eukaryonten zunächst auf, dass neben der in Kinetoplastiden nicht stattfindenden Synthese von Spermin die Aufgabengebiete der einzelnen Polyamine deutlich weiter gefasst sind. Der Biosyntheseweg ist in Abbildung 7 zusammengefasst und zeigt die hier wichtigen Retrokonversionsmöglichkeiten von Spermin und Spermidin über zwischengeschaltete Acetylierungsschritte. Hierfür verantwortlich zeichnet die Spermin/Spermidin-N-Acetyltransferase (SSAT) im Zusammenspiel mit der peroxisomalen Polyaminoxidase (PAO). Letztere oxidiert bevorzugt acetylierte Polyamine, so dass die SSAT-Reaktion vorgeschaltet wird und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmend ist, da die Acetylierung langsamer abläuft als die Oxidation [Janne *et al.*, 2004]. SSAT setzt Spermidin im Vergleich zu Spermin mit dreifacher Effizienz um [Wallace *et al.*, 2003], wobei ersteres ein asymmetrisches Molekül ist und im Cytosol spezifisch am N¹ acetyliert wird. Anschließend kann es entweder aus der Zelle austransportiert oder oxidiert werden, was vom Status der Zelle abhängt. Die Rückführung von Spermin zu Spermidin wird zusätzlich von einem 2002 entdeckten Flavoprotein, der Sperminoxidase (SPO), durchgeführt [Vujcic *et al.*, 2002]. Dieser Schritt benötigt keine Acetylierung und könnte erklären, warum SSAT Spermidin deutlich schneller umsetzt als Spermin. Generell ist festzuhalten, dass die Übertragung der Aminopropylreste bei der Biosynthese von Spermin und Spermidin praktisch irreversibel ist und daher die hier aufgeführten Enzyme für die jeweilige Rückreaktion benötigt werden. Eine interessante Rolle spielt das Antizym, ein Proteininhibitor der ODC, der auch den Eintransport von Polyaminen unterbinden kann. Seinerseits wird Antizym durch den Antizyminhibitor blockiert, der z.B. bei Wachstumsstimuli exprimiert wird. Die Funktionen der Polyamine im zellulären Kontext sind ausgesprochen vielfältig. Es existieren bis heute mehr als 1.500 Arbeiten, die Effekte von Polyaminen in den verschiedensten experimentellen Ansätzen beschreiben [Janne *et al.*, 2004]. Dies ist vor allem auf ihren molekularen Charakter als organische polyvalente Kationen zurückzuführen, die auf Grund ihrer hohen sterischen Flexibilität mit allen Arten von anionischen Makromolekülen interagieren können. Ein konkretes Beispiel hierfür ist die Induktion der Umwandlung von B-DNA zu Z-DNA [Wallace *et al.*, 2003]. Insgesamt muss jedoch konstatiert werden, dass die Relevanz der meisten dieser Arbeiten für die Situation *in vivo* eher fraglich erscheint, da die tatsächliche

Konzentration freier Polyamine innerhalb einer Zelle lediglich geschätzt werden kann. Während sich die intrazelluläre Gesamtkonzentration beispielsweise von Spermin und Spermidin im millimolaren Bereich bewegt, ist der Anteil an ungebundenem Polyamin vermutlich sehr gering. Die am längsten bekannte zelluläre Funktion von Polyaminen, die Stimulation der Proliferation, wurde bereits erstmals im Jahre 1949 beschrieben [Herbst & Snell, 1949], wobei die Einzelheiten der molekularen Grundlagen dieses Effekts bis heute nicht eindeutig geklärt sind. Die Inhibition der Polyaminbiosynthese wurde mitunter bei der Wirkstoffentwicklung gegen Krebserkrankungen ausgenutzt, jedoch führten die durchaus ermutigenden *in vitro* Resultate bisher nicht zu vergleichbaren Erfolgen im klinischen Bereich, was vermutlich auf die sehr komplexe und effiziente körpereigene Homöostase des Polyaminhaushaltes zurückzuführen ist [Seiler, 2003a, Seiler, 2003b].

Eine weitere Funktion von Spermin stellt die Interaktion mit Ionenkanälen dar: So werden beispielsweise K^+ -Kanäle spezifisch einwärts gerichtet, außerdem existieren Wechselwirkungen mit verschiedenen Glutamatrezeptoren. In ersterem Falle blockiert intrazelluläres Spermin den betreffenden K^+ -Kanal und verhindert somit einen Ausstrom von Ionen [Williams, 1997]. Die besagten Kanäle sind dabei verantwortlich für die Aufrechterhaltung des zellulären Ruhemembranpotentials. Im zweiten Fall kann Spermin entweder eine ähnliche Funktion bei Glutamatrezeptoren, ebenfalls durch Verstopfen des Kanals, einnehmen, oder es kann für eine Regulation durch Bindung an Stellen außerhalb der Pore sorgen.

Eine interessante Aufgabe für Spermidin besteht in der kovalenten Modifikation des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A), der essentiell für die zelluläre Proliferation ist. Zu diesem Zweck wird zunächst durch die Desoxyhypusinsynthese ein Aminopropylrest von Spermidin auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des Faktors transferiert. Durch eine folgende Hydroxylierung (Desoxyhypusinhydroxylase) wird aus dem ursprünglichen Lysin letztlich die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin, was eine der spezifischsten bekannten posttranslationalen Modifikationen darstellt. Dieser Weg wird im übrigen auch von Trypanosomen beschriftet [Kaiser *et al.*, 2003].

Eine weitere Rolle fällt den Polyaminen schließlich im Kontext der Apoptose zu, wobei die tatsächliche Bedeutung dieser Substanzen so vielschichtig und die Resultate der publizierten Experimente teilweise so widersprüchlich sind, dass man den Polyaminen bisher keine definierte Aufgabe zuordnen kann [Seiler & Raul, 2005]. Während das Entfernen von Polyaminen in gewissen Fällen zur Induktion von Apoptose führen kann,

ist in anderen Situationen auch eine Erhöhung ihrer Konzentration dazu in der Lage, wohl vornehmlich durch die Entstehung von ROS bei ihrem oxidativen Abbau.

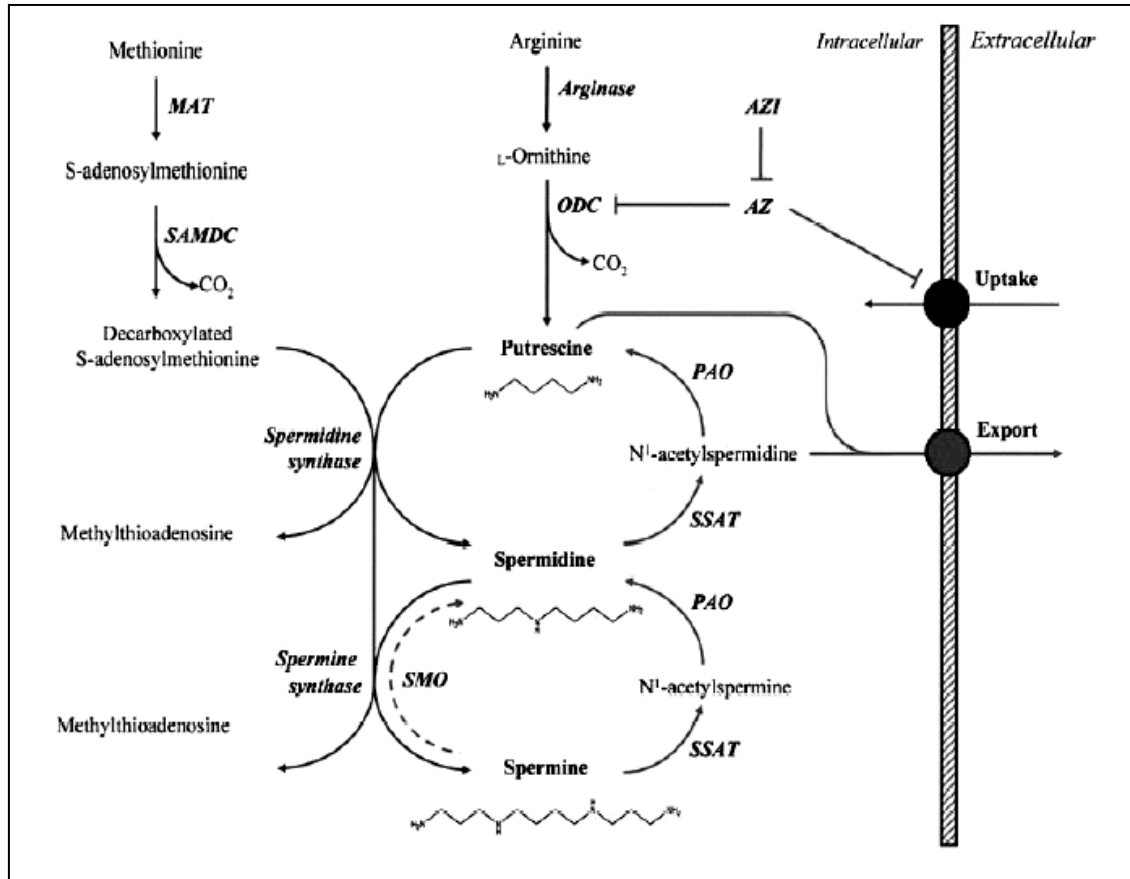


Abb. 7: Überblick über den Polyaminstoffwechsel in höheren Eukaryonten [Wallace *et al.*, 2003]. ODC = Ornithindecarboxylase; PAO = Polyaminoxidase; SSAT = Spermin/Spermidin-N-Acetyltransferase; SMO = Sperminoxidase; MAT = Methionin-Adenyltransferase; SAMDC = S-Adenosylmethionin-Decarboxylase; AZ = Antizym; AZI = Antizyminhibitor

III. Autophagie

Der Begriff Autophagie entstammt dem Griechischen und bezeichnet sinngemäß die Ernährung durch Verzehr eigener Bestandteile. Im zellbiologischen Kontext wird Autophagie als Überbegriff für die Einschlüsse zellulärer Komponenten in sog.

autophagische Vesikel und die anschließende lysosomale Degradation verwendet. Hierbei lassen sich verschiedene Mechanismen wie Mikro-, Makro- und Chaperon-vermittelte Autophagie unterscheiden [Codogno & Meijer, 2005]. Die signifikantesten Veränderungen innerhalb einer Zelle verursacht dabei die Makroautophagie, welche entweder einen lebensverlängernden Effekt verursachen oder, im Gegenteil, den Zelltod zur Folge haben kann. In letzterem Fall spricht man auch von Typ II des programmierten Zelltodes, der phänotypisch klar vom Typ I, der Apoptose, abzugrenzen ist. Allerdings laufen Apoptose und Autophagie nach neueren Erkenntnissen nicht notwendigerweise unabhängig voneinander ab, so dass beispielsweise in bestimmten Fällen die Inhibition früher autophagischer Ereignisse die Induktion von Apoptose verhindern kann [Bras *et al.*, 2005]. Die Einleitung von Autophagie erfolgt insbesondere unter Bedingungen des Energiemangels auf Grund von Nährstoffknappheit. In diesem Kontext wurde dieses Phänomen experimentell durch den Entzug von Aminosäuren induziert [Munafò & Colombo, 2001]. Ein weiteres exogenes Signal stellt die Applikation von Rapamycin dar, einem Wirkstoff, der über verschiedene Phosphorylierungssignale u.a. einen Translationsarrest bewirkt [Codogno & Meijer, 2005]. Wenngleich der genaue Mechanismus und die Regulation der Autophagie bisher lediglich punktuell aufgeklärt werden konnte, ist zu erwarten, dass sie ähnlich der Apoptose eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Homöostase eukaryontischer Organismen einnimmt. Eine der wichtigsten zu klärenden Fragen wird dabei in der Zukunft sein, unter welchen konkreten Bedingungen Autophagie entweder zum Erhalt oder dem programmierten Untergang der Zelle induziert wird.

IV. Stand der Therapiemethoden für Schlafkrankheit

Die Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit stellt bis heute ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, da keines der bisher eingesetzten Medikamente eine durchweg zufrieden stellende Therapiemöglichkeit bietet. Die in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelten Suramin und Pentamidin sind in der Lage, die Krankheit in ihrem Anfangsstadium vollständig zu therapieren, jedoch ist keines der beiden Medikamente fähig, die Blut-Hirn-Schranke zu durchtreten, um Trypanosomen im Zentralen Nervensystem zu bekämpfen. Dennoch werden beide Therapeutika bis

zum heutigen Tage verwendet, was die enormen Schwierigkeiten bei der Wirkstoffentwicklung gegen Trypanosomiasis widerspiegelt. Zwar schien dieses Problem mit der Entwicklung des ZNS-gängigen Melarsoprol im Jahre 1941 weitgehend gelöst, jedoch stehen die verheerenden Nebenwirkungen dieses Wirkstoffs den genannten Vorteilen entgegen: Das arsenhaltige Melarsoprol führt bei bis zu einem Fünftel der behandelten Patienten auf Grund seiner systemischen Wirkungen zum Tode. Trotzdem findet es mangels Alternative noch immer Anwendung, da unbehandelte Schlafkrankheit im neurologischen Stadium unweigerlich letal ist. Die einzige existierende Alternative zur Behandlung mit Melarsoprol wurde 1980 erstmals als Wirkstoff gegen afrikanische Trypanosomen beschrieben [Bacchi *et al.*, 1980]: Difluormethylornithin (DFMO) bzw. dessen Präparat mit dem Namen Eflornithin sind ebenfalls ZNS-gängig und können bei der westafrikanischen Schlafkrankheit praktisch nebenwirkungsfrei zur vollständigen Remission führen, sind allerdings aus bisher ungeklärten Gründen wirkungslos gegen die ostafrikanische Form. Trotz anfänglicher Erfolge konnte sich dieses Medikament nicht dauerhaft als Therapeutikum der Wahl etablieren, da es – insbesondere auf Grund der Entsorgung – enorme Kosten verursacht, die von den Betroffenen in Ländern der Dritten Welt nicht getragen werden können. Generell führt dieser Mangel an Rentabilität dazu, dass in den von der Schlafkrankheit nicht betroffenen Industriestaaten vergleichsweise sehr wenige Forschungsmittel zur Bekämpfung von Schlafkrankheit – sowohl von staatlicher als auch industrieller Seite – zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus ist sogar die Herstellung der bereits auf dem Markt befindlichen Medikamente gefährdet [Keiser *et al.*, 2001]. Trotz einiger innovativer gegen trypanosomenspezifische Angriffspunkte gerichteter Ansätze [Linares *et al.*, 2006], beispielsweise der kombinatorischen Entwicklung von RNA-Aptameren mit antitrypanosomaler Wirkung [Goringer *et al.*, 2006], besteht derzeit kaum Aussicht auf ein finanzierbares, spezifisches, ZNS-gängiges und möglichst oral applizierbares Medikament. Aus diesem Grunde sind in den letzten Jahren natürliche Quellen für neue Wirkstoffe in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses auf besagtem Gebiet gerückt. Es existieren zahlreiche Beispiele für den Nachweis antitrypanosomaler Aktivität komplexer Naturstoffe, insbesondere auf pflanzlicher [Hoet *et al.*, 2004, Hoet *et al.*, 2006, Salem & Werbovetz, 2006], aber auch auf tierischer Basis. So wurde das Gift der Schlange *Bothrops jararaca* auf seine Aktivität gegen *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania major* untersucht und festgestellt, dass es programmierten Zelltod in *T. cruzi* verursacht [Deolindo *et al.*, 2005, Goncalves *et al.*, 2002]. Dabei fällt jedoch auf,

dass in den wenigsten dieser Fälle auch eine aktivitätsbasierte Aufreinigung der hauptaktiven Komponente durchgeführt wurde [Cherigo *et al.*, 2005, Kubata *et al.*, 2005]. Dabei bildet ein solcher Prozess in der Tat die Grundvoraussetzung für die Identifikation neuer Leitstrukturen.

V. *Eristocophis macmahoni*

In dieser Arbeit wurde das Gift der Viper *Eristocophis macmahoni* (Abb. 8) bezüglich seiner Effekte auf *Trypanosoma brucei* untersucht. Beheimatet ist diese Schlange in sandigen Halbwüsten bzw. Wüsten in Pakistan, Afghanistan und dem Osten des Irans. Es existieren zahlreiche Synonyme für ihren oben aufgeführten Namen, beispielsweise *Pseudocerastes latirostris*, Blattnasenviper oder MacMahon-Viper, wobei der letzte Name auf ihren Entdecker zurückgeht. Ihre Länge überschreitet selten 60 cm, und besonders charakteristisch für ihr äußeres Erscheinungsbild ist der stark abgeflachte und breite Kopf und die relativ großen Augen. Die hochgiftige Schlange ist nachtaktiv und ernährt sich hauptsächlich von Echsen und kleinen Säugetieren, während sie sich tagsüber so weit in lockerem Sand eingräbt, dass meist nur Teile des Kopfes zu sehen sind (Abb. 9). Die Weibchen legen bis zu 12 Eier, aus denen nach ca. 8 Wochen die Jungtiere schlüpfen, die etwa 15 cm lang sind. Zwischen Oktober und Februar hält das Tier eine Winterruhe. Die Blattnasenviper kann sich bei Störung oder Bedrohung sehr angriffslustig verhalten, und ihr Biss hat bereits zu mehreren Todesfällen bei Menschen geführt. Ihr Gift wurde auf pharmakologische Wirkungen untersucht und per HPLC fraktioniert [Ali *et al.*, 1999]. Ferner isolierte man eine Phospholipase A₂ [Siddiqi *et al.*, 1991] und eine L-Aminosäure-Oxidase, die mit Apoptose in Verbindung gebracht wurde [Ali *et al.*, 2000]. Besonders interessant in medizinischem Zusammenhang war die Charakterisierung des spezifischen Disintegrins Eristostatin und seine inhibitorische Wirkung auf Melanomzellen im Mausmodell [McLane *et al.*, 2001].



Abb. 8: *Eristocophis macmahoni*, Frontansicht



Abb. 9: *Eristocophis macmahoni*, tagsüber im Sand eingegraben

VI. Zielsetzung der Arbeit

Schlangengifte dienten in der Vergangenheit bereits als wertvolle Quellen für therapeutische Proteine bzw. Peptide [Bailey & Wilce, 2001], wobei letztere bis zu 90% der gesamten Trockenmasse von Schlangengift ausmachen [Devi, 1968, Stocker, 1990]. In dieser Arbeit wurde das Gift von *Eristocophis macmahoni* und seine Wirkungen auf Trypanosomen untersucht. Dieses Projekt war bereits ein Teil meiner Diplomarbeit, in der eine beträchtliche trypanozide Aktivität und signifikante ultrastrukturelle Veränderungen innerhalb der Parasitenzellen nachgewiesen werden konnten. Das Hauptbestreben der vorliegenden Arbeit war die Analyse dieses Giftes bezüglich der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente. Dafür wurde eine aktivitätsbasierte Aufreinigung anhand verschiedener analytischer Methoden durchgeführt. Die Effekte der identifizierten und isolierten Komponente auf *Trypanosoma brucei* sollten in der Folge im Idealfall charakterisiert und das mögliche therapeutische Potential abgeschätzt werden.

B. Material und Methoden

I. Material

I.1. Trypanosomen

Für die hier vorgestellten Arbeiten wurde die klonierte Linie MITat (Molteno Institute Trypanozoon *antigenic type*) 1.2 (VSG Typ: 221) des monomorphen *Trypanosoma brucei brucei* Stammes EATRO 427 verwendet.

I.2. Versuchstiere

Es wurden Ratten der Rasse Sprague Dawley mit einem Körpergewicht von etwa 300 g (Interfauna; Versuchstierfarm GmbH & Co KG, Tuttlingen) verwendet. Die Tiere erhielten Alma[®]-Futter (Botzenhardt, Kempten) und Wasser *ad libitum*.

I.3. Zellkultur

Zellkulturflaschen (T-12,5; T-25; T-75; T-175)	
mit Sterilfilter im Deckel	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten (<i>6-well, 24-well, 96-well</i>)	Greiner, Frickenhausen
Spritzenvorsatz-Sterilfilter	
mit SFCA-Membran (0,2 µm)	Nalge, Hereford, UK
Glocken-Sterilfilter MediKap-2	
(Hohlfaserfilter, 0,2 µm)	Microgon, Laguna Hills, USA
Sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen

I.4. Elektronenmikroskopie

Beem [®] -Cups	Plano, Marburg
Kupfernetzchen, 400 mesh	Plano, Marburg
Negativfilm Kodak Plus-X-Plan 120 (125 ASA, 60 x 70 mm)	Kodak, Stuttgart

I.5. Licht-/Fluoreszenzmikroskopie

Objektträger/Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Objektträger für Immunfluoreszenz	Biomerieux, Mercy l'Etoile, Frankreich

I.6. HPLC

Gelfiltrationssäule I -125 (300 x 7,8 mm)	Waters, Milford, MA, USA
RP-Säule Saphir 110 C18 (50 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
RP-Säule TSK Gel Super-ODS (125 x 0,3 mm)	Grom, Herrenberg
HILIC-Säule SIL 120 Amino-2 PA (60 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
HILIC-Säule SIL Amino-3 CP (60 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
HILIC-Säule Saphir 65 CN (65 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
HILIC-Säule Saphir 65 Diol (65 x 2 mm)	Grom, Herrenberg
Eldex µLC-System	SunChrom, Friedrichstadt

I.7. Geräte

I.7.1. Zentrifugen

Microzentrifuge MC-13	Heraeus, Osterode
Microfuge E	Beckmann, München

Heraeus Sepatech Suprafuge 22	Heraeus, Osterode
Sigma 302K Laborzentrifuge	Sigma, St. Louis, USA
Heraeus Sepatech Biofuge A	Heraeus, Osterode
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen

I.7.2. Zellkultur

Brutschrank Heracell mit CO ₂ -Begasung, 37°C	Heraeus, Osterode
Brutschrank, 27°C	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Sterilbank, LaminAir [®] HLB 2448 GS	Heraeus, Osterode
Zählkammer, nach Neubauer (Tiefe 20 µm)	Brand, Wertheim

I.7.3. Sonstige Geräte

ELISA-Reader MRX-II Revelation	Dynex, Chantilly, USA
FACSCalibur [®] -Apparatur	Becton-Dickinson, NJ, USA
HPLC-System LC-10Avp	Shimadzu, Duisburg
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg
Hofer <i>mighty small</i> Gelapparatur	Hofer, San Francisco, USA
Invertmikroskop ID 02	Zeiss, Oberkochen
Massenspektrometer Esquire 3000+ Ion Trap	Bruker, Rheinstetten
Mikrotom Ultratome 4800	LKB Intstruments, Schweden
Minishaker MS2	IKA Works, Wilmington, USA
Multikanalpipette Research Pro	Eppendorf, Hamburg
PCR Cycler Progene	Techne, Jahnsdorf
Pyramitome 118000	LKB Intstruments, Schweden
Rasterelektronenmikroskop Cambridge	
Stereoscan Mk-2	Cambridge Instruments, Cambridge, UK

Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	
Zeiss EM 109 mit TFP-Großbildkamera	
(Trans-Faseroptik-Photographieeinrichtung)	Zeiss, Oberkochen
Vakuummzentrifuge	Bachofer, Reutlingen

I.8. Chemikalien

I.8.1. Laborchemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Annexin V	Roche, Mannheim
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie brilliant blue G-25	Roth, Karlsruhe
(D)-Glucose	Merck, Darmstadt
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
Eisessig (100%)	Merck, Darmstadt
FACSFlow [®]	Becton-Dickinson, NJ, USA
Foetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Giemsa-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämin	Sigma, Deisenhofen
Immu-Mount Einbettungsmedium	Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MEM Vitaminlösung	Sigma, Deisenhofen
MEM Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
3-Methyladenin	Sigma, Deisenhofen
Monodansylcadaverin	Fluka, Steinheim

NADH	Roche, Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nipent	Lederle, Münster
Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
Putrescin	Sigma, Deisenhofen
Na-Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat	Sigma, Deisenhofen
Spermidindihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Spermintetrahydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Wortmannin	Sigma, Deisenhofen

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Aminosäuren von Sigma bezogen, alle hier nicht aufgeführten anorganischen Salze von Merck, Darmstadt.

I.8.2. Enzyme

Lactatdehydrogenase	Roche, Mannheim
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Sigma, Deisenhofen

I.8.3. Chemikalien für die Elektronenmikroskopie

BDMA (Benzoldimethylamin)	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Bleicitrat	Sigma, Deisenhofen
DDSA (Dodecylbernsteinsäureanhydrid)	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Epon 812	Serva, Heidelberg
Epon-Beschleuniger DMP-30	Serva, Heidelberg
Epon-Härter DDSA	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
MNA (Methylnadinanhydrid)	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
Propylenoxid	Plano, Marburg
Uranylacetat	Plano, Marburg

I.9. Medien, Puffer und Lösungen

I.9.1 Anzucht und Isolierung von Trypanosomen

Citrat-Glucose-Anticoagulans (CGA); pH 7,7

Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O	100 mM
Glucose	40 mM

Separationspuffer; pH 8,0 [Lanham & Godfrey, 1970]

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	57 mM
KH ₂ PO ₄	3 mM
NaCl	44 mM
Glucose	55 mM

Trypanosome Dilution Buffer (TDB); pH 7,7

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	18 mM
---	-------

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2 mM
KCl	5 mM
NaCl	80 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 mM

Einfrriermedium für Stabilate (TDB-Glycerin)

TDB	77 ml
87% Glycerin (20% Endkonzentration)	23 ml

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	7,7 mM
KH ₂ PO ₄	2,3 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM

I.9.2. Enzymassays

I.9.2.1. LDH-Cytotoxizitätstest für WISH-Zellen

Puffer A:

Tris-HCl, pH 7,2	80 mM
NaCl	200 mM

Puffer B:

Tris-HCl, pH 7,2	80 mM
NaCl	200 mM
Pyruvat	3,2 mM
NADH	0,4 mM

I.9.2.2. Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstest für Trypanosomen

Lysepuffer

Na-Acetat, pH 5,5	1 M
p-Nitrophenylphosphat	20 mg/ml
Triton X-100	1% [v/v]

I.9.3. Trypsinierung von WISH-Zellen

Earle`s balanced salt solution (EBSS) pH 7,4

KCl	600 mg/l
NaCl	6800 mg/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140 mg/l
NaHCO ₃	2200 mg/l
Na ₂ SO ₄	200 mg/l
D-Glucose	1000 mg/l

Trypsin-Lösung*

Trypsin	0,05%
EDTA	0,02%

Trypsin-Inhibitor-Lösung*

Trypsin-Inhibitor	0,1%
EDTA	0,02%

* Die Substanzen wurden jeweils frisch in EBSS angesetzt.

I.9.4. FACS-Analysen

Kaliumphosphatpuffer (KPP), pH 7,4

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	100 mM
KH ₂ PO ₄	100 mM

Lysepuffer für die FACS-Analyse des DNA-Gehaltes

KPP 10 mM	2 ml
Complete Proteaseinhibitor	80 µl
RNase A	2 µl

Phosphatpuffer für FACS-Analyse

Na ₂ HPO ₄	7,7 mM
KH ₂ PO ₄	2,3 mM

Digitonin Stammlösung

Digitonin	6,4 mM in H ₂ O dest.
-----------	----------------------------------

Färbelösung zur Analyse des DNA-Gehaltes

PBS	2 ml
Propidiumjodid (10 mg/ml)	4 µl

Annexin-V-Puffer, pH 7,4

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl ₂	5 mM

Färbelösung zur Detektion von Phosphatidylserin

(Angaben pro Probe)

Annexin-V-Puffer	48 µl
Annexin-Lösung (kommerziell)	1 µl
Propidiumjodid (50 µg/ml in H ₂ O dest.)	1 µl

I.9.5. Giemsa-Färbung

Weise-Puffer, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	67 mM
KH ₂ PO ₄	6,6 mM

I.9.6. Puffer für die Elektronenmikroskopie

EM-Puffer, pH 7,4 [Langreth & Balber, 1975]

Natriumcacodylat x 3 H ₂ O	100 mM
Saccharose	120 mM

Glutaraldehydlösung

2% (v/v) in EM-Puffer,
täglich frisch aus 25%iger wässriger Stammlösung hergestellt.

Osmiumtetroxidlösung

3% in *aqua bidest.*,
wurde vor Verbrauch in doppelt konzentriertem EM-Puffer auf 1,5% verdünnt und
anschließend bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Uranylacetatlösung

5% in *aqua bidest.*
Auch diese Lösung wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bleicitratlösung

Eine Gesamtmenge von 10 mg Bleicitrat wurde in 10 ml *aqua bidest.* gegeben und zur
Verbesserung der Löslichkeit mit 50 µl 10 M NaOH versetzt. Nach etwa 10 min war
das Salz vollständig gelöst, woraufhin eine Sterilfiltration erfolgte.

Epon-Gemisch (modifiziert nach Luft [Luft, 1961])

Epon 812	16,8 g
----------	--------

DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)	8,0 g
MNA (Methylnadinanhydrid)	8,7 g
BDMA (Benzyltrimethylamin)	0,04 g

Die Substanzen wurden 20 min gemischt und blasenfrei verwendet. Die Mischung wurde jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt.

I.9.7. Zellkulturmedien

Minimum Essential Medium (MEM); pH 7,4

(nach Duszenko *et al.*, [Duszenko *et al.*, 1985, Duszenko *et al.*, 1992])

	[mg/l]
CaCl ₂ x H ₂ O	265
KCl	400
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140
NaCl	6800
HEPES	7140
Phenolrot	10

Die Substanzen wurden gelöst und der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt.

	[mg/l]
L-Arginin/HCl	126
L-Cystein	24
L-Histidin/HCl x H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	15

Material und Methoden

L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin/HCl	10
Adenosin	12

Die Aminosäuren und das Adenosin wurden separat gelöst und beide Lösungen gemischt. Dann wurden folgende Stammlösungen zugegeben:

	[ml/l]
MEM nicht essentielle Aminosäure-Lösung	10
MEM Vitamin-Lösung	10

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Dieses Grundmedium war zwei bis drei Monate haltbar. Zur Herstellung eines kompletten Kulturmediums wurden folgende Stammlösungen zum Grundmedium zugegeben:

		[ml/l]
NaHCO ₃	(750 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	30
L-Cystein	(30,3 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Bathocuproindisulfon nat (BCS)	(5,6 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	1
Hypoxanthin	(13,6 mg/10 ml 0,1 N NaOH)	10
2'-Desoxythymidin	(3,9 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
L-Glutamin	(292 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Natriumpyruvat	(220 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Myristinsäure gekoppelt an entfettetes BSA (50x)* ¹		20
Fötale Kälberserum	(hitzeinaktiviert: 30 min, 56°C)	150
Penicillin/Streptomycin		5

Die Herstellung der Myristinsäurelösung erfolgte nach Ferguson und Cross [Ferguson & Cross, 1984], wobei zunächst 24 mg Myristinsäure in 100 µl Ethanol (95%) gelöst wurden. Die ethanolische Myristinsäurelösung wurde dann schrittweise zu einer BSA-Lösung zugegeben (1 g fettsäurefreies BSA pro 20 ml H₂O dest.).

Das fertige Medium wurde sterilfiltriert und konnte bei 4°C für ca. 4 Wochen gelagert werden.

Kulturmedium für prozyklische Formen; pH 7,4

Folgende Stammlösungen wurden für die Kultivierung der prozyklischen Formen zum Grundmedium zugegeben:

		[ml/l]
Glutamin	(292 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Hämin	(25 mg/10 ml 0,1 NaOH.)	3
Pyruvat	(220 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Prolin	(600 mg/10 ml <i>Aqua dest.</i>)	10
Fötale Kälberserum	(hitzeinaktiviert: 30 min, 56°C)	150
Penicillin/Streptomycin-Lösung		5

Das Kultivierungsmedium wurde sterilfiltriert und konnte bei 4°C für ca. 4 Wochen gelagert werden.

I.9.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

I.9.8.1. Puffer für die Gelherstellung und Elektrophorese

Acrylamid-Bisacrylamidstammlösung

Acrylamid 30%

N,N'-Methylenbisacrylamid 0,8%

in H₂O dest., wurde lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Ammoniumperoxodisulfat

(NH₄)₂S₂O₈ 10%

Tris/HCl Puffer; pH 8,8

Tris 1 M

Tris/HCl Puffer; pH 6,8

Tris 1 M

Laufpuffer

Tris 25 mM

Glycin 250 mM

SDS 0,1%

SDS-Probenpuffer

Tris/HCl; pH 6,8 50 mM

DTT 100 mM

SDS 2%

Bromphenolblau 0,1%

Glycerol 10%

I.9.8.2. Coomassie-Färbung

Färbelösung

Coomassie brilliant blue G-250 0,25%

Methanol 25%

Eisessig 10%

Entfärbelösung

Methanol	25%
Eisessig	10%

I.9.8.3. Silberfärbung

Fixierlösung

Eisessig	12%
Ethanol	40%
Formaldehyd (37%)	0,05%

Waschlösung

H ₂ O dest.	50%
Ethanol	50%

Imprägnierlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ (10% in H ₂ O dest.)	0,2%
---	------

Silberinkubationslösung

AgNO ₃	0,2% [w/v]
Formaldehyd (37%)	0,075%

Entwicklungslösung

Na ₂ CO ₃	6% [w/v]
Na ₂ S ₂ O ₃ (10% in H ₂ O dest.)	0,004%
Formaldehyd (37%)	0,05%

Stopplösung

Ethanol	40%
Eisessig	12%

I.9.8.4. Trocknungslösung

Glycerin	2%
Ethanol	25%

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele in H₂O dest. angesetzt.

I.10. Eluenten für die HPLC

I.10.1. Gelfiltration

Mobile Phase

Acetonitril	2%
Trifluoressigsäure in H ₂ O	0,1%

I.10.2. *Reversed Phase*

Eluent A

Trifluoressigsäure in H ₂ O	0,0025%
--	---------

Eluent B

Trifluoressigsäure in H ₂ O	0.0023%
Acetonitril	80%

I.10.3. HILIC

Eluent A

NH₄HCOO 100 mM in H₂O, pH 2,8 100%

Eluent B

Acetonitril 100%

I.10.4. On-line μ LC/ESI-MS (*Reversed Phase*)

Eluent A

Trifluoressigsäure in H₂O 0,05%

Eluent B

Trifluoressigsäure in H₂O 0,05%

Acetonitril 80%

II. Methoden

II.1. Anzucht und Isolierung von Trypanosomen

Die zur Infektion von Ratten verwendeten Parasiten stammten aus Stabilaten, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden. Die Stabilate wurden in warmem Wasser schnell aufgetaut und mit CGA so verdünnt, dass eine Zelldichte von $2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ erreicht wurde. Ratten wurden mit 2×10^7 Trypanosomen durch intraperitoneale Injektion infiziert. Die Parasitämie wurde durch Blutentnahme aus der Schwanzvene kontrolliert, wozu 5 μl Blut mit 1 ml CGA verdünnt und die Trypanosomen mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,2 mm) ausgezählt wurden. Nach 2,5 Tagen zeigten die Ratten eine Parasitämie von 4×10^8 bis $1 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ Blut und wurden präpariert. Dazu wurden die Tiere mit CO_2 getötet, der Thorax geöffnet und nach Vorlegen von etwas kaltem CGA in den Brustraum die *Vena cava inferior* durchtrennt. Das austretende Blut wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und das Gefäßsystem durch Herzpunktion mit 10 ml CGA gespült. Das mit CGA versetzte Blut wurde in einer Laborzentrifuge (1.300 g, 10 min, 4°C) sedimentiert, der Serumüberstand verworfen und der *buffy coat*, der die Trypanosomen enthielt, in 2 ml Separationspuffer resuspendiert. Zur weiteren Abtrennung der bei pH 8,0 auf Grund der VSG-Moleküle ungeladenen Trypanosomen von den bei diesem pH-Wert negativ geladenen Blutzellen wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die Säule aus ca. 70 ml DEAE-Cellulose wurde mit 200 ml kaltem Separationspuffer äquilibriert und der *buffy coat* aufgetragen. Nach Anlegen eines Wasserstrahlvakuums und gleichzeitigem Spülen der Säule mit Separationspuffer erschienen die Trypanosomen als milchig-trübe Suspension. Der Durchlauf, der die Trypanosomen enthielt, wurde erneut zentrifugiert, in Medium aufgenommen und ausgezählt. Die Trypanosomen wurden in der Regel direkt verwendet.

II.2. *In vitro* Kultivierung von prozyklischen Trypanosomen

Die Zellen wurden bei 27°C in Suspension in entsprechendem Medium kultiviert. Die Zelldichte sollte $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ nicht überschreiten. Beim Verdünnen musste darauf

geachtet werden, dass die Zelldichte nicht unter $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ lag. Auf diese Weise konnten so genannte Dauerkulturen von prozyklischen Trypanosomen angelegt werden, die man über mehrere Wochen verwenden konnte. Die Parasiten durchliefen etwa alle 10 h eine Zellteilung.

II.3. *In vitro* Kultivierung von Blutformtrypanosomen

Die Kultivierung von Blutformtrypanosomen erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 in einem speziellen Brutschrank. Das Kulturmedium wurde vor der Verwendung im Brutschrank oder im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zur Anzucht einer Trypanosomenkultur wurden sowohl prozyklische als auch Blutformtrypanosomen aus in flüssigem Stickstoff gelagerten Stabilaten verwendet, wobei diese einmal mit 10 ml frischem Kulturmedium gewaschen und anschließend bei 4°C und 3.000 rpm für 5 min abzentrifugiert und gezählt wurden. Die initiale Zelldichte betrug jeweils $2\text{-}2,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ bei einer Generationsdauer von etwa 8 h.

II.4. Herstellung von Trypanosomenstabilaten

II.4.1. Rattenstabilate

Ein Teil der angelegten Kulturstabilate wurde dafür verwendet, Ratten zu infizieren. Zum Anlegen solcher Stabilate wurde das frisch gewonnene, mit CGA versetzte Blut einer Ratte mit einer Parasitämie von ca. 5×10^8 Trypanosomen pro ml im Verhältnis 1:1 mit eisgekühltem Einfriermedium verdünnt (Endkonzentration ca. $1\text{-}2 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$) und in 0,5 ml-Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt.

II.4.2. Stabilate für axenische Kultur

Um Stabilate für das Animpfen axenischer Kulturen zu erhalten, wurde nach dem Zentrifugieren des frisch entnommenen Rattenblutes der *buffy coat* in 4 ml CGA, 6 ml Blutformmedium und 2 ml Vetren®200 aufgenommen. Anschließend wurde die Dichte der Parasiten durch Auszählen in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt und in frischem, eiskaltem Blutformmedium auf $2 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Nach einer 1:1-Verdünnung der gewonnenen Parasitenkultur mit Einfriermedium wurden 0,5 ml-Aliquots angefertigt, die zunächst 1 h bei -20°C , dann über Nacht bei -80°C gelagert wurden, bevor man sie für die Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführte. Bei der Herstellung von Trypanosomenstabilaten wurde grundsätzlich unter Eiskühlung gearbeitet.

II.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

II.5.1. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Präparation wurden 1×10^8 Trypanosomen in 2% Glutaraldehyd in EM-Puffer bei 4°C , 60 min fixiert [Langreth & Balber, 1975]. Danach wurde zweimal für je 5 min mit EM-Puffer gewaschen. Die Zellen konnten nun in EM-Puffer über Nacht bei 4°C aufbewahrt oder direkt aufgearbeitet werden. Als zweites Fixativ wurde eine 1,5%ige Osmiumtetroxid-Lösung verwendet (60 min, 4°C), die zusätzlich zu einem starken Kontrastierungseffekt führte. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen zweimal mit EM-Puffer und zweimal mit *aqua bidest.* (je 5 min, RT) gewaschen. Schließlich wurden die Proben mit 0,5% Uranylacetat in *aqua bidest.* kontrastiert (60 min, RT) und anschließend einmal mit *aqua bidest.* gewaschen (5 min, RT). Das fixierte Material wurde dann mit steigenden Ethanolkonzentrationen entwässert (30%, 50%, 70%, 95%, 100%, 100%, je 5 min, RT) und zweimal je 10 min mit Propylenoxid (Überführungsmedium) gewaschen. Für die Vorbereitung für das TEM folgte schließlich die Einbettung in das Epoxidharz Epon 812 [Luft, 1961]. Dazu wurden die Proben in einem Epon-Propylenoxidgemisch (1:1, 60 min, RT) inkubiert, dann mit reinem Epon infiltriert (60 min, RT) und schließlich in Beem®-Cups überführt. Die

Polymerisation erfolgte 12 h bei 45°C und anschließend 24 h bei 60°C. Alle Schritte wurden mit 1 ml Flüssigkeit in Eppendorfgläsern durchgeführt. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Zellen jeweils in einer Beckman Microfuge B abzentrifugiert (13.000 g, 30 s, RT). Nach der Polymerisation des Eponharzes wurden die Proben am LKB Pyramitome 11800 zu Trapezen (ca. 0,5 mm Basislänge) getrimmt. Anschließend wurden Ultradünnschnitte angefertigt (LKB, Ultratome 4800), die mit Kupfernetzchen aufgefischt wurden. Zum Kontrastieren der Schnitte wurden die Netzchen auf 50 µl 5% Uranylacetattropfen gesetzt (60 min, RT, Schnitte nach unten). Die Netzchen wurden mit *aqua bidest.* gewaschen, in eine Bleicitratlösung getaucht (45 s, RT) und anschließend gewaschen (*jet washing*) und getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop mit TFP-Großbildkamera durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde der Negativfilm Kodak Plus-X-Plan 120 (125 ASA, 60 x 70 mm) verwendet.

II.5.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Entsprechend vorbehandelte Trypanosomen wurden bis zur Überführung in 70%igen Ethanol nach dem gleichen Protokoll wie für die Transmissionselektronenmikroskopie verarbeitet. Anschließend wurden sie sukzessive für jeweils 8 h in 96% und 100% Ethanol inkubiert. Die Kritischer-Punkt-Trocknung erfolgte in flüssigem CO₂, wonach die Proben mit einer Palladium-Gold-Mischung (Schichtdicke 20 nm) besputtert und mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops des Modells Cambridge Stereoscan 250 Mk2 untersucht wurden. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Karl-Heinz Hellmer im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Betz (Abteilung für Evolutionsbiologie der Invertebraten der Universität Tübingen) erstellt.

II.6. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte in der Hoefer *mighty small* Gelapparatur nach der Methode von Laemmli [Laemmli, 1970] mit einem 5%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Die Geldicke betrug 0,75 mm. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden Standardproteine mit aufgetrennt.

Gel-Lösungen für je 4 Gele

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
<i>Aqua bidest.</i>	8,4 ml	5,1 ml
30% Acrylamid	2,0 ml	9,1 ml
1,0 M Tris/HCl; pH 8,8	-	8,6 ml
1,0 M Tris/HCl; pH 6,8	1,5 ml	-
SDS, 10%	120 µl	120 µl
APS, 10%	60 µl	60 µl
TEMED	12 µl	12 µl

Laufbedingungen für 2 Gele:

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
200	120	60	40-45

Coomassie-Färbung

Die Färbung der Gele erfolgte für etwa 1 h, die Entfärbung des Gelhintergrunds mit Methanol und Essigsäure ca. 1,5 h jeweils auf einem Schüttler bei Raumtemperatur.

Silberfärbung

Zur Detektion geringerer Proteinmengen wurden Silberfärbungen nach folgendem Schema durchgeführt:

Fixieren:	10 min in Fixierlösung
Waschen:	3 x 10 min in 50% Ethanol
Imprägnieren:	1 min mit Imprägnierlösung
Waschen:	3 x 20 s in H ₂ O dest.
Silberinkubation:	20 min mit AgNO ₃ -Lösung
Waschen:	2 min in H ₂ O dest.
Entwickeln:	je nach Färbung ca. 10 s bis 1 h unter Sichtkontrolle mit Entwicklungslösung
Waschen:	2 x 2 min in H ₂ O dest.
Stoppen:	10 min in Stopplösung
Waschen:	20 min in 50% Ethanol

Alle Schritte wurden in einem Plastikbehälter auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

II.7. FACS-Analyse

II.7.1. Nekrosetest

Zur Detektion von Nekrose wurden die Parasiten zunächst für verschiedene Zeiträume mit der jeweiligen Komponente inkubiert und anschließend mit Propidiumjodid versetzt. Letzteres kann ausschließlich Zellen nekrotischer Zellen anfärben, da diese

keine intakte Plasmamembran mehr aufweisen. Durch die bei nekrotischen Prozessen entstehenden Poren kann der fluoreszierende Farbstoff somit ins Cytosol eintreten. Für die Messung wurde die Zellkultur in 0,5 ml-Aliquots in FACS-Röhrchen gegeben. Eine Positivkontrolle wurde mit 6 μ M Digitonin (ruft Nekrose hervor) versetzt, anschließend wurde zu allen Proben Propidiumjodid auf eine Endkonzentration von 0,5 μ g/ml zugegeben. Die fertigen Proben wurden im Rotkanal der FACS-Apparatur gemessen.

II.7.2. Zellzyklusbestimmung

Als interkalierendes Agens lagert sich Propidiumjodid in die große Furche doppelsträngiger DNA ein, was zur Bestimmung der Phase des Zellzyklus herangezogen werden kann. In der FACS-Apparatur wurde anhand der Fluoreszenzintensität und damit der Menge des genetischen Materials der jeweiligen Zelle deren Zellzyklusstadium bestimmt. Dazu wurde je 1 ml einer entsprechend vorinkubierten Blutformkultur in einem Eppendorfgesäß abzentrifugiert (Raumtemperatur, ca. 13.000 rpm, 15 s) und in eiskaltem PBS gewaschen, was im Regelfall einer absoluten Zellzahl von ca 1×10^6 entsprach. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 100 μ l Lysepuffer und die Überführung in FACS-Röhrchen, in denen die Zellen für etwa 30 min bei 4°C bis zur vollständigen hypotonen Lyse inkubiert wurden. Anschließend wurden 100 μ l einer Propidiumjodidlösung in PBS (20 μ g/ml) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 μ g/ml erreicht wurde. Die Färbung erfolgte bei 4°C im Dunkeln für etwa 30 min, bevor die Proben gemessen wurden.

II.7.3. Annexin-V-Apoptosetest

Das Membranphospholipid Phosphatidylserin ist im Normalfall lediglich im cytosolischen *leaflet* der Plasmamembran zu finden. Die Exposition dieses Molekül auf der cytosolischen Seite gehört zu den signifikantesten Charakteristika der Apoptose. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin und kann somit zur Detektion dieses apoptotischen Phänotyps dienen. Für den Versuch wurden wiederum

Trypanosomen unter den jeweils angegebenen Bedingungen vorinkubiert und vor der Messung 500 µl der Kultur entnommen. Nach einmaligem Waschen mit Annexin-V-Puffer und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 50 µl der Propidiumjodid-Farbelösung für die Zellzyklusbestimmung resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Schließlich gab man 450 µl Annexin-V-Puffer zu, bevor die Messung im Grünkanal der FACS-Apparatur erfolgte. Um eventuell auftretende Nekrose zu detektieren, die zu falsch positiven Annexin-gefärbten Zellen führen könnte, erfolgte eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid. Doppelt gefärbte Zellen konnten demnach nicht als apoptotisch eingeordnet werden. Zu beachten war bei dieser Methode die Überlappung der beiden Fluoreszenzen, für deren Kompensation spezielle Einstellungen am Durchflusszytometer vorgenommen werden mussten.

II.8. Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstest für Trypanosomen

Das Prinzip dieser Messung beruht auf der photometrischen Bestimmung der Aktivität freigesetzter Saurer Phosphatase [Bodley *et al.*, 1995]. Dabei wird das Enzym noch lebender Zellen gemessen, weshalb die betreffenden Kulturen vor der Zugabe des Substrates lysiert werden müssen. Für den Versuch wurden Trypanosomen aus Kulturstabilaten in Blutformmedium ohne Phenolrot angezogen und eine Hauptkultur in der späten logarithmischen Phase bei einer Zelldichte von etwa $8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in frischem Medium auf eine Zelldichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Aliquots von je 200 µl wurden für jede Konzentration viermal in eine *96-well plate* pipettiert und die Wirkstoffkonzentrationen mit Hilfe einer geeigneten Stammlösung auf die angegebenen Werte eingestellt. Ein Medium-Leerwert sowie Wirkstoff ohne Zellen wurden in jeweils acht *wells* gemessen, während die mit Wirkstoff inkubierten Zellkulturen als Vierfachbestimmungen pipettiert wurden. Der Ansatz wurde teilweise mit Parafilm versiegelt und für 24 oder 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die *wells* mit je 20 µl des p-Nitrophenylphosphat enthaltenden Lysepuffers versetzt und nach 3-6 weiteren Stunden im Brutschrank die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im *ELISA reader* bestimmt.

II.9. Giemsa-Färbung

Ein Volumen von 1 ml einer Trypanosomenkultur, die entsprechend vorinkubiert worden war, wurde in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (15 s, RT, 13.000 rpm). Die Zellen wurden in ca. 100 µl verbleibenden Mediums resuspendiert und auf einen Objektträger ausgestrichen. Nach Trocknung an der Luft wurden die Parasiten durch Auftragen von Methanol fixiert, und die 1:10 in Weise-Puffer verdünnte Giemsalösung wurde gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Einer 30minütigen Inkubation folgten etwa drei Waschschrte mit abgekochtem destilliertem Wasser, bis sich keine Farbwolken mehr ablösten. Der Objektträger wurde bis zur Analyse im Lichtmikroskop bei 4°C aufbewahrt.

II.10. LDH-Cytotoxizitätstest für WISH-Zellen

Für diesen Versuch nach [Dringen *et al.*, 1998] wurden WISH-Zellen aus einem Kulturstabilat zunächst auf eine Dichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in einer Kulturflasche angesetzt. Nach dem Erreichen der Konfluenz nach ca. 1-2 Wochen wurden die Zellen trypsiniert und wiederum bei der gleichen Initialdichte auf *24-well plates* ausgesät. Nach weiteren 1-2 Wochen wurde Wirkstoff in den angegebenen Konzentrationen zu jeweils 3 *wells* zugegeben und die Zellen für 24 bzw. 48 h unter den gleichen Kulturbedingungen wie Blutformtrypanosomen inkubiert. Als Positivkontrollen wurden nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer 30 min vor der Messung zwei *wells* mit Triton X-100 (auf 1% [v/v]) versetzt. Für die Messung selbst wurden von jeder Kultur jeweils drei *wells* einer *96-well plate* mit 10 µl beschickt. Nach der anschließenden Beladung mit Reaktionspuffer wurde die Anfangsgeschwindigkeit der NADH-Abnahme umgehend (0-1 min) im *ELISA reader* bei 340 nm gemessen.

II.11. HPLC

Das Schlangengift wurde zum Zweck der aktivitätsgerichteten Aufreinigung der trypanoziden Hauptkomponente mit Hilfe von verschiedenen Prinzipien der HPLC aufgetrennt. Dabei wurden alle Fraktionen manuell gesammelt und folgende Bedingungen gewählt:

Gefiltration

Als Ausgangsmaterial wurde je 1 mg lyophilisiertes Schlangengift eingewogen, in 100 µl mobiler Phase gelöst und in eine Injektionsschleife mit dem gleichen Volumen injiziert.

Flussrate: 0,5 ml/min
Detektion: 280 nm
Gradient: isokratisch

Reversed Phase

Die Fraktionen aus dem Gelfiltrationsschritt oder komplettes Schlangengift wurden in einem geeigneten Volumen der anfänglichen Zusammensetzung der mobilen Phase (95% A, 5% B) gelöst.

Flussrate: 250 µl/min
Detektion: 214 nm
Gradient: 0-5 min 95% A
5-60 min 95-20% A

HILIC präparativ

Hierbei wurden die Gelfiltrationsfraktionen mit der höchsten trypanoziden Aktivität in der initialen Mischung des Gradienten gelöst und in 20 µl injiziert.

Flussrate: 250 µl/min
Detektion: 214 nm

Gradient: 0-5 min 90% A
5-35 min 90-30% A

HILIC on-line zur Quantifizierung

Flussrate: 150 $\mu\text{l}/\text{min}$
Detektion: massenspektrometrisch
Gradient: isokratisch 30% A, 70% B

II.12. Bestimmung der trypanoziden Aktivität von HPLC-Fraktionen

Aus den HPLC-Trennungen erhaltene Fraktionen wurden zunächst in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt und bis zur Bestimmung der trypanoziden Aktivität bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurden alle Fraktionen in 20 μl Ampuwa aufgenommen. Insgesamt 16 μl aus jeder Probe wurden zu jeweils 184 μl unmittelbar zuvor auf $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ verdünnter Blutform-Trypanosomenkultur in einer *96-well plate* gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde teilweise mit Parafilm versiegelt und unter den üblichen Kulturbedingungen inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten die Zelldichte durch Auszählen in einem Hämacytometer bestimmt wurde. Die verbleibenden 4 μl jeder Probe wurden für die spätere massenspektrometrische Bestimmung bei 4°C aufbewahrt.

II.13. Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Untersuchungen von Schlangengiftkomponenten wurden per $\mu\text{LC}/\text{ESI-MS}$ mit einem Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer von Bruker durchgeführt. Dazu wurde eine Standard-ESI-Quelle oder eine handgefertigte Nanospraykapillare verwendet. Bei der on-line RP/ $\mu\text{LC}/\text{ESI-MS}$ -Analyse wurden die folgenden Bedingungen eingestellt:

Flussrate: 5 μ l/min
Detektion: 214 nm
Gradient: 0-5 min 95% A
5-60 min 95-40% A

Die Ionisierung wurde je nach Experiment im positiven oder negativen Modus durchgeführt. Gegebenenfalls erfolgte die Isolierung und Fragmentierung der Vorläuferionen in der Ionenfalle per *low-energy CID* bis in die dritte Dimension (MS^3). Steuerung und Auswertung erfolgten mit der Software Bruker Daltonics.

C. Ergebnisse

I. Schlangengift von *Eristocophis macmahoni*

I.1. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration

Ein Maß für die Toxizität eines Stoffes in einem gegebenen Organismus ist die so genannte IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*). Es handelt sich dabei um die Konzentration eines Stoffes, die eine Reduktion einer Population um 50% bewirkt (halbinhibitorische Konzentration). Da es bis heute keinen international anerkannten Standard für Cytotoxizitätstests mit Trypanosomen gibt, wurde mit einer initialen Zelldichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ gearbeitet. Abb. 10 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des kompletten Schlangengiftes von *Eristocophis macmahoni* bei Blutformtrypanosomen nach einer Inkubationsdauer von 48 h unter den üblichen Kulturbedingungen. Wie bei solchen Auftragungen üblich wurde eine semilogarithmische Darstellung gewählt, d.h. die Konzentration an Schlangengift wurde logarithmisch skaliert. Am Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Kurve lässt sich dabei auf der Abszisse direkt die IC_{50} ablesen. Anhand der vorliegenden Abbildung wurde dieser Wert im Falle des Schlangengiftes auf 198 ng/ml bestimmt. Auf Grund der enormen Komplexität der molekularen Zusammensetzung dieser Naturstoffmischung konnte keine Abschätzung der Konzentration auf Stoffmengenbasis erfolgen, da sowohl hochmolekulare Substanzen wie Proteine als auch niedermolekulare Stoffe vorhanden waren. Dennoch war zu erkennen, dass es sich um einen vergleichsweise starken inhibitorischen Effekt handelte, da beispielsweise das Gift von *Bothrops jararaca* bei *Trypanosoma cruzi* eine halbinhibitorische Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ aufwies [Deolindo *et al.*, 2005].

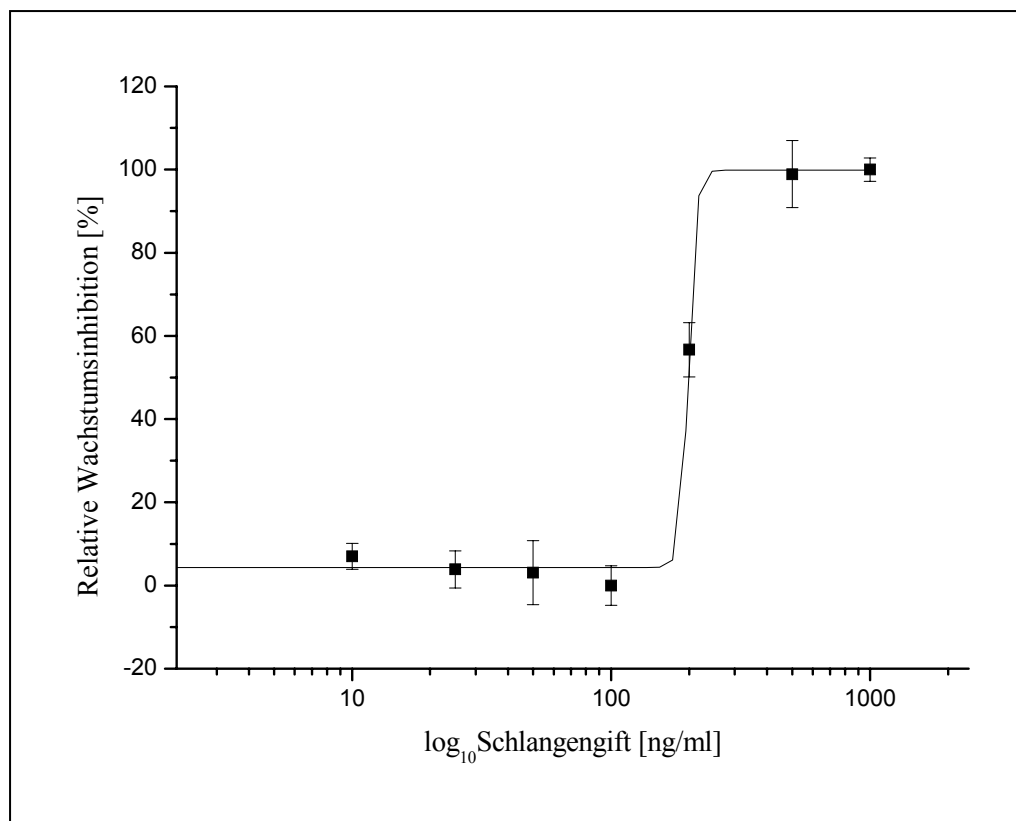


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des kompletten Schlangengiftes von *Eristocophis macmahoni* bei Blutformtrypanosomen nach einer Inkubationsdauer von 48 h. Die IC₅₀ betrug 198 ng/ml.

I.2. Effekt des Schlangengiftes auf den Wachstumsverlauf von Trypanosomen

Während die Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration des Gifts ein Maß für die antitrypanosomale Potenz und einen punktuellen Wert bei einer Inkubation von 48 h bereitstellte, sollte auch der offensichtlich vorhandene Einfluss auf den Wachstumsverlauf von Blutformtrypanosomen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen aus Stabilaten bis zu einer Dichte von $0,8-1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ angezogen und in frischem Medium auf $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ verdünnt. Anschließend wurde die Schlangengiftkonzentration in den einzelnen Kulturen auf 100, 130, 160 bzw. 200 ng/ml eingestellt. Da das lyophilisierte Schlangengift in Wasser gelöst war, entfiel hier die Lösungsmittelkontrolle wie auch in allen folgenden Versuchen. Abb. 11 zeigt den Kulturverlauf über ca. dreieinhalb Tage,

wobei die Proben mit 100 bzw. 130 ng/ml im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen ein eher geringfügig vermindertes Wachstumsverhalten aufwiesen. In der Probe mit 160 ng/ml war allerdings eine signifikante trypanozide Aktivität feststellbar, bei 200 ng/ml trat die Auslöschung der betreffenden Kultur bereits nach wenigen Stunden ein. Die leicht erhöhte Aktivität im Vergleich zu der Bestimmung der IC_{50} ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Kulturvolumina zurückzuführen, da bei den Wachstumsverlaufsexperimenten Kulturflaschen statt Mikrotiterplatten verwendet wurden.

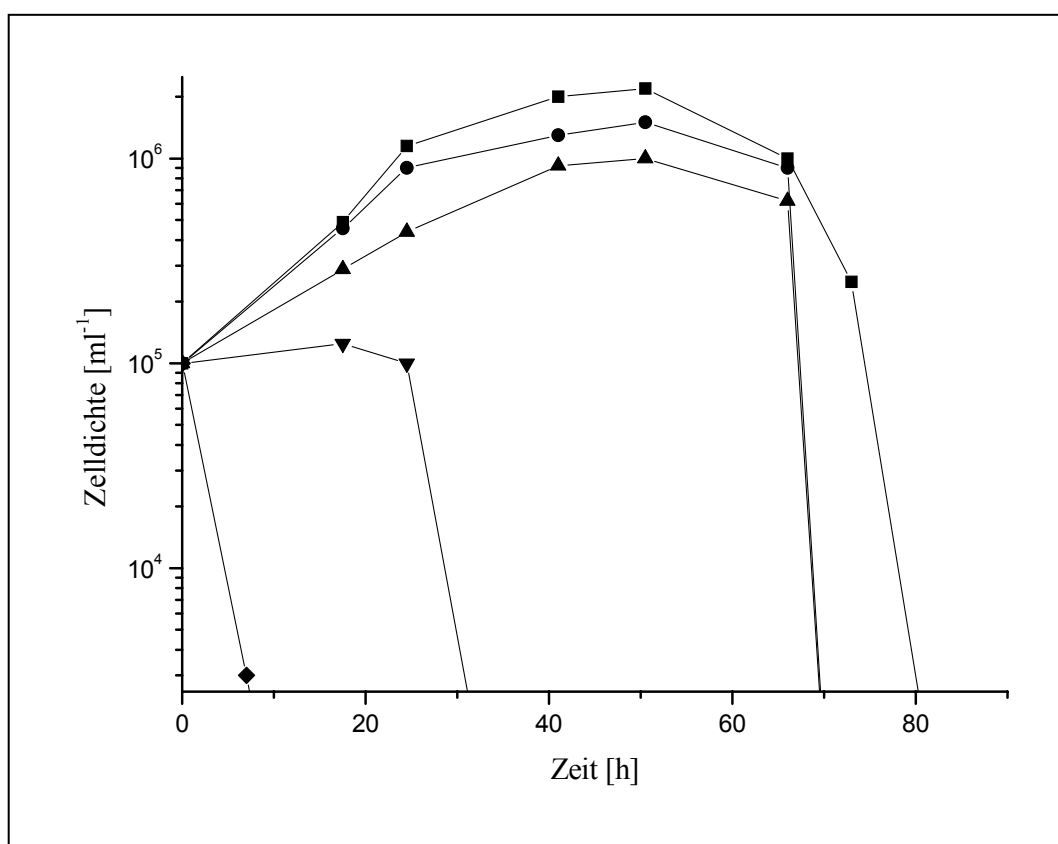


Abb. 11: Konzentrationsabhängige Effekte des kompletten Schlangengiftes auf den Wachstumsverlauf von Blutformtrypanosomen in axenischer Kultur. (■): Unbehandelte Kontrollzellen; (●): Schlangengift 100 ng/ml; (▲): Schlangengift 130 ng/ml; (▼): Schlangengift 160 ng/ml; (◆): Schlangengift 200 ng/ml

I.3. Lichtmikroskopische Aufnahmen

Blutformtrypanosomen in der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden bei einer Zelldichte von $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ mit Schlangengift bei einer Endkonzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ inkubiert, bis sich die Zellzahl der Parasiten auf etwa die Hälfte des Anfangswertes reduziert hatte. Um eventuelle morphologische Veränderungen der Parasiten besser zu visualisieren, wurden anschließend Ausstriche der Kulturen auf Objektträgern angefertigt und eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Abb. 12 stellt das typische Erscheinungsbild der behandelten Parasiten (B-D) im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen (A) dar. Auffällig ist die Vakuolisierung des Zellkörpers, die mit einem Verlust der charakteristischen langgestreckten Gestalt der *long slender* Blutformtrypanosomen hin zu einer gedrungeneren Form einhergeht.



Abb. 13: Lichtmikroskopische Untersuchung von giemsaefärbten, schlangengiftbehandelten ($1 \mu\text{g/ml}$) Blutformtrypanosomen. A: Unbehandelte Kontrollzelle; B-D: Schlangengiftbehandelte Zellen

I.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

I.4.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für dieses Experiment wurden zunächst insgesamt 1×10^8 Blutformtrypanosomen in der späten logarithmischen Phase in frischem Kulturmedium auf eine Dichte von $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Nach einer einstündigen Inkubation mit Schlangengift bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ unter den üblichen Kulturbedingungen war die Zelldichte auf etwa die Hälfte abgesunken, und es erfolgte die Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie. Abb. 13 (A) zeigt eine unbehandelte Kontrollzelle, welche die charakteristische *long slender* Struktur aufweist. Im Vergleich zu deren Morphologie zeigen die mit Schlangengift behandelten Trypanosomen (B-F) signifikante Veränderungen: Generell erkennt man eine typische korkenzieherartige Aufwindung, die zum Teil die Beobachtungen im Lichtmikroskop unterstützt, wobei dort auf Grund der geringeren Vergrößerung lediglich ein Abrunden der Zellen sichtbar ist. Die morphologischen Veränderungen weisen auf eine Störung der Struktur des mikrotubulären Cytoskeletts hin.

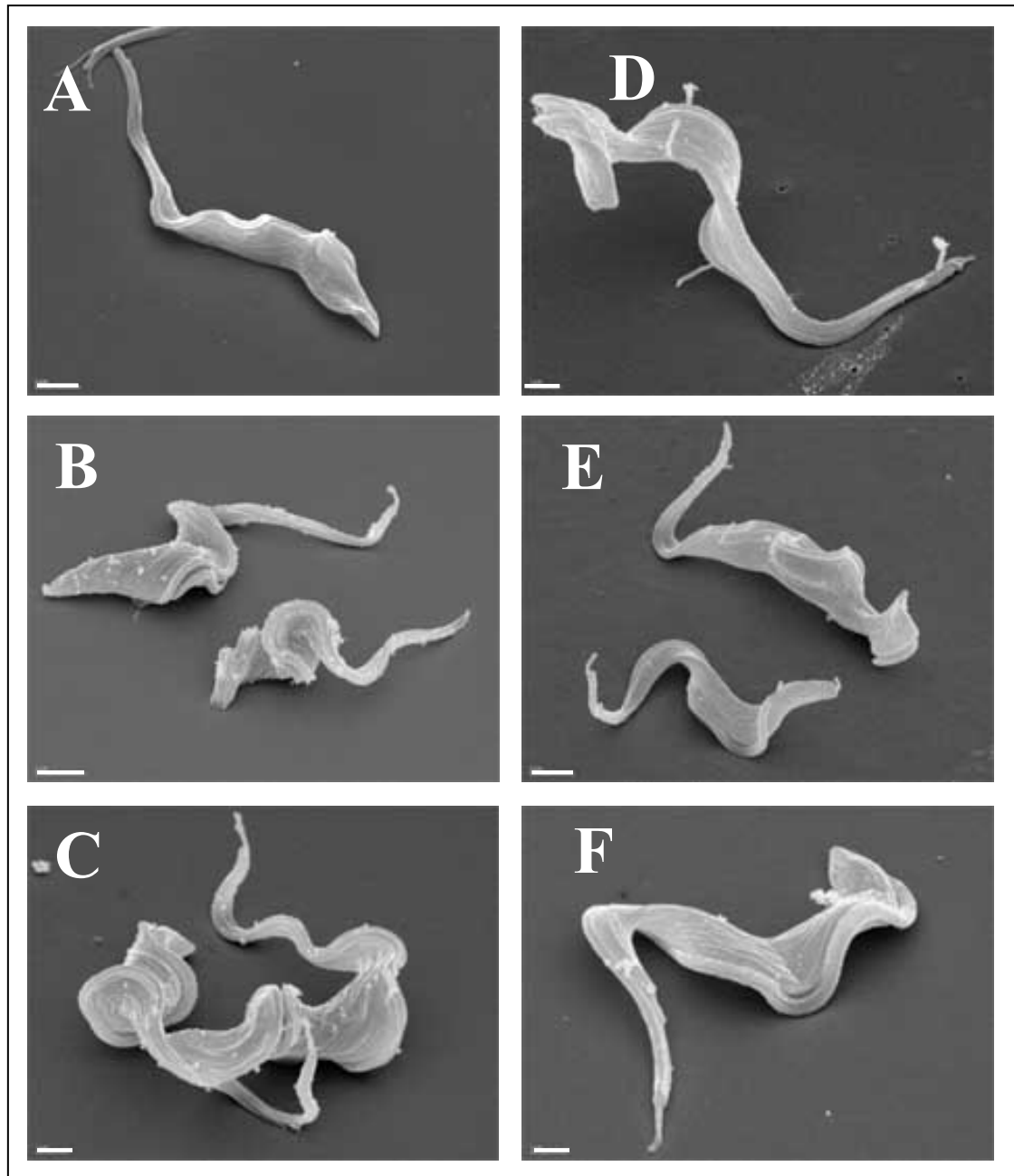


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Schlangengift behandelten Blutformtrypanosomen. **A:** Unbehandelte Kontrollzelle; **B-F:** Schlangengiftbehandelte Zellen. Charakteristisch für behandelte Zellen ist die Verdrillung des Zellkörpers. Der Balken am unteren Bildrand repräsentiert jeweils eine Länge von 2 μm .

I.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Vorbereitungen für diesen Versuch einschließlich der Inkubation der Blutformtrypanosomen mit Schlangengift waren, bis zur Einbettung in Eponharz, identisch mit denjenigen für die Rasterelektronenmikroskopie. Abb. 13 zeigt die charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen (B-F) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (A). Besonders auffällig sind hierbei Veränderungen an Cytoskelett und Plasmamembran. In Teilabbildung (B) ist eine Zelle zu sehen, deren mikrotubuläres Cytoskelett nicht die für Trypanosomen typische, einheitliche Anordnung in Längsstreben unterhalb der Zellmembran aufweist. Statt dessen sind zahlreiche Mikrotubuli innerhalb der Zelle zu sehen (Pfeile), was mit den schon lichtmikroskopisch sichtbaren Verdrillungen des Zellkörpers korreliert. Eine außergewöhnliche Beobachtung in (C) ist die Abschnürung oder Fusion eines Vesikels an der Membran des Flagellums (Pfeil). Wie bereits in der Einleitung diskutiert, erfolgen solche Exo- oder Endocytoseprozesse nach dem allgemeinen heutigen Standpunkt ausschließlich über die Flagellumtasche. Aufschluss über die Art des Zelltods geben die Abbildungen (D-F). Die hier zu beobachtenden zellulären Einschlüsse in vesikuläre Strukturen können als deutliche Anzeichen von Autophagie betrachtet werden. Dabei entsprechen die Vesikel teils Lysosomen, teils doppelmembranumschlossenen Vakuolen, wobei letztere auch Autophagosomen genannt werden. Besonders eindeutig ist der für Autophagie typische Abbau von zellulären Bestandteilen in (F) zu beobachten, wo Golgi-ähnliche Strukturen im Lysosom eingeschlossen sind. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es in behandelten Trypanosomen neben Autophagieprozessen zu signifikanten Störungen im Arrangement des mikrotubulären Cytoskeletts und im Ablauf von Exo- bzw. Endocytoseprozessen kommt.

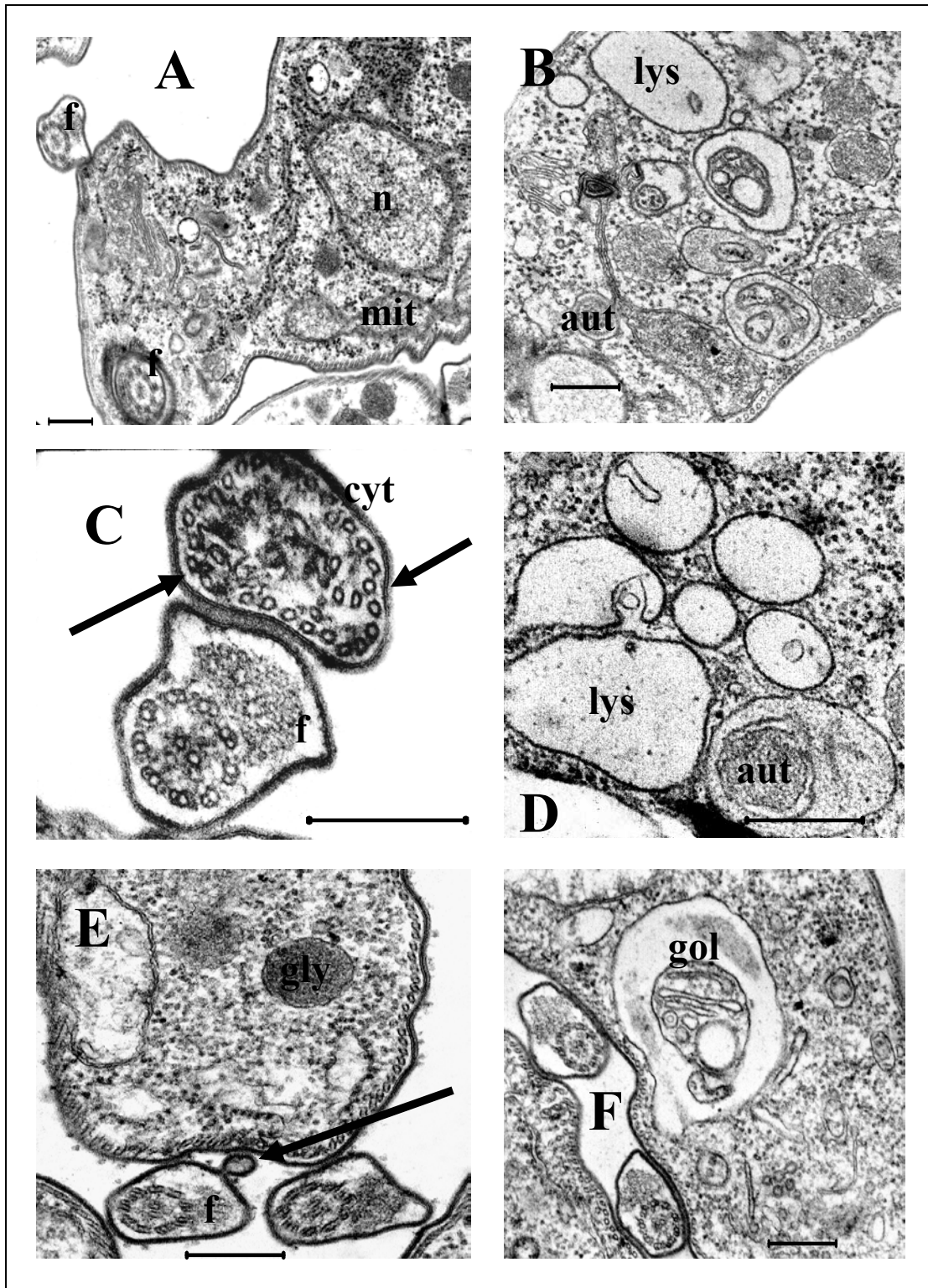


Abb. 14: TEM-Aufnahmen von schlangengiftbehandelten Blutformtrypanosomen. A: Unbehandelte Kontrollzelle. B-F: Zellen für 30 min vorbehandelt mit 1 µg/ml Schlangengift. Die Balken am unteren Bildrand repräsentieren je 0,5 µm. aut: Autophagosomen; cyt: Mikrotubuläres Cytoskelett; f: Flagellum; gly: Glycosom; gol: Golgi-ähnliche Struktur; lys: Lysosom; mit: Mitochondrium; n: Nucleus

I.5. Auftrennung der Proteinkomponenten des Gifts durch SDS-PAGE

Vom lyophilisierten Schlangengift wurden die Proteine bzw. Peptide auf einem 12%-igen SDS-Proteingel aufgetrennt und visualisiert, wobei für letzteres eine Silberfärbung angewendet wurde, die deutlich sensitiver war als die zuvor ebenfalls durchgeführten Coomassie-Färbungen (nicht dargestellt). Aus einer wässrigen Stammlösung (1 mg/ml) wurden je 1, 3 und 5 µg unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 190 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Silberfärbung erfolgte unter ständiger visueller Kontrolle und ist in Abb. 15 dargestellt. Bei ca. 14 kDa ist eine sehr prominente Bande zu sehen, die vermutlich der Phospholipase A₂ entspricht. Eine Bande, die unter nichtreduzierenden Bedingungen bei etwa 22 kDa auftaucht, verschwindet nach der Reduktion, was für eine in Schlangengiftpeptiden und -proteinen häufige Verbrückung durch Disulfidbindungen spricht.

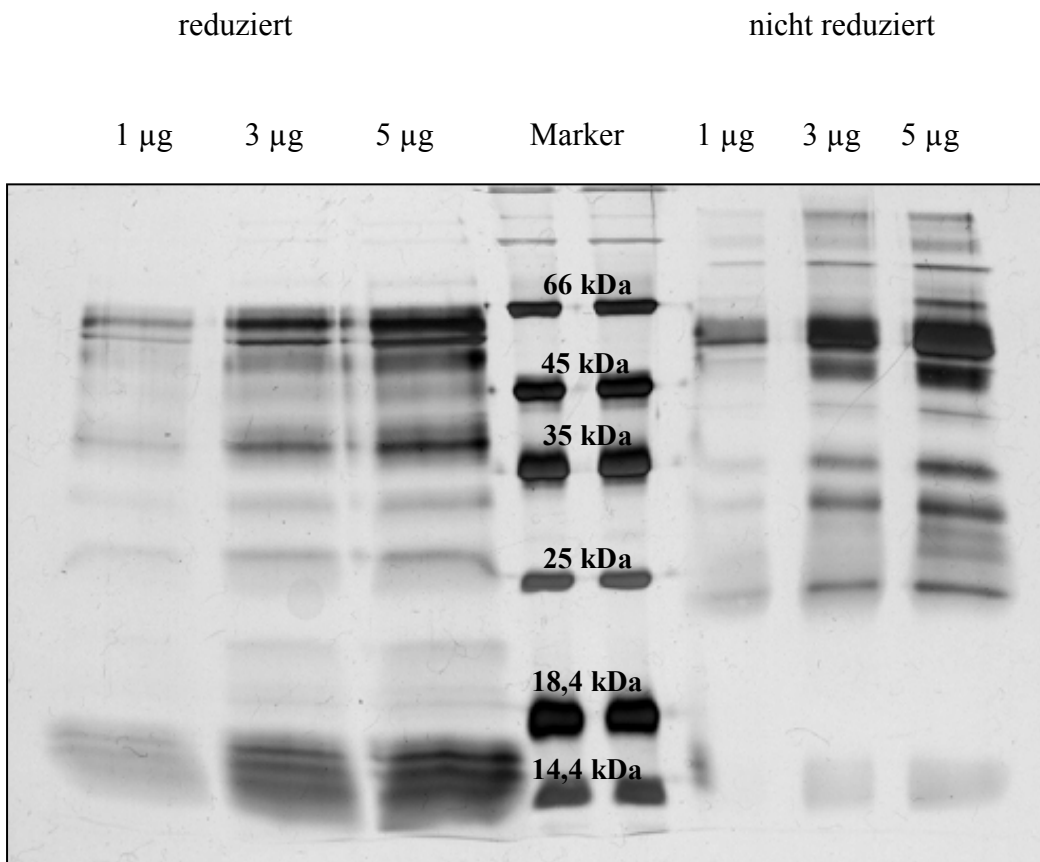


Abb. 15: Gelelektrophoretische Auftrennung und Visualisierung der Peptid- und Proteinkomponenten des Viperngiftes mittels SDS-PAGE mit Silberfärbung

II. Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven Komponente

II.1. Auftrennung des kompletten Schlangengiftes per Gelfiltration

Bei Schlangengiften handelt es sich prinzipiell um hochkomplexe Gemische aus verschiedenen Stoffklassen. Allein die enorme Vielfalt an Peptid- und Proteinkomponenten im Gift von *Eristocophis macmahoni* wurde bereits im SDS-PAGE-Experiment deutlich. Um daher einen besseren Überblick über die im Gift enthaltenen Substanzen zu erhalten, wurde eine initiale Auftrennung über eine Gelfiltrationssäule unter HPLC-Bedingungen vorgenommen. Dabei wurde 1 mg des lyophilisierten Viperngifts in 100 μ l mobiler Phase gelöst und direkt im Anschluss auf die HPLC-Säule appliziert. Nach einem Lauf von etwa 20 min Dauer waren unter den gegebenen Bedingungen alle bei 280 nm detektierbaren Komponenten eluiert. Das Chromatogramm in Abb. 16 zeigt neben dem Elutionsmuster die in jedem Lauf gesammelten Fraktionen.

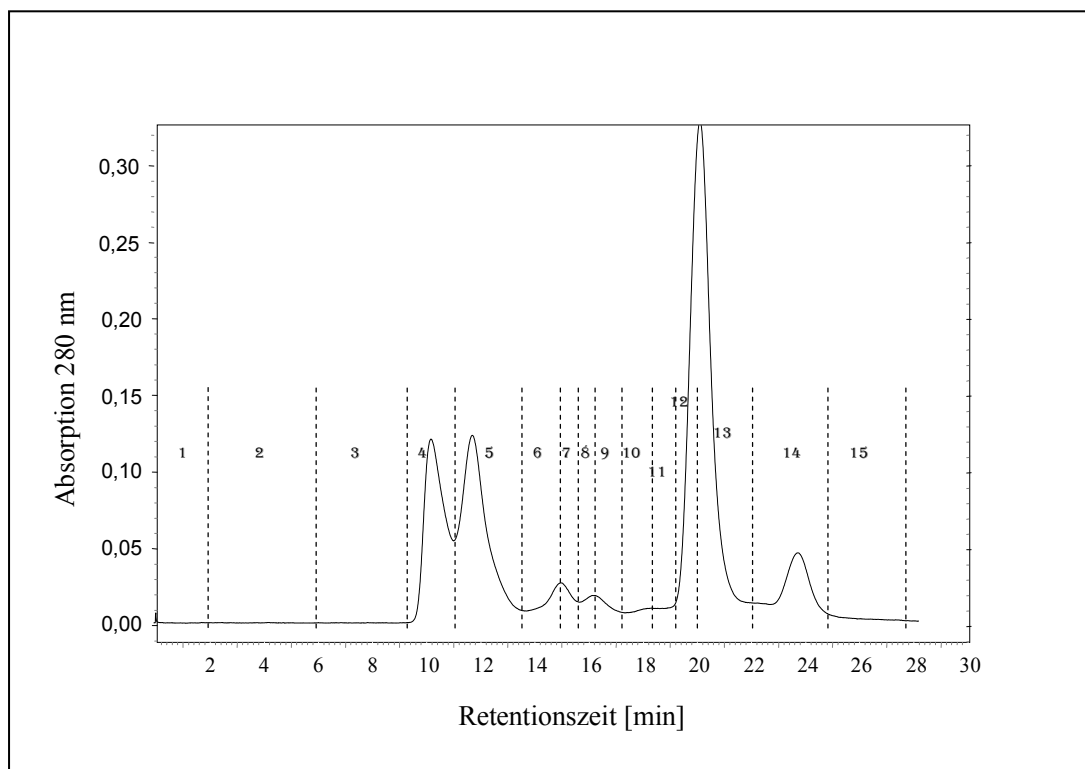


Abb. 16: Chromatogramm der Gelfiltrations-HPLC-Auftrennung von komplettem Schlangengift. Die Ziffern im Schaubild geben die gesammelten Fraktionen an.

Nachdem die in Eppendorfgläsern gesammelten Fraktionen über Nacht in einem Vakuumkonzentrator (*Speedvac*) zur Trockne eingedunstet worden waren, wurde die trypanozide Aktivität der jeweiligen Probe in Blutformtrypanosomenkultur gemessen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die erhaltenen Werte miteinander verglichen. Abb. 17 zeigt die Verteilung der relativen antitrypanosomalen Aktivität nach einer Inkubationsdauer von 17 h. Die Darstellung stellt Fraktion 10 als diejenige mit der höchsten Aktivität heraus.

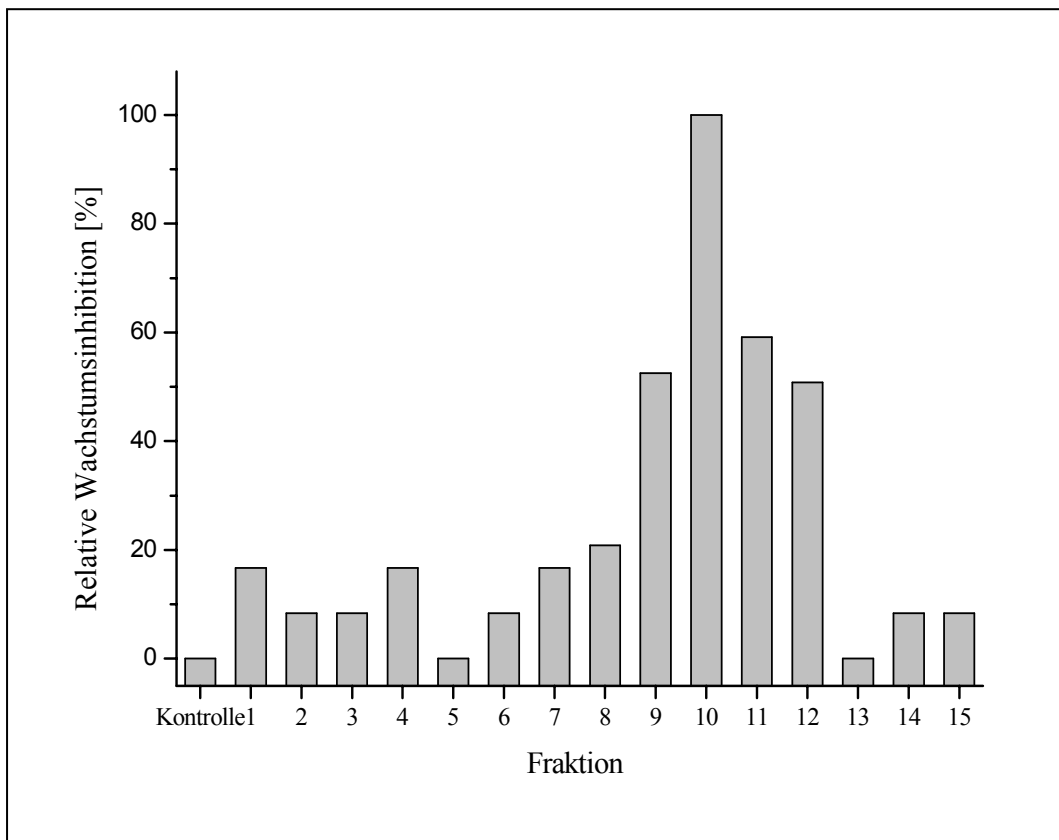


Abb. 17: Relative trypanozide Aktivität der einzelnen Fraktionen aus der Gelfiltrations-HPLC

II.2. Massenspektrometrische Untersuchung der Gelfiltrationsfraktionen

Bei der Analyse der antitrypanosomalen Aktivität wurde jeweils ein Fünftel der Fraktion für die massenspektrometrische Untersuchung zurückbehalten. Diverse

Vorarbeiten hatten die Vermutung nahe gelegt, dass entweder eine Phospholipase A₂ oder ein bisher unbekanntes Peptid mit signifikanter Homologie zu dem Disintegrin Eristocophin I maßgeblich an der Trypanozidität beteiligt ist [Patrick Merkel, 2003, Diplomarbeit]. Um diese These zu überprüfen, wurden auch die den beiden vereinten aktivsten Fraktionen 10 und 11 vorangehenden Peaks hinsichtlich ihrer molekularen Zusammensetzung untersucht, da im Vergleich zu den besagten Vorarbeiten eine feinere Auftrennung erreicht wurde. Für die Analyse wurde die jeweilige Probe mittels einer *on-line* μ LC-MS-Methode zunächst nach dem Prinzip der *Reversed Phase* (RP) HPLC weiter aufgetrennt und das Eluat direkt ionisiert. In der angeschlossenen Ionenfalle wurde, gegebenenfalls unter Fragmentierung, das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z -Wert) der jeweiligen Ionen gemessen. In Abb. 18 erkennt man das *on-line* RP-Chromatogramm der Fraktionen 6 und 7. Das Hauptsignal, markiert in Teilabbildung (A), wurde massenspektrometrisch analysiert. Die detektierten m/z -Werte (Abb. 18 (B)) entsprechen den Ladungszuständen +10, +11 bzw. +12 in der ersten massenspektrometrischen Dimension (*precursor ions*, nicht fragmentiert). Nachdem der m/z -Wert den Quotienten von Masse durch Ladung darstellt, ließ sich durch Berechnung auf die Einfachladung ein Molekulargewicht von 13,5 kDa bestimmen. Die Identifikation per Ansequenzierung (Edman-Abbau) zeigte, dass es sich bei diesem Protein um eine Phospholipase A₂ handelte. Das mit Abstand signifikanteste Signal aus den Gelfiltrationsfraktionen 8 und 9, deren Chromatogramm in Abb. 19 (A) gezeigt ist, wurde nach den gleichen Methoden untersucht und als ein Peptid mit hoher Homologie zu Eristocophin I identifiziert (s.o.). Die trypanozide Hauptaktivität war also offensichtlich mit einer anderen Komponente assoziiert als mit den beiden untersuchten Molekülen, zumal keines der beiden in Fraktion 10/11 gefunden werden konnte. Letztere wies bei der chromatographischen Untersuchung einen komplexeren Charakter auf, weshalb die Trennung per RP-HPLC in diesem Fall *off-line* durchgeführt wurde, um die Aktivität stärker eingrenzen zu können.

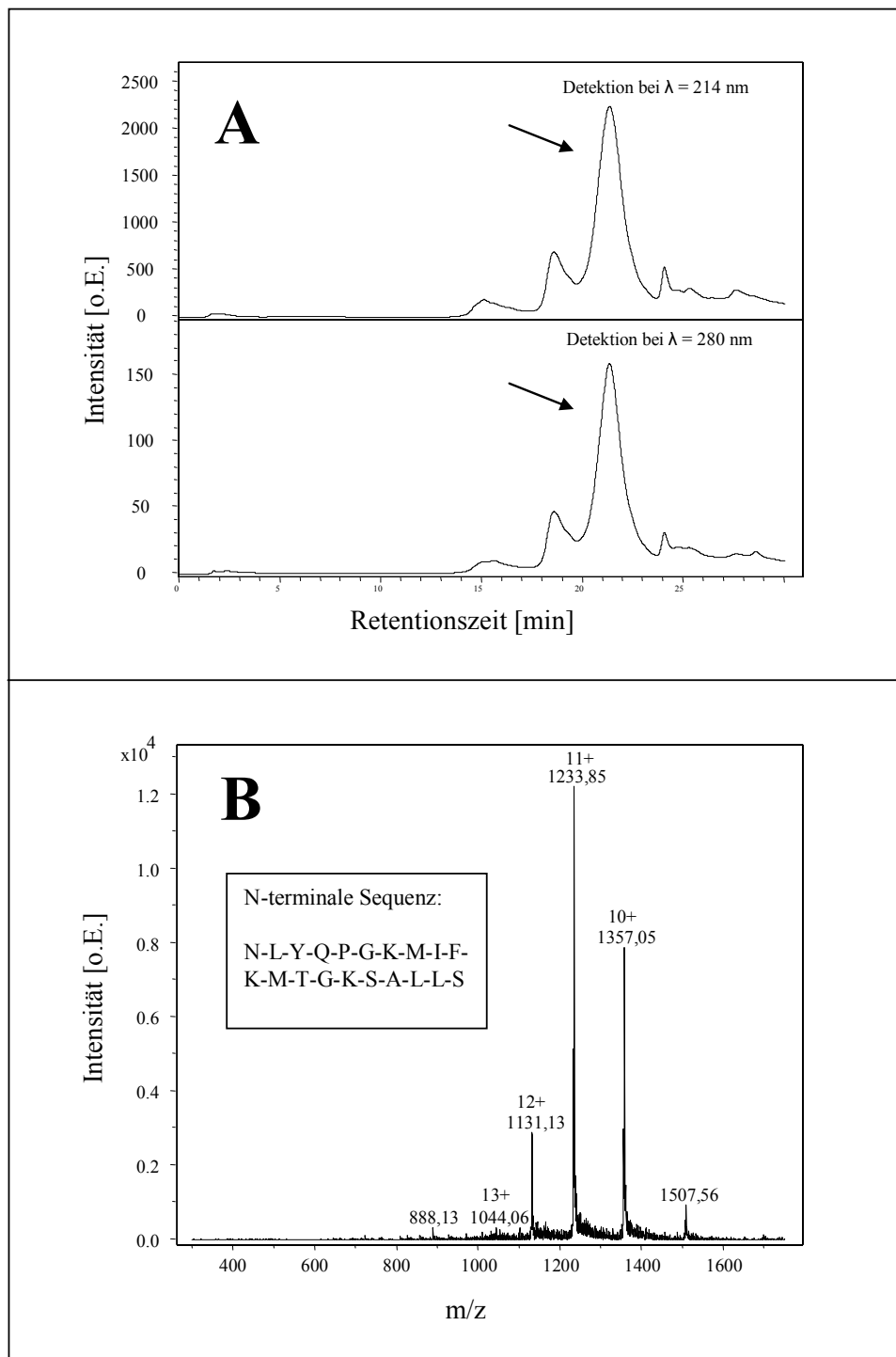


Abb. 18: On-line LC-MS-Analyse der Gelfiltrations-Fractionen 6 und 7. A: Chromatogramm der on-line LC, detektiert bei $\lambda = 214$ (oben) bzw. 280 nm (unten). B: Massenspektrometrische Analyse des markierten Hauptpeaks. Die Daten zusammen mit der N-terminalen Ansequenzierung per Edman-Abbau führten zur Identifizierung einer Phospholipase A_2 .

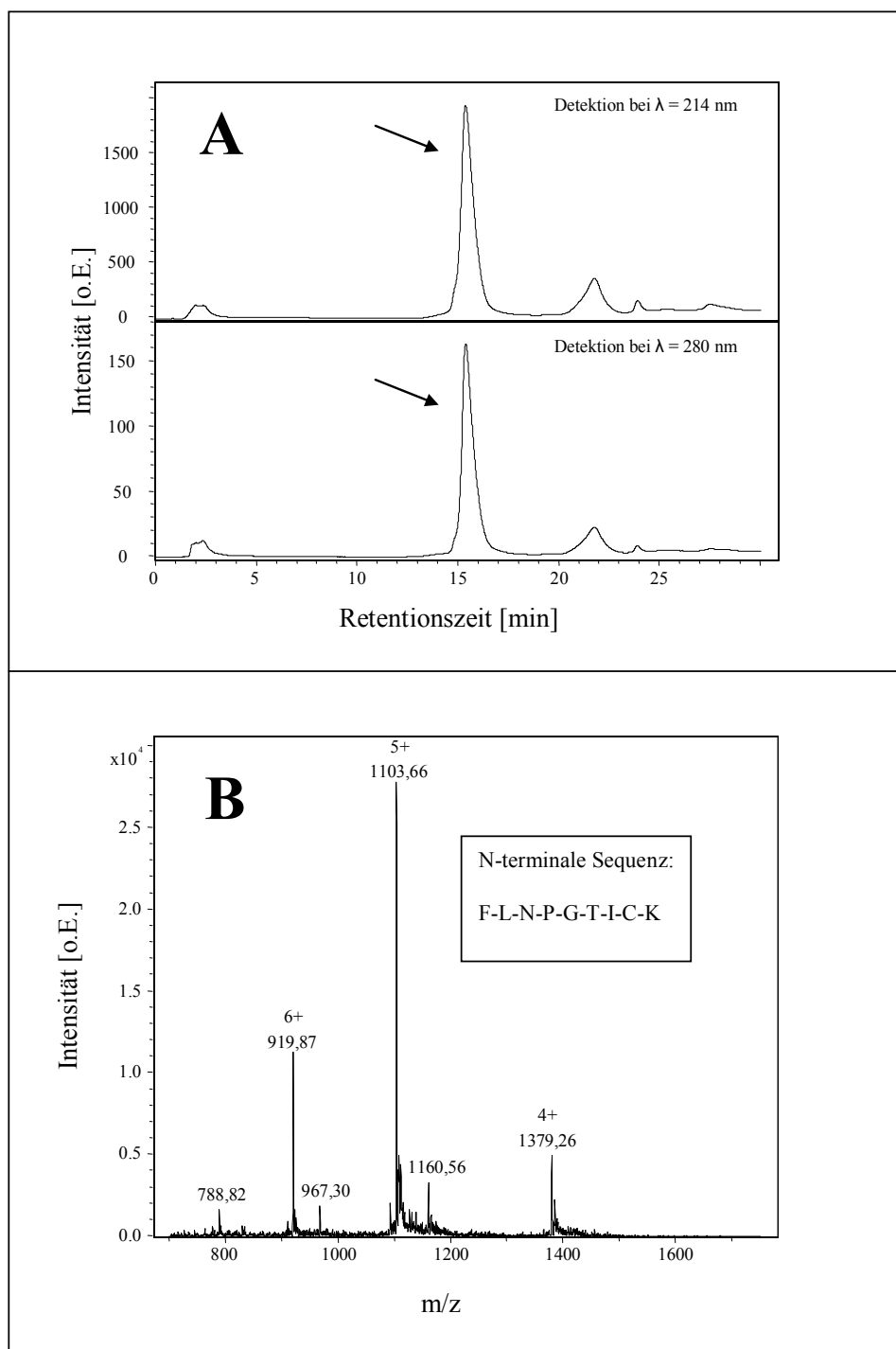


Abb. 19: On-line LC-MS-Analyse der Gelfiltrations-Fractionen 8 und 9. A: Chromatogramm der on-line LC, detektiert bei $\lambda = 214$ (oben) bzw. 280 nm (unten). B: Massenspektrometrische Analyse des markierten Hauptpeaks. Die Daten zusammen mit dem durchgeführten Edman-Abbau zeigten hohe Homologie des untersuchten Peptids mit dem Disintegrin Eristocophin I.

II.3. Auftrennung der aktivsten Fraktion per RP-HPLC

Die Fraktionen 10 und 11 aus der Gelfiltration mit der stärksten antitrypanosomalen Wirkung wurden auf Grund ihres chromatographischen Musters wie die zuvor genannten Fraktionen vereinigt und entsprechend der Beschreibung im Methodenteil per RP-HPLC aufgetrennt. Die gewonnenen Fraktionen wurden nach Einengung bis zur Trockne in H₂O *bidest.* aufgenommen, um wiederum die trypanozide Aktivität zu bestimmen. Abb. 20 zeigt das Chromatogramm aus der entsprechenden Auftrennung, detektiert wurde bei $\lambda = 214$ nm. Ein Balkendiagramm bezüglich der gemessenen Trypanozidität ist in diesem Fall nicht erforderlich, da diese ausschließlich im Injektionspeak zu finden war. Dies bedeutete, dass die relevante Komponente auf Grund ihres offenbar zu hydrophilen Charakters von der RP-Säule nicht retardiert werden konnte.

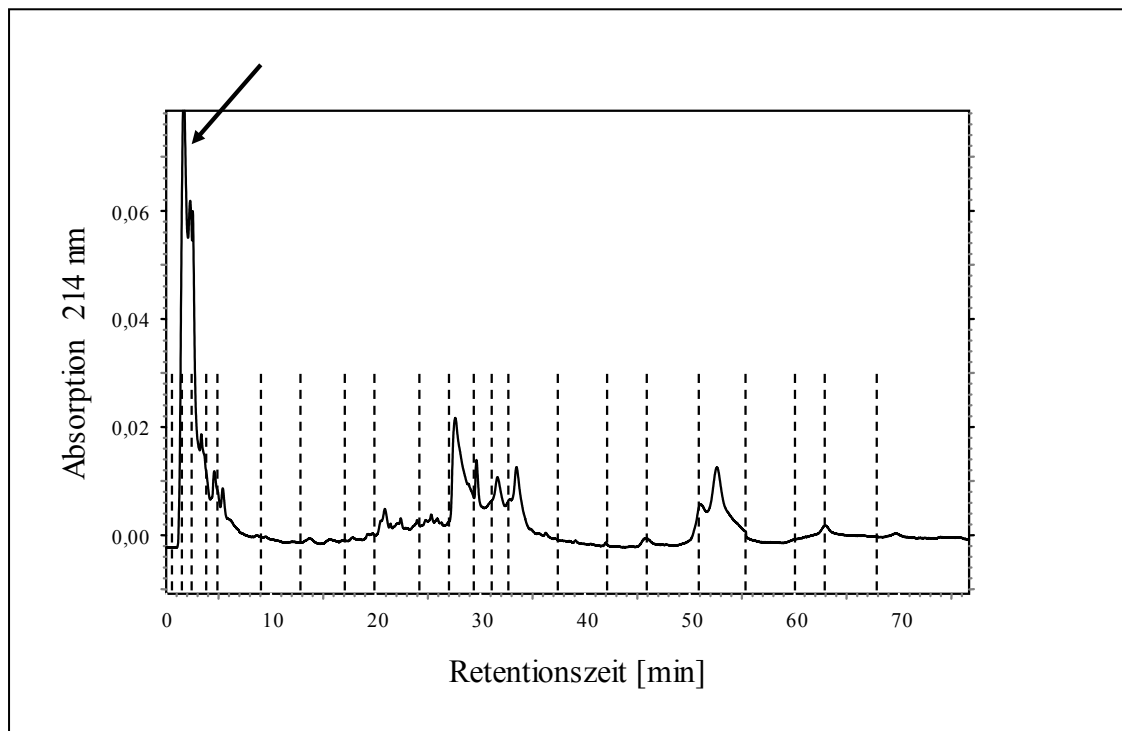


Abb. 20: Chromatogramm der RP-HPLC-Auftrennung der Fraktion 10/11 aus der initialen Gelfiltrationsauftrennung. Die gestrichelten Linien markieren die Grenzen zwischen den gesammelten Fraktionen, der Pfeil deutet auf den Injektionspeak, der die volle trypanozide Aktivität enthielt.

II.4. Massenspektrometrische Untersuchung der aktiven RP-HPLC-Fraktion

Der die trypanozide Aktivität beinhaltende Injektionspeak wurde nach den gleichen Methoden, die bei den Fraktionen aus der Gelfiltration angewendet wurden, massenspektrometrisch untersucht. In Abb. 21 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt, ein Chromatogramm wird in diesem Fall auf Grund der nicht vorhandenen Retardierung durch die chromatographische stationäre Phase nicht präsentiert. Ins Auge fällt hier ein starkes Signal bei $m/z = 202,68$, dessen Intensität die der anderen Ionen deutlich übertrifft. Anhand dieser Ergebnisse konnte das hauptaktive Molekül allerdings nicht identifiziert werden, da im Injektionspeak der Chromatographie außer dem genannten Signal noch mehrere weitere Molekülonen detektiert wurden, die auf Grund ihrer Hydrophilie nicht von der RP-Säule zurückgehalten wurden.

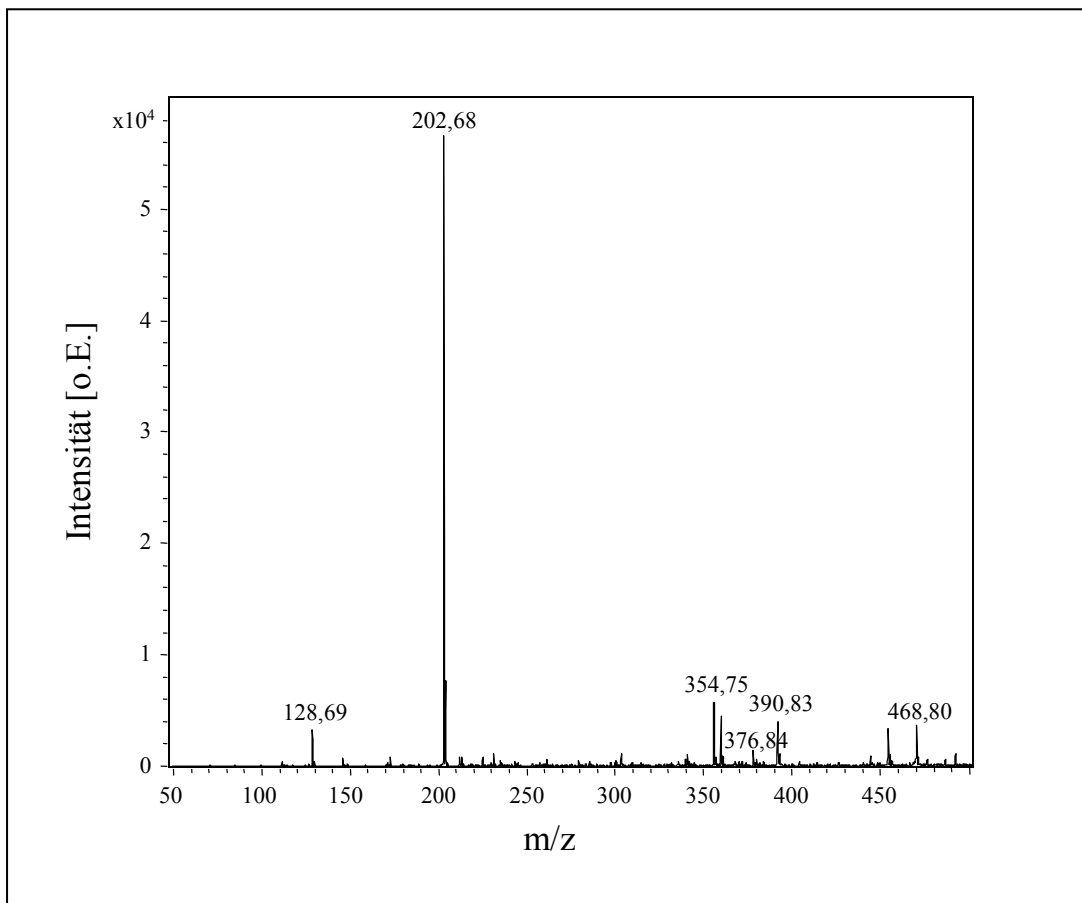


Abb. 21: Massenspektrometrische Analyse des Injektionspeaks aus der RP-HPLC-Auftrennung von Gelfiltrationsfraktion 10/11. Die Komponente mit dem m/z -Wert von 202,68 dominiert das Spektrogramm.

II.5. Auftrennung der aktivsten Fraktion per HILIC

Mit der klassischen RP-Methodik war eine Retention der Aktivität auch unter Veränderung der Bedingungen (Flussrate, Säulenmaterial) nicht möglich. Die hydrophilen Eigenschaften der gesuchten Komponente legten eine Veränderung der Isolierungsstrategie nahe, weshalb eine Umkehrung der Phase vorgenommen wurde. Mit Hilfe von hydrophiler Interaktion sollte das betreffende Molekül isoliert werden, damit eine zweifelsfreie Identifizierung erreicht werden konnte. Zu diesem Zwecke wurde nach einigen Vorversuchen unter mehreren Säulenmaterialien eine Aminophase ausgewählt. Da die Methode im Labor neu etabliert werden musste, wurden Testläufe mit einem Peptidgemisch aus Bradykinin, Angiotensin I und Angiotensin II durchgeführt. Wie Abb. 22 zeigt, konnte das Gemisch dieser drei bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr ähnlichen Peptide erfolgreich aufgetrennt werden.

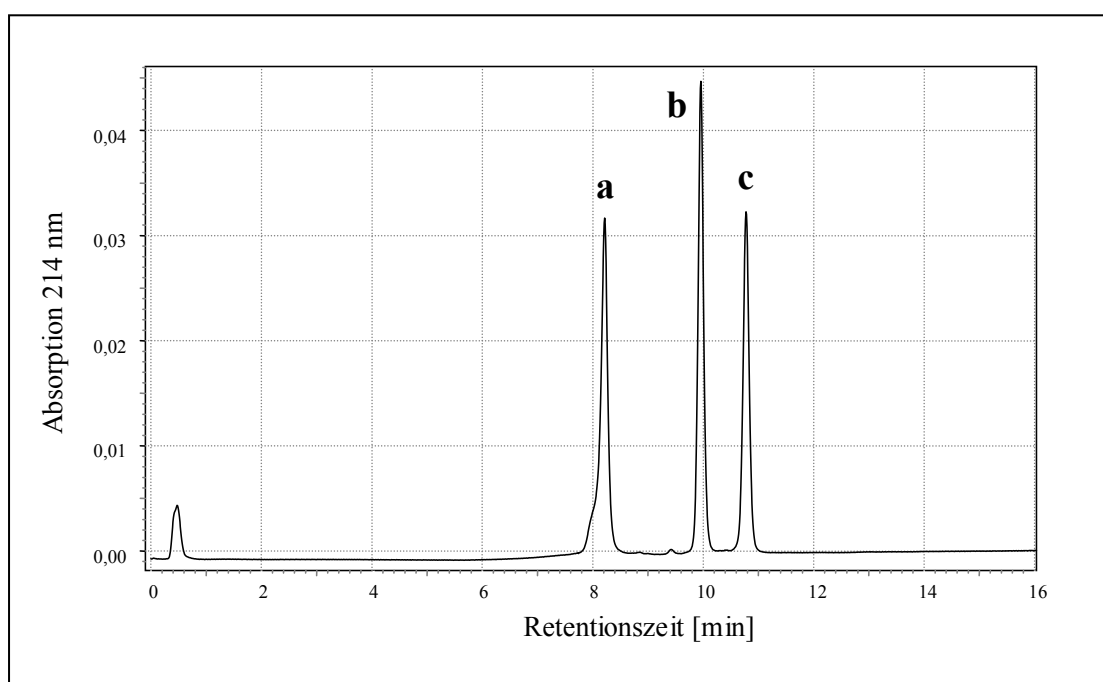


Abb. 22: Chromatogramm der HILIC-Auftrennung eines Peptidgemisches aus Angiotensin I (a), Angiotensin II (b) und Bradykinin (c)

Anschließend wurde Fraktion 10/11 aus der Gelfiltration wie im Methodenteil angegeben mit Hilfe eines Gradienten aufgetrennt, wobei für die UV-gestützte Detektion eine Wellenlänge von $\lambda = 214$ nm gewählt wurde. Abb. 23 zeigt ein entsprechendes Diagramm, bei dem zunächst auffällt, dass die Basislinie im Verlauf der Trennung stark ansteigt. Dies ist auf das Gradientenprogramm zurückzuführen, da der Anteil an Ameisensäure (Eluent B) kontinuierlich ansteigt. In diesem Zusammenhang ist die Skalierung der Ordinate zu beachten, die sehr niedrige Absorptionswerte anzeigt, weshalb die Zusammensetzung des Eluentengemisches in dieser Darstellung stark ins Gewicht fällt.

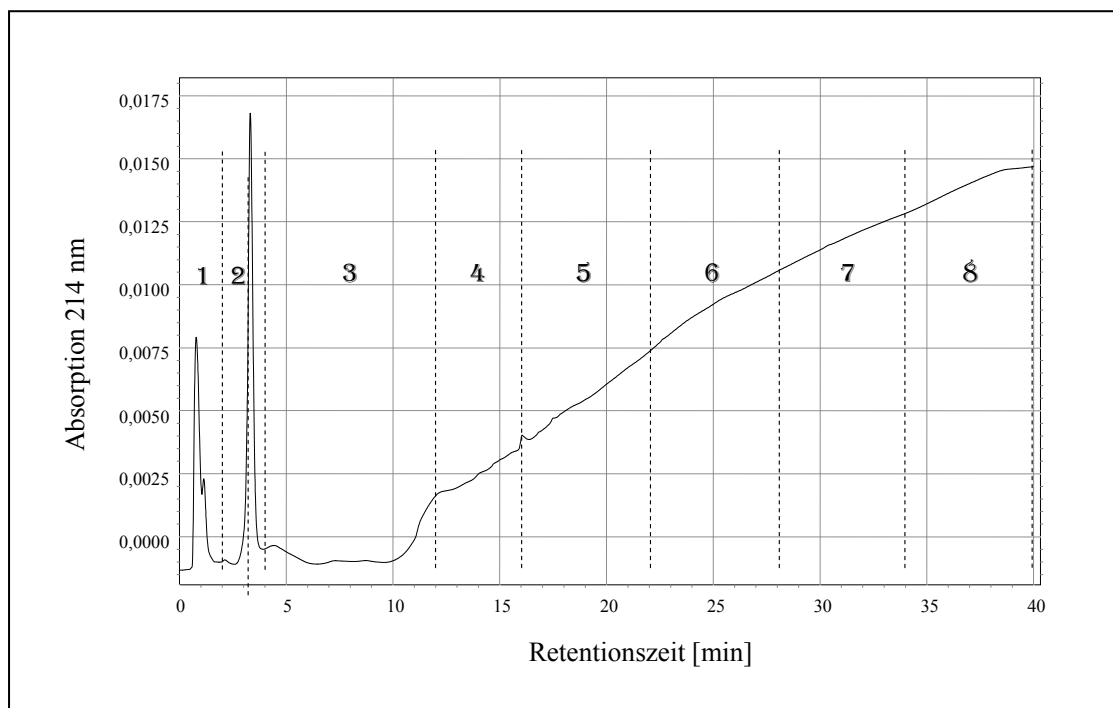


Abb. 23: Chromatogramm der HILIC-Auftrennung von Gelfiltrationsfraktion 10/11. Die Ziffern im Chromatogramm repräsentieren die gesammelten Fraktionen, deren Grenzen durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet werden.

Im Anschluss an die Auftrennung fand wiederum die Bestimmung der trypanoziden Aktivität nach der bereits beschriebenen Methode statt. Dabei zeigte das Ergebnis des Versuches, das in Abb. 24 dargestellt ist, eine klare Lokalisierung der antitrypanosomalen Hauptaktivität in Fraktion 5. Interessanterweise war bei letzterer

praktisch kein UV-Signal detektiert worden, so dass beispielsweise ein Peptid oder Protein als wirksame Komponente ausgeschlossen werden konnte.

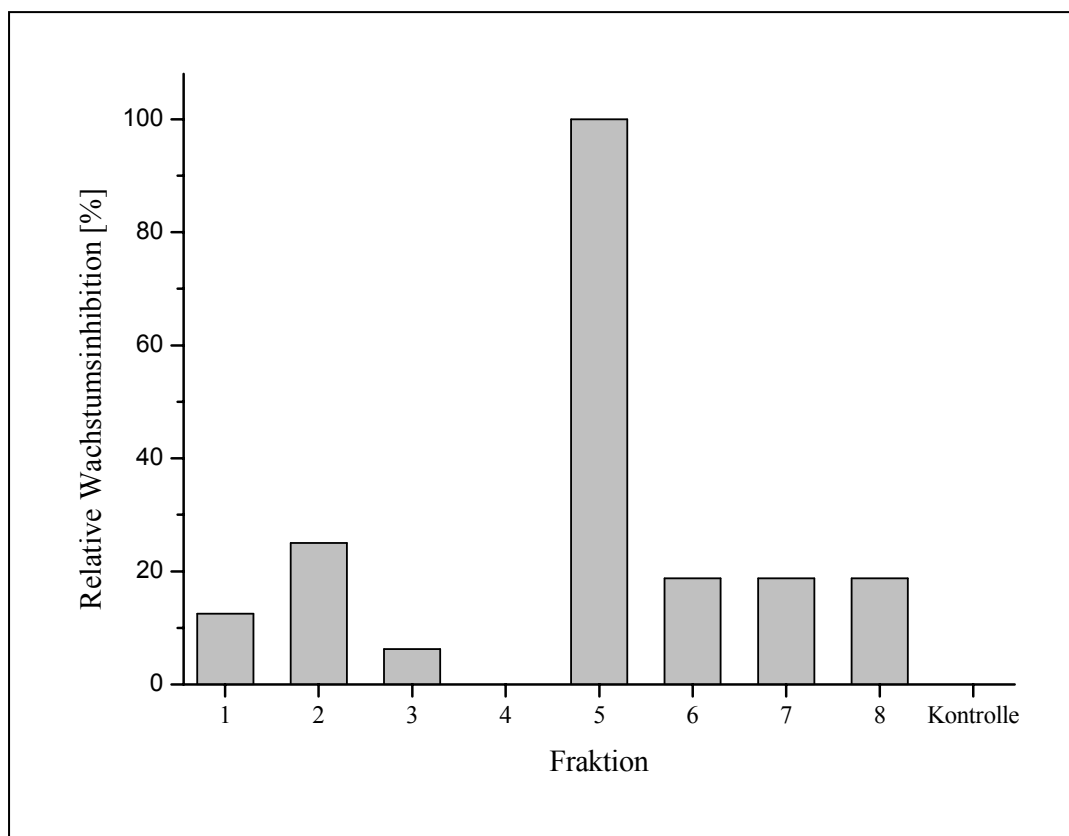


Abb. 24: Relative trypanozide Aktivität der HILIC-Fractionen von der Auftrennung von Gelfiltrationsfraktion 10/11

II.6. Massenspektrometrische Analyse der trypanoziden Hauptkomponente

Besagte Fraktion 5 der HILIC-Auftrennung wurde wie zuvor beschrieben massenspektrometrisch untersucht. Da auf Grund der vorangegangenen Analysen der RP-Fractionen mit niedermolekularen Analyten gerechnet worden war, wurde das Massenspektrometer mit Hilfe eines Gemisches aus Tryptophan und Threonin kalibriert, so dass im unteren m/z -Bereich zuverlässig gemessen werden konnte. In der besagten Fraktion ließ sich lediglich eine einzelne Komponente detektieren, bei der es sich um diejenige handelte, welche bereits bei der Analyse des RP-Injektionspeaks aufgefallen war und ein Molekulargewicht von 202 Da aufwies. Um indirekte

Informationen bezüglich der molekularen Struktur der Komponente zu erhalten, wurde mit Hilfe der Ionenfalle eine Fragmentierung (*low energy CID*) durchgeführt. Das Molekülion ist in Abb. 25 (A) zu sehen, die Fragmentionen nach MS/MS und MS³ in (B) bzw. (C).

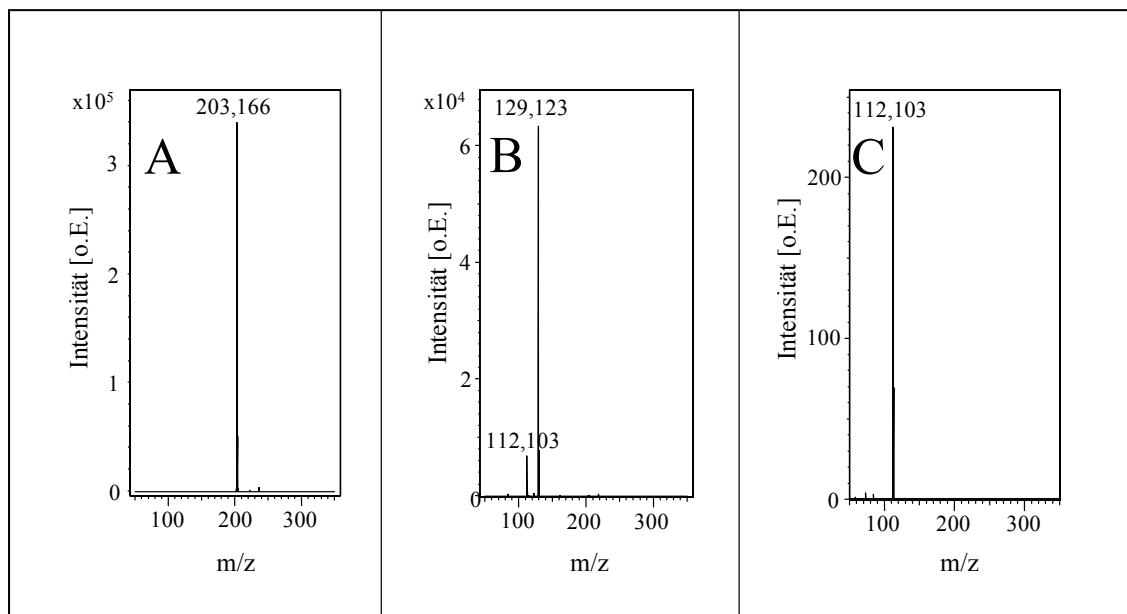


Abb. 25: Massenspektrometrische Analyse von Fraktion 5 aus der HILIC-Auftrennung von Gelfiltrationsfraktion 10/11. A: Molekülion; B: Fragmentionen bei MS/MS; C: Fragmentionen bei MS³

Bei der ersten Fragmentierung konnte man auf einen neutralen Massenverlust von 74 Da schließen, in der dritten massenspektrometrischen Dimension, für die die Komponente mit $m/z = 129,123$ isoliert wurde, auf einen weiteren Verlust von 17 Da. Eine Fragmentierung des entstehenden Ions mit $m/z = 112,103$ war mit der zur Verfügung stehenden Apparatur nicht möglich. Dieser Umstand gab einen Hinweis auf die Beschaffenheit des Moleküls, da mit Hilfe der angewandten Methode keine nichtaktivierten C-C-Bindungen gebrochen werden konnten. Ferner deutete der Neutralverlust von 17 Da auf eine Abspaltung von NH_3 hin. Die chemischen Eigenschaften der Komponente wie das Fehlen eines UV-Signals bei 214 oder 280 nm ließen eine nichtpeptidische und nichtaromatische Verbindung vermuten. Während der chromatographischen Auftrennung zeigte sich die hohe Hydrophilie der Komponente, die man anhand der hervorragenden Ionisierbarkeit im massenspektrometrischen Positivmodus als Basizität präzisieren konnte. Für eine Verbindung mit einem

Molekulargewicht von 202 Da und mit den oben genannten Eigenschaften bot sich ein lineares Polyamin an. Das Fragmentierungsmuster sprach in diesem Zusammenhang für die Substanz Spermin.

II.7. Verifizierung der Identifikation von Spermin

Um das Ergebnis dieser qualitativen Analyse sicherzustellen, wurde ein Vergleichsexperiment mit käuflich erworbenem Spermin durchgeführt. Dabei erfolgte die Fragmentierung des Moleküls mit den gleichen Einstellungen, die für die aktivste HILIC-Fraktion verwendet worden waren. Das Ergebnis zeigte ein Spektrogramm, das mit dem in Abb. 25 identisch war, so dass die Identifizierung von Spermin als gesichert angesehen werden konnte. Ein Fragmentierungsmuster, wie es bereits unter ähnlichen Bedingungen von einer anderen Gruppe erhalten und publiziert worden war [Ippolito *et al.*, 2005], ist in Abb. 26 dargestellt.

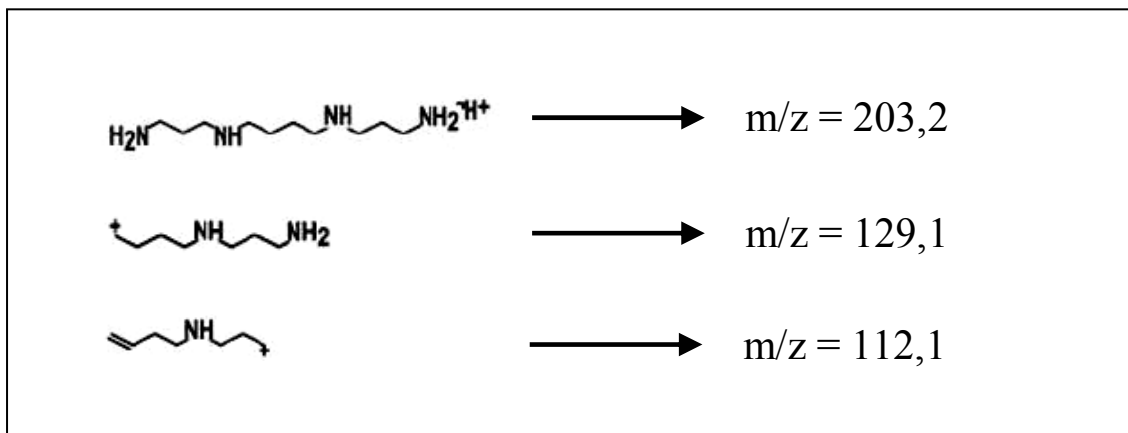


Abb. 26: Fragmentierungsmuster von Spermin, das als hauptaktive Komponente identifiziert wurde. Das Ion mit $m/z = 203,2$ entspricht dem Molekülion, d.h. einfach protoniertem Spermin.

II.8. Quantifizierung von Spermin in Schlangengift

Als Ergänzung zum analytischen Teil des Projekts sollte der Anteil von Spermin an der Trockenmasse von komplettem Schlangengift bestimmt werden. Dazu wurde per *on-line* HILIC eine Kalibrationskurve mit kommerziell erhältlichem Spermin erstellt. Definierte Stoffmengen an Spermin wurden in mobiler Phase gelöst und unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen chromatographiert. Es wurde jeweils das MS/MS-Signal bei $m/z = 129,1$ gemessen, um die Spezifität zu erhöhen. Über die Fläche der jeweils detektierten Peaks wurde mit Hilfe der Bruker Daltonics Software integriert, um die relative Stärke des Signals zu bestimmen. Die zur Trockne eingeeengte aktivste Gelfiltrationsfraktion wurde in mobiler Phase gelöst, 1:20 verdünnt und unter identischen Bedingungen je dreimal gemessen, die zugehörigen Chromatogramme sind in Abb. 27 dargestellt.

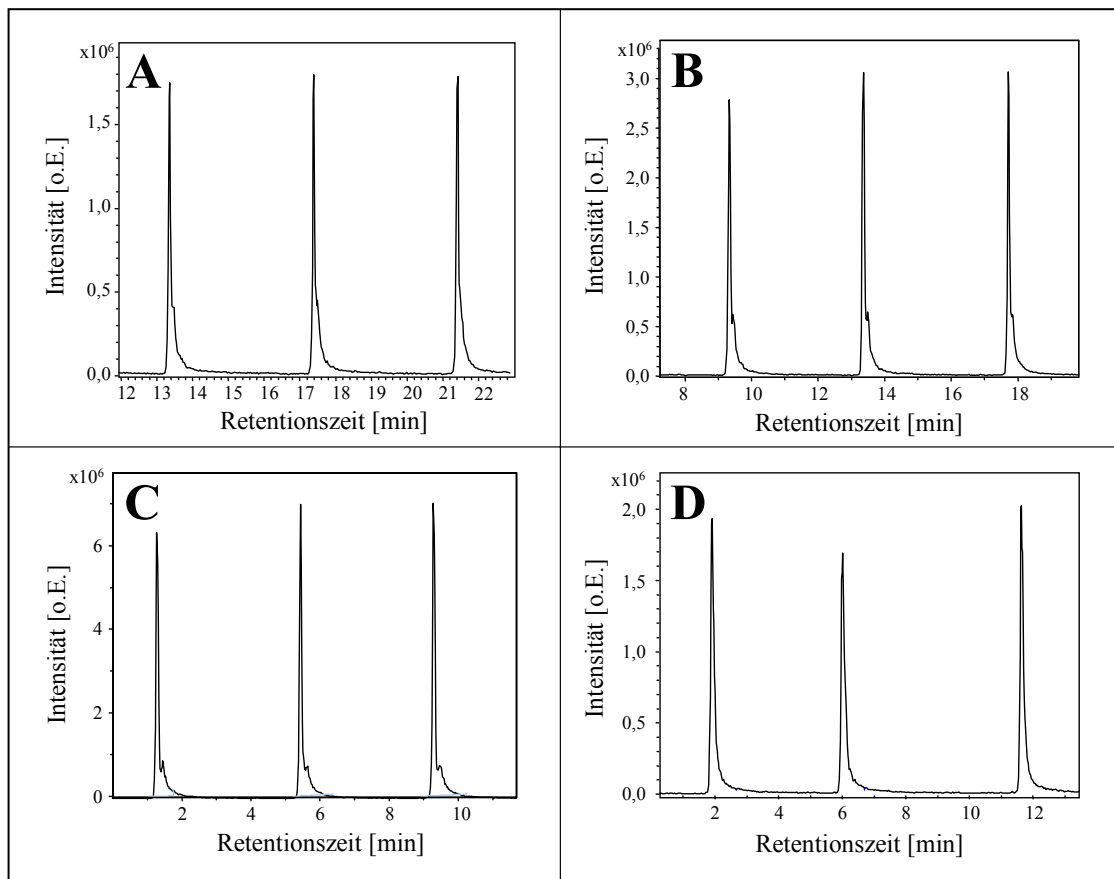


Abb. 27: Chromatogramme der *on-line* HILIC zur Quantifizierung von Spermin in Schlangengift. Detektiert wurde das MS/MS-Signal bei $m/z = 129,1$. A: 100 pmol Spermin; B: 250 pmol Spermin; C: 1 nmol Spermin; D: Fraktion 10/11

Mit den berechneten Flächen wurde eine lineare Regression durchgeführt ($R = 0,99859$), die resultierende Kalibrationsgerade ist in Abb. 28 aufgeführt.

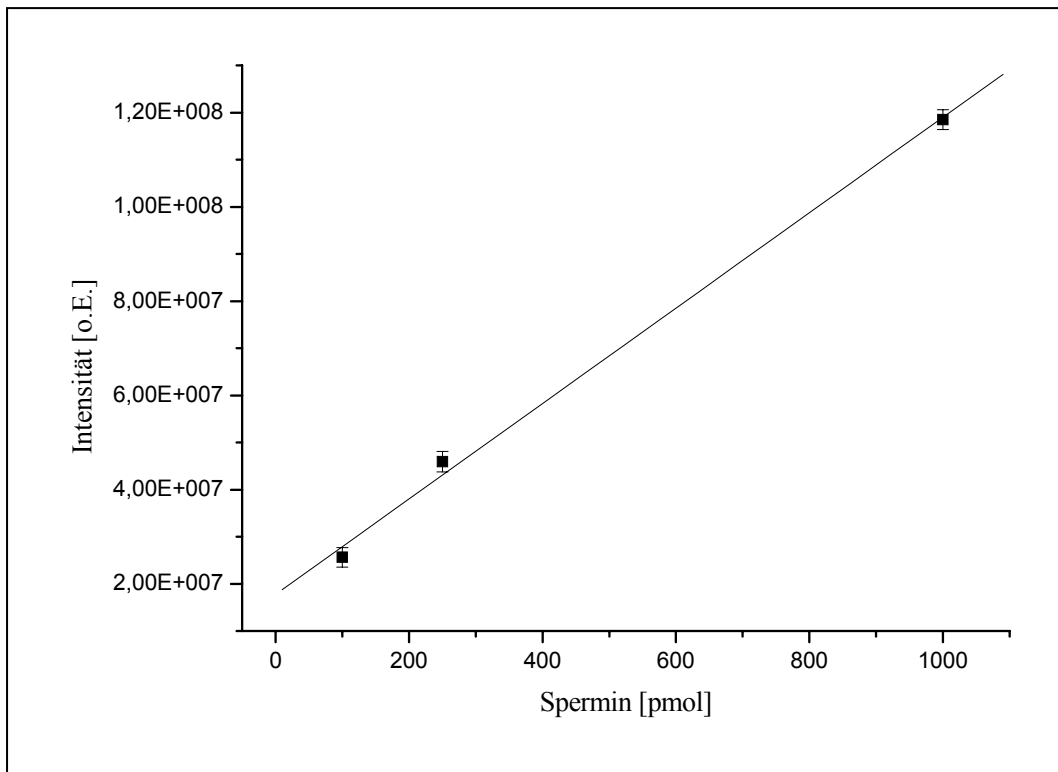


Abb. 28: Kalibrationsgerade für die quantitative Bestimmung von Spermin in der aktiven Gelfiltrationsfraktion des Schlangengiftes

Es ergab sich folgende Geradengleichung: $Y = 1,77513 \times 10^7 + 101210,5308 X$ mit $X =$ Stoffmenge des eingesetzten Spermins in pmol und $Y =$ Gesamtintensität des gemessenen Signals. Mit dem Mittelwert der berechneten Peakflächen für die Injektion der Fraktion des Schlangengifts ($Y = 29124545,3$) folgte:

$$X = (Y - 1,77513 \times 10^7) / 101210,5308$$

$$X = (29124545,3 - 1,77513 \times 10^7) / 101210,5308$$

$$X = 112,3721535 \text{ [pmol]}$$

$$X = 2,3 \times 10^{-8} \text{ g}$$

Es wurden 5 von insgesamt 100 μl injiziert, die Probe war zudem 1:20 verdünnt. Somit musste das Ergebnis noch mit $20 \times 20 = 400$ multipliziert werden:

$$X = 400 \times 2,3 \times 10^{-8} \text{ g}$$

$$X = 9,14 \text{ } \mu\text{g}$$

Der Anteil von Spermin an der Trockenmasse von komplettem Schlangengift betrug demnach etwa 0,9% [w/w] bei einer absoluten Stoffmenge von 45,17 nmol Spermin pro mg Gift.

Mit diesem Experiment war der rein analytische Teil der Arbeit abgeschlossen, der die erfolgreiche aktivitätsgeleitete Aufreinigung, Identifizierung und Quantifizierung der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente des Gifts beinhaltete.

III. Effekte von reinem Spermin auf *Trypanosoma brucei*

III.1. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration

Bei der Charakterisierung der Wirkungen der reinen hauptaktiven Komponente des Viperngiftes wurde zunächst analog vorgegangen wie bei komplettem Schlangengift. Bei diesen Untersuchungen wurde stets käuflich erworbenes Spermintetrahydrochlorid eingesetzt. Die Bestimmung der IC_{50} bei Blutformtrypanosomen erbrachte ein Ergebnis von $3,5 \mu\text{M}$, eine entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurve ist in Abb. 29 gezeigt.

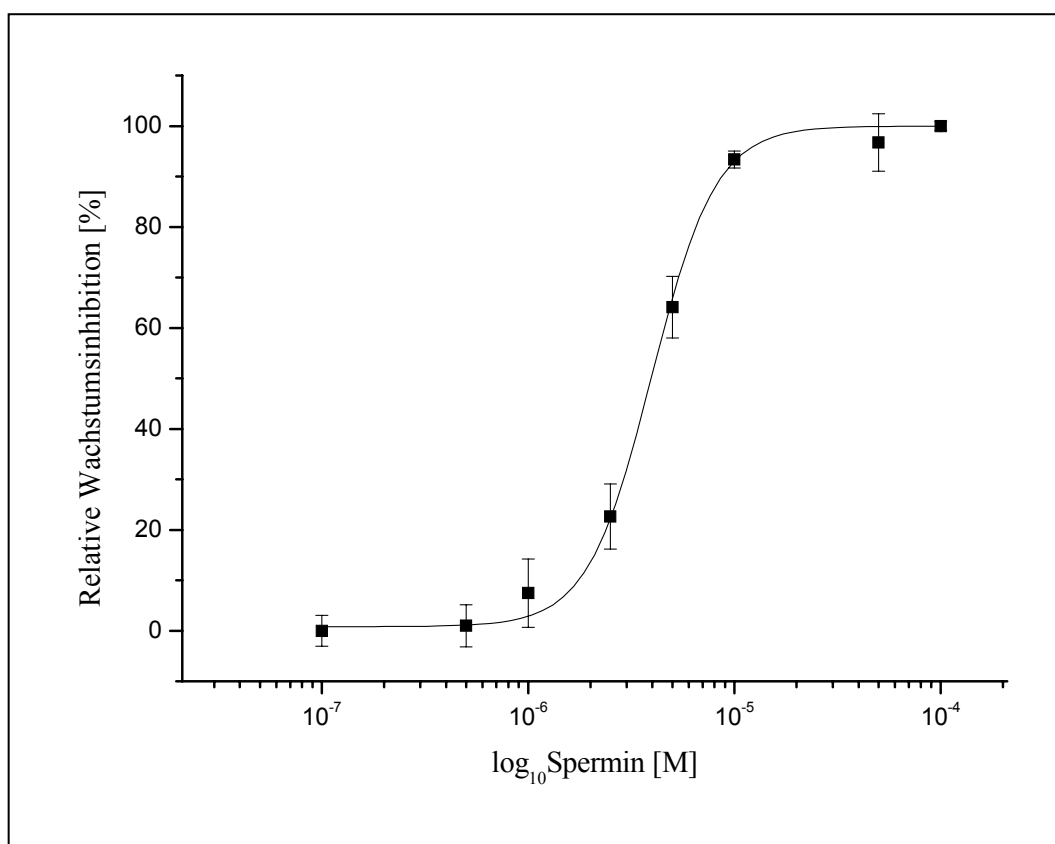


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Spermin bei Blutformtrypanosomen nach einer Inkubationsdauer von 48 h. Die IC_{50} wurde als $3,5 \mu\text{M}$ bestimmt.

III.2. Effekt von Spermin auf den Wachstumsverlauf von Trypanosomen

Wie für das mit komplettem Schlangengift beschriebene Experiment wurden Blutformtrypanosomen in der späten logarithmischen Phase auf $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ verdünnt und in Kulturflaschen mit frischem, sperminhaltigem Medium inkubiert. Die aus diesem Experiment resultierende Wachstumskurve ist in Abb. 30 zu sehen. Wie aus der Darstellung ersichtlich wird, hatte eine Konzentration von $2 \mu\text{M}$ Spermin noch einen wenig signifikanten Effekt auf das zelluläre Wachstum, während bei $5 \mu\text{M}$ eine deutliche Abflachung der Kurve erkennbar ist. Die Zellzahl erreichte hier maximal zwei Verdopplungen, während bei der Kontrolle mindestens vier zu verzeichnen waren. Bei einer Sperminkonzentration von $10 \mu\text{M}$ war bereits eine akute Toxizität festzustellen.

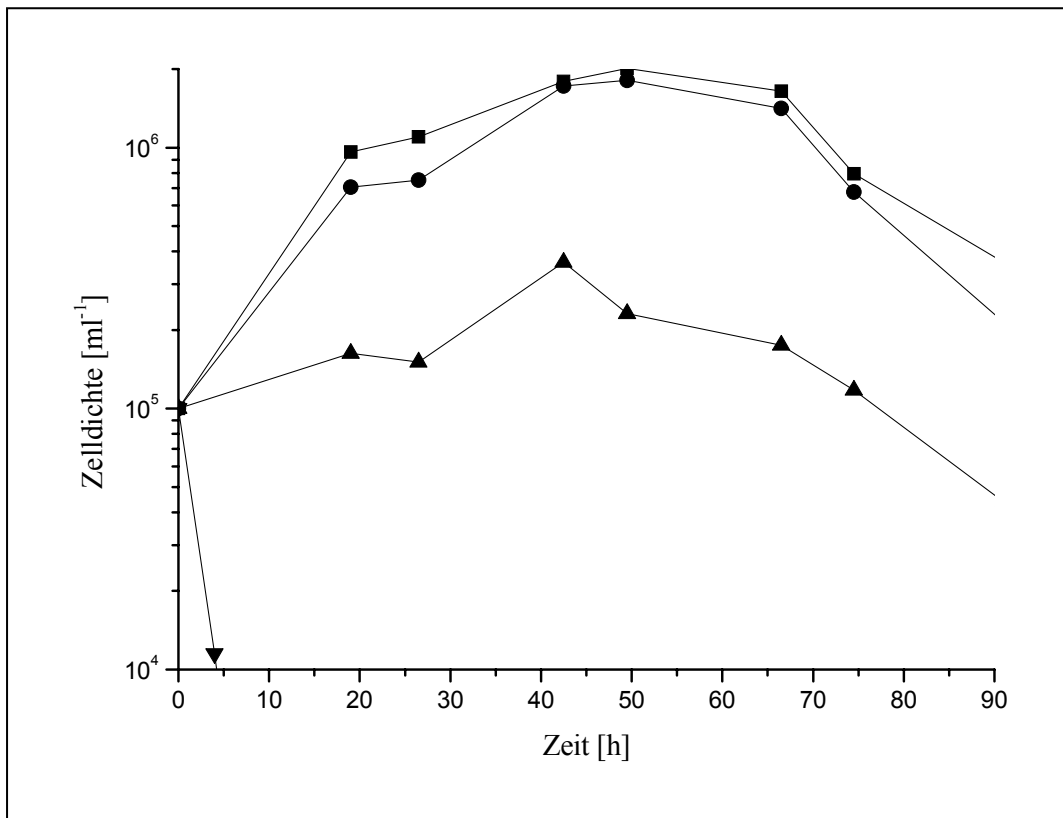


Abb. 30: Konzentrationsabhängige Effekte von Spermin auf den Wachstumsverlauf von Blutformtrypanosomen in axenischer Kultur. (■): Unbehandelte Kontrollzellen; (●): Spermin $2 \mu\text{M}$; (▲): Spermin $5 \mu\text{M}$; (▼): Spermin $10 \mu\text{M}$

III.3. Lichtmikroskopische Aufnahmen

Wie zuvor wurde eine Giemsa-Färbung von behandelten Blutformtrypanosomen angefertigt. Im Falle von Spermin wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz behandelt und die Bilder in Abb. 31 mit Hilfe eines Lichtmikroskops aufgenommen. Teilabbildung (A) zeigt die charakteristische Morphologie einer unbehandelten Kontrollzelle. Nach der Behandlung mit 2 μM Spermin (B) zeigten sich praktisch keine morphologischen Besonderheiten, was sich mit den Versuchen zur konzentrationsabhängigen trypanoziden Aktivität Spermins deckte. Bei der Applikation von 5 μM Spermin waren dagegen teilweise verdrillte (C) oder vereinzelt lysierte (D) Parasiten zu beobachten. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass bei beiden Konzentrationen die große Mehrzahl der untersuchten Trypanosomen morphologisch nur geringfügig von den unbehandelten Kontrollen zu unterscheiden war.

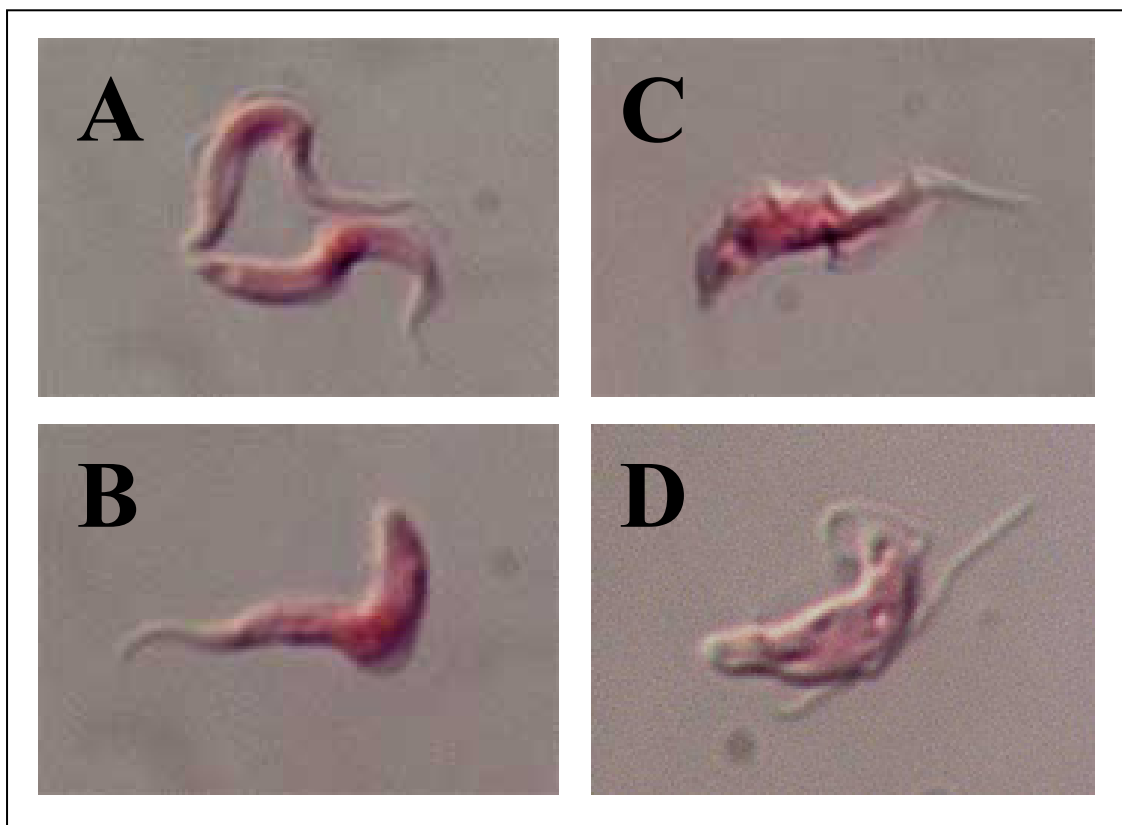


Abb. 31: Lichtmikroskopische Untersuchung von sperminbehandelten und giemsaefärbten Blutformtrypanosomen. A: Unbehandelte Kontrollzellen; B: Spermin 2 μM ; C & D: Spermin 5 μM

III.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

III.4.1. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Eine absolute Zellzahl von 1×10^7 Blutformtrypanosomen wurde in frischem Kulturmedium auf eine Dichte von 1×10^5 ml eingestellt. Die Behandlung erfolgte in diesem Fall mit $3,5 \mu\text{M}$, also der IC_{50} von Spermin. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h wurde kontrolliert, dass die Zelldichte gegenüber der Kontrolle etwa die Hälfte betrug, und die Parasiten wurden für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Eine unbehandelte Kontrolle als Vergleich ist in Abb. 32 (A) gezeigt. Die sperminbehandelten Trypanosomen zeigen eine beeinträchtigte Struktur, d.h. ähnlich wie bei Behandlung mit komplettem Schlangengift ist auch hier eine charakteristische Verdrillung des Zellkörpers zu sehen.

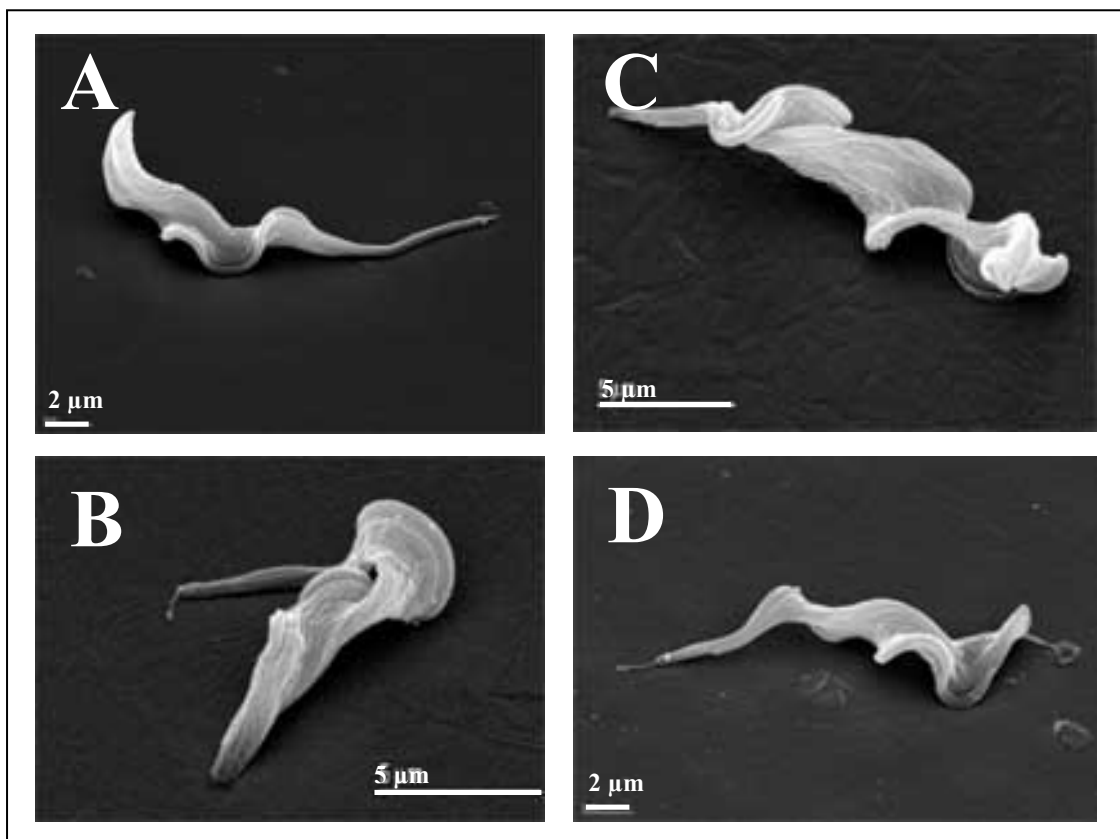


Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von sperminbehandelten Blutformtrypanosomen. A: Unbehandelte Kontrollzelle; B-D: Sperminbehandelte Zellen. Ähnlich wie bei Behandlung mit Schlangengift tritt eine Verdrillung des Zellkörpers ein.

III.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Um eventuelle ultrastrukturelle Veränderungen innerhalb der Zellen beurteilen zu können, wurde eine transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurden Blutformtrypanosomen für 48 h mit 3,5 μM Spermin inkubiert, bevor die Einbettung in Epoxidharz und die Präparation von Ultradünnschnitten erfolgte. In Abb. 33 werden einige morphologische Besonderheiten auf Grund der Sperminbehandlung ersichtlich. Während (A) eine unbehandelte Kontrollzelle mit den gewöhnlichen Organellstrukturen zeigt, sind in (B-F) zum Teil ähnliche Beeinträchtigungen wie bei der Behandlung mit komplettem Schlangengift zu beobachten. In (B) ist zunächst ein extrem dilatiertes und fragmentiertes Mitochondrium zu sehen, während (C) und (D) *multivesicular bodies* bzw. Autophagosomen dokumentieren (siehe Pfeile). Auffällig in (E) ist das Auftreten extrazellulärer Vesikel, die sich zum Teil vom Flagellum abschnüren oder mit diesem fusionieren. Ein solches Vesikel ist auch in (F) abgebildet, wo es sich in unmittelbarer Nähe der Plasmamembranen zweier Trypanosomen befindet. Im direkten Vergleich mit den Bildern des Versuches mit komplettem Schlangengift ähneln sich die beobachteten Phänomene stark insbesondere im Hinblick auf autophagische Ereignisse und die beschriebenen extrazellulären Vesikel. Dagegen sind Störungen in der Struktur des tubulären Cytoskeletts lediglich bei Behandlung mit dem Rohextrakt, nicht aber bei Spermin beobachtet worden. Die elektronenmikroskopische Analyse ließ damit eindeutig auf eine autophagische Form des Zelltods oder zumindest eine Beteiligung von Autophagie schließen, was durch entsprechende Kontrollen verifiziert werden sollte.

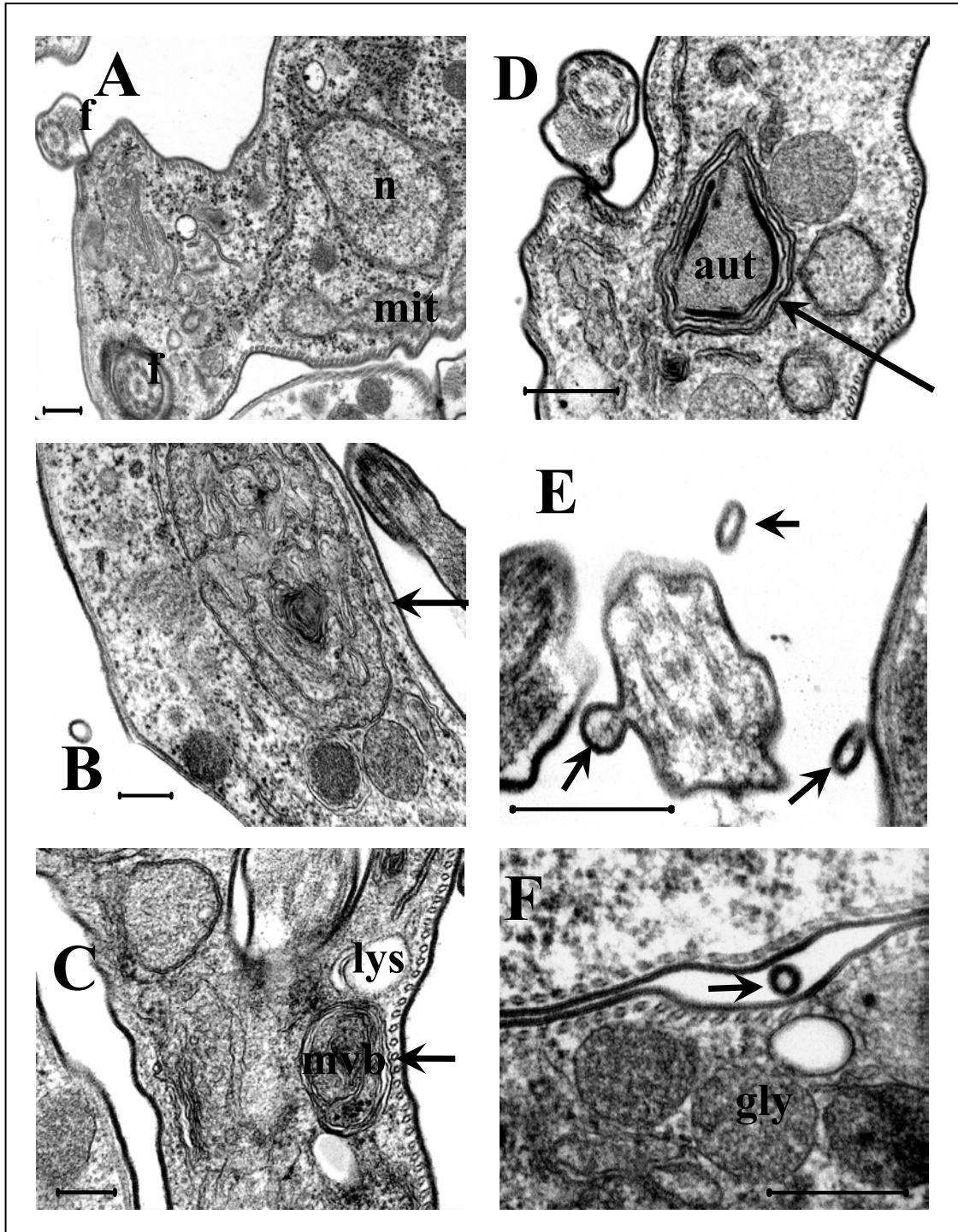


Abb. 33: TEM-Aufnahmen von sperminbehandelten Blutformtrypanosomen. A: Unbehandelte Kontrollzelle. B-F: Behandelt mit 3,5 μ M Spermin. Der jeweils am unteren Bildrand dargestellte Balken repräsentiert 0,5 μ m. aut: Autophagosom; f: Flagellum; gly: Glycosom; lys: Lysosom; mit: Mitochondrium; mvb: *multivesicular body*; n: Nucleus

III.4.3. TEM unter Einsatz von Autophagieinhibitoren

Der Einsatz verschiedener Autophagieinhibitoren hatte keinen Einfluss auf die sperminbedingte Wachstumsinhibition der Trypanosomen (nicht abgebildet). Dennoch sollte mittels ultrastruktureller Analyse per TEM untersucht werden, ob sich die Bildung der autophagischen Strukturen durch die Inhibitoren beeinflussen lässt. Dazu wurden die Zellen, bis auf eine Negativkontrolle, wie zuvor für 48 h mit Spermin inkubiert. Den sperminbehandelten Blutformtrypanosomen wurden dabei folgende Substanzen zugesetzt: Adenosin (50 μ M) + Nipent® (Desoxycoformycin, 100 μ M), 3-Methyladenin (100 μ M) bzw. Wortmannin (50 nM). Als Positivkontrolle wurde eine unbehandelte Kultur vor der Einbettung in Epoxidharz für 3 h in TDB kultiviert, da bei Trypanosomen in Abwesenheit von Serum bzw. Aminosäuren Autophagie induziert wird [Katherine Figarella, 2006, Dissertation], was zuvor auch in höheren Eukaryonten beschrieben worden war [Munafo & Colombo, 2001]. Die unbehandelte Negativkontrolle ist in Abb. 34 (A) dargestellt, die beschriebene Positivkontrolle ist in 34 (B) zu sehen. Bei letzterer kann man sich über das gesamte Zellinnere erstreckende membranöse Strukturen erkennen, welche vermutlich auf Dilatationen des Kinetoplasten zurückzuführen sind. Ähnliche Strukturen sind auch in all denjenigen Zellen zu sehen, die nur mit Spermin (C) oder Spermin und Autophagieinhibitoren behandelt worden waren (D-F), teils auch mit Einschlüssen zellulären Materials in den mit großer Häufigkeit vorkommenden Vesikeln. Demnach konnte durch die Coinkubation sperminbehandelter Blutformtrypanosomen mit diversen, von höheren Eukaryonten bekannten, Inhibitoren der autophagische Phänotyp nicht supprimiert werden. Andererseits zeigte die Positivkontrolle in Abb. 34 (B), der „Hungerphänotyp“, identische ultrastrukturelle Veränderungen wie sperminbehandelte Zellen, so dass weiterhin von Autophagie ausgegangen werden konnte, zumal die eingesetzten Inhibitoren bislang nicht als wirksam bei Trypanosomatiden beschrieben worden waren.

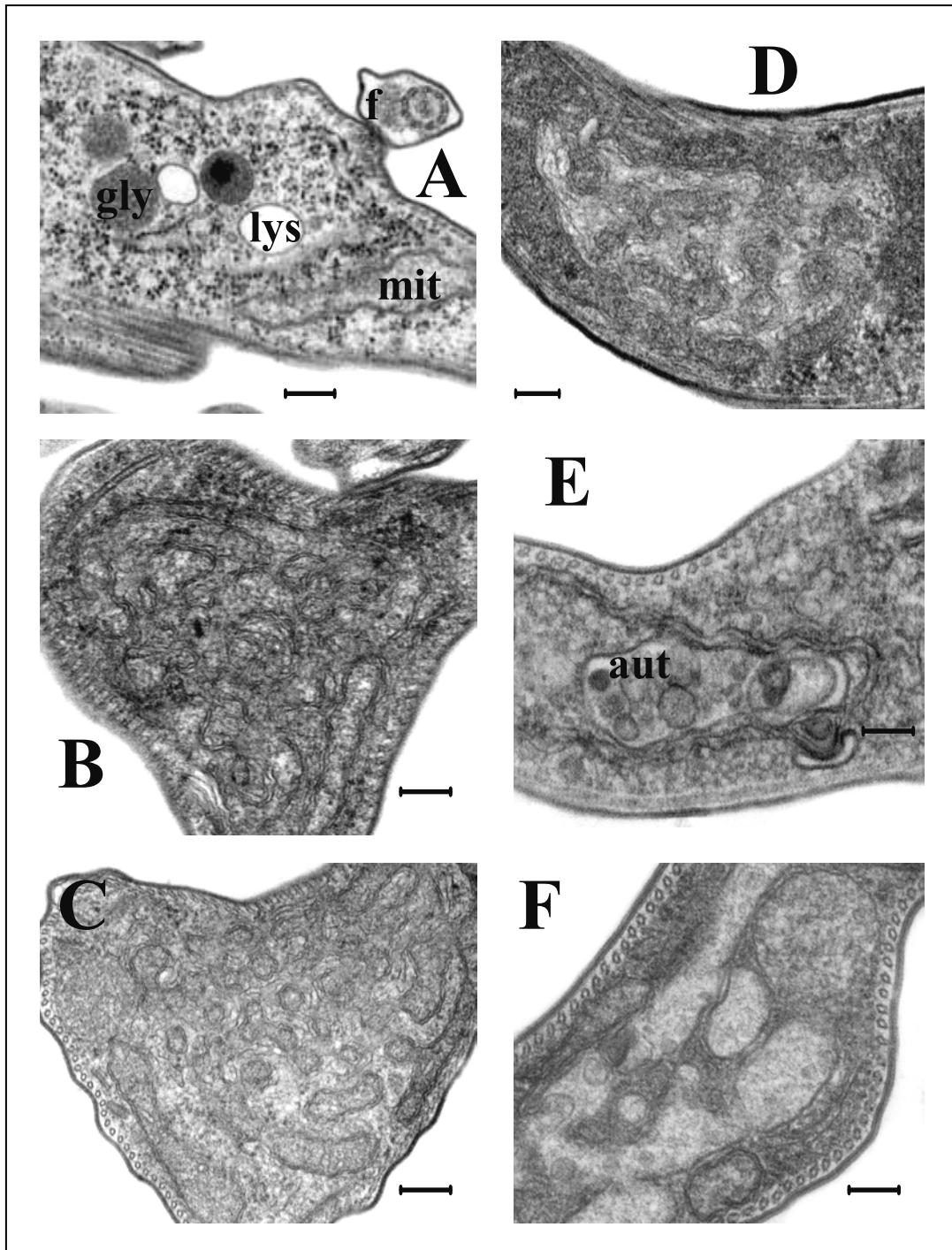


Abb. 34: TEM-Aufnahmen von sperminbehandelten Blutformtrypanosomen bei zusätzlicher Inkubation mit Autophagieinhibitoren. A: Unbehandelte Kontrollzelle; B: Positivkontrolle für Autophagie; C: Sperminbehandelte Zelle; D: Spermin + Wortmannin (50 nM); E: Spermin + Adenosin (50 µM) + Nipent® (Desoxycoformycin, 100 µM); F: Spermin + 3-Methyladenin (100 µM). Der jeweils am unteren Bildrand dargestellte Balken repräsentiert 0,5 µm. aut: Autophagosom; f: Flagellum; gly: Glycosom; lys: Lysosom; mit: Mitochondrium

III.5. Reversibilität der Effekte von Spermin auf Trypanosomen

Um einschätzen zu können, ob die beobachteten Effekte von Spermin auf die Parasiten eine dauerhafte Präsenz der Substanz erforderten, wurden Blutformtrypanosomen in frischem Medium in einer *24-well plate* auf eine Zelldichte von $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Anschließend wurde die Sperminkonzentration auf 1 mM gebracht, um den toxischen Konzentrationsbereich der Komponente zu nutzen. Nach den Zeitpunkten 5 min, 10 min, 20 min und 30 min wurde das Medium der entsprechenden Kulturen komplett gewechselt, um das Spermin auszuwaschen. Wie in Abb. 35 (A) deutlich wird, kann dies allerdings in keinem der Fälle die Toxizität von Spermin beeinflussen. Für das vorliegende Diagramm wurde die Zelldichte der Kulturen nach 16 h Inkubation durch Auszählen im Hämazytometer bestimmt. Außer in der unbehandelten Kontrolle waren zu diesem Zeitpunkt in keiner Probe Parasiten zu detektieren. Demzufolge war unter den gewählten Bedingungen eine irreversible Schädigung der Zellen bereits nach 5 min eingetreten. Wie allerdings aus der Darstellung in Abb. 35 (B) abzuleiten ist, trat der Zelltod nicht augenblicklich, sondern erst mehrere Stunden nach dem Auswaschen des Spermins ein. Dies sprach weiterhin für einen Prozess innerhalb der Parasiten, der durch kurzzeitige Spermingabe induziert, aber nach Auswaschen nicht mehr revertiert werden konnte.

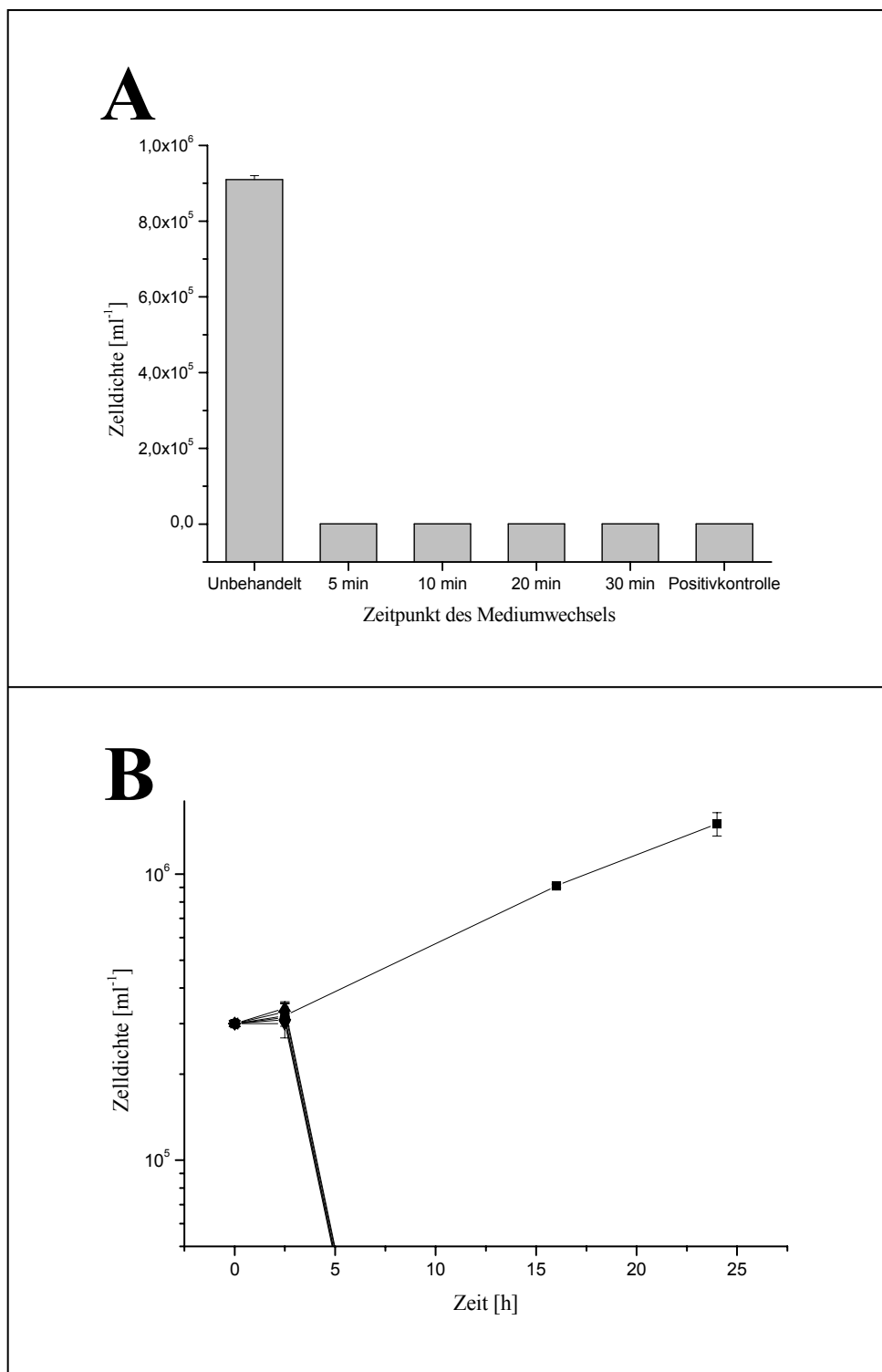


Abb 35: Toxizität von 1 mM Spermin bei Auswaschen der Substanz nach verschiedenen Zeitpunkten. A: Zelldichten der Kulturen nach 16 h Inkubation; B: Wachstumsverhalten über 24 h; (■): Unbehandelte Kontrollzellen; (●): Mediumwechsel nach 5 min; (▲): 10 min; (▼): 20 min; (◆): 30 min; (◄): Positivkontrolle ohne Medienwechsel

III.6. Temperaturabhängigkeit des Effektes von Spermin

Bei Trypanosomen kann eine eventuelle Temperaturabhängigkeit eines toxischen oder wachstumsinhibitorischen Effektes Aufschluss über den Aufnahmemechanismus erbringen, da die Endocytosevorgänge der Parasiten temperaturbedingt eingestellt werden können. Bei einer Temperatur von 12°C war zuvor beobachtet worden, dass zwar Substanzen durch die Flagellumtasche aufgenommen wurden, diese aber innerhalb der Zelle nicht an weiterverarbeitende Kompartimente transferiert wurden [Brickman *et al.*, 1995]. Für den Versuch mit Spermin wurden Blutformtrypanosomen auf eine Zelldichte von ca. $2,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Zellen wurden in Volumina von 200 μl in PCR-Gefäße aliquotiert, um die Heiz- bzw. Kühlfunktion der verwendeten *PCR cyclers* nutzen zu können. Diese wurden auf 12°C bzw. 37°C temperiert und die Zelldichten der betreffenden Kulturen nach verschiedenen Zeitpunkten durch Auszählen bestimmt. Anschließend wurde die Konzentration von Spermin mit Hilfe einer wässrigen Stammlösung auf 1 mM gebracht. Wie in Abb. 36 zu sehen ist, wirkte bei einer Inkubationstemperatur von 37°C Spermin nach einigen Stunden wie erwartet toxisch. Dagegen wurde zwar das Wachstum bei Kontrolle und sperminbehandelten Zellen bei 12°C im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C inhibiert, der toxische Effekt von Spermin wurde allerdings komplett aufgehoben. Dieser Umstand wies darauf hin, dass Spermin obligatorisch über Endocytose aufgenommen werden muss, so dass bei 12°C die aufgenommene Substanz nicht zu ihren Zielorten innerhalb der Zelle gelangte. Allerdings konnte anhand dieses Versuches nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der erniedrigten Temperatur auch andere zelluläre Prozesse beeinträchtigt wurden und zur Vermeidung der toxischen Effekte beitrugen.

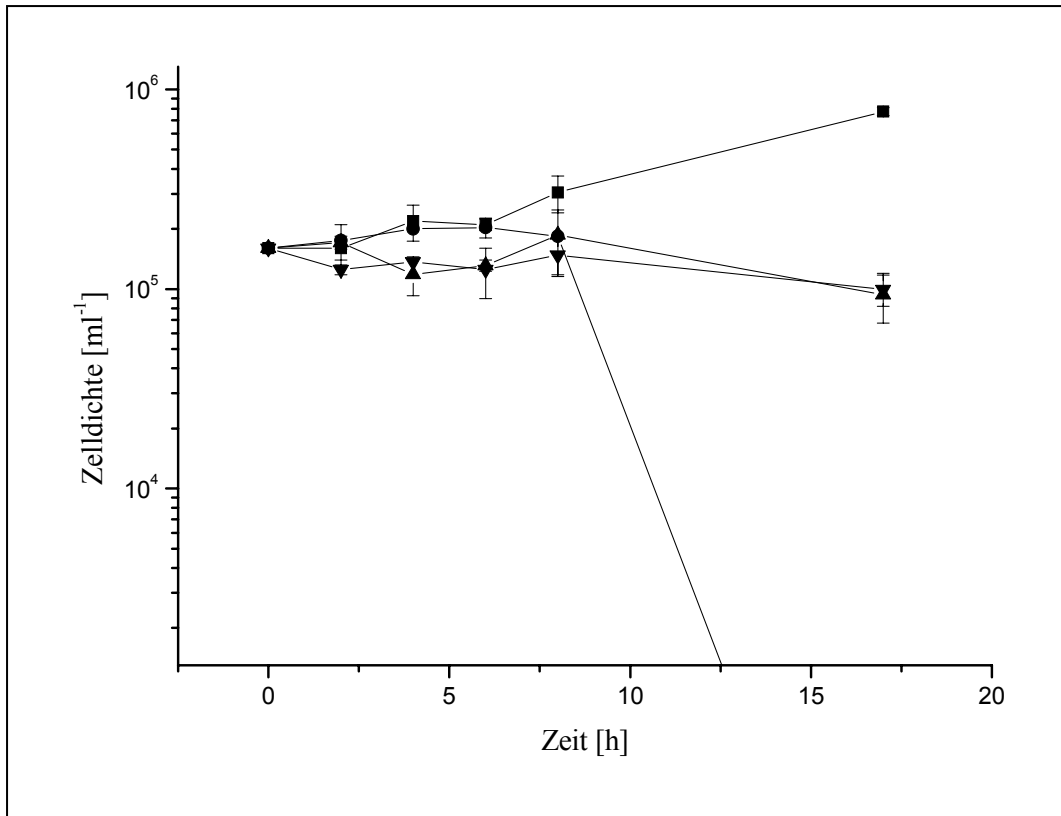


Abb. 36: Zelldichte von Blutformtrypanosomen während der Inkubation mit 1 mM Spermin bei verschiedenen Temperaturen. (■): Unbehandelte Kontrolle bei 37°C; (●): 1 mM Spermin bei 37°C; (▲): Unbehandelte Kontrolle bei 12°C; (▼): Spermin 1 mM bei 12°C

III.7. FACS-Analyse

III.7.1. Nekrosetest

Die Art des Zelltodes sollte weiter eingegrenzt werden, indem mit Hilfe der Substanz Propidiumjodid auf eventuell auftretende Nekrose getestet wurde. Bei genannter Verbindung handelt es sich um ein interkalierendes Agens, das sich in doppelsträngige DNA einlagert und auf Grund seiner fluoreszenten Eigenschaften detektiert werden kann. Da Propidiumjodid nicht membrangängig ist, wird es nur von Zellen aufgenommen, deren Plasmamembran geschädigt ist. Letzteres Phänomen kann mit Nekrose gleichgesetzt werden. Diese angefärbten nekrotischen Zellen können per

FACS-Analyse detektiert und quantifiziert werden. Für den entsprechenden Versuch wurden Blutformtrypanosomen bei einer initialen Zelldichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ mit $3,5 \mu\text{M}$ Spermin versetzt und für 48 h unter Standardbedingungen in Kulturflaschen inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 37 und 38 als Histogramme bzw. Balkendiagramm zusammengefasst. In Abb. 37 ist auf der Abszisse die Intensität der roten Fluoreszenz aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde die cytotoxische Substanz Digitonin ($6 \mu\text{M}$) eingesetzt, was zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl positiv gefärbter Zellen führte (C). Dagegen zeigten die sperminbehandelten Zellen keinen Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen, was durch die Darstellung in Abb. 38, in welcher der prozentuale Anteil nekrotischer Parasiten als Messgröße diente, bestätigt wurde. Insofern ließ sich bei Behandlung von Blutformtrypanosomen mit der halb-inhibitorischen Konzentration von Spermin keine Nekrose nachweisen.

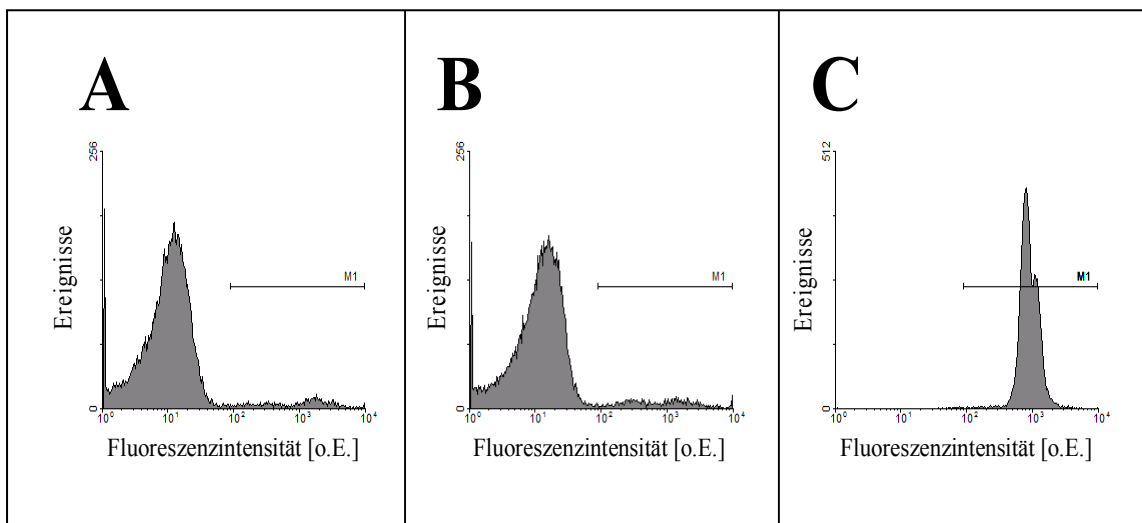


Abb. 37: FACS-Analyse von mit $3,5 \mu\text{M}$ Spermin für 48 h behandelten Trypanosomen nach Färbung mit Propidiumjodid. A: Unbehandelte Kontrollzellen; B: Spermin $3,5 \mu\text{M}$; C: Digitonin $6 \mu\text{M}$. Die Markierung M1 bezeichnet den Detektionsbereich nekrotischer Zellen.

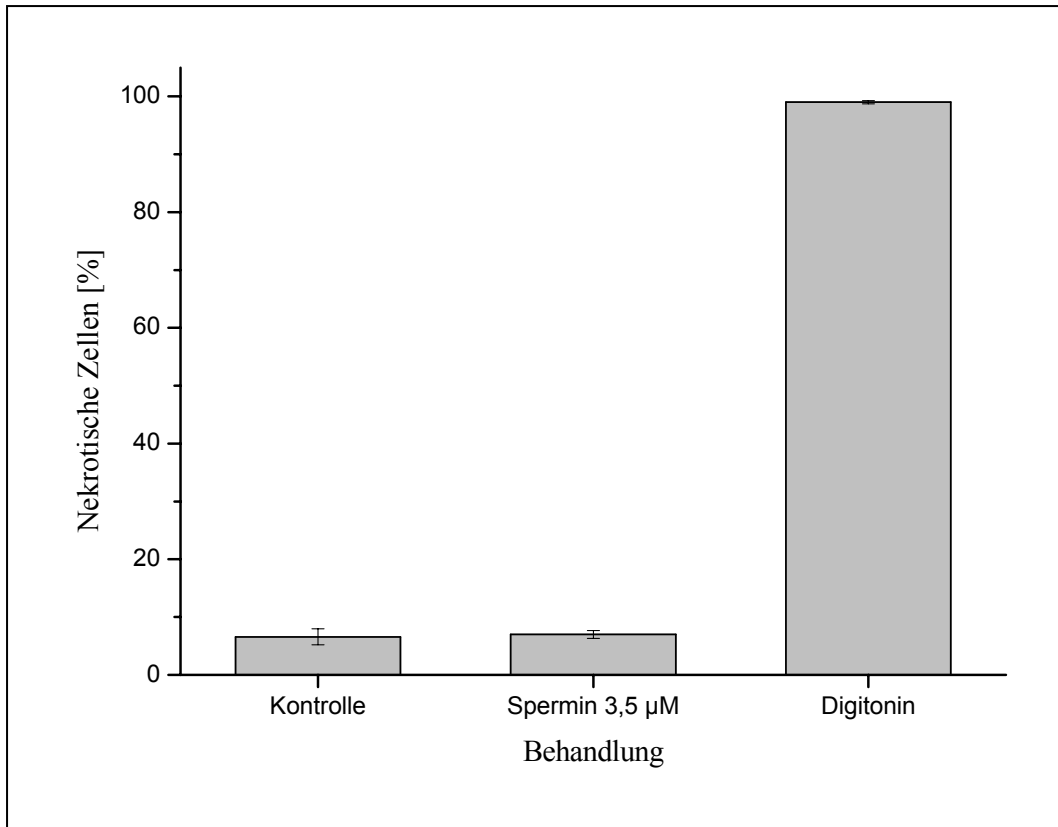


Abb. 38: FACS-Analyse von mit 3,5 µM Spermin für 48 h behandelten Trypanosomen nach Färbung mit Propidiumjodid: Prozentualer Anteil nekrotischer Zellen

III.7.2. Externalisierung von Phosphatidylserin

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden Polyamine in der Literatur mit Apoptose in Verbindung gebracht [Seiler & Raul, 2005]. Einen der gängigen Nachweise apoptotischer Vorgänge stellt der Test auf die Externalisierung von Phosphatidylserin dar. Dieses Membranphospholipid befindet sich in nichtapoptotischen Zellen praktisch ausschließlich in der inneren Schicht der Plasmamembran. Wird Apoptose induziert, tritt es auch in der äußeren Membranschicht auf, was mit Hilfe des Proteins Annexin V, welches spezifisch an Phosphatidylserin bindet, nachgewiesen werden kann. Die Detektion im Durchflusszytometer erfolgt schließlich über ein an Annexin V gekoppeltes Fluorophor, wodurch bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe bei *T. brucei*

Apoptose nachgewiesen worden war [Figarella *et al.*, 2006]. Die Blutformtrypanosomen wurden wie zuvor bei einer Anfangsdichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ für 48 h mit $3,5 \mu\text{M}$ Spermin inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation für die Annexinfärbung, wobei auch eine Färbung mit Propidiumjodid wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde. Dies sollte falsch positive Ergebnisse auf Grund einer Anfärbung von Phosphatidylserin innerhalb der Zelle vermeiden, die zustande kommen, wenn Annexin durch eine nicht intakte Membran ins Cytosol gelangt. Bei sperminbehandelten Zellen konnte keine Anfärbung detektiert werden, während bei Kontrollzellen, die mit $6 \mu\text{M}$ Digitonin behandelt worden waren, aus den genannten Gründen gebundenes Annexin nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 39 und 40 gezeigt. Die erste der beiden Darstellungen präsentiert *dot plots*, wobei jeweils Propidiumjodid- gegen Annexinfluoreszenz aufgetragen wurde. Bei den Kontrollzellen in Abb. 39 (A) lässt sich eine Population erkennen, die keine der beiden Fluoreszenzen aufweist. Ebenso wenig war eine der Färbungen bei sperminbehandelten Parasiten zu detektieren (B), während die mit Digitonin inkubierten Kontrollzellen bezüglich beider Färbungen positiv gemessen wurden (C). Die Darstellung des prozentualen Anteils annexingefärbter Zellen in Abb. 40 bestätigte diese Aussage. Anhand dieser Resultate ließen sich kein Hinweise auf Apoptose ableiten.

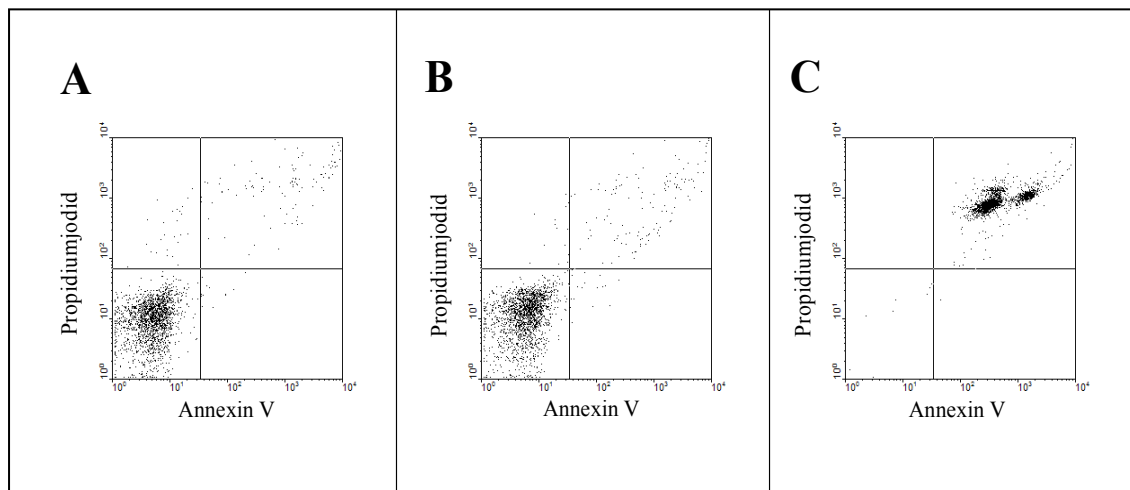


Abb. 39: Dot Plots der FACS-Analyse von sperminbehandelten Blutformtrypanosomen nach Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumjodid. A: Unbehandelte Kontrollzellen; B: Spermin $3,5 \mu\text{M}$; C: Digitonin $6 \mu\text{M}$

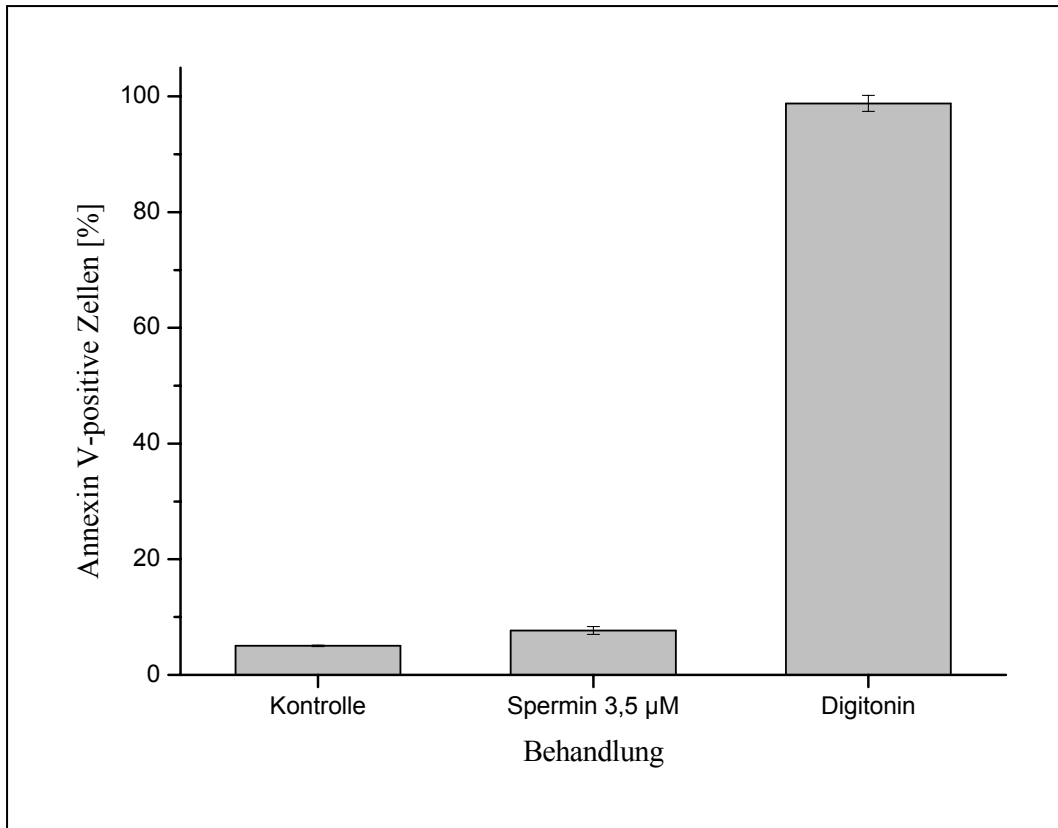


Abb. 40: FACS-Analyse von sperminbehandelten Blutformtrypanosomen nach Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumjodid. Prozentualer Anteil Annexin V-positiver Zellen

III.7.3. Bestimmung der Zellzyklusphase

Eine weitere Applikation von Propidiumjodid bei der FACS-Analyse besteht in der Färbung nukleärer DNA, um anhand der Menge der im Zellkern vorhandenen DNA bestimmen zu können, in welcher Phase des Zellzyklus sich die betreffende Zelle befindet. Zu diesem Zweck wurden Blutformtrypanosomen unter den genannten Bedingungen mit 3,5 µM Spermin inkubiert und nach Ablauf von 24 h hypoton lysiert, um die Nuclei freizusetzen. Letztere wurden mit einer höheren Konzentration an Propidiumjodid inkubiert als beim Nekrosetest und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Die Inkubationsdauer wurde bewusst auf 24 h angesetzt, um einen möglichen Zellzyklusarrest besser detektieren zu können. Nach 48 h lässt sich auch in

unbehandelten Zellen eine Verschiebung zu Kernen in der G2-Phase erkennen. Abb. 41 zeigt den DNA-Gehalt der für 24 h inkubierten Parasiten in Histogrammform, während in Abb. 42 der jeweilige prozentuale Anteil von Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus dargestellt ist. Während sich die Mehrzahl der unbehandelten Kontrollzellen (etwa 50%) in der G1-Phase befindet, überwiegen nach Sperminbehandlung die Zellen in der G2-Phase, während nur noch knappe 25% auf die G1-Phase entfallen. Auffällig ist die signifikante Zunahme von offenbar polyploiden Nuclei, die bei behandelten Zellen ebenfalls etwa 25% ausmachen. Diese Ergebnisse sprechen für eine verminderte Teilungskapazität der mit Spermin inkubierten Trypanosomen, wobei weiterhin Replikation der DNA stattfindet.

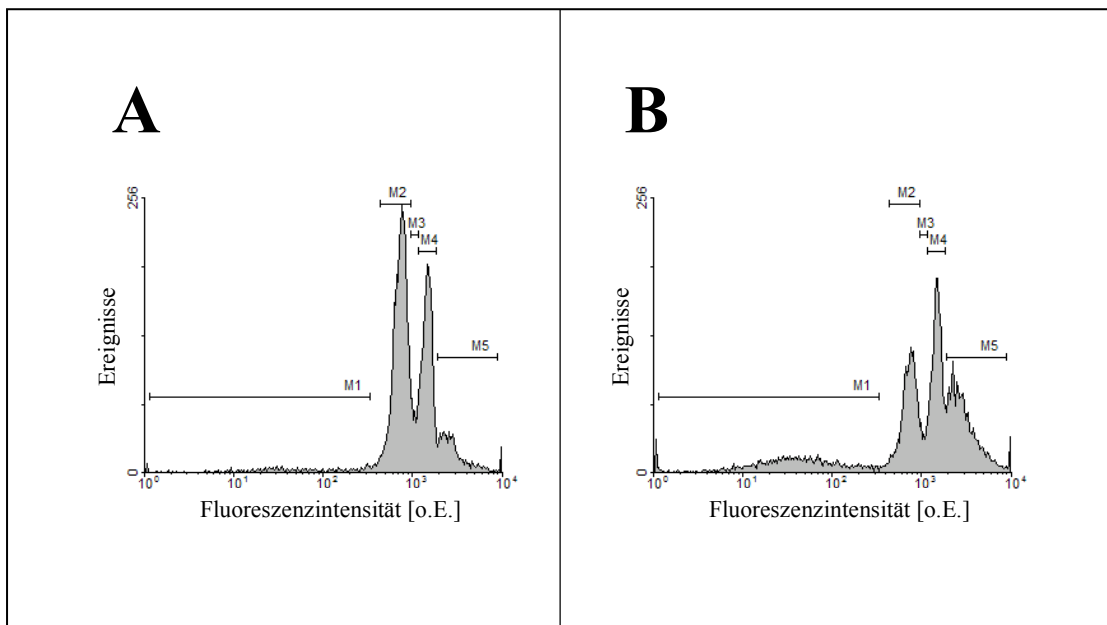


Abb. 41: Zellzyklusbestimmung von sperminbehandelten Trypanosomen per FACS-Analyse. Die Marker in den Histogrammen entsprechen definierten Phasen bzw. Zuständen. M1: Degradierete DNA; M2: G1-Phase; M3: S-Phase; M4: G2-Phase; M5: Polyploide Nuclei. A: Unbehandelte Kontrolle; B: Spermin 3,5 µM

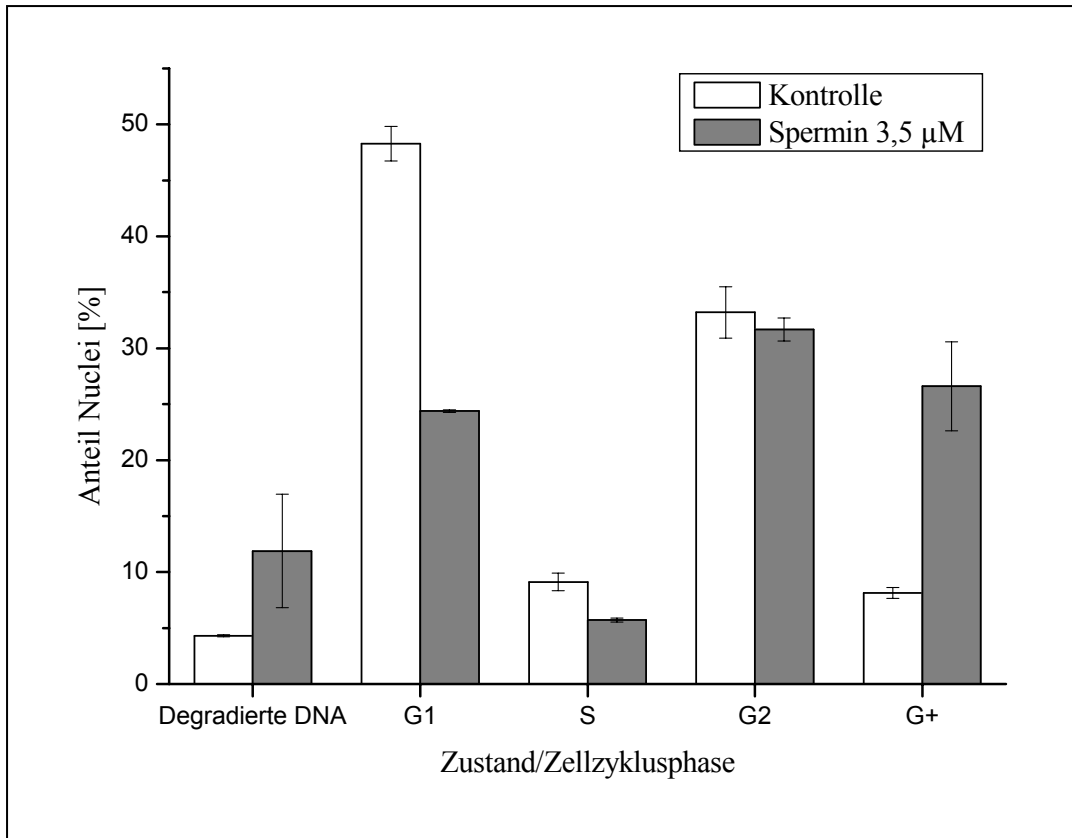


Abb. 42: Prozentualer Anteil sperminbehandelter Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus

III.8. Cytotoxizitätstest mit WISH-Zellen

Um ein mögliches therapeutisches Potenzial der antitrypanosomalen Schlangengiftkomponente Spermin abschätzen zu können, wurde die Toxizität der Verbindung für WISH-Zellen getestet. Bei letzteren handelt es sich um eine immortalisierte menschliche Amnion-Zelllinie. Für das entsprechende Experiment wurden die Zellen in einer 24-well plate in je 1 ml DMEM bei einer Dichte von etwa $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ angezogen, bis sie einen konfluenten Zellrasen ausbildeten. Anschließend wurde die Sperminkonzentration in frischem Medium auf die in Abb. 43 angegebenen Werte eingestellt. Die Zellen wurden wie Blutformtrypanosomen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert, und nach Ablauf von 48 h wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Mediumüberstand gemessen, um so den prozentualen Anteil lysierter Zellen

abschätzen zu können. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte WISH-Zellen. Anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abb. 43 konnte ein IC_{50} -Wert von 193 μM bestimmt werden, was einer um den Faktor 50-60 niedrigeren Toxizität entsprach als für *T. brucei*.

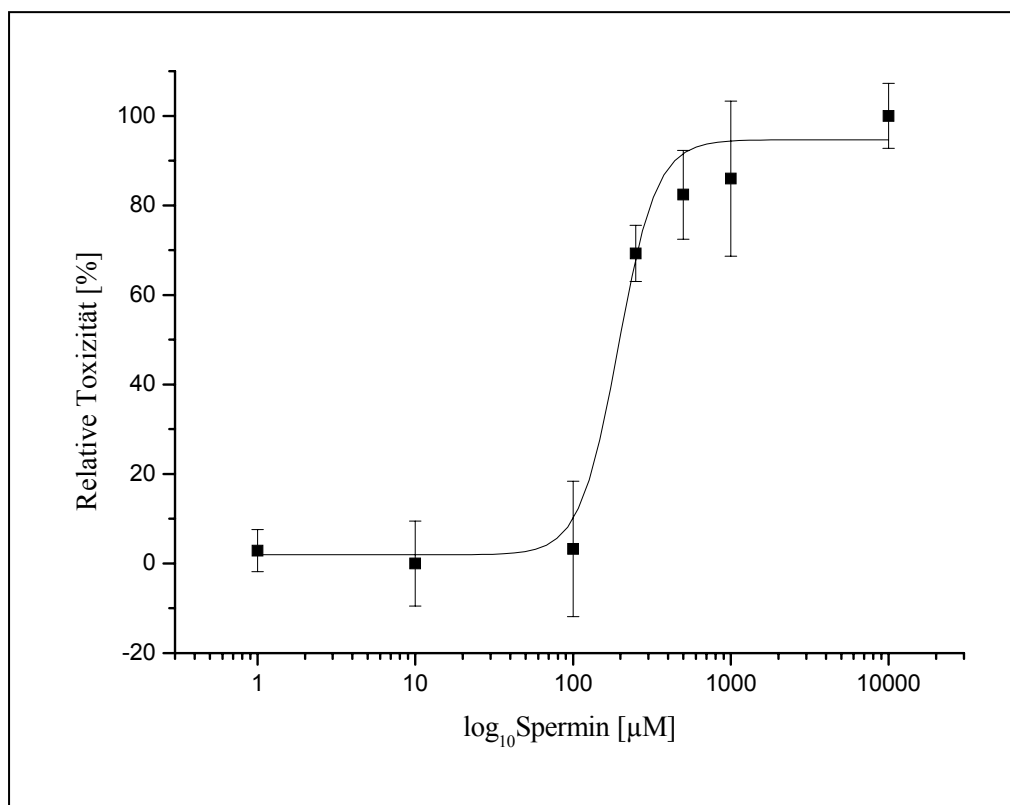


Abb. 43: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Spermin bei WISH-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 48 h. Eine IC_{50} von 193 μM wurde bestimmt.

III.9. Kontrolle der Beteiligung von Serumkomponenten

Nachdem in der Literatur bereits berichtet wurde, dass eine Polyaminoxidase (PAO)-Aktivität in Rinderserum Polyamine zu cytotoxischen Aldehyden unter der Freisetzung von Wasserstoffperoxid umsetzen kann [Ferrante *et al.*, 1984, Traore-Leroux *et al.*, 1987], sollte überprüft werden, inwiefern ein solcher Mechanismus in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen könnte. Obwohl stets hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Spermin in dem

verwendeten Kulturmedium ebenfalls zu den genannten Produkten reagierte. Es wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem das Kälberserum durch hitzeinaktiviertes Pferdeserum ersetzt wurde, da letzteres bekanntermaßen keine detektierbare PAO-Aktivität aufweist [Hegre *et al.*, 1984]. Um die Rolle der beteiligten Seren bei der trypanoziden Aktivität von Spermin einschätzen zu können, wurde sowohl für Spermin als auch für komplettes Schlangengift die halbinhibitorische Konzentration in Kulturmedium mit Pferdeserum bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 und 45 aufgeführt und sprechen eindeutig für eine Beteiligung von Komponenten des fötalen Kälberserums an der antitrypanosomalen Aktivität von Spermin, da dessen IC_{50} von 3,5 μM auf einen Wert von 210 μM anstieg. Im Gegensatz dazu blieb die halbinhibitorische Konzentration kompletten Schlangengiftes mit 198 ng/ml statt zuvor 199 ng/ml praktisch unverändert.

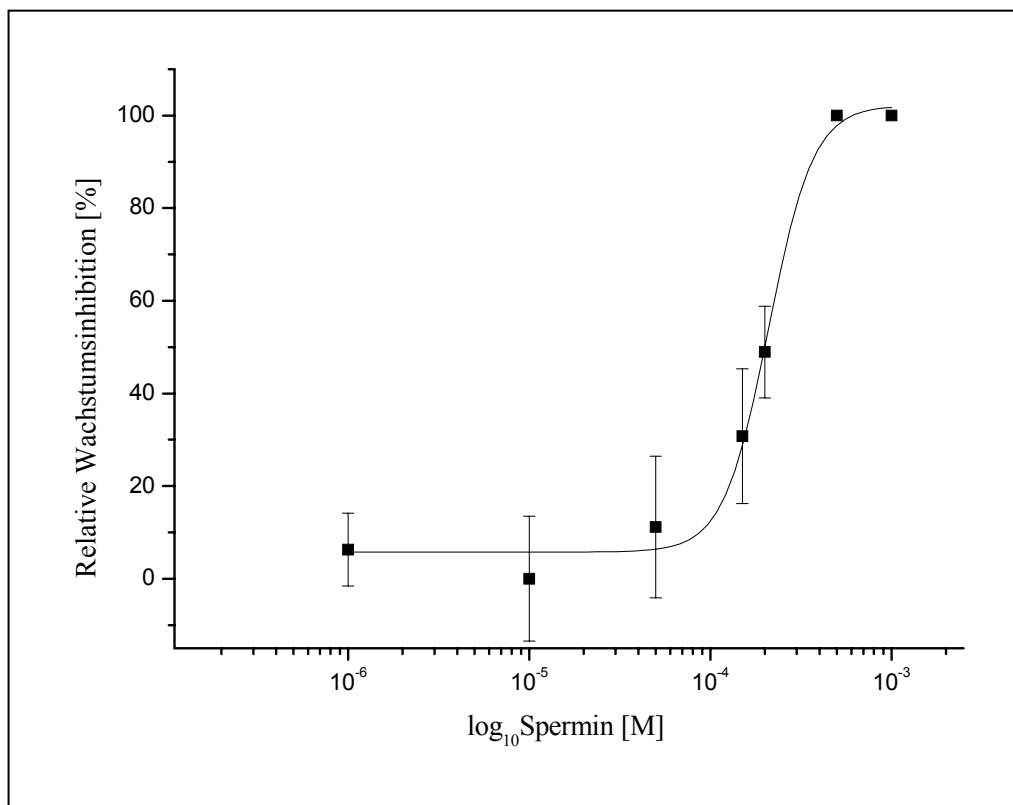


Abb. 44: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Spermin bei *T. brucei* nach 48 h in Kulturmedium mit hitzeinaktiviertem Pferdeserum. Die IC_{50} betrug 210 μM .

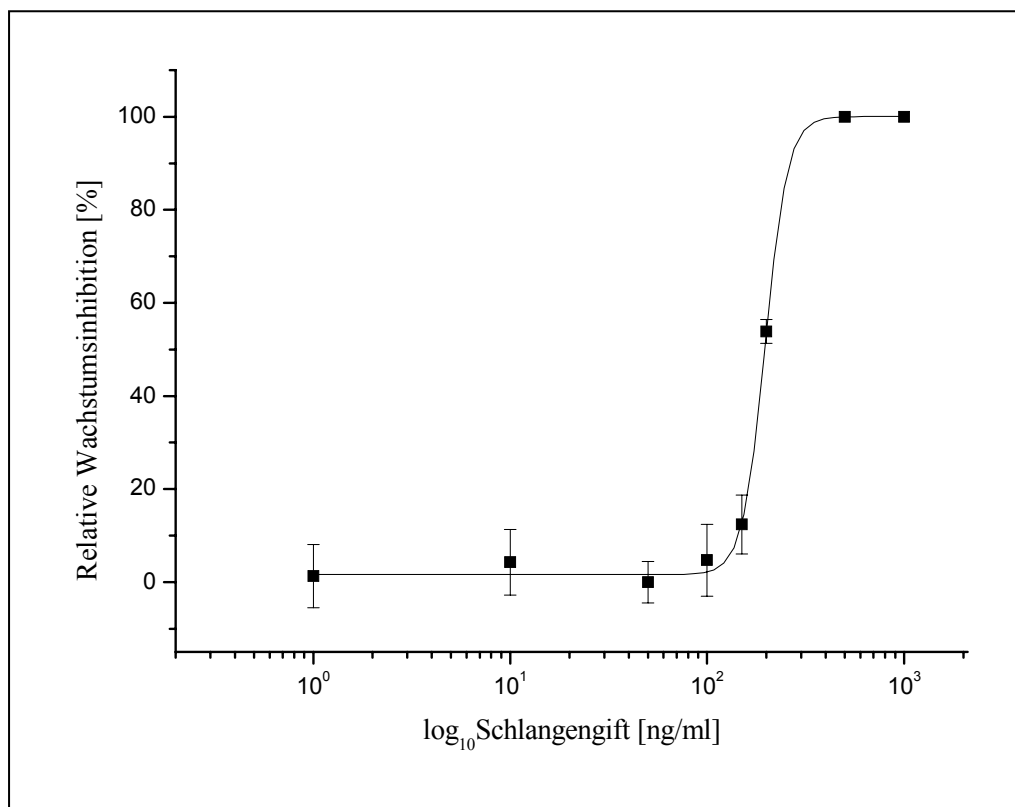


Abb. 45: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von komplettem Schlangengift bei *T. brucei* nach 48 h in Kulturmedium mit hitzeinaktiviertem Pferdeserum. Es wurde eine IC₅₀ von 198 ng/ml gemessen.

III.10. Hemmung der Bildung toxischer Oxidationsprodukte durch Katalase

Im Rahmen der o.g. Arbeiten [Ferrante *et al.*, 1984, Traore-Leroux *et al.*, 1987] bezüglich der Bildung toxischer Oxidationsprodukte von Spermin durch Rinderserumkomponenten wurde eine Hemmbarkeit der beobachteten trypanoziden Effekte durch Katalase erreicht, da Wasserstoffperoxid hierbei eine bedeutende Rolle einnimmt. Dieses Ergebnis wurde, wie Abb. 46 zeigt, unter Verwendung des laborüblichen FCS-haltigen Kulturmediums reproduziert. Dabei konnte auch beim Einsatz von Schlangengift eine signifikante, wenn auch geringere Hemmung des antitrypanosomalen Effekts erzielt werden, was wiederum für die Präsenz weiterer trypanozider Giftkomponenten neben Spermin spricht.

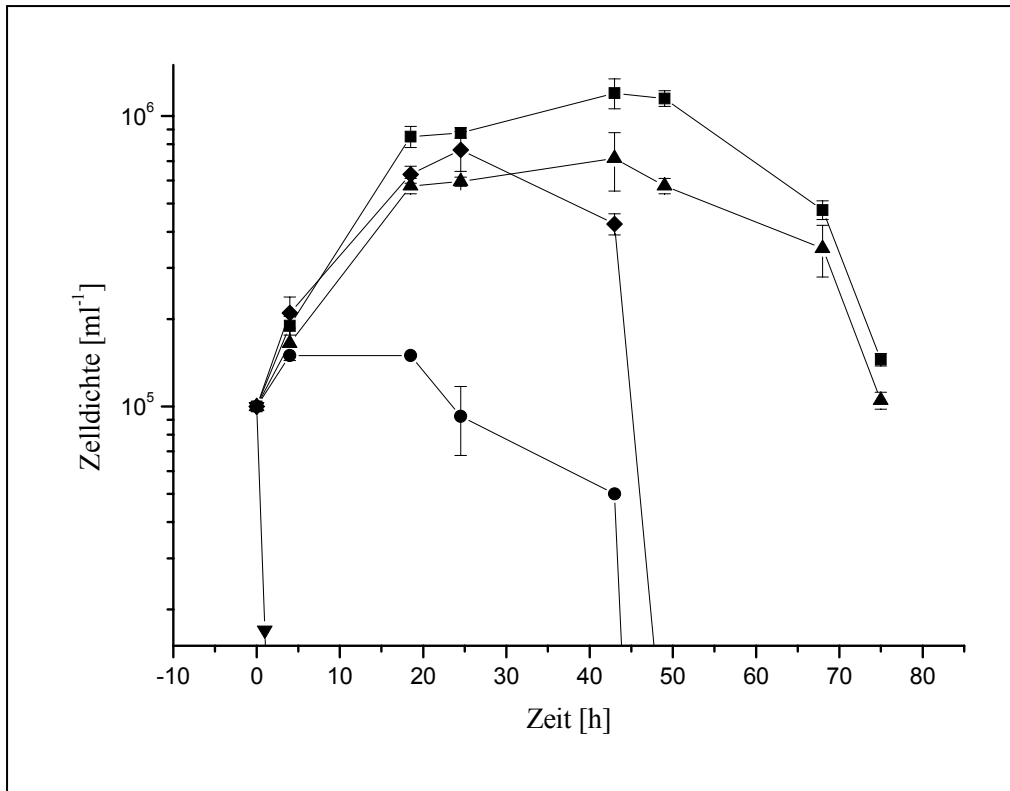


Abb. 46: Zelldichteverlauf bei Coinkubation von Blutformtrypanosomen mit Spermin und Katalase bzw. komplettem Schlangengift und Katalase. In beiden Fällen war eine Verminderung des trypanoziden Effekts durch die Zugabe von Katalase zu verzeichnen. (■): Unbehandelte Kontrollzellen; (●): Spermin 5 μM; (▲): Spermin 5 μM + Katalase 280 U; (▼): Schlangengift 500 ng/ml; (◆): Schlangengift 500 ng/ml + Katalase 280 U

Auf Grund der Diskrepanz zwischen den Veränderungen der IC_{50} -Werte von Spermin und Schlangengift beim Wechsel von FCS auf Pferdeserum sollte geprüft werden, ob beim Einsatz von komplettem Gift mit Pferdeserum ebenfalls ein H_2O_2 -gebundener Mechanismus vorlag, obwohl in Pferdeserum keine PAO-Aktivität vorhanden ist. Das in Abb. 47 dargestellte Experiment mit 500 ng/ml Schlangengift und 280 U Katalase in pferdeserumhaltigem Medium zeigte, dass wie bei FCS-haltigem Medium wiederum eine Hemmbarkeit des trypanoziden Effekts durch Katalase und damit eine Beteiligung von Wasserstoffperoxid gegeben war. Da Spermin als Giftkomponente mit der höchsten trypanoziden Aktivität identifiziert worden und die IC_{50} kompletten Schlangengifts bei beiden verwendeten Seren identisch war, ließ sich schlussfolgern, dass das Spermin im

Schlangengift bei diesem Experiment durch intrinsische enzymatische Aktivität bzw. Aktivitäten im Gift oxidativ umgesetzt wurde.

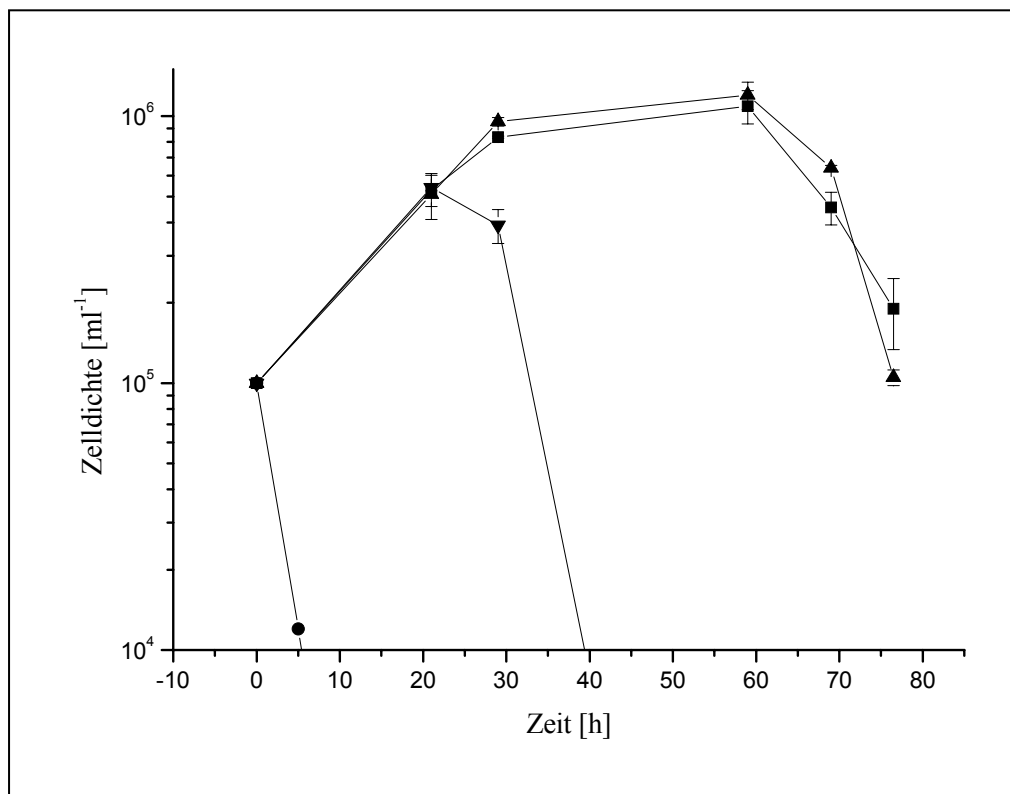


Abb. 47: Zelldichteverlauf bei Coinkubation von Blutformtrypanosomen mit komplettem Schlangengift und Katalase unter Verwendung von pferdeserumhaltigem Kulturmedium. (■): Unbehandelte Kontrollzellen; (●): Schlangengift 500 ng/ml; (▲): Katalase 280 U; (▼): Schlangengift 500 ng/ml + Katalase 280 U

D. Diskussion

I. Effekte des reinen Schlangengiftes auf *Trypanosoma brucei*

Das Gift der Blattnasenviper *Eristocophis macmahoni* wurde in dieser Arbeit bezüglich seiner Effekte auf *Trypanosoma brucei* untersucht, nachdem grundlegende Studien bereits in meiner Diplomarbeit durchgeführt worden waren. In Blutformtrypanosomen wurde in der vorliegenden Arbeit eine halbinhibitorische Konzentration von 198 ng/ml bestimmt, was einem signifikanten trypanoziden Effekt entspricht. So wurde beispielsweise für das Gift der Schlange *Bothrops jararaca* bei *Trypanosoma cruzi* ein IC_{50} -Wert von 10 µg/ml gemessen [Deolindo *et al.*, 2005], während das Gift des Skorpions *Buthus indicus* bis in den millimolaren Konzentrationsbereich bei Trypanosomen keinerlei inhibitorische Effekte zeigte (unveröffentlichte Beobachtungen in unserem Labor). Morphologische Untersuchungen im Licht- sowie Rasterelektronenmikroskop zeigten Verkrümmungen bzw. Verdrillungen des Zellkörpers als Folge der Behandlung mit komplettem Schlangengift, das zuvor lyophilisiert und anschließend in Wasser gelöst worden war. Während diese Veränderungen als wenig charakteristisch bezeichnet werden konnten, da diverse Stressfaktoren ähnliche Phänomene bei Trypanosomen hervorrufen, wies die transmissionselektronenmikroskopische Analyse auf spezifischere Ereignisse bei Giftbehandlung hin. Hierbei konnten hauptsächlich drei Phänomene beobachtet werden: die Bildung von extrazellulären Vesikeln, Veränderungen in der Struktur des Cytoskeletts und das Erscheinen von Autophagosomen.

Die extrazellulären Vesikel, die sich teilweise am Flagellum abschnüren oder der Plasmamembran eng benachbart sind, stellen für Trypanosomen außergewöhnliche Phänomene dar. Die Abschnürung oder Fusion extrazellulärer Vesikel findet normalerweise ausschließlich in der Flagellumtasche statt [Landfear & Ignatushchenko, 2001]. Ob es sich im vorliegenden Fall um Abschnürungen oder Fusionen oder eventuell beides handelt, ist der Darstellung im Elektronenmikroskop nicht zu entnehmen. Naheliegend ist allerdings die Spekulation, dass es sich um *membrane blebbing* handelt. Dieser Begriff beschreibt ein apoptotisches Ereignis, bei dem die Oberfläche einer sterbenden Zelle durch die Abschnürung exocytotischer Vesikel reduziert wird.

Das zweite beobachtete Phänomen besteht in der Abweichung der Struktur des tubulären Cytoskeletts, bei der die gewöhnlich in einer Reihe angeordneten Mikrotubuli aus dem Verbund austreten und bisweilen entfernt von der Plasmamembran im zellulären Lumen auftreten. Akkumulationen von Mikrotubuli waren zuvor in unserer Gruppe bei Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet worden [Selzer *et al.*, 1991]. Es wurde bei der Applikation von Schlangengiften auf Säugerzellen von einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels berichtet [Mora *et al.*, 2006]. Eine Modulation dieses Parameters durch das Gift der Blattnasenviper in Trypanosomen wäre ein denkbarer Mechanismus, durch den die Lage der Mikrotubuli beeinflusst werden könnte.

Die auffälligste morphologische Veränderung liegt in der Bildung von Autophagosomen. Wie in der Arbeit beobachtet wurde, befanden sich nach Behandlung der Zellen mit komplettem Schlangengift teilweise ganze Kompartimente wie Golgi-Felder in Vesikel eingeschlossen. Diese Strukturen entsprachen Lysosomen, die bekanntermaßen als Fusionspartner für Autophagosomen dienen und den Abbau des nicht mehr benötigten zelleigenen Materials gewährleisten. Wie in der Einleitung beschrieben, ist Autophagie u.a. als eine Form des programmierten Zelltodes (Typ II) bekannt [Codogno & Meijer, 2005]. Dieses Phänomen würde dem Erscheinen des für gewöhnlich mit Apoptose in Zusammenhang gebrachten *membrane blebbing* nicht notwendigerweise entgegensprechen. Bei Studien über die DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) wurde ein solches *membrane blebbing* gleichzeitig mit der Bildung autophagischer Vesikel beobachtet, während weitere Anzeichen von Apoptose ausblieben [Inbal *et al.*, 2002].

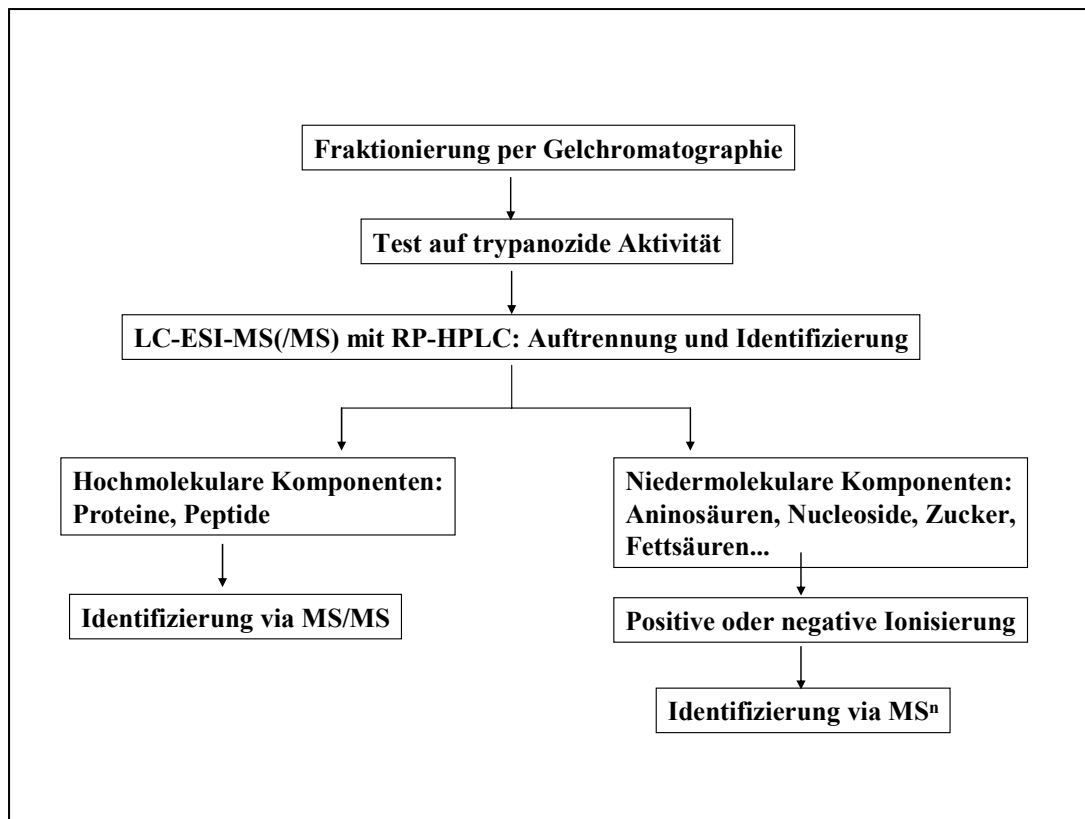
Charakteristisch für die molekulare Zusammensetzung von Schlangengiften zeigte sich das Gift der Blattnasenviper im SDS-PAGE-Experiment, welches die beträchtliche Anzahl von Peptid- und Proteinkomponenten verdeutlichte. Ebenfalls augenfällig war der signifikante Unterschied von reduzierenden zu nichtreduzierenden Bedingungen, was für die Präsenz diverser disulfidverbrückter Moleküle sprach.

Das Gift von *Eristocophis macmahoni* wurde in der Literatur mehrfach im Zusammenhang mit medizinisch bzw. pharmakologisch relevanten Themen beschrieben [Ali *et al.*, 1999, Siddiqi *et al.*, 1992]. Dabei wurden teilweise auch einzelne Moleküle mit biologischer Aktivität isoliert und charakterisiert, so z.B. eine Apoptose induzierende L-Aminosäureoxidase [Ali *et al.*, 2000] oder das Metastase inhibierende Disintegrin Eristostatin [McLane *et al.*, 2001]. Diese Beispiele unterstrichen einerseits

das Potenzial des Giftes an biologischer bzw. pharmakologischer Aktivität, andererseits die Möglichkeit, bedeutende Komponenten erfolgreich zu isolieren.

II. Isolierung von Spermin aus komplettem Schlangengift

Die Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven Komponente des Viperngifts wurde in dieser Arbeit nach einem mehrstufigen HPLC-MS-basierten Protokoll durchgeführt. Als Aufreinigungskriterium diente dabei die trypanozide Aktivität unter *in vitro*-Bedingungen. Die ursprünglich geplanten Schritte sind in Schema 1 dargestellt.

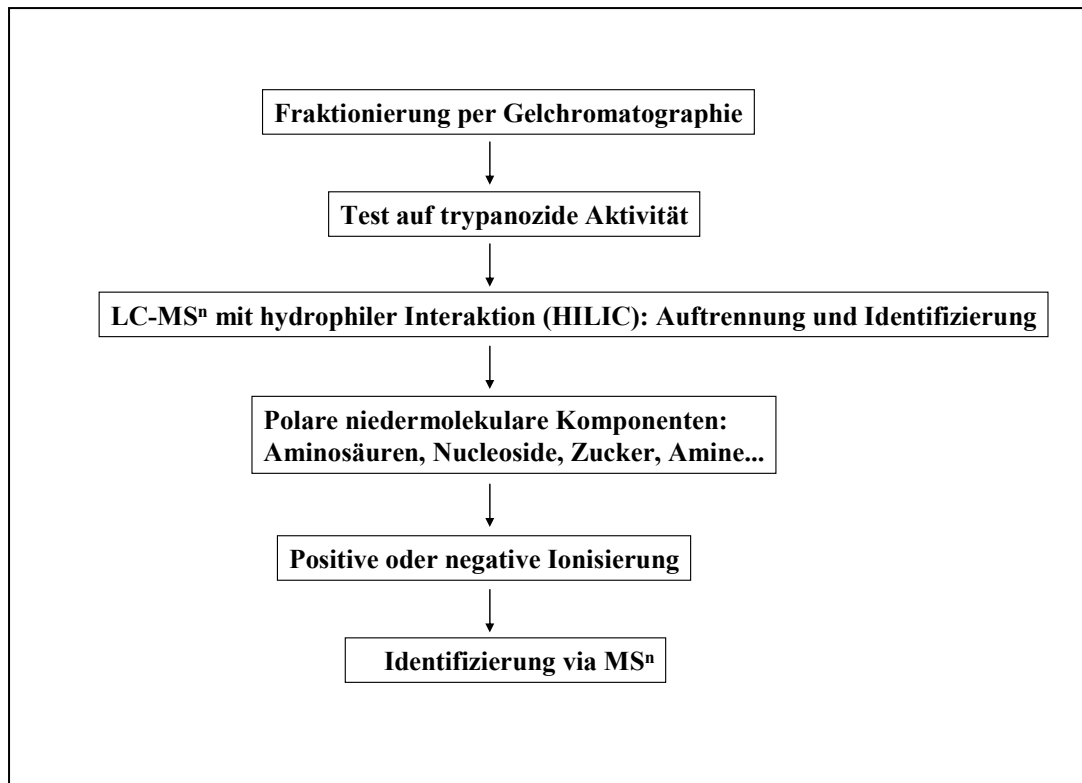


Schema 1: Anfängliche Isolierungsstrategie bezüglich der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente des Schlangengifts

Die vorgeschaltete Auftrennung per Größenausschluss wurde auf Grund der großen Vielfalt verschiedener Moleküle im Schlangengift gewählt. Eine Aufreinigung des kompletten Giftes per RP-HPLC mit einer C4-Phase war zuvor von unserem

Kooperationspartner Dr. Syed Abid Ali durchgeführt worden [Ali *et al.*, 1999]. Allerdings wurden bei dieser Methode 25 Hauptfraktionen gewonnen, wobei die *peaks* zu einem beträchtlichen Anteil keine Basislinientrennung aufwiesen. Unter solchen Voraussetzungen wäre eine aktivitätsgeleitete Aufreinigung möglicherweise nur erschwert durchführbar gewesen. In der vorliegenden Arbeit erbrachte der gelchromatographische Schritt eine primäre Auftrennung, bei der nur bezüglich der ersten beiden von sechs erhaltenen *peaks* keine Basislinientrennung erzielt wurde. Daraufhin konnte gezielt die Fraktion mit der höchsten trypanoziden Aktivität für den folgenden Trennungsschritt eingesetzt werden. Die Ausgangsstrategie, wie sie in Schema 1 abgebildet ist, beinhaltete hierbei eine RP-HPLC-Methode, die *on-line* oder *off-line* durchgeführt werden sollte. Bei der anschließenden MS-basierten Identifizierung der gesuchten Verbindung waren entweder Protein- bzw. Peptidkomponenten oder niedermolekulare Substanzen zu erwarten. In ersterem Falle hätte man sich verschiedener Datenbanken, beispielweise MASCOT [www.matrixscience.com], bedienen können, um die erhaltenen Signale auszuwerten. Massenspektrometrische Fragmentierungsmuster von durch tryptischen Verdau erzeugten Peptiden können mit Hilfe von MASCOT gegen *in silico* generierte Muster abgeglichen werden, was bei entsprechenden Datenbankeinträgen mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Identifizierung des gesuchten Proteins führt. Bei den niedermolekularen Verbindungen, die sich im vorliegenden Fall als verantwortlich für die hauptsächliche antitrypanosomale Aktivität erwiesen, ist diese Methode nur in sehr beschränktem Maße anwendbar, da für diese Substanzen praktisch keine vergleichbaren, frei verfügbaren Datenbanken existieren.

Die ursprüngliche Isolierungsstrategie konnte in der Praxis bis zum Schritt der RP-HPLC erfolgreich durchgeführt werden. Die Abtrennung des Polyamins Spermin von anderen polaren Komponenten der betreffenden Fraktion aus der Gelfiltration war mit dieser Methode allerdings nicht möglich. Auf Grund der Erkenntnis, dass es sich um eine stark hydrophile und, wie aus der Massenspektrometrieanalyse des RP-Injektionssignals ersichtlich wurde, niedermolekulare Verbindung handelte, wurde die anfängliche Strategie revidiert. Das Ergebnis ist in Schema 2 zu sehen.



Schema 2: Revidierte Isolierungsstrategie bezüglich der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente des Schlangengifts

Die statt der RP-HPLC eingesetzte Hydrophile Interaktionschromatographie erwies sich als geeignet, um eine Fraktion zu generieren, die nur eine detektierbare Komponente mit der *in vitro* bestimmten trypanoziden Aktivität enthielt. Mit Hilfe der verwendeten Aminophase als Trennmaterial ließ sich demnach eine hinreichende Retention erzielen, was für die generelle Anwendbarkeit von HILIC für die Isolierung von Polyaminen sprach. Diese Methode wurde für die qualitative Analyse *off-line* verwendet, um die entsprechenden Fraktionen einem Aktivitätstest unterziehen zu können. Für die quantitative Analyse war allerdings auch die *on-line* Anwendung ohne Weiteres durchführbar, wofür die HPLC-Apparatur direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt wurde. Nach dem Austreten des Eluates aus der Säule erfolgte somit sofort die Ionisierung und Analyse.

Die Identifizierung von Spermin erfolgte in erster Linie anhand des spezifischen Fragmentierungsmusters, welches auch in einer anderen Arbeitsgruppe unter ähnlichen experimentellen Bedingungen unter Einsatz eines Ionenfallen-Massenspektrometers

gefunden worden war [Ippolito *et al.*, 2005]. Erleichtert wurde die Eingrenzung möglicher Kandidatenmoleküle maßgeblich durch zwei charakteristische Eigenschaften linearer Polyamine, nämlich das Fehlen einer signifikanten Absorption von UV-Strahlung sowie die beträchtliche Basizität. Letztere war einerseits durch die chromatographischen Eigenschaften der Komponente und andererseits durch die selektive Ionisierbarkeit im positiven Modus bei der Massenspektrometrie deutlich geworden. Bezüglich des Isolierungsprozesses von Spermin lässt sich festhalten, dass sich die auf HILIC bzw. HILIC-MS basierende Methode als geeignet für die Aufarbeitung von Polyaminen aus einer komplexen natürlichen Quelle erwiesen hat. Bisher in der Literatur beschriebene Methoden zur chromatographischen Auftrennung von Polyaminen verwendeten zumeist RP-HPLC-Schritte, bei denen eine vorausgehende Derivatisierung der Moleküle nötig war [Ekegren & Gomes-Trolin, 2005]. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten hydrophilen Phasen können diese Komponenten in nativer Form aufgereinigt werden. Darüber hinaus wurde die Verwendung von ESI-MS zu ihrer Identifizierung auf Grund der schonenden Ionisierung bereits als geeignet für die Analyse der teilweise thermolabilen natürlich vorkommenden Polyamine beschrieben [Chesnov *et al.*, 2002].

Abgesehen von der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente wurden zwei weitere Inhaltsstoffe des Schlangengifts isoliert und identifiziert: eine Phospholipase A₂ und ein bisher unbekanntes Peptid mit Homologie zum Disintegrin Eristocophin I aus demselben Schlangengift, bei dem zuvor trypanozide Aktivität vermutet worden war [Patrick Merkel, 2003, Diplomarbeit]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun mit Hilfe veränderter chromatographischer Bedingungen herausgestellt, dass sich keine der beiden Komponenten in der Fraktion mit der hauptsächlich trypanoziden Aktivität befand. Dennoch könnten beide Moleküle von Bedeutung für andere biochemische oder biomedizinische Fragestellungen sein, da einerseits Phospholipasen aus Schlangengiften als multifunktionelle Enzyme beschrieben wurden [Stabeli *et al.*, 2006], die teilweise antimikrobielle Aktivität aufwiesen [Zieler *et al.*, 2001], andererseits Disintegrine auf Grund der selektiven Blockierung ihrer Rezeptoren, der Integrine, zur Inhibition von Tumorwachstum eingesetzt wurden [McLane *et al.*, 2001].

III. Bedeutung von Spermin als antitrypanosomale Komponente

Die Identifizierung von Spermin als hauptaktive trypanozide Komponente eines Schlangengiftes war im Vorfeld aus zwei Gründen nicht zu erwarten gewesen: Zum einen wurden bisher hauptsächlich Peptid- oder Proteinkomponenten im Zusammenhang mit nachweisbarer biologischer Aktivität beschrieben, zum anderen war Spermin vor allem auf Grund seines proliferationsfördernden Effektes bekannt, der bereits 1949 erstmals im Zusammenhang mit Bakterien erwähnt wurde [Herbst & Snell, 1949]. In der Tat sind in Schlangengiften generell zahlreiche Moleküle aller Klassen zu finden, auch wenn bis zu 90% der Trockenmasse auf Proteine oder Peptide entfällt [Stocker, 1990]. Die Tatsache, dass niedermolekulare Komponenten dieser Gifte bisher wenig Beachtung fanden, ist möglicherweise auch auf ihre wesentlich schwierigere analytische Zugänglichkeit zurückzuführen. Während Proteine oder Peptide beispielsweise grundsätzlich eine charakteristische Absorption von UV-Strahlung aufweisen und ihre physikalisch-biochemischen Eigenschaften inklusive der Fragmentierungsmuster bei verschiedenen massenspektrometrischen Untersuchungen in frei zugänglichen Datenbanken gespeichert sind, ist die Identifizierung und Isolierung niedermolekularer Komponenten im Normalfall mit weitaus mehr Aufwand verbunden. Bezüglich der biologischen Effekte natürlich vorkommender linearer Polyamine wie Putrescin, Spermidin und Spermin hat sich in den vergangenen 10-20 Jahren ein deutlich differenzierteres, aber auch komplexeres Bild ergeben, welches weit über die reine proliferationsfördernde Wirkung auf verschiedene Pro- und Eukaryonten hinausgeht. Die mittlerweile charakterisierten Effekte umfassen die Induktion sowie die Inhibition von Apoptose [Seiler & Raul, 2005], regulatorische Effekte auf Ionenkanäle [Williams, 1997] oder die direkte Interaktion mit DNA in Bezug auf die Umwandlung von B- zu Z-Helices [Janne *et al.*, 2004]. Ferner wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass die Polyamine Spermin und Spermidin in Kombination mit Rinderserum auf Grund einer in letzterem enthaltenen Polyaminoxidase (PAO)-Aktivität zu toxischen Aldehyden bzw. H_2O_2 umgesetzt werden. Diese Abbauprodukte vermitteln eine trypanozide Aktivität, die teilweise durch Katalase inhibiert werden kann [Ferrante *et al.*, 1984, Traore-Leroux *et al.*, 1987]. Allerdings wurde in den entsprechenden Studien der Effekt auf (sub)zellulärer Ebene nicht weiter charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Kultivierung der Trypanosomen stets Medium mit hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum verwendet, was sich für das Wachstum der

Parasiten *in vitro* im Laufe der Jahre als unumgänglich im Vergleich mit anderen Seren herausgestellt hat. Die Hitzeinaktivierung, die für Trypanosomen toxische enzymatische Aktivitäten eliminieren sollte, war allerdings offenbar nicht ausreichend, um die PAO vollständig zu inaktivieren. Entsprechende Ergebnisse zeigten die Experimente mit pferdeserumhaltigem Medium, in dem die IC_{50} von Spermin mit 210 μ M beträchtlich höher lag als die zuvor gemessenen 3,5 μ M. Besagtes Serum weist keine detektierbare PAO-Aktivität auf, weshalb es auch in früheren Studien in Verbindung mit Spermin und trypanozider Aktivität verwendet wurde [O'Sullivan *et al.*, 1997]. Im Rahmen jener Arbeit wurden Spermin bzw. Sperminderivate eingesetzt, um die Inhibition der Trypanothionreductase und die antitrypanosomale Wirkung durch diese Komponenten zu analysieren. Wie bei der IC_{50} -Bestimmung mit Pferdeserum in der vorliegenden Arbeit (210 μ M) lag auch die von O'Sullivan und Kollegen bestimmte halbinhibitorische Konzentration nach 48 h bei über 100 μ M. Niedrigere Werte wurden mit synthetischen hydrophoberen Derivaten erzielt. In adultem menschlichem Serum ist praktisch keine PAO-Aktivität detektierbar, es liegt jedoch nahe, dass eine der zahlreichen Proteinkomponenten im Schlangengift durch die Umsetzung von Spermin zur Bildung von toxischen Abbauprodukten führt, wofür die unveränderte trypanozide Giftaktivität in Medium mit Pferdeserum in Verbindung mit der Hemmbarkeit durch Katalase spricht. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass von unserem Kooperationspartner eine L-Aminosäureoxidase im Gift der Blattnasenviper gefunden wurde [Ali *et al.*, 2000]. Die Präsenz einer Polyaminoxidase ist nicht auszuschließen und würde einen tieferen Sinn ergeben, da die entstehenden Verbindungen Acrolein und H_2O_2 nicht nur auf Trypanosomen toxisch wirken, sondern alle Opfer der Schlange massiv schädigen würden. Dieser Umstand könnte eine wichtige Rolle für lineare Polyamine wie Spermin und Spermidin in Schlangengiften offenlegen. Dabei wäre zu berücksichtigen, dass zahlreiche enzymatische Aktivitäten im Gift zunächst maskiert vorliegen, bevor sie bei dessen Verdünnung ins Blut des Opfers aktiviert werden.

Ein weiterer Grund für den mit ca. 1% der Trockenmasse beträchtlichen Sperminanteil des Giftes könnte in der Aktivierung anderer enzymatischer Komponenten liegen, da beispielsweise gezeigt wurde, dass die Aktivität einer Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas durch Spermin und Spermidin *in vitro* signifikant erhöht werden konnte [Thuren *et al.*, 1986]. Eine Phospholipase A_2 konnte auch im verwendeten Gift identifiziert werden.

Eine von toxischen Produkten unabhängige trypanozide Aktivität, wie sie in den Versuchen mit Pferdeserum im hohen mikromolaren Konzentrationsbereich beobachtet wurde, muss durch andere Mechanismen vermittelt werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine Konkurrenz von Spermin, dessen Synthese in *T. brucei* bisher nicht gezeigt werden konnte, mit anderen Polyaminen. Prädestiniert hierfür wäre Spermidin auf Grund seiner engen strukturellen Verwandtschaft zu Spermin. So könnte Spermin beispielsweise an Stelle von Spermidin von der Trypanothionsynthetase genutzt werden, was bereits bei Blockierung der Spermidinsynthese in *T. brucei* beobachtet werden konnte [Oza *et al.*, 2003]. Ob die bei dieser Reaktion entstehenden Glutathionylsperminkonjugate analog zu Trypanothion von der Zelle verwendet werden können, blieb unklar. Bei hohen Sperminkonzentrationen könnte ähnliches auch auf andere zelluläre Reaktionen zutreffen, an denen Spermidin beteiligt ist.

Bezüglich der Experimente mit kälberserumhaltigem Medium wurden über die Beteiligung von H₂O₂ hinaus weitere Erkenntnisse im Hinblick auf den Wirkmechanismus der trypanoziden Komponente(n) gewonnen. Die Tatsache, dass bei einer Erniedrigung der Temperatur auf 12°C kein Effekt mehr auf Trypanosomen detektiert werden kann, spricht für die obligatorische Beteiligung endocytotischer Prozesse. Ferner konnte die Toxizität nicht durch Mediumwechsel nach kurzen Zeiten (≥ 5 min) beeinflusst werden. Diese Beobachtung, die für die Induktion eines eigenständigen, im Zelltod mündenden Prozesses spricht, wurde bereits in früheren Studien in Bezug auf *T. lewisi* und *T. musculi* getätigt [Ferrante *et al.*, 1984]. Eine mögliche Erklärung für einen solchen Vorgang stellt die Apoptose dar. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch weder Externalisierung von Phosphatidylserin per FACS-Analyse noch DNA-Kondensation per Elektronenmikroskop nachgewiesen. Statt dessen konnten mit Hilfe der letzteren Methode eindeutige Anzeichen eines autophagischen Zelltodes festgestellt werden, nachdem bei Applikation der halbinhibitorischen Konzentration von Spermin auch Nekrose durch FACS-Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Die Induktion von Autophagie, dem „Typ II“ des programmierten Zelltodes, wird charakterisiert durch das Auftreten von Autophagosomen, die normalerweise eine Doppelmembran aufweisen, aber auch in *multivesicular bodies* übergehen können. Weiterhin charakteristisch ist die Beteiligung des Mitochondriums, das seinerseits morphologischen Veränderungen wie Dilatation unterliegen kann [Bras *et al.*, 2005]. Diese Ereignisse waren bereits bei der Verwendung des kompletten Schlangengiftes beobachtet worden, ebenso die Bildung extrazellulärer

Vesikel bzw. *membrane blebbing*, was bereits unter dem entsprechenden Punkt diskutiert wurde. Die Störung der Struktur des tubulären Cytoskeletts kann allerdings nicht auf Spermin zurückgeführt werden, da diese ausschließlich bei der Verwendung kompletten Schlangengiftes auftrat. Der Einsatz verschiedener bekannter Autophagieinhibitoren konnte das Erscheinen der beschriebenen Phänomene nach Spermingabe nicht aufhalten. Obwohl dieses Ergebnis per se zunächst gegen das tatsächliche Auftreten von Autophagie spricht, ist nicht notwendigerweise zu erwarten, dass sich diese Art des Zelltods analog den Vorgängen in höheren Eukaryonten vollzieht. Man geht zwar davon aus, dass autophagische Vorgänge in Trypanosomatiden eine Rolle beim *turnover* von Glycosomen einnehmen [Michels *et al.*, 2006], jedoch gibt es bisher keine publizierten Daten, die den genauen Ablauf von Autophagie in *T. brucei* beschreiben. Auch ein möglicher Zusammenhang des in dieser Arbeit per FACS-Analyse beobachteten Vorkommens polyploider Kerne mit Autophagie kann nicht ausgeschlossen werden, ebenso wenig wie das *membrane blebbing*. Interessanterweise deckten neuere bioinformatische Analysen des Genoms von Trypanosomatiden in Bezug auf Autophagie auf, dass weniger als die Hälfte der in Hefe bekannten relevanten Gene in ähnlicher Form in den Parasiten auftreten [Herman *et al.*, 2006, Rigden *et al.*, 2005]. Dies unterstreicht im Allgemeinen die Diversität dieser Organismen im Vergleich mit anderen Eukaryonten, im Speziellen könnte es eine Erklärung dafür darstellen, warum bekannte Autophagieinhibitoren bei spermin-behandelten Zellen die Bildung entsprechender Vesikel nicht verhindern können.

IV. Resümee und Ausblick

Im Hinblick auf die primär formulierte Zielsetzung dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass die Identifizierung und Isolierung der hauptaktiven trypanoziden Komponente des Viperngifts von *Eristocophis macmahoni* erfolgreich abgeschlossen wurde. Der tatsächliche therapeutische Wert dieser Entdeckung kann erst eingeschätzt werden, wenn entsprechende Studien *in vivo* durchgeführt werden, zumal der trypanozide Effekt von Spermin stark von der PAO-Aktivität des jeweiligen Serums abhängt.

Bezüglich der Rolle von Spermin und möglicherweise anderen linearen Polyaminen wie Spermidin in Schlangengift wurden Hinweise auf synergistische Effekte erhalten.

Spermin wurde offenbar von intrinsischen enzymatischen Giftkomponenten zu toxischen Derivaten, darunter H_2O_2 , umgesetzt. Insofern könnten Spermin oder Spermidin aus Schlangengift beim Biss eines Opfers *in situ* von besagten Enzymen, die bei Verdünnung ins Blut aktiviert werden, umgesetzt werden.

Obwohl Spermin und diverse seiner synthetischen Derivate bereits als antitrypanosomale Komponente in der Literatur beschrieben wurden [Ferrante *et al.*, 1984, O'Sullivan *et al.*, 1997, Traore-Leroux *et al.*, 1987], konnten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse insbesondere bezogen auf die Art des Zelltods gewonnen werden. Die hier beobachtete Induktion von Autophagie gehört zu einem Gebiet, das neben der Erforschung von Apoptose immer stärker in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten über verschiedenste Eukaryonten gerät. Spermin könnte somit ein molekulares Werkzeug darstellen, um entsprechende Vorgänge in Trypanosomen näher zu beleuchten.

E. Summary

The snake venom from the leaf-nosed viper *Eristocophis macmahoni* was analyzed regarding its toxic effects on the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. A considerable trypanocidal effect was measured with an IC₅₀ value of 198 ng/ml in bloodstream form parasites. By means of transmission electron microscopy, autophagic structures, membrane blebbing and cytoskeletal disorder were detected. An *in vitro* activity-directed isolation procedure including several HPLC separation steps was applied in order to identify the major trypanocidal compound. A primary size exclusion chromatography step yielded a fraction with maximum antitrypanosomal activity that was further analyzed by hydrophilic interaction chromatography (HILIC), since RP-based retention of the activity was not feasible. The major trypanocidal effect was assigned to a single HILIC fraction. Analysis by off-line ESI-MSⁿ revealed an m/z value of 202.2 for the precursor ion and fragment ions of m/z = 129.1 (MS²) and 112.1 (MS³), respectively, clearly corresponding to the molecular mass and the fragmentation pattern of the polyamine spermine. Quantification of spermine within the viper venom using an on-line HILIC/ESI-MS method revealed that this compound constituted approximately 1% of the dry venom mass. Pure spermine had an IC₅₀ value of 3.5 μM in bloodstream form *T. brucei* and was shown to induce autophagy in the parasites using transmission electron microscopy, even though known inhibitors of autophagy were not able to block the observed effects. However, autophagy is expected to occur in trypanosomes in a way different from most other eukaryotes. Necrosis or apoptosis were excluded by means of FACS and electron microscopic analyses. Experiments with horse serum or catalase, respectively, showed the involvement of a polyamine oxidase (PAO) activity in the fetal calf serum used for cultivation of the parasites despite excessive heat inactivation. Degradation of spermine to toxic aldehydes and H₂O₂ by serum PAO resulting in trypanocidal effects had been shown previously. When crude venom was applied in media without PAO activity, spermine was apparently also oxidized by intrinsic venom components, suggesting an important synergistic function of polyamines in snake venoms. When they are oxidized to cytotoxic aldehydes and/or H₂O₂ by enzymatic activities already included but masked in the crude venom, these products could be generated *in situ* upon injection into the victim's body independently from a possible presence of polyamine oxidase in the respective organism.

F. Literatur

- Ali, S. A., Hamid, F., Abbasi, A., Zaidi, Z. H. & Shehnaz, D. (1999). Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. *Toxicon* **37**, 1095-1107.
- Ali, S. A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J. M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B. & Voelter, W. (2000). Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch Biochem Biophys* **384**, 216-226.
- Bacchi, C. J., Nathan, H. C., Hutner, S. H., McCann, P. P. & Sjoerdsma, A. (1980). Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* **210**, 332-334.
- Bacchi, C. J., Vergara, C., Garofalo, J., Lipschik, G. Y. & Hutner, S. H. (1979). Synthesis and content of polyamines in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* **26**, 484-488.
- Bailey, P. & Wilce, J. (2001). Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg Med (Fremantle)* **13**, 28-36.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renault, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K.,

- Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416-422.
- Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P. & Bringaud, F. (2002). Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. *J Biol Chem* **277**, 38001-38012.
- Blum, M. L., Down, J. A., Gurnett, A. M., Carrington, M., Turner, M. J. & Wiley, D. C. (1993). A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature* **362**, 603-609.
- Bodley, A. L., McGarry, M. W. & Shapiro, T. A. (1995). Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *J Infect Dis* **172**, 1157-1159.
- Borst, P. & Fairlamb, A. H. (1998). Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu Rev Microbiol* **52**, 745-778.
- Bras, M., Queenan, B. & Susin, S. A. (2005). Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Moscow)* **70**, 284-293.
- Brickman, M. J., Cook, J. M. & Balber, A. E. (1995). Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes. *J Cell Sci* **108 (Pt 11)**, 3611-3621.
- Bringaud, F. & Baltz, T. (1993). Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **13**, 1146-1154.

- Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., Shaw, M. K., Ginger, M. L., Gaskell, S. J., McKean, P. G. & Gull, K. (2006).** Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* **440**, 224-227.
- Cherigo, L., Polanco, V., Ortega-Barria, E., Heller, M. V., Capson, T. L. & Rios, L. C. (2005).** Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineata*. *Nat Prod Res* **19**, 373-377.
- Chesnov, S., Bigler, L. & Hesse, M. (2002).** Detection and characterization of natural polyamines by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization (electrospray ionization) mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* **8**, 1-16.
- Clarkson, A. B., Jr., Bienen, E. J., Pollakis, G. & Grady, R. W. (1989).** Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J Biol Chem* **264**, 17770-17776.
- Codogno, P. & Meijer, A. J. (2005).** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12**, 1509-1518.
- Cross, G. A. (1975).** Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **71**, 393-417.
- Deolindo, P., Teixeira-Ferreira, A. S., Melo, E. J., Arnholdt, A. C., Souza, W., Alves, E. W. & DaMatta, R. A. (2005).** Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 33-38.
- Devi, A. (1968).** The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In *Venomous animals and their venoms*. Edited by B. Bücherl & V. Deulofeu. New York: Academic Press.

- Dringen, R., Kussmaul, L. & Hamprecht, B.** (1998). Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* **2**, 223-228.
- Duszenko, M.** (1998). Aspekte der Infektionsbiologie: Afrikanische Trypanosomen und Schlafkrankheit. *Biologie in unserer Zeit* **28**, 72-81.
- Duszenko, M., Ferguson, M. A., Lamont, G. S., Rifkin, M. R. & Cross, G. A.** (1985). Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *J Exp Med* **162**, 1256-1263.
- Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E. T. & Welburn, S. C.** (2006). Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* **22**, 536-542.
- Duszenko, M., Muhlstadt, K. & Broder, A.** (1992). Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **50**, 269-273.
- Ekegren, T. & Gomes-Trolin, C.** (2005). Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **338**, 179-185.
- El-Sayed, N. M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S. E. & Donelson, J. E.** (2000). The African trypanosome genome. *Int J Parasitol* **30**, 329-345.
- Ferguson, M. A. & Cross, G. A.** (1984). Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem* **259**, 3011-3015.
- Ferrante, A., Rzepczyk, C. M. & Saul, A. J.** (1984). Polyamine oxidase-mediated trypanosome killing: the role of hydrogen peroxide and aldehydes. *J Immunol* **133**, 2157-2162.

- Figarella, K., Rawer, M., Uzcategui, N. L., Kubata, B. K., Lauber, K., Madeo, F., Wesselborg, S. & Duszenko, M.** (2005). Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ* **12**, 335-346.
- Figarella, K., Uzcategui, N. L., Beck, A., Schoenfeld, C., Kubata, B. K., Lang, F. & Duszenko, M.** (2006). Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ*.
- Goncalves, A. R., Soares, M. J., de Souza, W., DaMatta, R. A. & Alves, E. W.** (2002). Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol Res* **88**, 598-602.
- Goringer, H. U., Homann, M., Zacharias, M. & Adler, A.** (2006). RNA aptamers as potential pharmaceuticals against infections with African trypanosomes. *Handb Exp Pharmacol*, 375-393.
- Grab, D. J., Nikolskaia, O., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Ito, S., Hara, T., Fukuma, T., Nyarko, E., Kim, K. J., Stins, M. F., Delannoy, M. J., Rodgers, J. & Kim, K. S.** (2004). African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Parasitol* **90**, 970-979.
- Hegre, O. D., Marshall, S. & Hickey, G. E.** (1984). Spermidine cytotoxicity in vitro: effect of serum and oxygen tension. *In Vitro* **20**, 198-204.
- Herbst, E. J. & Snell, E. E.** (1949). Putrescine and related compounds as growth factors for *Hemophilus parainfluenzae* 7991. *J Biol Chem* **181**, 47-54.
- Herman, M., Gillies, S., Michels, P. A. & Rigden, D. J.** (2006). Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* **2**, 107-118.

- Hoet, S., Opperdoes, F., Brun, R., Adjakidje, V. & Quetin-Leclercq, J.** (2004). In vitro antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants. *J Ethnopharmacol* **91**, 37-42.
- Hoet, S., Stevigny, C., Herent, M. F. & Quetin-Leclercq, J.** (2006). Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med* **72**, 480-482.
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G. & Kimchi, A.** (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* **157**, 455-468.
- Ippolito, J. E., Xu, J., Jain, S., Moulder, K., Mennerick, S., Crowley, J. R., Townsend, R. R. & Gordon, J. I.** (2005). An integrated functional genomics and metabolomics approach for defining poor prognosis in human neuroendocrine cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9901-9906.
- Janne, J., Alhonen, L., Pietila, M. & Keinanen, T. A.** (2004). Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur J Biochem* **271**, 877-894.
- Kaiser, A., Gottwald, A., Maier, W. & Seitz, H. M.** (2003). Targeting enzymes involved in spermidine metabolism of parasitic protozoa--a possible new strategy for anti-parasitic treatment. *Parasitol Res* **91**, 508-516.
- Keiser, J., Stich, A. & Burri, C.** (2001). New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development. *Trends Parasitol* **17**, 42-49.
- Kubata, B. K., Nagamune, K., Murakami, N., Merkel, P., Kabututu, Z., Martin, S. K., Kalulu, T. M., Huq, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Kinoshita, T., Duzenko, M. & Urade, Y.** (2005). Kola acuminata proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* **35**, 91-103.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamont, G. S., Tucker, R. S. & Cross, G. A.** (1986). Analysis of antigen switching rates in *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **92** (Pt 2), 355-367.
- Landfear, S. M. & Ignatushchenko, M.** (2001). The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 1-17.
- Langreth, S. G. & Balber, A. E.** (1975). Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* **22**, 40-53.
- Lanham, S. M. & Godfrey, D. G.** (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol* **28**, 521-534.
- Linares, G. E., Ravaschino, E. L. & Rodriguez, J. B.** (2006). Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem* **13**, 335-360.
- Luft, J. H.** (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 409-414.
- Madison-Antenucci, S., Grams, J. & Hajduk, S. L.** (2002). Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell* **108**, 435-438.
- McLane, M. A., Kuchar, M. A., Brando, C., Santoli, D., Paquette-Straub, C. A. & Miele, M. E.** (2001). New insights on disintegrin-receptor interactions: eristostatin and melanoma cells. *Haemostasis* **31**, 177-182.
- Michels, P. A., Bringaud, F., Herman, M. & Hannaert, V.** (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*.

- Mora, R., Maldonado, A., Valverde, B. & Gutierrez, J. M.** (2006). Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* **47**, 75-86.
- Muller, S., Liebau, E., Walter, R. D. & Krauth-Siegel, R. L.** (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol* **19**, 320-328.
- Munafò, D. B. & Colombo, M. I.** (2001). A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* **114**, 3619-3629.
- O'Sullivan, M. C., Zhou, Q., Li, Z., Durham, T. B., Rattendi, D., Lane, S. & Bacchi, C. J.** (1997). Polyamine derivatives as inhibitors of trypanothione reductase and assessment of their trypanocidal activities. *Bioorg Med Chem* **5**, 2145-2155.
- Oza, S. L., Ariyanayagam, M. R., Aitchison, N. & Fairlamb, A. H.** (2003). Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **131**, 25-33.
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D. P. & Perez-Morga, D.** (2006). The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* **4**, 477-486.
- Rigden, D. J., Herman, M., Gillies, S. & Michels, P. A.** (2005). Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans* **33**, 972-974.
- Roditi, I. & Clayton, C.** (1999). An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **103**, 99-100.
- Salem, M. M. & Werbovetz, K. A.** (2006). Isoflavonoids and other compounds from *Psoralea argyrea* with antiprotozoal activities. *J Nat Prod* **69**, 43-49.

- Seiler, N.** (2003a). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr Drug Targets* **4**, 537-564.
- Seiler, N.** (2003b). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr Drug Targets* **4**, 565-585.
- Seiler, N. & Raul, F.** (2005). Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* **9**, 623-642.
- Selzer, P. M., Webster, P. & Duszenko, M.** (1991). Influence of Ca²⁺ depletion on cytoskeleton and nucleolus morphology in *Trypanosoma brucei*. *Eur J Cell Biol* **56**, 104-112.
- Siddiqi, A. R., Persson, B., Zaidi, Z. H. & Jornvall, H.** (1992). Characterization of two platelet aggregation inhibitor-like polypeptides from viper venom. *Peptides* **13**, 1033-1037.
- Siddiqi, A. R., Zaidi, Z. H. & Jornvall, H.** (1991). Purification and characterization of two highly different group II phospholipase A2 isozymes from a single viperid (*Eristocophis macmahoni*) venom. *Eur J Biochem* **201**, 675-679.
- Stabeli, R. G., Amui, S. F., Sant'Ana, C. D., Pires, M. G., Nomizo, A., Monteiro, M. C., Romao, P. R., Guerra-Sa, R., Vieira, C. A., Giglio, J. R., Fontes, M. R. & Soares, A. M.** (2006). Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **142**, 371-381.
- Stocker, K.** (1990). Composition of snake venoms. In *Medical use of snake venom proteins*. Edited by K. F. Stocker. Boca Raton: CRC Press Inc.

- Thuren, T., Virtanen, J. A. & Kinnunen, P. K.** (1986). Polyamine-phospholipid interaction probed by the accessibility of the phospholipid sn-2 ester bond to the action of phospholipase A2. *J Membr Biol* **92**, 1-7.
- Tielens, A. G. & Van Hellemond, J. J.** (1998). The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1365**, 71-78.
- Traore-Leroux, T., Fumoux, F., Chaize, J. & Roelants, G. E.** (1987). Trypanosoma brucei: polyamine oxidase mediated trypanolytic activity in the serum of naturally resistant cattle. *Exp Parasitol* **64**, 401-409.
- Van der Ploeg, L. H., Cornelissen, A. W., Barry, J. D. & Borst, P.** (1984). Chromosomes of kinetoplastida. *Embo J* **3**, 3109-3115.
- Vickerman, K.** (1969). On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci* **5**, 163-193.
- Vujcic, S., Diegelman, P., Bacchi, C. J., Kramer, D. L. & Porter, C. W.** (2002). Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J* **367**, 665-675.
- Wallace, H. M., Fraser, A. V. & Hughes, A.** (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* **376**, 1-14.
- Williams, K.** (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* **325** (Pt 2), 289-297.
- Zieler, H., Keister, D. B., Dvorak, J. A. & Ribeiro, J. M.** (2001). A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp Biol* **204**, 4157-4167.

G. Akademische Lehrer

Zoologie:	Prof. Pfeifer, Dr. Günzl
Mikrobiologie:	Prof. Wohlleben, Prof. Götz
Botanik:	Frau Prof. Ninnemann
Physik:	Prof. Gönnenwein, Prof. Nakel
Anatomie:	Prof. Reutter
Mathematik:	Dr. Pommer
Chemie:	Prof. Strähle, Prof. Hagenmaier, Prof. Oberhammer, Prof. Gauglitz, Prof. Lindner, Prof. Maier, Prof. Jung, Prof. Zeller, Prof. Albert
Informatik:	Prof. Klaeren
Bioinformatik:	Dr. Selzer
Pharmakologie/Toxikologie:	Prof. Schwarz, Prof. Bock, Prof. Krug, Dr. Jäger
Isotopenlabor:	Dr. Reinecke, Dr. Haug
Immunologie:	Dr. Klein, Frau Prof. Müller
Biochemie:	Prof. Bisswanger, Prof. Bohley, Prof. Duszenko, Prof. Eisele, Prof. Hamprecht, Prof. Mecke, Prof. Probst, Prof. Voelter, Prof. Weser, Dr. Fröhlich, Dr. Madeo

H. Curriculum Vitae

I. Persönliche Details

Vor- und Zuname: Patrick Merkel

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 01/02/1977

Geburtsort: Frankfurt a.M.

Familienstand: ledig

Eltern: Jessica Bok-Hee Merkel, geb. 1940 in Seoul, Südkorea
Sylvester Merkel, geb. 1946 in Dachau

II. Schulische und akademische Ausbildung

Grundschule: 1983-1984: Max-von-Gagern-Schule, Kelkheim
1984: Grundschule Linter, Limburg a.d. Lahn
1984-1987: Friedrich-Fröbel-Schule,
Obertshausen

Gymnasium: 1987-1993: Hermann-Hesse-Schule, Obertshausen
1993-1996: Franziskanergymnasium Kreuzburg,
Großkrotzenburg

Allgemeine Hochschulreife: Abitur am 20.06.1996 am Kreuzburg-
Gymnasium; Note: 1,1

Universitätsstudium: Oktober 1997 - Februar 2003:
Biochemie Diplom, Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

- Auslandsaufenthalt: August 2000 - Februar 2001: Oregon Health Sciences University (OHSU) in Portland, OR, USA; Betreuer: Prof. Dr. Scott M. Landfear
- Examina: Februar 2000: Vordiplom; Note: 1,2
Februar 2003: Diplom; Note: 1,0
- Diplomarbeit: Juli 2002 - Februar 2003: Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen
Titel: „Untersuchung der Wirkungen von trypanoziden tierischen und pflanzlichen Naturstoffen auf den Energiestoffwechsel von *Trypanosoma brucei*“
Betreuer: Prof. Dr. Michael Duszenko
- Doktorarbeit: März 2003 - Februar 2007: Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen
Titel: „Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente des Viperngiftes von *Eristocophis macmahoni* und ihre Effekte auf *Trypanosoma brucei*“
Betreuer: Prof. Dr. Michael Duszenko

III. Sonstige Aktivitäten

- Zivildienst: Oktober 1996 - September 1997:
Kindergarten für geistig und körperlich behinderte Kinder in Hechingen, Körperbehindertenförderung Neckar-Alb

Arbeitserfahrung:	Juli - August 1999: Praktikum bei der Gambro in Hechingen, Abteilung für Biohistokompatibilität von Membranen
Praktikums- und Seminarbetreuung:	April 2000 - Februar 2007: Betreuung des biochemischen Grundkurses für Medizinstudenten, Universität Tübingen Mai - November 2003: Betreuung einer Gruppe des Miescherkollegs für Medizinstudenten an der Universität Tübingen; Thema: Kanzerogenese und Therapie Dezember 2003: Betreuung von Biochemiestudenten bei der Proteinjodierung im Rahmen des Radioisotopenkurses im Isotopenlabor der Universität Tübingen Juli 2005: Betreuung eines Seminarvortrages über p53 Januar 2006: Betreuung eines Seminarvortrages zum Thema Impfstoffentwicklung bei Malaria April - Juni 2006: Anleitung des molekularbiologischen Praktikums für Biochemiestudenten, Universität Tübingen
Stipendien:	Seit September 2001: e-fellows.net

Publikationen: Burchmore, R.J., Rodriguez-Contreras, D., McBride, K.,
Merkel, P., Barrett, M.P., Modi, G., Sacks, D., Landfear, S.M.
(2003). Genetic Characterization of glucose transporter function
in *Leishmania mexicana*.

Proc Natl Acad Sci USA **100**, 3901-3906.

Merkel, P., Ali, S.A., Beck, A., Duszenko, M. (2003). A snake
venom blocks energy metabolism in *Trypanosoma brucei*.

Molecular Parasitology Meeting XIV, Woods Hole, MA, USA.

Poster

Kubata, B. K*, Nagamune, K*, Murakami, N*, **Merkel,**
P*, Kabututu, Z., Martin, S. K., Kalulu, T. M.,
Mustakuk, H., Yoshida, M., Ohnishi- Kameyama, M.,
Kinoshita, T., Duszenko, M. and Urade, Y. (2005). *Kola*
acuminata proanthocyanidins: a class of antitrypanosomal
compounds effective against *Trypanosoma brucei*

Int J Parasitol **35**, 91-103

***equal contribution**

Ali Shah, S. T*, **Merkel, P***, Ragge, H., Duszenko, M.,
Rademann, J. and Voelter, W. (2005). Stereospecific synthesis of
chiral 2,3-dihydro-1,4-benzodithiine and methyl-2,3-dihydro-1,4-
benzodithiine derivatives and their toxic effects on *Trypanosoma*
brucei

Chembiochem **6**, 1438-41

***equal contribution**

Merkel P., Beck, A., Muhammad, K., Ali, S.A., Duszenko, M.
(2006). Isolation and identification of spermine as the major
trypanocidal compound in the snake venom of *Eristocophis*
macmahoni and its effects on *Trypanosoma brucei*

22. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie*
e.V., Wien. Vortrag