

Rolle der Prostaglandinproduktion in afrikanischen
Trypanosomen: Charakterisierung des Effektes von Prostaglandin D₂ und
seiner Metabolite auf die Blutform von *Trypanosoma brucei*.

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
Katherine del Carmen Figarella Araujo

Tag der mündlichen Prüfung:

23 November 2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Mecke

Danksagung

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

Ich bedanke mich beim Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) für die Vergabe des Stipendiums, die nicht nur die Durchführung meiner Promotion an der Universität Tübingen ermöglicht hat, sondern mir auch die Möglichkeit gegeben hat, die deutsche Kultur kennen zu lernen.

Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich besonders für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die stete Diskussionsbereitschaft und für seine dauernde Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Dieter Mecke bedanke ich mich für seine Unterstützung und die Annahme als Berichterstatter.

Insbesondere bedanke ich mich bei Néstor Uzcátegui, der mich nicht nur durch seine Liebe, sein Verständnis und seine Unterstützung besonders glücklich macht, sondern auch für seine hilfreichen Diskussionen, die mir sehr während der Durchführung meiner Arbeit geholfen haben.

Viola Denninger und Patrick Merkel danke ich ganz herzlich für ihre uneingeschränkte Hilfe beim sprachlichen Korrekturlesen.

Bei Caroline Schönfeld und Martin Schmid bedanke ich mich für die große Hilfe bei den Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen und bei Alexandra Thor für ihre mühevollen Arbeit bei der Extraktion von Prostaglandinen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei der gesamten AG Duszenko für die gute Zusammenarbeit und die außergewöhnlich freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Ich werde euch nie vergessen...

Prof. Florian Lang danke ich für die Möglichkeit, die FACS Analysen am Physiologischen Institut durchführen zu können. Ein herzliches Dankeschön gilt Verena Brand, die mir bei dem Einstieg in die FACS-Handhabung eine große Hilfe war.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich auch an meine Eltern und Geschwister, die mich mit Freude und Vertrauen auf all meinen Wegen unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit gehen in folgende Veröffentlichungen ein:

Figarella, K, Rawer, M, Kubata, B, Duszenko, M. Role of prostaglandins in African Trypanosomes. Molecular Parasitology Meeting XIV, Abs 233A. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2003.

Figarella, K, Uzcategui, NL, Duszenko, M. Induction of programmed cell death in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* by PGD₂ and its metabolites. Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting I, Abs. 207A. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2005.

Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata B, Lauber K, Madeo F, Wesselborg S and Duszenko M. Prostaglandin D₂ induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death and Differentiation*, 12(4): 335-346, 2005.

Figarella K, Uzcategui NL, Beck A, Schoenfeld C, Kubata BK, Lang F, and Duszenko M. Caspase-independent programmed cell death in *Trypanosoma brucei* by prostaglandins of J series involves oxidative stress, *submitted*.

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Schlafkrankheit	1
1.1.1. Bedeutung und Verbreitung	1
1.1.2. Chemotherapie und Prophylaxe	3
1.2. Der Erreger – <i>Trypanosoma brucei</i> –	5
1.2.1. Taxonomische Einordnung von <i>Trypanosoma brucei</i>	5
1.2.2. Entwicklungszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i>	6
1.2.3. Zellmorphologie	9
1.2.4. Zellzyklus	10
1.2.5. Differenzierung	11
1.2.6. Besonderheiten von <i>Trypanosoma brucei</i>	13
1.2.6.1. Polycistronische Transkription, trans-Spleißen und Kontrolle der Genexpression	13
1.2.6.2. Antigenvariation	13
1.2.6.3. Trypanothion	14
1.2.6.4. Glycosomen	16
1.3. Der Programmierte Zelltod	16
1.3.1. Programmierter Zelltod in höheren Eukaryonten	18
1.3.2. Programmierter Zelltod bei Einzellern	20
1.4. Eicosanoide: Prostaglandine	23
1.4.1. Entdeckung von Prostaglandinen	24
1.4.2. Nomenklatur von Prostaglandinen	25
1.4.3. Prostaglandinstoffwechsel	27
1.4.4. Physiologische Eigenschaften von Prostaglandinen	29
1.4.5. Ausgewählte Prostaglandine	29
1.4.5.1. Prostaglandin E ₂	29
1.4.5.2. Prostaglandin F _{2α}	30
1.4.5.3. Prostaglandin D ₂	30
1.4.5.4. Prostaglandine der J ₂ -Serie	31
1.5. Zielsetzung der Arbeit	33
2. Material und Methoden	35
2.1. Materialien	35

2.1.1. Verwendete Organismen	35
2.1.2. Chemikalien	36
2.1.2.1. Laborchemikalien	36
2.1.2.2. Radiochemikalien	39
2.1.2.3. Verwendete Antikörper	39
2.1.2.4. Kits	39
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	39
2.1.4. Geräte	40
2.1.5. Medien, Puffer und Lösungen	41
2.1.5.1. Kulturmedien für Trypanosomen	41
2.1.5.2. Puffern zur Trypanosomen Isolierung aus Blut	44
2.1.5.3. Puffer zur Herstellung von Trypanosomenlysate	45
2.1.5.4. Lösungen zur Trypsinierung von Fibroblasten	46
2.1.5.5. SDS-PAGE Gele – Herstellung und Färbung	47
2.1.5.6. Puffer für <i>Western Blot</i>	48
2.1.5.7. Giemsa-Färbung	49
2.1.5.8. TUNEL-Färbung	50
2.1.5.9. Immunfluoreszenz	50
2.1.5.10. Cytotoxizität <i>assay</i>	51
2.1.5.11. Elektronenmikroskopie	51
2.1.5.12. Lösungen für Dünnschichtchromatographie	53
2.1.5.13. Trennung und Identifizierung von Prostaglandinen	53
2.1.5.14. Lösungen zur FACS-Analyse	54
2.1.5.15. Puffer zur Sauerstoffverbrauchbestimmung	55
2.2. Methoden	56
2.2.1. Anzucht und Isolierung der Trypanosomen aus dem Blut	56
2.2.2. Herstellung von Stabilaten	56
2.2.3. Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen	57
2.2.4. Transformation der Blutform von <i>Trypanosoma brucei</i> zur prozyklischen Form	58
2.2.5. <i>In vitro</i> Kultivierung der prozyklischen Form	58
2.2.6. Kultivierung der <i>Microtus montanus</i> Fibroblasten	58
2.2.7. Trypsinierung von MEF Kulturen	59
2.2.8. Kultivierung vom pleomorphen Trypanosomen Stamm AnTat 1.1.	59
2.2.9. Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Substanzen auf	

das Wachstum von <i>T. brucei</i> unter <i>in vitro</i> Kultivierung	60
2.2.10. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC ₅₀)	60
2.2.11. Proliferationsassay mit methyl- ³ H-Thymidin	61
2.2.12. Transmissions- und <i>Scanning</i> - Elektronenmikroskopie	61
2.2.13. Immunfluoreszenz	63
2.2.14. TUNEL-Test	63
2.2.15. Färbung mit Monodansylcadaverin	64
2.2.16. Färbung des Mitochondriums mittels TMRE	64
2.2.17. Annexin-V-Färbung	65
2.2.18. Färbung mit Propidiumjodid zur Analyse des DNA-Gehaltes	65
2.2.19. Bestimmung von ROS mittels DCFH-DA	66
2.2.20. Färbung des Kernes und der Kinetoplast mittels DAPI	66
2.2.21. Extraktion und Dünnschichtchromatographie von PG	67
2.2.22. Bestimmung der PGD ₂ -Abnahme durch HPLC	67
2.2.23. Trennung und Identifizierung der PGD ₂ -Metabolite	68
2.2.24. Bestimmung der Albuminbindung von Prostaglandin D ₂	69
2.2.25. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	69
2.2.26. SDS-PAGE Gele und <i>Western Blot</i> Analyse	69
3. Ergebnisse	71
3.1. Untersuchung des <i>in vitro</i> Effektes von Prostaglandinen auf das Zellwachstum monomorpher Trypanosomen	71
3.1.1. Wachstumshemmung von monomorphen Trypanosomen durch PG	71
3.1.2. Bestimmung der IC ₅₀ von Prostaglandinen	73
3.1.3. Bestimmung der Zellproliferation	75
3.2. Wirkung von PG auf das Zellwachstum pleomorpher Trypanosomen	76
3.3. Effekt von PGD ₂ auf cAMP-induzierte Trypanosomen	79
3.4. Bestimmung der Prostaglandin D ₂ -Bindung an Albumin	80
3.5. Untersuchung des PGD ₂ -Stoffwechsels in Trypanosomen-Kulturen	82
3.5.1. Dünnschichtchromatographie	82
3.5.2. Trennung und Identifizierung der PGD ₂ -Metabolite durch HPLC und LC-ESI/MS	83
3.6. Untersuchung des Effektes der verschiedenen PGD ₂ -Metabolite auf das Zellwachstum monomorpher Trypanosomen	88
3.7. Untersuchung der Differenzierung nach Behandlung mit PGD ₂ oder	

seiner Metabolite	91
3.8. Untersuchung der Morphologie nach Behandlung mit Prostaglandinen	93
3.8.1. Morphologie von PGD ₂ -behandelten Trypanosomen	93
3.8.2. Morphologie der mit J-Metaboliten behandelten Trypanosomen	95
3.9. Untersuchung des programmierten Zelltodes II (Autophagie) in PGD ₂ -behandelten Trypanosomen	98
3.10. Untersuchung des programmierten Zelltodes I (Apoptose-like PCD) nach Behandlung mit Prostaglandinen mittels FACS Analyse	101
3.10.1. PCD Nachweis nach Behandlung mit PGD ₂	101
3.10.2. PCD Nachweis nach Behandlung mit Metaboliten der J-Serie	104
3.10.3. Nachweis von DNA-Brüchen nach Behandlung mit Prostaglandinen durch den TUNEL-Test	106
3.10.4. Bestimmung der Phosphatidylserin-Exposition nach Prostaglandin-Behandlung	107
3.11. Aufhebung des Prostaglandin-induzierten PCD durch Cycloheximide	109
3.12. Untersuchung des intrazellulären oxidativen Stresses nach Prostaglandin-Behandlung	110
3.13. Untersuchung der Funktionalität des Mitochondriums	113
4. Diskussion	115
4.1. Hemmung des Zellwachstums von <i>Trypanosoma brucei</i> durch Behandlung mit PGD ₂	115
4.2. Induktion von Zellzyklus-Arrest und Zelltod durch PGD ₂	116
4.3. Metabolismus von Prostaglandin D ₂	118
4.4. Induktion von programmiertem Zelltod durch J-Serie Derivate	119
4.5. Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Prostaglandine	120
4.6. Aufhebung des Prostaglandin-Effektes	121
4.7. Mögliche Beteiligung des Mitochondriums an der ROS-Produktion	122
4.8. Schlussfolgerung	123
5. Zusammenfassung	125
6. Literaturverzeichnis	128

Abkürzungen

AIF	<i>apoptosis inductor factor</i>
AnTat	Antwerpen Trypanozoon <i>antigenic type</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonat
BF	Blutform der Trypanosomen
BSA	bovine serum albumin
cAMP	Adenosin-3'-5'-cyclo-monophosphat
CDKs	<i>cyclin-dependent kinases</i>
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
COX	Cyclooxygenase
CRKs	<i>cdc2-related kinases</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCFH-DA	Dichlordihydrofluorescein diacetat
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHLA-DH	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
DIF	Differenzierungsfaktor
DFMO	Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothretinol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	<i>Electrospray Ionization Chromatographie</i>
EP	epimastigote Form
EBSS	<i>Earle`s balanced salt solution</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothicyanat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDNA	Kinetoplasten-DNA

LS	<i>long slender</i> Form der Trypanosomen
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MC	metazyklische Form
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MITat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigenic type</i>
NSAID	<i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	<i>Poly ADP-Ribose Polymerase</i>
PC	Procyklische Fliegenform der Trypanosomen
PCD	Programmierter Zelltod
PG	Prostaglandin
PI	Protease-Inhibitoren
PPARs	<i>peroxisome proliferator-activator receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHAM	Salicylhydroxamsäure
SIF	<i>Stumpy inductor factor</i>
SS	<i>short stumpy</i> Form der Trypanosomen
TAO	Alternative Oxidase
TbPGFS	Prostaglandin F _{2α} Synthase von <i>Trypanosoma brucei</i>
TDB	<i>Trypanosome dilution buffer</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyendiamin
TMRE	Tetramethylrodaminester
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptors</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
TXN	Tryparedoxin
VSG	<i>variant surface protein</i>
WHO	Gesundheitswelt Organisation

1 Einleitung

1.1 Die Schlafkrankheit

1.1.1 Bedeutung und Verbreitung

Der Erreger der Schlafkrankheit, die einzelligen Trypanosomen, konnte an der Wende vom 19 zum 20 Jahrhundert von Dutton und Farde identifiziert werden. Im Jahre 1895 zeigte Bruce, dass sie durch den Stich der Tsetse-Fliege (Diptera, Genus *Glossina*) übertragen werden (Baker, 1995; Fevre *et al.*, 2004).

Tsetse-Fliegen bewohnen in Afrika ein ca. 10 Mio. km² großes Gebiet, den sogenannten „Tsetse-Gürtel“. Dieser erstreckt sich vom 14° nördlicher bis zum 29° südlicher Breite, er beginnt also direkt unterhalb des Sahel im Norden Afrikas und reicht bis über den Sambesi im Süden (Kuzoe, 1993). Heute sind über 60 Mio. Menschen in 36 afrikanischen Ländern dem ständigen Risiko einer Erkrankung durch Trypanosomen ausgesetzt, jedoch stehen derzeit nur 3 bis 4 Millionen unter ärztlicher Überwachung (WHO, 2000; Cattand *et al.*, 2001). Aufgrund der Kolonialisierung, dem Eisenbahnbau und schließlich dem Einzug von Fahrzeugen in Afrika wurde der Erreger, der bis zum Ende des 19. Jahrhunderts auf bestimmte Regionen begrenzt war, auf andere Bereiche ausgedehnt. So breitete sich die Schlafkrankheit epidemisch aus und forderte Anfang des letzten Jahrhunderts hohe Verluste. In den folgenden Jahrzehnten setzte eine intensive Bekämpfung der Krankheit ein und ihre Inzidenz ging stark zurück. In den 1950er Jahren hatte man die Situation durch systematische Überwachung der Bevölkerung in Risikogebieten und Vektorenbekämpfung zumindest teilweise unter Kontrolle gebracht (Kuzoe, 1993). Allerdings blieben immer noch endemische Gegenden bestehen. In den 1970er Jahren stieg die Zahl der Infizierten schlagartig an, und die Krankheit endete ohne rechtzeitige Behandlung nach quälenden zentralnervösen Symptomen mit dem Tod. Die Bevölkerung wird noch lange an den sozialen und ökonomischen Folgeschäden leiden, die hauptsächlich auf eine Dezimierung der Arbeitskräfte und eine damit einhergehende Unterbrechung der landwirtschaftlichen Aktivitäten zurückzuführen sind (Cattand *et al.*, 2001). Da eine vollständige Kontrolle

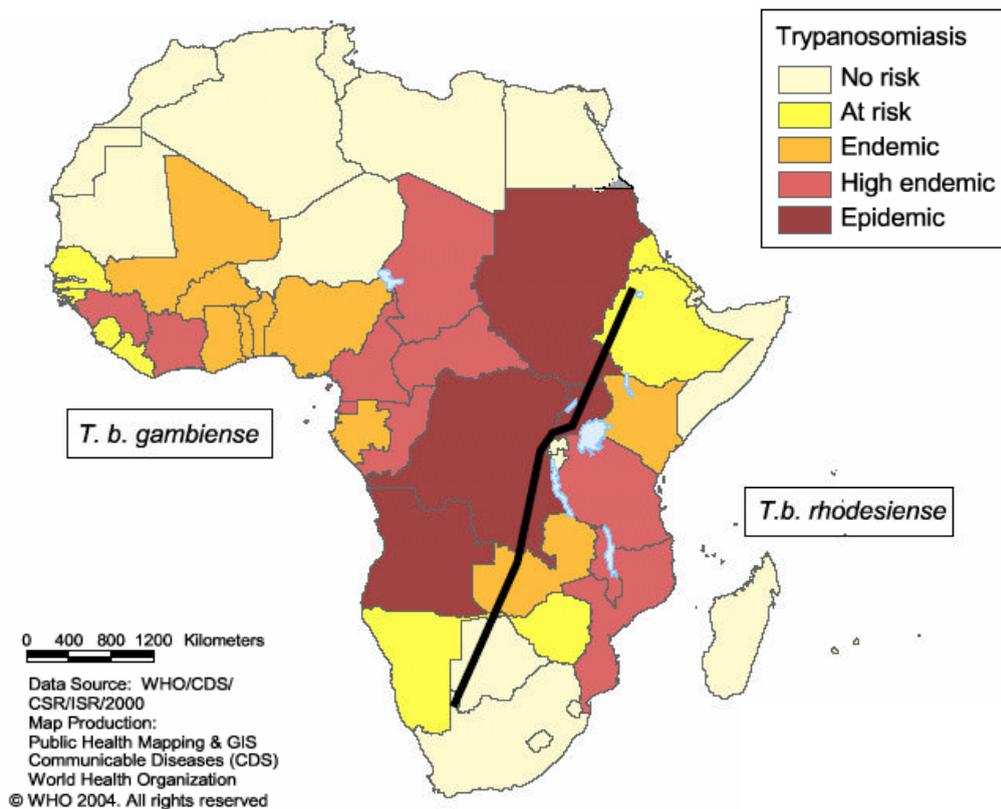


Abbildung 1.1. Verbreitungsgebiet von *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*. [Quelle: WHO, 2004]

einer Epidemie enorme Kosten bedeutet, sind die Länder besonderes betroffen, die aufgrund ihres niedrigen Etats ohne finanzielle Hilfe von außen kaum Reaktionsspielraum haben. Diese Tatsachen machen die Schlafkrankheit zu einem auch heute noch schwerwiegenden Gesundheitsproblem in Afrika. Sie gilt als eine der Hauptursachen für die Entvölkerung großer Gebiete, und die Angst der Einwohner vor einer Infektion führt zusätzlich dazu, dass potentiell fruchtbares Land gemieden wird. Die Folge ist eine Hemmung der landwirtschaftlichen Entwicklung und Produktion in diesen Gebieten (Kuzoe, 1991; 1993). Heute sind in den Regionen Afrikas südlich der Sahara 500.000 Menschen mit dem Erreger der Schlafkrankheit infiziert. Pro Jahr werden über 40.000 Neuerkrankungen gemeldet (Cattand *et al.*, 2001; Jannin und Cattand, 2004). Die Vereinten Nationen (2000) schätzen sogar 300.000 jährliche Neuerkrankungen, von denen aber nur 10 bis 15% diagnostiziert und behandelt werden. Pro Jahr werden der Trypanosomiasis 70.000 Todesfälle zugeschrieben (WHO, 2003). Trotzdem wird dieser Krankheit in der letzten Zeit international nur wenig Beachtung geschenkt, denn die ländlichen und dadurch armen Gegenden, in denen endemische

Foci auftreten, sind oft lokal-politisch von geringem Interesse (Smith *et al.*, 1998). Durch die geringe Kontrolle in den letzten Jahren ist die Schlafkrankheit deswegen alarmierend angestiegen (Cattand *et al.*, 2001).

1.1.2 Chemotherapie und Prophylaxe

Da keine protektive Immunisierung möglich ist, wird die Chemotherapie als älteste und am häufigsten angewandte Methode zur Bekämpfung der afrikanischen Trypanosomiasis verwendet. Das größte Problem beim Einsatz von Medikamenten ist jedoch die Resistenz und Kreuzresistenz, welche die Trypanosomen immer häufiger entwickeln. Ein Grund für diese Tatsache ist die unsachgemäße Handhabung der Medikamente von Farmern in Gebieten mit hohem Infektionsdruck und dementsprechend hohem Medikamentenverbrauch.

Die Behandlungsstrategie hängt in erster Linie vom Stadium der Krankheit ab. Im Spätstadium der Schlafkrankheit befinden sich die Parasiten im *Liquor cerebrospinalis*. Präparate, die zur Behandlung dieses Stadiums eingesetzt werden, müssen die Blut-Hirn-Schranke passieren können.

Fünf verschiedene Trypanozide sind zur Therapie der Schlafkrankheit eingesetzt worden (Pepin und Milord, 1994; WHO, 1998; Schofield und Maudlin, 2001) (Tabelle 1.1).

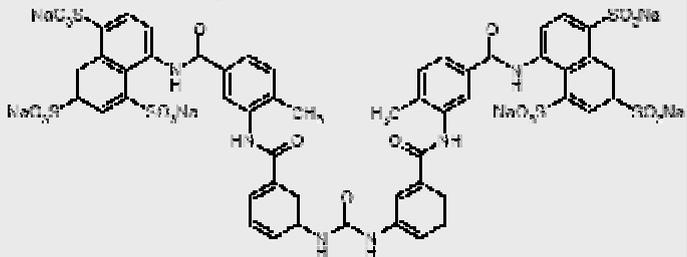
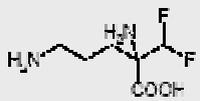
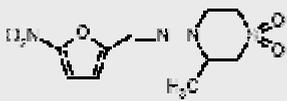
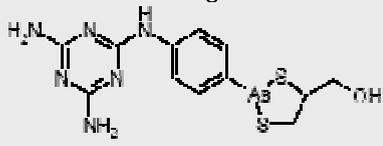
Die Haus- und Nutztiere, als Erreger-Reservoir für *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*, werden mit den Salzen folgender Verbindungen behandelt (Peregrine, 1994):

- Diminazenazeturat (Berenil®, Veriben®), ein aromatisches Diamidin, wirkt außer bei *T. congolense*- und *T. vivax*- auch bei *T. b. brucei*-Infektionen von Rindern, Schafen, Ziegen und Schweinen. Diese Verbindung ist zur Zeit das in Afrika am häufigsten eingesetzte Medikament zur Trypanosomenbehandlung von Tieren.
- Isometamidiumchlorid (Samorin®, Trypamidium®) ist ein Hybridmolekül, welches Teile von Diminazen (s.o.) und von Homidium, einem Phenanthridin, beinhaltet (Kinabo, 1993). Es wird zur Prophylaxe und Therapie von *T. brucei*-, *T.*

congolense-, *T. vivax*-, *T. evansi*- und *T. simiae*-Infektionen der Rinder, Schafe, Ziegen, Esel, Pferde, Kamele und Schweine benutzt.

- **Suramin** (Naganol®) gilt als Mittel der Wahl bei *T. evansi*-Infektionen von Kamelen und Pferden und wird im Frühstadium der Schlafkrankheit bei *T. b. rhodesiense* in Menschen verwendet.
- **Quinapyramin** (Antrycide®, Trypacide®) Seit 1984 ist es aufgrund seiner Toxizität und Resistenzentwicklung nur noch zur Behandlung von Kamelen und Pferden zugelassen.
- **Melarsomin** (Mel Cy®, Cymelarsan®), eine Melaminyl-Thioarsenverbindung, wirkt gegen alle Trypanosomen des Subgenus *Trypanozoon*, ist aber nur für die Behandlung von Kamelen in Gebrauch freigegeben.

Tabelle 1.1. Eingesetzte Medikamente gegen die afrikanische Trypanosomiasis

Präparat	Chemische Gruppe	Stadium
Pentamidin (Pentamidine®) (Lomidine®)	Aromatisches Diamin 	Frühstadium der Schlafkrankheit <i>T. b. gambiense</i>
Suramin (Germanin®)	sulfoniertes Naphtylamin 	Frühstadium der Schlafkrankheit <i>T. b. rhodesiense</i>
Eflornithin (Ornidyl®)	Difluoromethyl-ornithin (DFMO) 	Spätstadium der Schlafkrankheit <i>T. b. rhodesiense</i> und <i>gambiense</i>
Nifurtimox (Lampit®)	5-Nitrofuran 	Spätstadium der Schlafkrankheit <i>T. b. rhodesiense</i> und <i>gambiense</i>
Melarsoprol (Arsobal®) (Mel B®),	trivalentes Arsenpräparat aus der Gruppe der Melaminophenyl-arsen-Verbindungen 	Spätstadium der Schlafkrankheit <i>T. b. rhodesiense</i> und <i>gambiense</i>

1.2. Der Erreger – *Trypanosoma brucei* –

Trypanosoma brucei ist ein gestreckter spindelförmiger Flagellat, der durch die Tsetse-Fliege *Glossina sp.* zwischen Säugetieren übertragen wird. Die drei morphologisch nicht zu unterscheidenden Unterarten, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* und *T. b. brucei*, verursachen beim Menschen die Schlafkrankheit (*gambiense*, *rhodesiense*) die tödlich verläuft, wenn sie nicht behandelt wird, und die Tierseuche Nagana (*brucei*), die Rinder, Schafe, Ziegen und Schweine befällt. *T. b. brucei* ist nicht human pathogen, da die HDL-Fraktion des menschlichen Serums für diese Unterart toxisch ist. Die Parasiten persistieren oft jahrelang in ihren Wirten, bevor diese schließlich sterben, wenn sie nicht medikamentös behandelt werden. Bisher ist es nicht gelungen, einen Impfstoff oder gut wirksame Medikamente ohne schwere Nebenwirkungen zu entwickeln.

1.2.1. Taxonomische Einordnung von *Trypanosoma brucei*

Die der Ordnung der Kinetoplastida angehörigen Trypanosomen trennten sich sehr früh in der Evolution von der eukaryontischen Hauptlinie. Deren taxonomische Klassifizierung richtet sich nach morphologischen und biologischen Charakteristika (Abbildung 1.2). Der Ordnungsname ist auf die Präsenz des Kinetoplasts zurückzuführen. Je nach Anzahl der Flagellen leiten sich die Unterordnungen Trypanosomatina (ein Flagellum) und Bodonina (zwei Flagellen) ab. Die Familie Trypanosomatidae, der unter anderem die Gattung *Trypanosoma* angehört, zählt zu den Trypanosomatina. Die Gattung *Trypanosoma* gliedert sich in die beiden Sektionen Salivaria und Stercoraria. Diese Klassifizierung richtet sich nach dem Vermehrungsort im Vektor und der Übertragungsart. Die der Sektion der Stercoraria angehörenden Parasiten vermehren sich im Hinterdarm des Vektors und werden durch die Faezes übertragen. Die Vervielfachung der Trypanosomen der Salivaria Sektion findet im vorderen Teil des Verdauungstraktes des Vektors statt, daher werden diese Parasiten durch den Speichel übertragen. Zu den Stercoraria gehört der Erreger der Chagaskrankheit in Mittel- und Südamerika, *T. cruzi*, der durch Raubwanzen übertragen

wird. Zu den Salivaria gehören neben der *T. brucei* Artgruppe auch *T. congolense* und *T. vivax*, Erreger der Rinderseuche in Afrika, *T. evansi* der Erreger der Surra und *T. equiperdum*, der die Kreuzlähme beim Pferd verursacht.

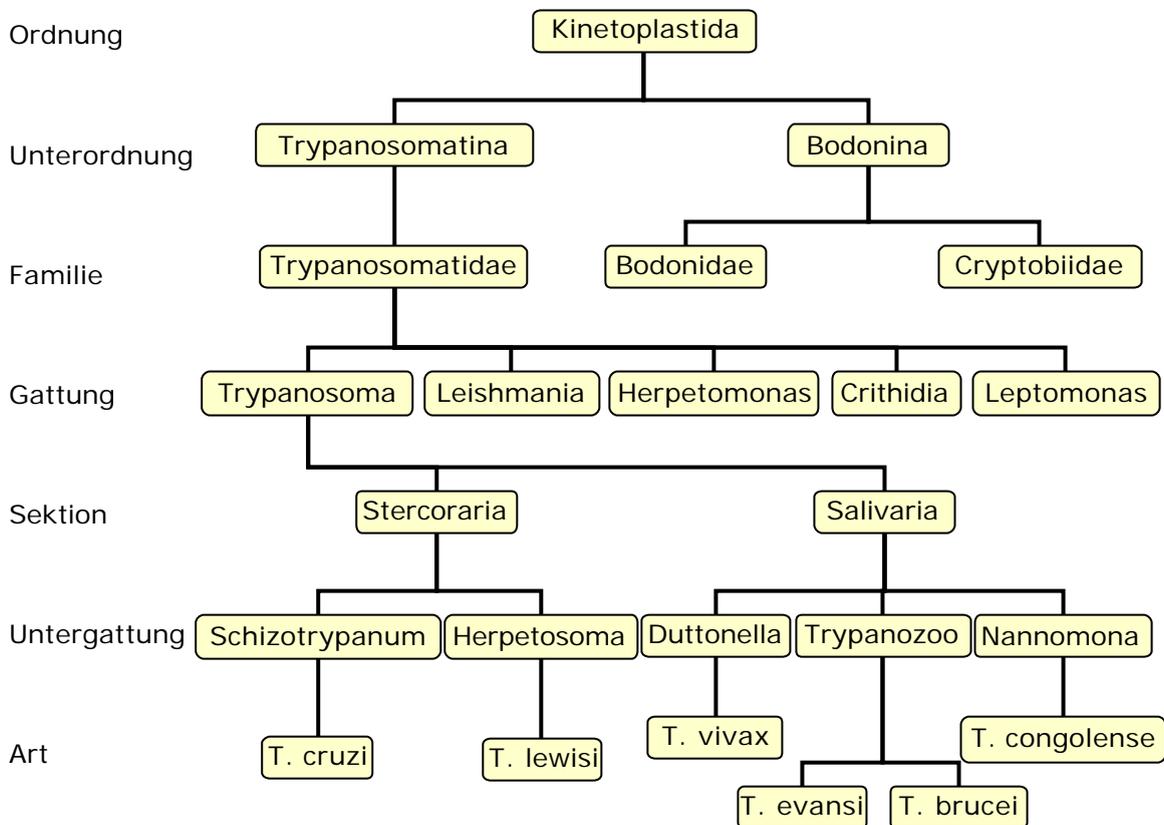


Abbildung 1.2. Klassifizierung der Kinetoplastida.

1.2.2. Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei*

Afrikanische Trypanosomen sind extrazelluläre Parasiten, die sich durch ungeschlechtliche Zweiteilung im Blut und Gewebe von Säugern vermehren. Im Gegensatz zu den südamerikanischen Trypanosomen (*T. cruzi*) besitzen sie kein intrazelluläres Vermehrungsstadium. Der Lebenszyklus von *T. brucei* zeichnet sich durch das alternierende Auftreten von proliferierenden Stadien und im Zellzyklus arretierten teilungsinaktiven Formen aus (Abbildung 1.3). Da ein vollständiger Zyklus unterschiedliche Lebensräume passiert, sind drastische morphologische und stoffwechselphysiologische Veränderungen der Zellen unvermeidlich.

Während der Blutmahlzeit einer infizierten Tsetsefliege gelangen die Trypanosomen in das dermale Bindegewebe des Säugerwirtes, wo sie eine lokale Entzündung (Trypanosomenschanter) hervorrufen (Barry und Emery, 1984). Sie dringen aber gleichzeitig in die Lymph- und Blut-Bahn ein. Die proliferierende *long slender* (LS) Form vermehrt sich durch Zweiteilung. Sie besitzen ein rudimentäres Mitochondrium und gewinnen infolgedessen ihre Energie ausschließlich aus der im Blut vorhandenen Glucose (Fairlamb, 1989; Opperdoes und Borst, 1977). Ab einer bestimmten Zelldichte differenzieren die teilungsaktiven LS Formen zu Zellzyklus arretierten *short stumpy* (SS) Formen. Diese unterscheiden sich morphologisch durch ihre gedrungene Form und ein verkürztes Flagellum von den LS Formen. Stoffwechselphysiologisch verfügen sie über ein teilweise funktionelles Mitochondrium, in dem Enzyme wie Pyruvat-Dehydrogenase, Prolinoxidase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase exprimiert werden (Flynn und Bowman, 1973).

Sie sind somit präadaptiert an das Leben im Insektenvektor, in dem Prolin die Hauptenergiequelle darstellt. Da nicht alle Trypanosomen differenzieren, kann man beide Formen im Blut beobachten.

Regelmäßig entwickelt sich eine neue Population der Blutformen durch die Expression einer neuen VSG-Variante (*variant surface glycoprotein*) und besitzt somit eine veränderte Zelloberfläche. Auf diese Weise sind sie in der Lage, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen. Die Fieberepisoden des Wirts fallen anders als bei manchem Malaria-Erreger nicht mit dem wellenförmigen Verlauf der Parasitämie zusammen. In der letzten Phase der Infektion dringen die Trypanosomen über die Blut-Liquor-Schranke in das zentrale Nervensystem ein und lösen eine Meningoencephalitis aus (Chimelli und Scaravilli, 1997).

Die SS Formen sterben nach drei bis vier Tagen, wenn sie nicht von einer Tsetsefliege (*Glossina ssp.*) aufgenommen werden (Tyler, 2003). Sofern sie den Mitteldarm der Fliege erreichen, transformieren sie innerhalb von 48-72 Stunden zu teilungsaktiven prozyklischen (PC) Formen, welche statt VSG Procyclin als Hauptoberflächenprotein exprimieren (Mowatt und Clayton, 1988; Roditi *et al.*, 1989). Das Mitochondrium der PC Formen ist hier nun vollständig entwickelt und erfüllt die bekannten Stoffwechselfunktionen: Citratzyklus und Atmungskette (Priest und Hajduk, 1994). Im Verlauf der nächsten zehn Tage wandern die Zellen über den Oesophagus,

Pharynx und Hypopharynx in die Speicheldrüse ein. An dieser Stelle findet eine weitere Differenzierung zu teilungsfähigen epimastigoten Zellen statt. Die epimastigote (EP) Form ist durch einen vor dem Kern liegenden Kinetoplasten und die Anheftung an die Epithelzellen von allen anderen trypomastigoten Formen zu unterscheiden. Abschließend wandelt sich die EP Zellen zu der für den Säuger-Wirt infektiöse teilungsinaktive Form, die metazyklische (MC) Form. Ihr Oberflächenmantel besteht wieder aus VSG, und wenn sie beim Stich einer Tsetsefliege übertragen werden, kann der Lebenszyklus erneut beginnen.

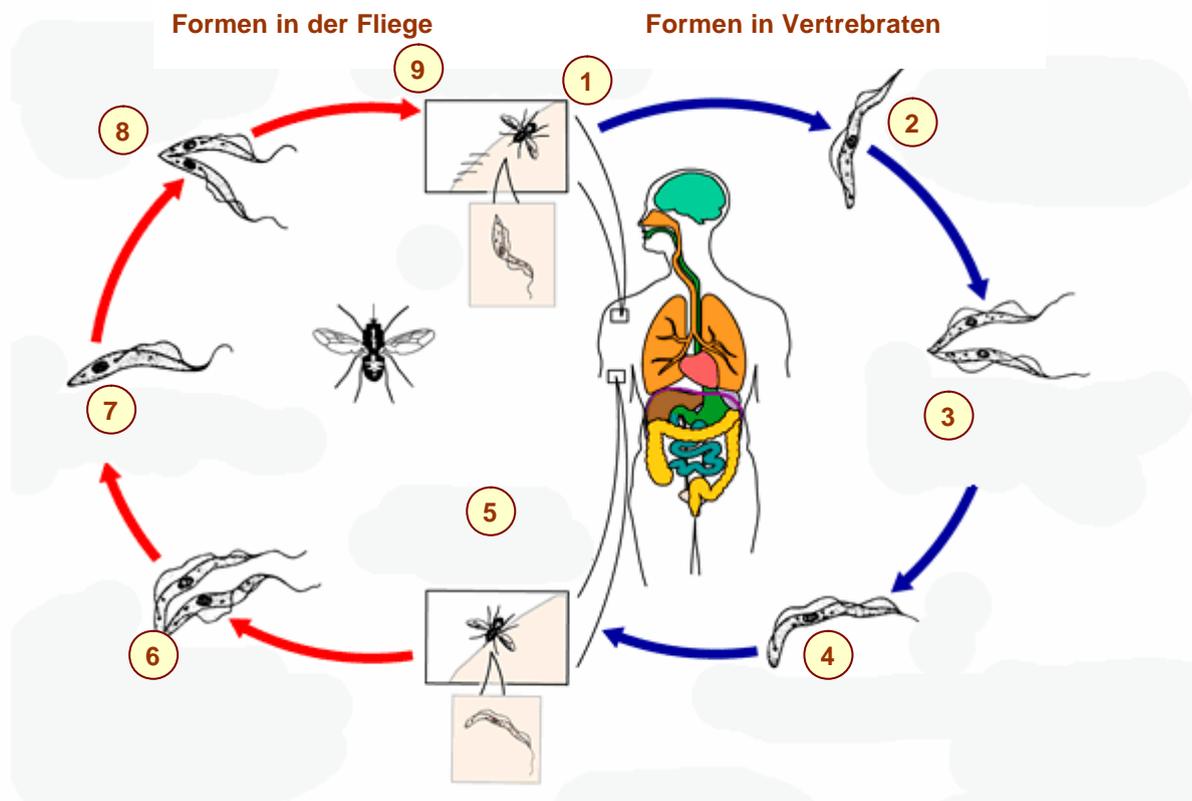


Abbildung 1.3. Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*. [1] Fliege Mahlzeit und dadurch Übertragung von Trypanosomen. [2] Transformation zur LS Form. [3] Vermehrung durch Zweiteilung. [4] Differenzierung zur Fliegeninfektösen SS Form. [5] Aufnahme von Trypanosomen während die Fliegenmahlzeit. [6] Transformation zur PC Form und Vermehrung durch Zweiteilung. [7] Transformation zur EP Form. [8] Vermehrung der EP Form und Transformation zur Humanpathogenen MC Form. [9] Übertragung von Trypanosomen durch den Stich der Tsetse Fliege.

1.2.3. Zellmorphologie

Trypanosomen gehören zu der Unterordnung Trypanosomatina, woraus ersichtlich ist, dass sie ein einziges Flagellum besitzen, welches am Hinterende der Zelle aus der Flagellumtasche entspringt. Im Gegensatz zum intrazellulären Aufbau ändert sich die äußere Gestalt mit dem jeweiligen Stadium des Lebenszyklus. Die Ausmaße der Zelle betragen 15 bis 40 µm in der Länge und 0,5 bis 2 µm in der Breite. Parallel angeordnete Mikrotubuli verlaufen unterhalb der Zelloberfläche und verleihen der Zelle nicht nur ihre charakteristische Form sondern auch Stabilität (Hemphill *et al.*, 1991; Gull, 1999). VSG oder Procyclin, Proteine die an der Zellmembran einen Oberflächenschicht bilden, schützen die Blutformen bzw. die Fliegenformen gegen das Immunsystem des jeweiligen Säugerwirts und die Verdauungsenzyme im Darm der Fliege.

Eingeschlossen im Zytoplasma können zwei bemerkenswerte Sonderentwicklungen beschrieben werden. Erstens sind anstelle von den klassischen Peroxisomen die trypanosomenspezifischen Glycosomen zu finden. Sie enthalten die meisten Enzyme der Glycolyse. Zweitens besitzen Trypanosomen ein einziges Mitochondrium, das sich schlauchartig durch die ganze Zelle zieht und in den verschiedenen Entwicklungsstadien Veränderungen aufweist. In einer Aussackung in der Höhe der Flagellumtasche ist die gesamte mitochondriale DNA (kDNA) lokalisiert. Die kDNA präsentiert eine lang gestreckte zirkuläre Struktur, wobei etwa 50 *maxicircles* (20-38 Kilobasen) und mehrere tausend *minicircles* (ca. 1 Kilobase) miteinander verknüpft sind (Barrois *et al.*, 1981; Englund *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1995; Lukes *et al.*, 2002). Die DNA der *maxicircles* codiert für die ribosomale RNA (rRNA), sowie für einige der mitochondrialen Proteine der oxidativen Phosphorylierung und der Elektronentransportkette (Simpson, 1987; Simpson und Thiemann, 1995). Auf den *minicircles* ist ein Teil der *guideRNAs* lokalisiert, die für das RNA-*editing* der *maxicircle* Transkripte benötigt werden (Pollard *et al.*, 1990; Sturm und Simpson, 1990). Der Zellkern enthält 11 Chromosomen. Da findet sich das 7×10^7 bp große diploide Genom von *T. brucei* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei/). Die Kernteilung erfolgt durch eine geschlossene Mitose, deshalb findet nur eine geringfügige Chromosomenkondensation statt (Van der Ploeg *et al.*, 1984). Die bereits

beschriebenen Strukturen ausgenommen, verfügen die Trypanosomen über die von höheren Eukaryonten bekannten Zellorganellen (Abbildung 1.4).

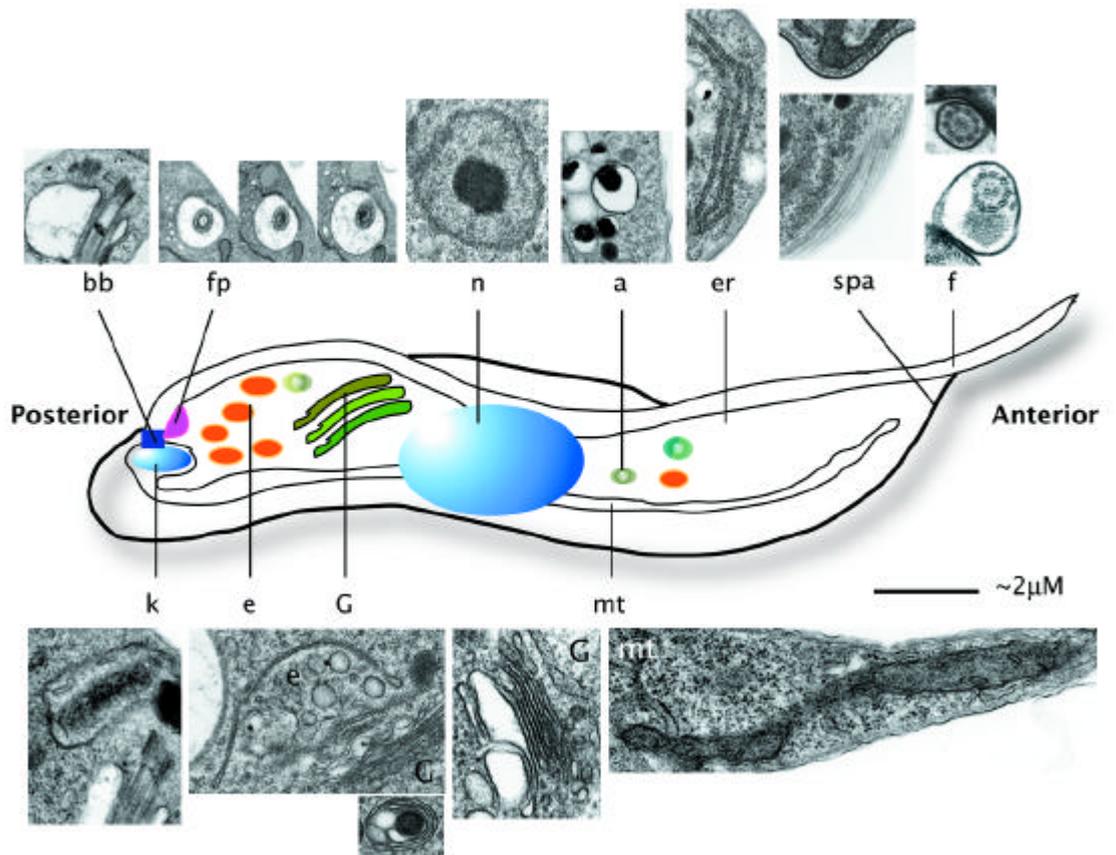


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der Zellmorphologie. Am Rahmen sind Elektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellkompartimente zu sehen. Die dargestellten Strukturen sind: Flagellumtasche (fp), Basalkörper (bb), Kern (n), subpelikularis Mikrotubuli Array (spa), Flagellum (f), Kinetoplast (k), Endosomen (e), Golgi Apparat (G), Mitochondrium (mt), Acidocalcisomen (a) und Endoplasmatische Retikulum (er) [Quelle: <http://homepage.mac.com/mfield/lab/PDFs/Microtex200103.pdf>].

1.2.4. Zellzyklus

Der Zellzyklus von *Trypanosoma brucei* besitzt sowohl in der Blut- als auch in der prozyklischen-Form, die normalen sequenziellen G1, S, G2 und M Verlaufphasen (Woodward und Gull, 1990). Die Präsenz eines einzigen Mitochondriums stellt eine

Abweichung von dem Hefe- und Säugerzellen-Zellzyklus dar, da das Mitochondrium synchron mit dem Kern zur Teilung kommen muss (Ploubidou *et al.*, 1999).

Das erste Ereignis in der Zellteilung ist die Umwandlung des Pro-Basalkörpers in einen zweiten Basalkörper und daraus die Bildung eines neuen Flagellums (Robinson und Gull, 1991). Das Flagellum verlängert sich und das *paraflagellar rod* wird ausgebildet. Nachdem sich die kDNA in einer eigenen Replikationsphase verdoppelt hat und die Kinetoplastteilung vollzogen ist, werden die Basalkörper voneinander getrennt. Kurz darauf wird die nukleare DNA dupliziert und anschließend findet die Zellteilung statt.

Die Progression des Zellzyklus in Eukaryonten ist ein feiner und komplizierter Mechanismus, der durch eine Familie von *cyclin-dependent kinases* (CDKs) und zusätzliche Partnermoleküle reguliert wird (Sogin, 1991). In Trypanosomen wird eine komplexe Regelung vermutet, da eine ganze Reihe von Genen mit großer Homologie zu CDK identifiziert geworden ist. Sie wurden kloniert und als *cdc2-related kinases* (CRKs) bezeichnet. CRK1-4 und CRK6 haben 40-50% Identität mit der Aminosäuresequenz von Hefe- und Säugerzellen-CDKs. Sie verfügen über die *cyclin-binding box* „PSTAIR“, die „DSEI“ *box* und phosphorylierbare Threonin- und Tyrosin-Reste (Van Hellemond *et al.*, 2000). Allerdings existieren einige Differenzen, wie die längere N-terminale Sequenz bei CRK2 und 3 und zwei zusätzliche Domänen in der katalytischen Box von CRK4 (Brown *et al.*, 1992). Daher wird angenommen, dass die Zellzyklusregulation bei Trypanosomen auf molekularem Niveau von der anderer eukaryontischer Zellen abweicht.

1.2.5. Differenzierung

Die Differenzierungsprozesse sind stark mit dem Zellzyklus verknüpft. Der Übergang zur Differenzierung fordert den Eintritt in die G₀-Phase, was einen Mechanismus zur Regulation des Wachstums darstellt. Abhängig von äußeren Bedingungen wird spät in der G₁-Phase entschieden, ob die Zelle in die S-Phase zur Teilung kommt oder in die G₀-Phase zur Differenzierung übergeht (Hartwell *et al.*, 1974; Pardee, 1989). Die Initialisierung der Differenzierung von Slender- zu Stumpy-

Formen und von diesen zu prozyklischen Formen wird durch externe Änderungen hervorgerufen. Beispielsweise können sich Bultformen zu prozyklischen Formen umwandeln, wenn sie mit cis-Aconitat inkubiert werden (Brun und Schönenberger, 1981; Overath *et al.*, 1986). Die folgenden Bedingungen und Substanzen sind ebenfalls in der Lage, Differenzierungs- und Transformations-Prozesse zu induzieren:

- *In vitro* Kultivierung ohne Wechsel des Kulturmediums: Bildung von Stumpy-like Formen (Hamm *et al.*, 1990; Hesse *et al.*, 1995)
- Die Zelldichte: Induktion der Slender- zu Stumpy- Form Differenzierung (Hesse *et al.*, 1995; Reuner *et al.*, 1997; Vassella *et al.*, 1997).
- Die cytoplasmatische Ca^{++} -Konzentration: Induktion der Stumpyform (Stojdl und Clarke, 1996).
- Säuren und proteolytischer Stress: Transformation zu prozyklischer Form (Mutomba und Wang, 1998; Rolin *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 2000).
- Aphidicolin und Hydroxylharnstoff (Mutomba und Wang, 1996).

Die genaue Regulation der Differenzierungsprozesse ist noch unklar. Obwohl in *Trypanosoma brucei* eine Reihe von Molekülen gefunden wurde, die in höheren Eukaryonten wichtige Bestandteile von Signalwegen sind, ist es bis heute noch nicht gelungen, eine vollständige Signalkette bei diesem Parasiten aufzuklären. Bisher sind nur einzelne Beobachtungen beschrieben worden, wie z.B. Unterschiede im Proteinphosphorylierungsmuster der verschiedenen Formen des Parasiten (Aboagye-Kwarteng *et al.*, 1991; Parsons *et al.*, 1991; 1993; 1994). Ebenso ist die cAMP-Konzentration nicht konstant. Durch die Parasitenzunahme im Wirt steigt die cAMP-Konzentration bis zum Erreichen der maximalen Dichte an und nimmt nach Differenzierung zu nicht proliferierenden SS-Zellen wieder ab (Mancini und Patton, 1981). Die Zellen sekretieren einen Faktor (DIF oder SIF), der bei einer kritischen Konzentration Zellzyklusarrest in der G1-Phase und die Differenzierung von LS- zu SS-Formen induziert (Hesse *et al.*, 1995; Vasella und Boshart, 1996). Jedoch blieben bis heute seine Struktur und der darauf folgende Signalweg ungeklärt.

1.2.6. Besonderheiten von *Trypanosoma brucei*

1.2.6.1. Polycistronische Transkription, *trans*-Spleißen und Kontrolle der Genexpression

Bei *T. brucei* liegen die meisten Gene in polycistronischen Transkriptionseinheiten vor. Zur Transkription eines Gens wird zunächst die entsprechende polycistronische Transkriptionseinheit in eine Vorläufer-mRNA umgeschrieben, aus der die einzelnen mRNA-Moleküle herausgeschnitten werden. Die Prozessierung der Primärtranskripte durch 5'-*trans*-Spleißen und 3'-Polyadenylierung erfolgt posttranskriptionell. Das 5'-*trans*-Spleißen eines Gens ist über einen zwischen den Genen liegenden Polypyrimidintrakt mit der 3'-Polyadenylierung des stromaufwärts gelegenen Gens funktionell gekoppelt (Sutton und Boothroyd 1986; Vassella *et al.*, 1994; Matthews *et al.*, 1994; Schürch *et al.*, 1994). Beim 5'-*trans*-Spleißen wird eine 39 Nukleotide lange Miniexonsequenz, die bereits mit einer 7-Methylguanოსinkappe versehen ist, an das 5'Ende addiert. Die 1,35 kb lange Miniexon-DNA-Einheit liegt in mindestens 200 Kopien im *T. brucei* Genom vor (Nelson *et al.*, 1983).

Die Kontrolle der Genexpression erfolgt posttranskriptionell, weshalb das Expressionsmuster von Genen einer Transkriptionseinheit sehr unterschiedlich sein kann (Vanhamme und Pays, 1995). Am besten untersucht ist die Regulation der Genexpression von VSG und Procyclin (Borst *et al.*, 1998; Vanhamme und Pays, 1998; Hotz *et al.*, 1998). Regulatorische Sequenzen wurden bisher nur in der nicht translatierten Region des 3' Endes (3'-UTR) gefunden (Hug *et al.*, 1993; Hehl *et al.*, 1994; Hotz *et al.*, 1995; Berberof *et al.*, 1995; Schürch *et al.*, 1997). Nur wenige Promotoren wurden bis jetzt in *T. brucei* identifiziert: der Promoter für die ribosomale RNA, für Procyclin, VSG und für tRNA Gene (Vanhamme und Pays, 1995).

1.2.6.2. Antigenvariation

Am Ende der 1960iger Jahre wurde der erste experimentelle Hinweis auf eine protektive Proteinhülle bei den Trypanosomen gefunden (Vickerman, 1969). Es handelt

sich hierbei um einen Oberflächenmantel, der aus etwa 10^7 identischen Glycoproteinmolekülen (VSG; *variant surface glycoprotein*) besteht. Jeder Trypanosomenklon präsentiert einen einzigen VSG Typ (Cross, 1975). Da die VSG Moleküle immunogen sind, werden gegen das zu einem Zeitpunkt exprimierte VSG Antikörper gebildet, was zur Vernichtung dieser Trypanosomenpopulation führt. Die Parasiten, die einen anderen Typ von VSG exprimieren, werden jedoch nicht erkannt und deswegen nicht eliminiert. So stellen sie den Ausgangsklon einer neuen Population dar. Auf diese Weise kommt es zum typischen wellenförmigen Verlauf der Parasitämie (Ross und Thomson, 1910). Jeder Klon entwickelt sich innerhalb von acht bis zehn Tagen, also in der Zeit, die der Organismus benötigt, um den entsprechenden Antikörper zu produzieren.

Die Expression einer anderen Variante des Oberflächenmoleküls, das sogenannte *antigenic switching*, findet bei monomorphen Stämmen ca. 10^{-6} Mal pro Zellteilung und bei pleomorphen Formen etwa 10^{-9} Mal statt (Lamont *et al.*, 1986; Pays, 1988). Diese Antigenvariation konnte ebenso in Kulturen beobachten werden, woraus eine Unabhängigkeit von der Immunantwort folgt (Doyle *et al.*, 1980). Trypanosomen verfügen über ca. 1000 VSG-kodierende Gene (Borst, 1986). Das aktive VSG-Gen ist in einer telomernahen *expression site* lokalisiert. Die anderen VSG-Gene liegen im Innern der Chromosomen oder im Telomer, sind aber nicht aktiv. Die Aktivierung der stillen Gene kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (Borst, 1991).

1.2.6.3. Trypanothion

Trypanosomen differieren von anderen Eukaryonten u.a. in ihrer Antioxidansmaschinerie. Sie besitzen keine Katalase und Selen-haltige Glutathionperoxidase (Flohé *et al.*, 1999). Etwa 70% ihres Glutathions wird in *N1,N8*-bis(Glutathionyl)-Spermidin, das sogenannte Trypanothion ungewandelt (Fairlamb und Cerami, 1992). Trypanothion ist der essenzielle Redox-Mediator in den Trypanosomatiden *Crithidia*, *Leishmania* und *Trypanosoma* (Fairlamb und Cerami, 1985). Trypanothion wird *de novo* aus Spermidin, Glutathion und ATP synthetisiert (Henderson *et al.*, 1990; Koenig *et al.*, 1997; Oza *et al.*, 2002; Comini *et al.*, 2003).

Durch das Trypanosomatiden-spezifische Enzym Trypanothion Reduktase (entspricht der Glutathion Reduktase im Säuger) wird das oxidierte Trypanothion wieder reduziert und so regeneriert (Fairlamb and Cerami, 1992). Tryparedoxin (TXN), ein Molekül von der Thiorexin Familie, dient als Akzeptor für das Reduktions-Equivalent des Trypanothions. TXN ist gleichzeitig Substrat für die Tryparedoxin Peroxidase, welche Wasserstoffperoxid und andere Hydroperoxide reduziert (Gommel *et al.*, 1997; Nogoceke *et al.*, 1997). In der Abbildung 1.5 ist die Hydroperoxyd Detoxifikationskaskade zusammengestellt. Eine Runterregulation der Trypanothion Reduktase in *Trypanosoma brucei* führt zu einer Zunahme der Wasserstoffperoxydempfindlichkeit, Verlust der Virulenz und zum Arrest der Proliferation (Dumas *et al.*, 1997; Krieger *et al.*, 2000).

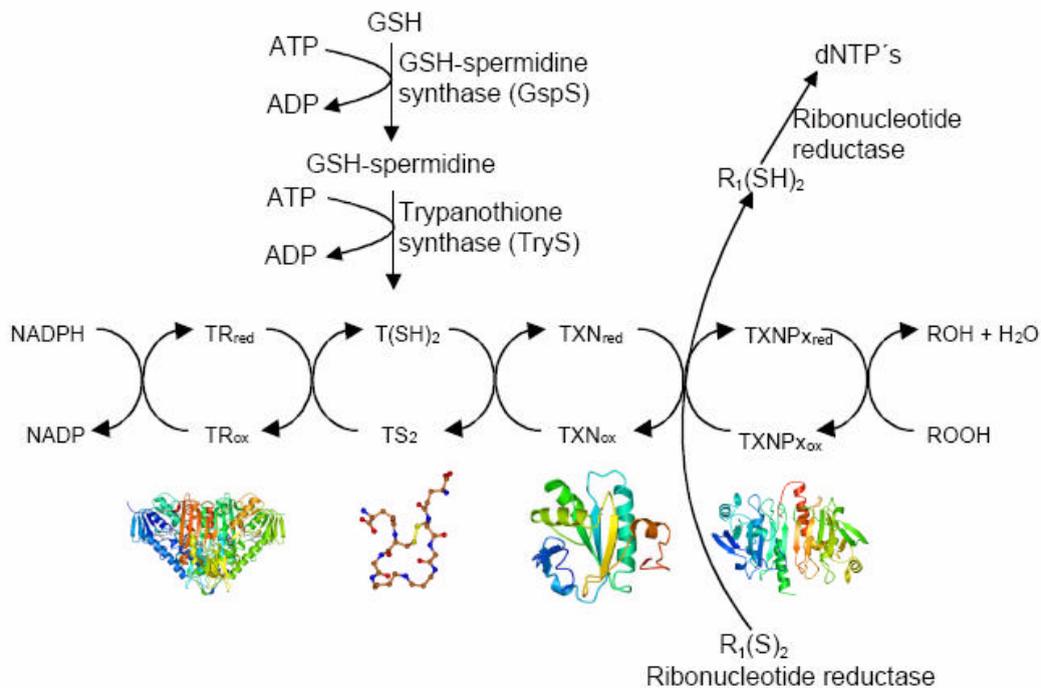


Abbildung 1.5. Detoxifikationskaskade für Hydroperoxide in Kinetoplastiden. Die Hydroperoxyde werden durch die Terminal Peroxidase (TXNPx) reduziert. Bei dieser Reaktion wird NADPH benötigt. Die oxidierte Terminal Peroxidase wird durch Tryparedoxin (TXN) regeneriert und dieses wird dann durch Trypanothion [T(SH)₂] wieder reduziert. Die Wiedergewinnung des Trypanothion wird durch die Trypanothion Reduktase (TR) durchgeführt. An der Trypanothionsynthese nehmen die Glutathionspermidin Synthase (GspS) und die Trypanothion Synthase (TryS) teil. Diese Reaktionen erfordern zwei Moleküle ATP. In einige Fälle werden beide Reaktionen durch ein einziges Enzym katalysiert. In *Trypanosoma brucei* ist dieser Detoxifikationsmechanismus mit der Synthese von Desoxyribonucleotiden (dNTPs) verknüpft, da die Durchführung der Ribonucleotid Reduktase Reaktion Trypanothion erfordert. [Quelle: Krauth-Siegel und Schmidt, 2002]

1.2.6.4. Glycosomen

Bei Trypanosomen und anderen Kinetoplastiden findet die Glycolyse in einem speziellen Organell, dem Glycosom, statt. Die Glucose wird dort bis zum 3-Phosphoglycerat umgesetzt, wobei die ATP-Nettobilanz Null dargestellt. Erst im Cytosol erfolgt der energieliefernde Abbau bis zum Pyruvat. Da *long slender* Formen über ein rückgebildetes Mitochondrium verfügen, können weder Atmungskette noch Citratzyklus durchgeführt werden. Trotzdem gelingt es den Trypanosomen aufgrund der ausreichenden Glucosekonzentration im Blut und der extrem hohen Glycolyserate, genügend ATP zu gewinnen. Neben der Glycolyse finden in den Glycosomen weitere Stoffwechsellleistungen statt: Glycerinmetabolismus, Etherlipid- und Pyrimidinsynthese CO₂ Fixierung und Purinstoffwechsel.

1.3. Der Programmierte Zelltod

Das Auftreten von Zelltod unter physiologischen und pathologischen Bedingungen wurde seit mehr als 150 Jahren in multizellulären Organismen dokumentiert (Clarke und Clarke, 1995). Im Jahre 1871 wurde der Zelltod von Virchow als „Nekrose“ und „Nekrobiose“ bezeichnet (Virchow, 1871). In dieser Zeit wurde der Zelltod von Toxikologen und Pathologen als ein passives, degeneratives Ereignis angenommen. Mit der Entwicklung der Biologie wurde jedoch entdeckt, dass es sich hierbei um ein programmiertes Phänomen handelt (Saunders, 1966). Nach der Beobachtung morphologischer Veränderungen und der Feststellung einer Notwendigkeit der *de novo* Proteinsynthese, wurde am Anfang der 70er Jahre von Farber und Mitarbeiter eine Art von Suizid vorgeschlagen (Farber *et al.*, 1971). In dieser Form gewann das Phänomen an biologischer Relevanz. Im Jahre 1972 wurde von Kerr, Wyllie und Currie eine Klassifizierung in zwei Arten vorgenommen. Die eine wurde Nekrose benannt und beschreibt den morphologischen Zustand von Zellen, die nach Verletzungen, Verbrennungen und anderen Umfällen absterben. Diese Form tritt unerwartet und plötzlich auf und ist in der Regel nicht physiologisch. Die Zelle schwillt an und platzt schließlich. Der Zellinhalt verteilt sich in der Umgebung der Zelle und löst

in Metazoen eine charakteristische Entzündung aus (Kerr *et al.*, 1972). Im Gegensatz dazu weist die Apoptose bestimmte morphologische Charakteristika auf, die einen programmierten aktiven Prozess erkennen lassen, der eine Reaktion auf physiologische oder pathologische Umgebungsveränderungen darstellt und somit induzierbar ist (Kerr *et al.*, 1972). Diese Klassifikation öffnete neue Türen für das Verständnis der Entwicklung und Regulation der Zellhomöostase in Organismen. Allerdings brachte sie eine große Kontroverse mit sich, da atypische morphologische Veränderungen, die sich nicht eindeutig der Nekrose oder Apoptose zuordnen ließen, auftraten.

Infolge der „Apoptose Diversifikation“ wurde der allgemeine Begriff des programmierten Zelltodes (PCD, von *programmed cell death*) zur Charakterisierung aller Modalitäten (außer Nekrose) eingerichtet. Clarke führte im Jahr 1990 eine neue dreierartige Klassifizierung des programmierten Zelltodes ein: PCD I stellt die typische Apoptose dar; PCD II oder Autophagie ist durch die Bildung von autophagischen Vakuolen charakterisiert und PCD III, bei dem sich die Zelle ungeachtet der Beteiligung des Lysosomensystems in Fragmente auflöst (Clarke, 1990). Eine morphologische und funktionale Charakterisierung des PCD I und PCD II wurde von mehreren Forscher durchgeführt und von Bursch und Mitarbeiter zusammengefasst (Bursch *et al.*, 2000). Zusätzlich schlugen Leist und Jäätelä ein deskriptives Modell vor, welches den Zelltod nach der nuklearen Morphologie in vier Subklassen einteilt (Abbildung 1.6) (Leist und Jäätelä, 2001). Apoptose ist für eine Klasse II Chromatinkondensation in kompakte Figuren charakterisiert. Apoptose-like PCD zeigt eine wenig kompakte Chromatinkondensation (Chromatinkondensation Klasse I). Bei der Nekrose-like PCD ist hingegen keine Chromatinkondensation zu sehen. Nekrose ist als cytoplasmatische Ausbreitung und Zellmembranbruch definiert.

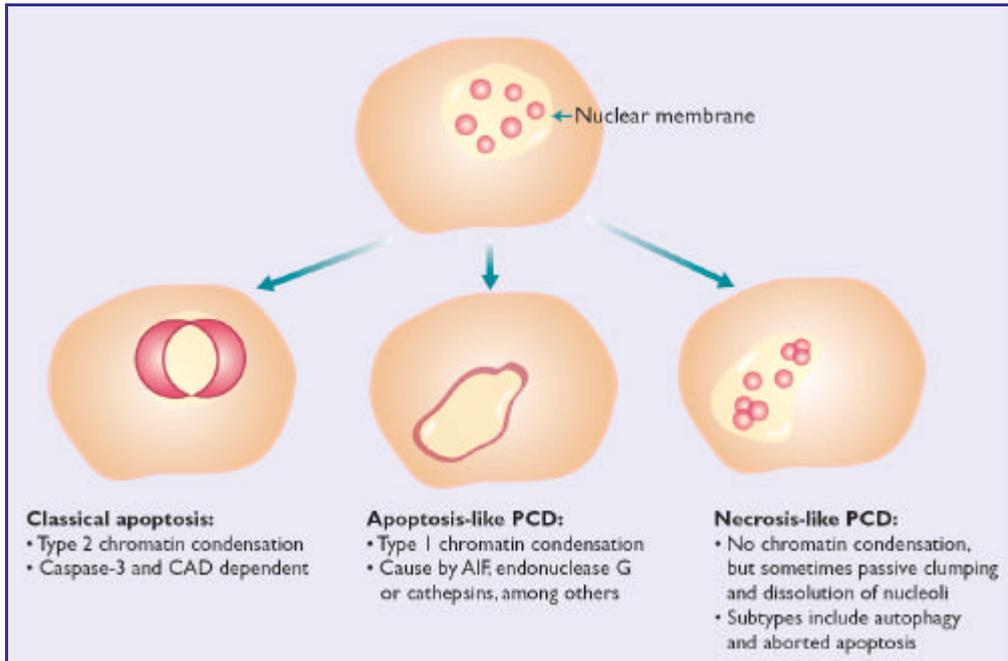


Abbildung 1.6. Klassifizierung des Zelltodes nach der nuklearen Morphologie.
 [Quelle: Jäättelä und Tschopp, 2003]

1.3.1. Programmierter Zelltod in höheren Eukaryonten

Bei multizellulären Organismen kommt es zu einem ständigen Abbau und einer entsprechenden Erneuerung von Zellen, um die Homöostase der Organe aufrecht zu erhalten (Nagata und Golstein, 1995). Das zelluläre Gleichgewicht und damit die Integrität der Organe wird also durch das Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod garantiert. Eine abnormale Zelltod-Resistenz kann Missbildungen, Autoimmunerkrankungen oder die Entstehung eines Tumors verursachen. Eine gesteigerte Zelltod-Rate wird in einer Reihe von akuten (Infarkte) und chronischen Krankheitsbildern (neurodegenerative Erkrankungen, AIDS) beobachtet (Thompson, 1995). Zeitlich betrachtet lässt sich PCD in drei Phasen einteilen (Martin und Green, 1995). In der Induktionsphase sind viele verschiedene Stimuli in der Lage, den programmierten Zelltod auszulösen. Je nachdem, ob die Stimuli exogen oder endogen auftreten, können zwei verschiedene Wege induziert werden. Zur exogenen Anregung gehören die Stimulation von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, z.B. von Mitgliedern der Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptoren-Familie (TNFR) wie der CD95-Rezeptor (Van Parijs und Abbas, 1998). Entzug von Wachstumsfaktoren, reaktive

Sauerstoffradikale, Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{++} , u.a. zählen als endogene Stimuli. Auf diese stimulusspezifische Induktionsphase folgt die Effektorphase, in der die definitive Entscheidung fällt, ob die Zelle stirbt. In der Degradationsphase kommt es dann zum programmierten Zelltod mit den typischen biochemischen und morphologischen Erscheinungen wie die Aktivierung von Proteasen und Endonucleasen, die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA, die Kondensation des Zytoplasmas und Zellschrumpfung, sowie die Ausbildung apoptotischer Partikel und das Zerfallen der Zellen in Membranvesikel (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998).

Die molekularen Mechanismen der PCD Kaskade sind an einigen Modellen gut untersucht und beschrieben worden. Es handelt sich um eine sehr komplexe Maschinerie, wobei zahlreiche Moleküle involviert sind. Das erste apoptotische Gen (*BCL-2*) wurde am Anfang der 90er Jahre entdeckt, indem seine Fähigkeit zur Verhinderung der Apoptose gezeigt wurde (Hockenbery *et al.*, 1990). Heute besitzt die *BCL-2* Familie viele Mitglieder die entweder Apoptose aktivieren (*BID, BIM, BMF, Noxa, BAX, BAD, BAK, BCL-xs*) oder die diese Prozesse unterdrücken (*BCL-2, BCL-xl, MCL-1*). Mitglieder der *BCL-2* Familie nehmen vor allem an dem durch das Mitochondrium aktivierten PCD teil. In der Initiationsphase der Apoptose werden verschiedene Faktoren aus dem Mitochondrium (Cytochrom c, APAF-1, AIF) freigesetzt, welche eine Familie von Proteasen aktiviert. Alle diese Proteasen haben ein Cystein in ihrem katalytischen Zentrum und spalten ihre Targetproteine nach einem Aspartatrest, deshalb werden sie als Caspasen (*cysteine dependent aspartate specific proteases*) bezeichnet (Thronberry und Lazebnik, 1998). Die Zielmoleküle für die Caspasen sind Proteine, die wichtige Funktionen für die Zellintegrität ausführen (Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP), Laminine, Gelsoline, etc.). Der Abbau dieser elementaren Substrate führt zu den die Apoptose kennzeichnenden morphologischen Veränderungen (Degterev *et al.*, 2003). Allerdings stellt die Caspase Aktivierung nicht die einzige Möglichkeit der Entscheidung über Leben und Tod dar (Blagosklonny, 2000; Kitanaka und Kuchino, 1999; Lockshin *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000; Wyllie und Golstein, 2001).

Alternative, Caspasen-unabhängige Formen von Zelltod wurden bereits beschrieben (Borner und Monney, 1999; Kitanaka und Kuchino, 1999; Blagosklonny,

2000; Sperandio *et al.*, 2000; Leist und Jäättela, 2001). Eines von diesen Modellen ist die Paraptose. Für sie sind eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas und eine Dilatierung des Mitochondriums und des Endoplasmatischen Retikulums charakteristisch. Paraptose wird durch MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ohne Beteiligung von Caspasen vermittelt (Sperandio *et al.*, 2004) und kann durch Mitglieder der TNF Rezeptorfamilie TAJ/TROY induziert werden (Wang *et al.*, 2004). Die Mitotische Katastrophe repräsentiert einen anderen Weg des Zelltodes. Sie tritt nach unvollständiger Mitose ein und generiert kernlose Zellen. Dieser Todesweg kann durch stabilisierte oder nicht stabilisierte Mikrotubuliagentien und DNA-Defekte in einer p53-abhängigen Weise induziert werden (Roninson *et al.*, 2001). Schließlich können Calpaine, Cathepsine, Endonucleasen und andere Proteasen ebenso wie Caspasen PCD auslösen, wobei die Koordination des Prozesses unter Beteiligung verschiedener Zellorganellen wie Mitochondrien, Lysosomen und endoplasmatischem Retikulum ablaufen kann. In der Abbildung 1.7 sind einige der in höheren Eukaryonten beschriebenen Zelltod-Mechanismen schematisch dargestellt.

1.3.2. Programmierter Zelltod bei Einzellern

Seit der Entdeckung des programmierten Zelltodes in multizellulären Organismen und unter dem Konzept seiner physiologischen Funktion als Homöostase erhaltender Mechanismus, war ein Auftreten eines solchen Prozesses in Einzellern undenkbar. Dennoch sind unizelluläre Organismen fähig, sich selbst in Zellpopulationen zu organisieren und interzelluläre Kommunikationsmuster zu errichten (Shapiro, 1995; Palkova *et al.*, 1997). Einige Einzeller reagieren auf Wachstumsfaktoren und Cytokine, welche auf eine bestimmte Weise den programmierten Zelltodprozess regulieren (Barcinski und Costa-Moreira, 1994). In den letzten 10 Jahren sind neue Studien, die das Auftreten von PCD Markern in Einzellern zeigen, veröffentlicht worden: *Dictyostelium discoideum* (Cornillon *et al.*, 1994; Arnoult *et al.*, 2001), *Tetrahymena thermophila* (Christensen *et al.*, 1996), *Trypanosoma cruzi* (Ameisen *et al.*, 1995; Piacenza *et al.*, 2001), *Leishmania amazonensis* (Moreira *et al.*, 1996), *Trypanosoma*

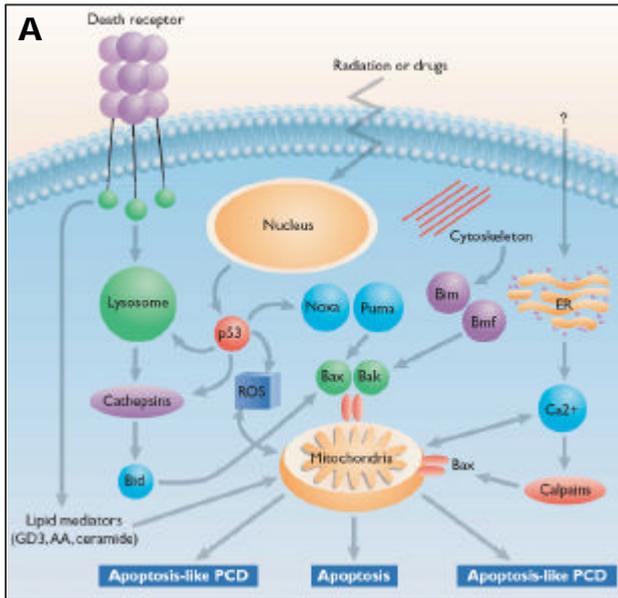
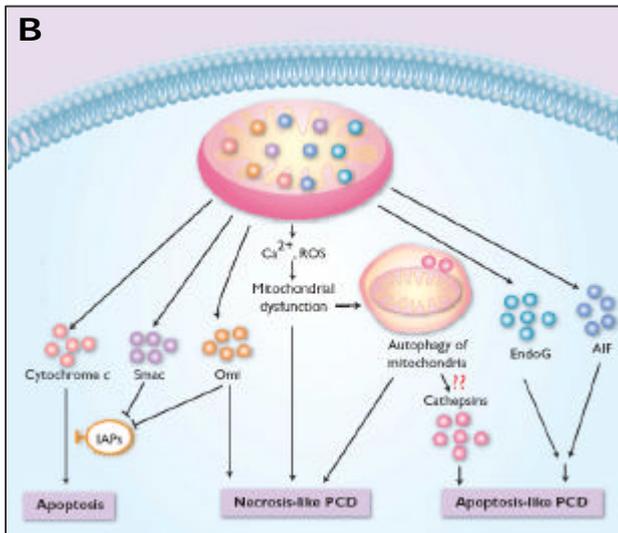
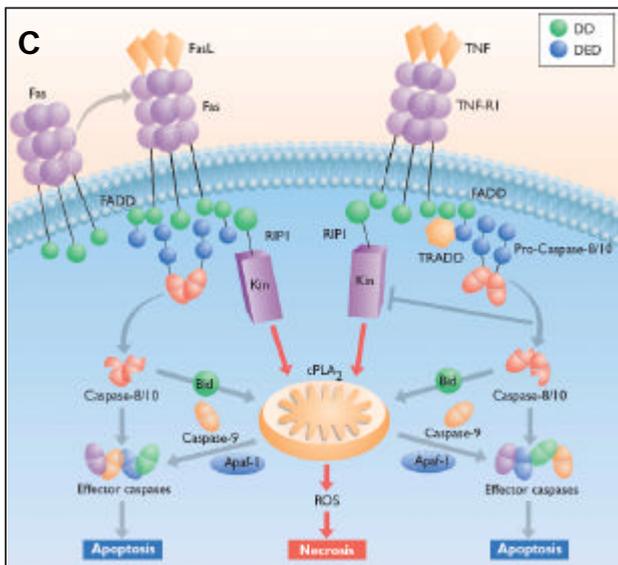


Abbildung 1.7. Mechanismen von programmiertem Zelltod in höheren Eukaryonten.

A. Caspase-unabhängiger Signalweg durch MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization). *Death* Rezeptoren von der TNFR Familie, ebenso wie Oxidanzien, Detergenzien oder einige Medikamente induzieren die Freisetzung von Cathepsinen aus den Lysosomen. Der Bruch des Cytoskeletts verursacht die Freisetzung von Bim und Bmf. DNA-Schäden induzieren die Transkription von Genen (BAX, Noxa, Puma, ROS bildende Proteine und Cathepsin D). ER Stress ruft Calcium Freisetzung hervor, was zur mitochondrialen Schädigung führt. Außerdem können einige *death* Stimuli die Produktion von Mediatoren-Fettsäuren wie Arachidonsäure (AA), Ceramide und Ganglioside (GD3) induzieren.



B. MOMP kann Caspase-abhängige oder -unabhängige PCD auslösen. Der Schaden des Mitochondriums führt zur Freisetzung von mitochondrialen Proteinen, die PCD auslösen. Die Freisetzung von Cyt c aktiviert Caspasen und löst Apoptose aus. AIF induziert Caspase-unabhängigen Zelltod mit DNA-Fragmentierung und für den Apoptosis-like PCD typische Chromatinkondensation I. EndoG spaltet DNA und verursacht ebenfalls Chromatinkondensation. Calcium und ROS so wie Autophagie können mitochondriale Dysfunktion induzieren.



C. Zelltod in T-Lymphozyten durch *Death* Rezeptoren. Die Liganden-Aktivierung des *Death* Rezeptors kann Caspase-abhängigen oder Caspase-unabhängigen PCD hervorrufen. Nach der Stimulierung des Rezeptors werden die Caspasen aktiviert und dadurch die typische Apoptose ausgelöst. Aktivierung von FADD und RIP vermitteln Nekrose PCD, die durch mitochondriale oder PLA₂ induzierte ROS Formation hervorgerufen wird.

[Quelle: Jäätelä und Tschopp 2003]

brucei (Welburn *et al.*, 1996; Ridgley *et al.*, 1999), *Plasmodium falciparum* (Picot *et al.*, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (Madeo *et al.*, 1997; 1999; 2002a; 2002b), *Peridinium gatunense* (Vardi *et al.*, 1999), *Leishmania infantum* (Serenio *et al.*, 2001), *Leishmania donovani* (Das *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), *Leishmania mexicana* (Zangger *et al.*, 2002), *Leishmania major* (Arnoult *et al.*, 2002), *Plasmodium bergeri* (Al Olayan *et al.*, 2002).

Die Präsenz des programmierten Zelltodes in niederen Eukaryonten verstärkte die Idee, dass PCD aus einem ursprünglichen Zelltodmechanismus entstanden ist (Fraser und James, 1998). Kinetoplastiden sind die ersten Einzeller, die Mitochondrien besitzen. Die Akquirierung des Mitochondriums scheint von großer Bedeutung für die Kontrolle von Leben und Tod in der Eukaryontenevolution zu sein (Nguewa *et al.*, 2004). Eine Hypothese für die Entstehung von PCD ist in der Theorie begründet, dass die eukaryontische Zelle eine Fusion von verschiedenen Bakterienspezies ist. Die entstandene Zelle musste Konflikte zwischen den unterschiedlichen Genomen lösen, um eine Kooperativität zu erreichen. Auf diese Weise könnten dann *killer* Gene selektiert worden sein (Ameisen, 1996).

Obwohl der Phänotyp des Zelltodes bei Trypanosomatidae viele Charakteristika mit den verschiedenen Typen von PCD in höheren Eukaryonten teilt, sind die molekularen Mechanismen noch nicht klar. Es ist schon berichtet worden, dass einige Gene unterschiedlich exprimiert werden, wenn PCD in diesen Parasiten stattfindet. In *Trypanosoma brucei* wurde eine Stimulierung von Prohibitin (ein Proto-Oncogen), TRACK (ein Mitglied der RACK Gen Familie) und ein Homologon des QM Proteins (ein Regulator von c-Jun Proto-Oncoprotein) während des Ablauf des Zelltodes festgestellt (Welburn und Murphy, 1998; Lillico *et al.*, 2002). In *Trypanosoma cruzi* konnte die Relokalisierung von TcEF-1 α (Elongation Faktor 1) in den Kern mit der Induktion von Apoptose-like PCD assoziiert werden (Billaut-Mulot *et al.*, 1996). In *Leishmania infantum* rief die Überexpression von LiSIR2 (*silent information* Regulator) eine Verlängerung des Überlebens durch die Resistenz gegen Apoptose-like PCD hervor (Vergnes *et al.*, 2002). Die präzisen Signalwege, die in Trypanosomatidae PCD auslösen, sind jedoch in keiner Weise aufgeklärt.

1.4. Eicosanoide: Prostaglandine

Unter dem Begriff der Eicosanoide (eicosin [griechisch]: zwanzig) fasst man solche Naturstoffe zusammen, die aus C-20 Fettsäuren durch oxidativen Metabolismus im tierischen und menschlichen Organismus entstehen. Eicosanoide werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren produziert. Die Ursprungssubstanzen sind die ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure (16:1, ω -7), Ölsäure (18:1, ω -9), Linolsäure (18:2, ω -6) und α -Linolensäure (18:3, ω -3). Die beiden Familien der ω -3 und ω -6 Fettsäuren gelten als essentielle Fettsäuren. Sie werden dem menschlichen Körper durch Nahrungsaufnahme zugeführt und kommen bevorzugt in tierischen Fetten und Fisch, aber auch in pflanzlichen Ölen wie Sonnenblumen-, Sojabohnen- und Weizenkeimöl vor.

Durch anabole Reaktionen der Linolsäure können andere Fettsäuren mit einer höheren Anzahl von Kohlenstoffatomen synthetisiert werden. Ein Beispiel davon ist die Arachidonsäure (20:4, ω -6) (5,8,11,14-Eicosatetraencarbonsäure), welche die wichtigste Vorstufe für viele biologisch hoch aktive Stoffe darstellt. Arachidonsäure wird auch zum großen Teil über die Nahrung aufgenommen und in die Phospholipide eingebaut. Je nach Zelltyp wird die Arachidonsäure als Antwort auf bestimmte Stimuli durch die Phospholipase A₂ abgespalten (Abbildung 1.8). Die so freigesetzte Arachidonsäure kann auf zwei Wegen in der Eicosanoid Biosynthese einmünden. Auf der einen Seite können sich durch die Lipooxygenase Leukotriene bilden. Auf der anderen Seite ist die Cyclooxygenase für die Bildung von Thromboxanen und Prostaglandinen verantwortlich. Diese Substanzen haben vielfältige Effekte, die jeweils durch spezifische Rezeptoren in den Zellen der unterschiedlichen Zielgewebe vermittelt werden.

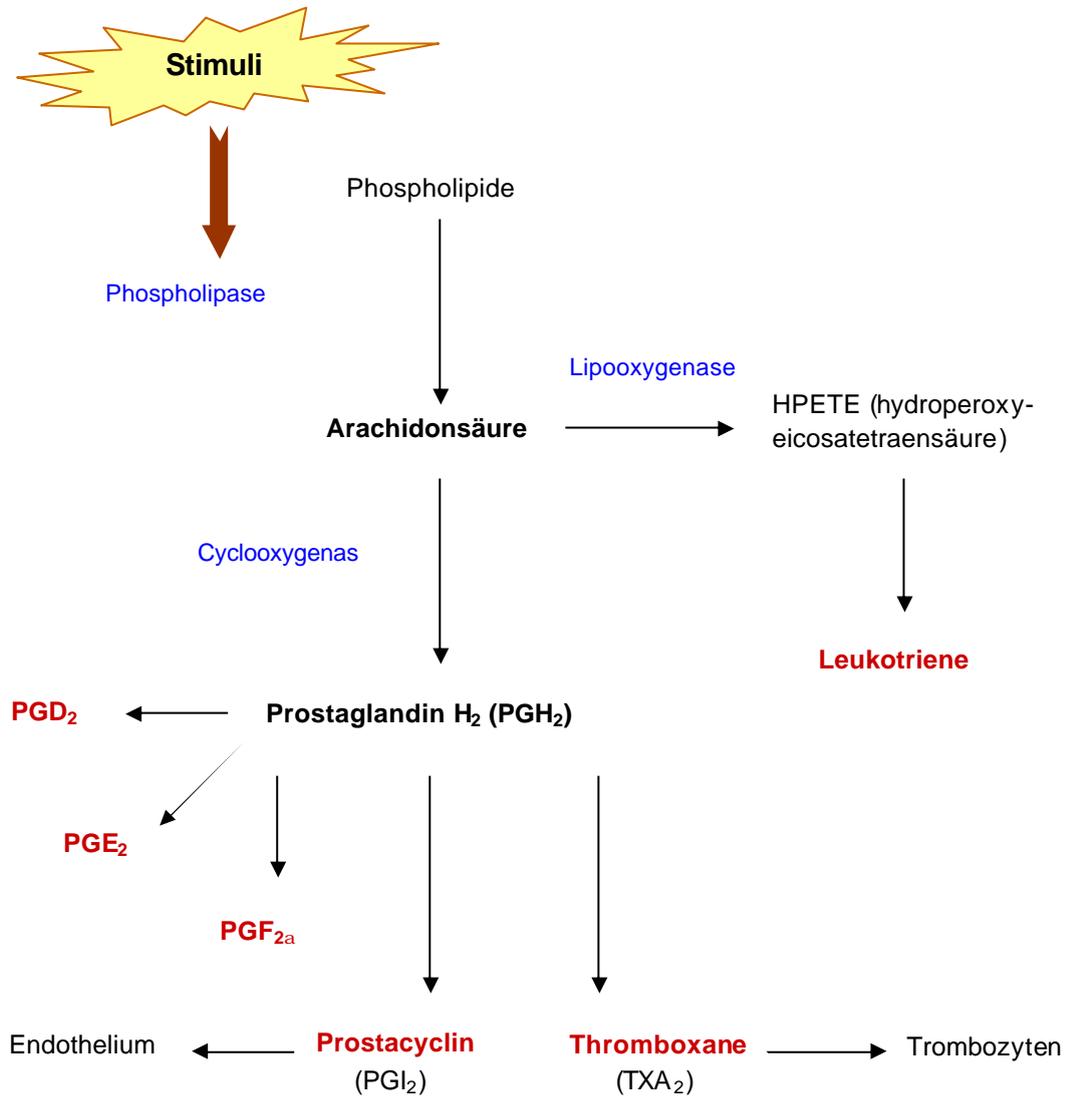


Abbildung 1.8. Schematische Darstellung des Eicosanoid Metabolismus.

1.4.1 Entdeckung von Prostaglandinen

Im Jahre 1931 wurde von Gaddum und von Euler ein „Faktor P“ aus menschlichem Samenblasenplasma isoliert (von Euler und Gaddum, 1931). Wenige Jahre später stellten von Euler und Goldblatt fest, dass der Extrakt aus menschlichen Samenvesikeln hochwirksame biologische Eigenschaften besitzt, wie Blutdrucksenkung

und eine starke Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur (Goldblatt, 1933; von Euler, 1934). Euler gab der wirksamen Substanz den Namen „Prostaglandin“. Es dauerte jedoch bis Anfang der 60er Jahre bis Samuelson die Struktur der Prostaglandine entdeckte (Samuelson, 1963). Prostaglandine werden von fast allen Zellen des Organismus (ausgenommen Erythrozyten) synthetisiert. Insbesondere ist die Prostaglandinsynthese in Samenvesikel, Nieren und Lungen sehr hoch (Christ und van Dorp, 1972). Sie wirken als lokale Mediatoren oder Gewebshormone, die Signale und Auswirkungen anderer Hormone, Nervenimpulse oder des Immunsystems modulieren können (Marks *et al.*, 1999).

1.4.2. Nomenklatur von Prostaglandinen

Prostaglandine enthalten einen Cyclopentanring und zwei laterale Ketten, die α und ω genannt werden und an einen Cyclopentanring gebunden sind. Gemäß der Modifikationen des Cyclopentanrings werden sie in verschiedene Typen von A bis J eingeteilt (Abbildung 1.9). Prostaglandine des Typs A, B und C sind in der Natur nicht zu finden, sondern werden während der Extraktionsverfahren produziert. Prostaglandin G und H besitzen die gleiche Ringstruktur, verfügen aber über eine Hydroperoxid- bzw. eine Hydroxyl-Gruppe in der Position C-15 (Narumiya *et al.*, 1999). Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) besitzt eine Sauerstoffbrücke zwischen C-6 und C-9. Der griechische Index bei Prostaglandinen vom F-Typ weist auf die Stellung der Hydroxylgruppe an C-9 hin (Slater und McDonald-Gibson, 1987). Je nach Zahl der Doppelbindungen in den lateralen Ketten erfolgt eine der Prostaglandine weitere Klassifizierung in drei Serien (Serie 1, 2 und 3); Prostaglandine der Serie 1 enthalten eine 13-*trans* Doppelbindung, Prostaglandine der Serie 2 haben eine zusätzliche Doppelbindung in Position 5-*cis* und die von der Serie 3 verfügen über 3 Doppelbindungen in den Positionen 5-*cis*, 13-*trans* und 17-*cis* (Abbildung 1.9). Aus Arachidonsäure werden ausschließlich die Prostaglandine der Serie 2 synthetisiert (Narumiya *et al.*, 1999).

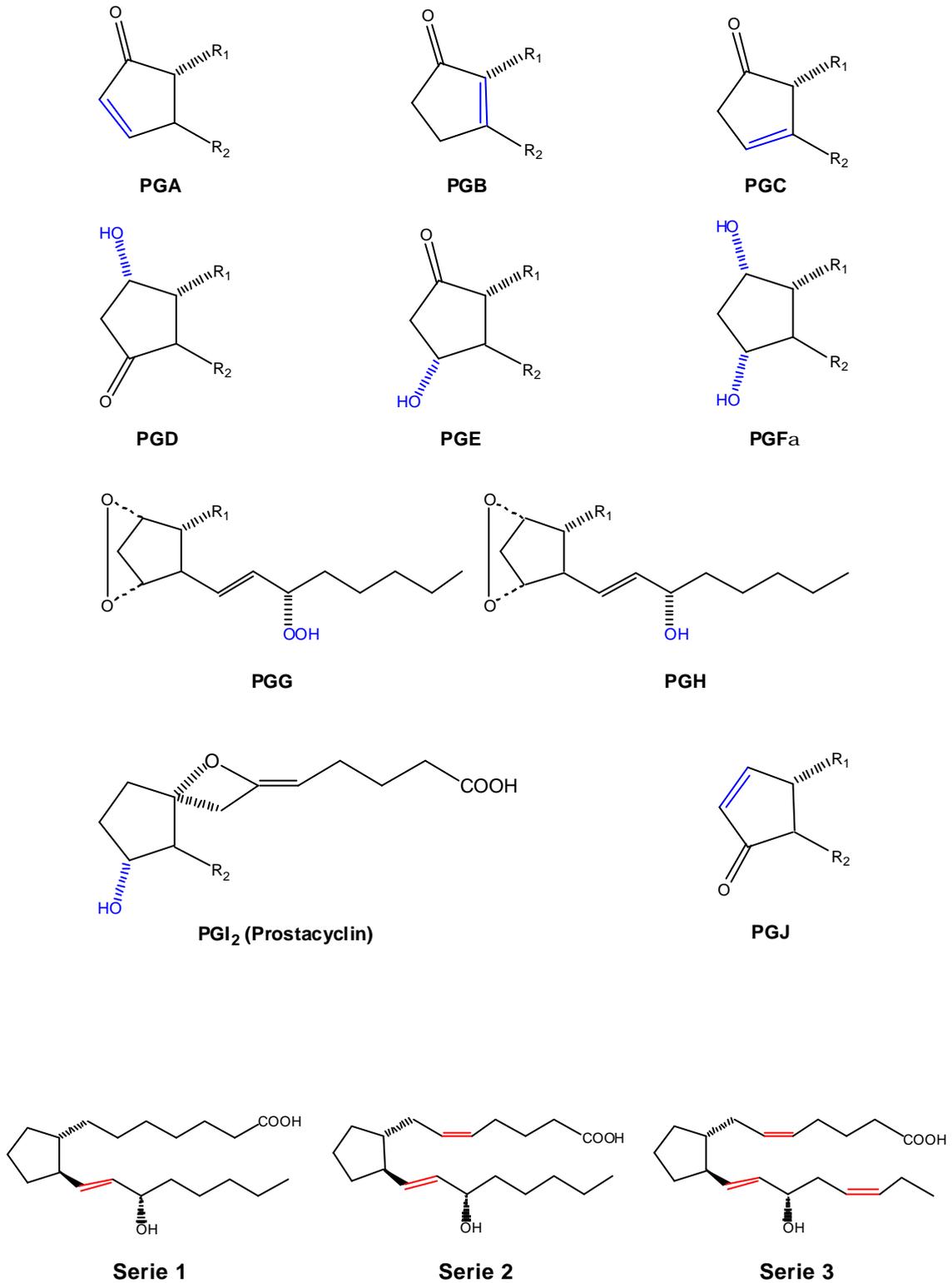


Abbildung 1.9. Nomenklatur der Prostaglandine. Ringstruktur der verschiedenen Prostaglandine und Darstellung der Doppelbindungsposition in den 3 Prostaglandin Serien [Quelle: Slater und McDonald-Gibson, 1987]

1.4.3. Prostaglandinstoffwechsel

Nach der Abspaltung von Arachidonsäure von dem mittleren Kohlenstoffatom des Glycerols durch die Phospholipase A₂, beginnt die Prostaglandinsynthese mit der Bildung von Prostaglandin H₂ (PGH₂), welches das Vorstufenmolekül der Prostaglandine und der Tromboxane ist. In der Abbildung 1.10 ist die allgemein anerkannte Entstehung von Prostaglandinen dargestellt. Zwei Reaktionen führen zur Bildung von PGH₂, die beide durch das bifunktionelle Enzym Cyclooxygenase (COX) ausgeführt werden (Nelson und Cox, 2000). Zuerst wird molekularer Sauerstoff durch die Cyclooxygenaseaktivität des Enzyms an C-9, C-11 und C-15 inkorporiert, was zur Bildung des Endoperoxids Prostaglandin G₂ (PGG₂) führt. Darauf folgend wird PGG₂ durch eine enzymatische Reaktion mittels der Peroxidaseaktivität von COX zu PGH₂ umgewandelt.

Prostaglandin H₂ ist physiologisch sehr instabil und wird entweder enzymatisch durch die Endoperoxy-Isomerase oder nicht-enzymatisch z.B. durch Liponsäure in die Prostaglandine D₂ (PGD₂), F₂ (PGF₂) und E₂ (PGE₂) umgewandelt.

Die Prostaglandine J₂ (PGJ₂) und A₂ (PGA₂) werden durch Dehydratisierung aus PGD₂ bzw. PGE₂ synthetisiert. PGJ₂ wurde erst relativ spät als Metabolit von PGD₂ entdeckt (Fitzpatrick und Wynalda, 1983; Kikawa *et al.*, 1984), mit ihm werden anti-carcinogene und anti-virale Eigenschaften verbunden (Nakahata *et al.*, 1990; Fukushima, 1990). Das physiologisch weitgehend inaktive Prostaglandin B₂ (PGB₂) wird durch Isomerisierung der Doppelbindung aus PGA₂ erzeugt (Jones, 1972). Die 11-Ketoreduktase kann PGD₂ zu PGF_{2α} metabolisieren. Weiterhin werden durch eine Oxidation an Position C-15 die entsprechenden 15-Keto-Prostaglandine produziert, die so an der 13,14-Doppelbindung reduziert werden. Der Abbau der Prostaglandine erfolgt durch α-, β-, und ω-Oxidation an der Kohlenstoffkette, sowie durch Hydroxylierung an Position C-19. Die Abbauprodukte wurden für die meisten Prostaglandintypen bereits nachgewiesen, im Besonderen für diejenigen der M-Serie. Bei M-Typ Prostaglandinen ist die obere α-Seitenkette um 4 Kohlenstoffatome verkürzt und die ω-Seitenkette am terminalen C-Atom zu einer Carbonsäure abgebaut worden.

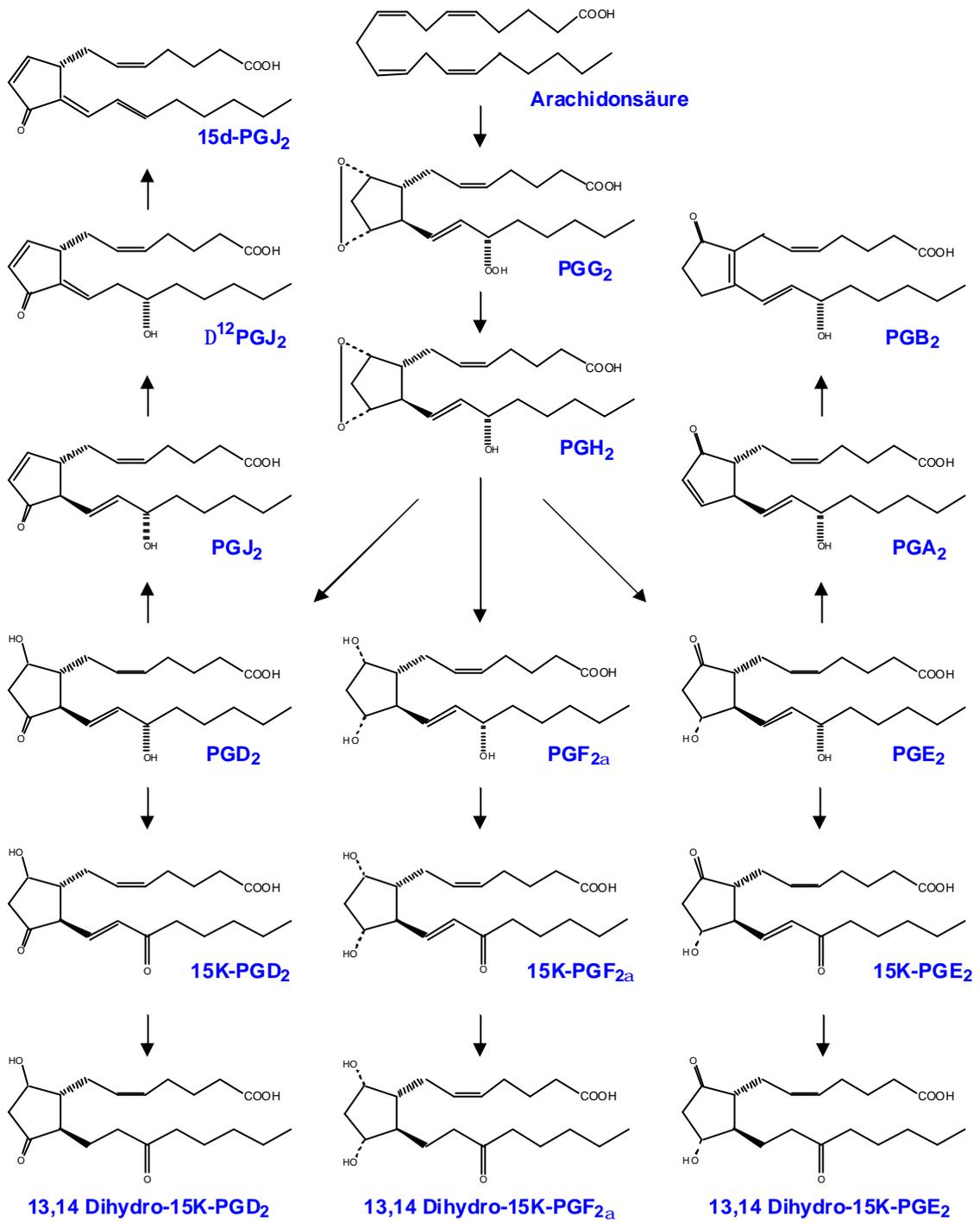


Abbildung 1.10. Metabolismus der Prostaglandine.

1.4.4. Physiologische Eigenschaften von Prostaglandinen

Die oft unterschiedlichen und vielfältigen Wirkungen der meisten Prostaglandine sind stark davon abhängig, in welchem Gewebe die Untersuchungen gemacht wurden. Prostaglandine werden als Antwort auf verschiedene spezifische Stimuli freigesetzt und entfalten ihre Wirkung nach der Bindung an spezifische Rezeptoren. Acht Rezeptor-Typen wurden bereits pharmakologisch identifiziert und, nachdem Hirata und Mitarbeiter im Jahre 1991 den Human TxA_2 Rezeptor klonierten, durch homologes *screening* ihrer Sequenzen bestätigt. Je nach Effekt und Signaltransduktionsweg sind diese Rezeptoren in drei Gruppen eingeteilt: Entspannungs-Rezeptoren, Schrumpfungs-Rezeptoren und Hemmungs-Rezeptoren (Narumiya *et al.*, 1999). Die Entspannungs-Rezeptoren vermitteln die Zunahme an cAMP und lösen eine Entspannung (Relaxation) der glatten Muskulatur aus. Die Schrumpfungs-Rezeptoren vermitteln Ca^{++} -Mobilisierung und induzieren eine Kontraktion der glatten Muskulatur. Die Hemmungs-Rezeptoren führen zur Senkung des cAMP- Niveaus und dadurch zur Hemmung der Relaxierung der glatten Muskulatur.

Der bekannteste Effekt der Prostaglandine ist wohl deren Wirkung auf die glatte Muskulatur (Relaxation und Kontraktion). Allerdings modulieren sie auch die Freisetzung von Neurotransmittern, rufen Fieber und Schlaf hervor, regulieren die Sekretion und Motilität im Darm, sowie den Ionen- und Wassertransport in den Nieren. Prostaglandine nehmen an Prozessen wie Zelltod, Zelldifferenzierung und Onkogenese teil und sind auch in der Aktivierung und Deaktivierung von Thrombozyten involviert (Narumiya *et al.*, 1999).

1.4.5. Ausgewählte Prostaglandine

1.4.5.1. Prostaglandin E_2

PGE_2 entsteht aus PGH_2 und vermittelt seine Effekte durch die PGE_2 -Rezeptoren. Diese gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

(Yumoto *et al.*, 1986), an die verschiedene intrazelluläre Signalübertragungswege gebunden sind (Narumiya *et al.*, 1993). Die Gs- und Gi-Proteine stimulieren oder inhibieren die Adenylatcyclase. Man unterscheidet 7 verschiedene PGE₂- Rezeptortypen (Coleman *et al.*, 1994; Fedyk *et al.*, 1996), die sich in 4 Subklassen, EP1, EP2, EP3 und EP4, unterteilen lassen. Die EP-Rezeptoren befinden sich im gesamten Organismus, wobei EP2 und EP4 an die Adenylatcyclase gebunden sind (Hebert, 1994; Scutt *et al.*, 1995; Choung *et al.*, 1998; Crider *et al.*, 1998). Die anderen Rezeptoren inhibieren möglicherweise das Enzym (Gi vermittelt, z.B. EP3). Die Rezeptoranzahl erklärt auch die Vielzahl der biologischen Wirkungen, die durch Prostaglandine der E-Reihe ausgelöst werden. PGE₂ ist vor allem für seine immunsuppressive Wirkung bekannt und findet sich in großen Mengen in der Nähe von Tumorzellen und deren lokalen Milieus. Als Quelle von PGE₂ werden hauptsächlich Monozyten angesehen.

1.4.5.2. Prostaglandin F_{2a}

Dieses Prostaglandin wird ebenfalls wie PGE₂ aus PGH₂ gebildet. Da PGF_{2α} zu den zyklischen Endoperoxiden gehört, hat es normalerweise entgegengesetzte Effekte zu PGE₂ und wirkt über eine cAMP-unabhängige intrazelluläre Kalzium-Erhöhung (Murdoch, 1996). Seine Wirkung wird durch einen spezifischen Rezeptor (FP) vermittelt und über spezielle, Pertussistoxin-resistente, G-Proteine weitergeleitet, wobei eventuell die intrazelluläre Kalzium-Erhöhung mittels IP₃ zustande kommt (Davis *et al.*, 1989; Coleman *et al.*, 1994; Carrasco *et al.*, 1997). Der FP-Rezeptor findet sich hauptsächlich im Corpus luteum, wo die luteolytische Wirkung von PGF_{2α} vermittelt wird (Coleman *et al.*, 1994). Bisher gibt es keine Informationen über FP-Rezeptorsubtypen.

1.4.5.3. Prostaglandin D₂

Prostaglandin D₂ ist das Hauptprodukt des Cyclooxygenaseweges des Arachidonsäuremetabolismus in Mastozyten (Lewis *et al.*, 1982), Makrophagen (Urade *et al.*, 1989) und Knochenmark (Kojima *et al.*, 1980; Ujihara *et al.*, 1988). PGD₂

vermittelt seine Effekte durch den DP-Rezeptor, der seltenste Prostaglandin-Rezeptor (Narumiya *et al.*, 1999). Der DP- Rezeptor wird in der Maus gemäßigt in Ileus, Lunge, Magen, und Uterus exprimiert (Hirata *et al.*, 1994). Im Menschen wurde er durch Northern blot Analyse im Dünndarm detektiert (Boie *et al.*, 1995). DP mRNA Expression wurde in den *Leptomeninges* (die weichen Gehirnhäute Dura mater, Arachnoidea und Pia mater) und aber nicht im Gehirnparenchym von Mäusen gefunden (Oida *et al.*, 1997). Scammell und Mitarbeiter untersuchten die funktionelle Aktivität des DP- Rezeptors in den *Leptomeninges* und stellten Schafinduktion fest (Scammell *et al.*, 1998). Genauso wie der DP-Rezeptor, wird die Gehirn- spezifische Prostaglandin D₂ Synthase in den *Leptomeninges* lokalisiert (Urade *et al.*, 1993). Interessanterweise ist eine Dysregulation des Schlaf-Wach-Rhythmus für das späte Stadium der Schlafkrankheit charakteristisch. Bei diesen Patienten wurde eine Erhöhung des Prostaglandin D₂ Spiegel im *Liquor cerebrospinalis* festgestellt (Pentreath *et al.*, 1990). Interessanterweise produzieren hier tatsächlich die Trypanosomen Prostaglandine (Kubata *et al.*, 2000).

1.4.5.4. Prostaglandine der J₂-Serie

Die Prostaglandine der J Serie, PGJ₂, Δ^{12} PGJ₂ und 15d-PGJ₂, werden durch Wasserentziehung aus Prostaglandin D₂ gebildet (Fukushima, 1992). Diese Metabolite bieten ein einziges Spektrum von biologischen Aktivitäten wie Hemmung der Zellzyklusprogression, Aufhebung der Viralreplikation, Induktion von *heat shock* Proteinen und Stimulierung der Osteogenese (Fukushima, 1992). Im Gegensatz zu den klassischen Prostaglandinen, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, werden die Prostaglandine der J Serie aktiv in den Kern aufgenommen und mit nuklearen Proteinen assoziiert (Narumiya *et al.*, 1987). PGJ₂ und seine Derivate können die intrazellulären *peroxisome proliferator-activator receptors* (PPARs) aktivieren (Kliwer *et al.*, 1995). PPARs regulieren durch ihre Bindung an PPAR *response elements* die Expression von Genen (Issemann und Green, 1990; Lemberger *et al.*, 1996). Drei Isoformen von PPAR (PPAR α , PPAR δ und PPAR γ) sind in menschlichen Zellen vorhanden (Schmidt *et al.*, 1992; Sher *et al.*, 1993;

Greene *et al.*, 1995). PPAR α befindet sich hauptsächlich in Gewebe mit hohem Fettsäurenverbrauch, PPAR δ ist in Herz, Nieren und Darm sehr hoch exprimiert, und PPAR γ überwiegt in Adipozyten, adrenalen Drüsen, Milz und einigen myeloiden Zelllinien (Kliwer *et al.*, 1994; Tontonoz *et al.*, 1994; Braissant *et al.*, 1996).

15d-PGJ₂ ist als spezifischer Ligand für PPAR γ beschrieben und mit Adipozyten-Differenzierung assoziiert (Forman *et al.*, 1995; Kliwer *et al.*, 1995). Dieses Prostanoid spielt eine Rolle bei der Pathophysiologie der Carcinogenese (Chinery *et al.*, 1999; Clay *et al.*, 1999; Straus und Glass, 2001), bei der Apoptose (Bishop-Bailey und Hla, 1999; Keelan *et al.*, 1999) und bei der Adipogenese (Sinha *et al.*, 1999). Außerdem wurde auch eine antiinflammatorische Aktivität berichtet (Maggi *et al.*, 2000). Allerdings sind in den letzten fünf Jahren eine Reihe von PPAR γ -unabhängigen Effekten veröffentlicht worden: 15d-PGJ₂ inhibiert die Aktivierung des nuklearen Faktors κ B (NF- κ B), ein vermittelnder Faktor von Immun- und Entzündungsreaktionen (Castrillo *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000; Straus *et al.*, 2000); es ruft ebenso Zelltod durch die Hemmung der Ubiquitin Isopeptidase Aktivität bei dem Proteasom-Signalweg hervor (Mullally *et al.*, 2001) und löst durch Induktion von oxidativem Stress Apoptose in Makrophagen, humanen hepatischen Myofibroblasten, Neuroblastoma-Zellen und Lymphozyten aus (Hortelano *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Nencioni *et al.*, 2003). Oliva und Mitarbeiter stellten fest, dass 15d-PGJ₂ in NIH 3T3 Fibroblasten eine spezifische Aktivierung von H-Ras jedoch nicht von K-Ras und N-Ras induziert. Diese Aktivierung führt zu einer Stimulation der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) und IP3-Kinase und schließlich zur Induktion der Zellproliferation (Oliva *et al.*, 2003). Kürzlich wurde über die Induktion des programmierten Zelltodes in Brustkrebs Zellen durch den mitochondrialen Weg berichtet (Pignatelli *et al.*, 2005).

Δ^{12} PGJ₂ wirkt sehr stark inhibitorisch auf das Zellwachstum und die Differenzierung einiger Tumorzellen (Mahmud *et al.*, 1984; Narumiya und Fukushima, 1985; Kato *et al.*, 1986). Δ^{12} PGJ₂ wird aktiv durch ein spezifisches Transportprotein auf der Zelloberfläche aufgenommen und dann im Kern akkumuliert. Die Aufnahme und Akkumulation hängt mit der inhibitorischen Wachstumsaktivität zusammen (Narumiya *et al.*, 1986; 1987). Δ^{12} PGJ₂ ruft Zelltod durch einen apoptotischen Weg in murinen Leukämie L1210 Zellen hervor (Kim *et al.*, 1993). Dieser Zelltod ging aus einem

Zellzyklusarrest in G2/M hervor und zeigte eine Abhängigkeit von der Proteinsynthese. Daher müssen DNA Schäden und Expression von Genen in dem induzierten Prozess involviert sein (Lee *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde ebenso eine Blockade des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase gezeigt (Bhuyan *et al.*, 1986). Jedoch blieben die präzisen molekularen Mechanismen, durch die diese Substanzen ihre zytostatischen oder zytotoxischen Effekte vermitteln, ungeklärt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, welche Rolle die Prostaglandin D₂-Produktion und seine darauf folgende Metabolisierung bei der Blutform von *Trypanosoma brucei* spielt. Anfang der 90er Jahre wurde von Pentreath und Mitarbeiter bewiesen, dass Patienten mit chronischer afrikanischer Trypanosomiasis, im Vergleich mit nicht infizierten Patienten, drei- bis vierfach höhere Werte von PGD₂ in der Cerebrospinalflüssigkeit aufweisen, wogegen die PGE₂ Konzentration unverändert bleibt (Pentreath *et al.*, 1990).

Eine Zeit lang wurde angenommen, dass die Eicosanoid- bzw. die Prostaglandin-Produktion exklusiv auf Säugerzellen beschränkt war. Allerdings wurde die Eicosanoid-Synthese auch in Invertebraten nachgewiesen. Dort spielen sie eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Regulation von Ionentransport, Neurobiologie und Reproduktion (Smith, 1989; Stanley-Samuels, 1991; Stanley *et al.*, 1998). Seit 1977, als die erste Arbeit über Prostaglandin-Produktion in Protozoen veröffentlicht wurde (Das und Padma, 1977), ist der Nachweis von Eicosanoid-Produktion bei zahlreichen Endo- und Ekto-Parasiten erbracht worden. Auf diese Weise und infolge des hohen Prostaglandin Spiegels bei Patienten mit afrikanischer Trypanosomiasis wurde von unserer Gruppe in Zusammenarbeit mit einer Gruppe in Japan die Prostaglandin-Produktion in *Trypanosoma brucei* untersucht und bewiesen (Kubata *et al.*, 2000). Nachfolgende Arbeiten zur Charakterisierung der am Prostaglandinstoffwechsel beteiligten Enzyme zeigten einige Besonderheiten. Die klassischen Hemmstoffe für die Cyclooxygenase (COX), die NSAIDs (*non steroidal anti-inflammatory drugs*), wirken nicht auf Trypanosomen (Rawer, 2004).

Datenbankrecherchen mittels bekannten Sequenzen für die COX ergaben keine Übereinstimmung. Jedoch wurde ein COX-like Enzym im protozoischen Parasit *Entamoeba histolytica* identifiziert und charakterisiert (Dey *et al.*, 2003). Dieses Enzym besitzt nur wenig Homologie mit den bekannten COX Enzymen. Seltsamerweise treten die hoch konservierten COX Sequenzen, wie die Arachidonsäure-Bindungsdomäne und die katalytischen Stellen bei der Amoeba-COX nicht auf. Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz von einem ursprünglichen COX-like Enzym hin. Da sich die Trypanosomen sehr früh innerhalb der Evolution abgespalten haben, könnten sie über ähnliche Enzyme verfügen. De facto wurde ein anderes Enzym dieser Kaskade, die *T. brucei* Prostaglandin F_{2α} Synthase (TbPGFS) isoliert und charakterisiert (Kubata *et al.*, 2000). Die Konversion von PGH₂ zum PGF_{2α}, die bei der TbPGFS katalysiert wird, findet durch einen abweichenden Mechanismus als der für die menschliche PGF₂ Synthase statt. Mittlerweile sind die Kristallstruktur und der genaue Reaktionsmechanismus der TbPGFS aufgeklärt (Okano *et al.*, 2002; Kilunga *et al.*, 2005).

Die ersten Untersuchungen des Effektes von Prostaglandin D₂ auf *Trypanosoma brucei* wurden in einer vorherigen Arbeit begonnen (Rawer, 2004). Die Beobachtungen deuteten auf apoptotischen Vorgänge hin. Allerdings waren die Daten nicht ganz schlagend. Zusätzlich ist in der Literatur bereits beschrieben, dass PGD₂ ein instabiles Molekül ist, das biologisch aktivere Metaboliten generieren kann. Deshalb war von großer Bedeutung, diese Arbeiten fortzusetzen, um eine bessere Erkenntnis über die Zellproliferation- und Zelltod-Mechanismen bei diesem Parasiten zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Zelltodinduktion von PGD₂ auf die Blutform von *T. brucei* weiter charakterisiert werden. Zusätzlich wurde ebenfalls die PGD₂-Metabolisierung und die Evaluation des Effektes von den verschiedenen Derivaten durchgeführt. Außerdem sind die ersten Hinweise auf den Mechanismus, durch den diese Moleküle den Zelltod auslösen, gezeigt.

2 Material & Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verwendete Organismen

Trypanosomen

In dieser Arbeit wurden zwei Stämme von *Trypanosoma brucei brucei* verwendet: der monomorphe Stamm MITat 1.2 mit der VSG- Antigenvariante 221 (Molteno Institute Trypanozoon antigenic type, Cambridge) (Cross, 1975) und der pleomorphe Stamm AnTat 1.1 (Antwerpen Trypanozoon antigenic type). Der monomorphe Stamm wurde in Uganda aus dem EATRO 427 Stamm isoliert. Procyklische Trypanosomen wurden aus dem monomorphen Stamm durch Transformation mit Citrat/Cis-Aconitat gewonnen.

Fibroblasten

Microtus montanus Fibroblasten wurden in dieser Arbeit benutzt, um die pleomorphen Trypanosomen *in vitro* zu kultivieren. Sie wurden aus tiefgefrorene Stabilate gewonnen und in Blutformmedium kultiviert.

Versuchstiere

Es wurde Ratten der Rasse Wistar mit einem Körpergewicht von ca. 300 g und weibliche NMRI-Mäuse verwendet (Interfauna, Tuttlingen). Die Tiere erhielten sniff R7M-H Alleinfutter für Ratten und Mäuse (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

2.1.2. Chemikalien

2.1.2.1. Laborchemikalien

Aceton	Riedel-de-Haem
Acetonitril	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
cis-Aconitsäure	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	ROTH, Karlsruhe
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
Agarose (SeaKem® LE)	FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA
Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat (APS)	Merck, Eurolab GmbH, Mannheim
Annexin-V-Lösung	Roche, Mannheim
Arachidonsäure	Sigma, Deisenhofen
ATP	Sigma, Deisenhofen
Bisbenzimid	Sigma, Deisenhofen
BMA GelBond PAGfilm	BioWhittaker, Walkersville, MD, USA
Bleicitrat	Sigma, St. Louis, USA
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
8-Brom-cAMP	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenol Blau	ROTH, Karlsruhe
Calciumchlorid x H ₂ O	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Chloroform	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Complete®, Protease-Inhibitormix	Roche, Mannheim
Coomassie brilliant blue G-25	ROTH, Karlsruhe
Dansylcadaverine	Fluka, Steinheim
DEAE-Sephacel	Sigma, Deisenhofen
DEVD-CHO	Calbiochem, Schwalbach
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Steinheim
Dichlordihydrofluorescein diacetat (DCFH-DA)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Digitonin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen

DNA-Leiter (100bp & 1 kb)	NEB GmbH, Schwalbach/Taunus
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	ROTH, Karlsruhe
Dodeceny-succinic-anhydrid (DDSA)	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Eisessig (100%)	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Epon 812	Serva, Heidelberg
Epon-Beschleuniger DMP-30	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe
Ethylacetat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	ROTH, Karlsruhe
Foetales Kälberserum (FCS)	Pan Systems, Aidenbach
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Gelatine	Sigma, Steinheim
Giemsa-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma, St. Louis, USA
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycylglycin	Sigma, Deisenhofen
Hämin	Sigma, Deisenhofen
HCL	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hexokinase/Glucose-6-phosphat Dehyd.	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Isopropanol	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Kodak Lx24 Entwickler	Kodak, France
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Fink GmbH, Herrenberg
Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland

Magnesiumsulfat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Mannitol	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
MEM Vitaminlösung	Sigma, Deisenhofen
MEM Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Methylacetat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Mowiol	Calbiochem, Schwalbach
N-acetyl-L-cystein	Sigma, Deisenhofen
NAD ⁺ /NADH	Roche, Mannheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Eurolab, GmbH Deutschland
Nitroblautetrazolium	Sigma, Deisenhofen
Osmiumtetroxid	Plano, Marburg
p-Nitrophenyl-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA
Propylenoxid	Plano, Marburg
Prostaglandine	Biomol, Hamburg Cayman Chemicals, IBL, Hamburg Sigma, St. Louis, USA
Protein Ladder, BenchMark. <i>prestained</i>	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Protein-Marker	Sigma, Deisenhofen
Pyruvat	Sigma, Deisenhofen
Salicylhydroxamsäure (SHAM)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	ROTH, Karlsruhe
Tental SUPERFIX	Tental Photowerk GmbH, Norderstedt
Tetramethylrodaminester (TMRE)	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe

Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Plano, Marburg
Valinomycin	Sigma, Deisenhofen
Vetren [®] 200	Byk Gulden (jetzt Altana), Konstanz

2.1.2.2. Radiochemikalien

[C ¹⁴]-Arachidonsäure	Amarsham Biosciences, Freiburg
[H ³]-Prostaglandin D ₂	Hartmann Analytic, Deutschland
Methyl-[H ³]-Thymidin	Moravек Biochemicals Inc., Brea, USA
Ultima Gold	Packard, Frankfurt

2.1.2.3. Verwendete Antikörper

Anti-DHLA-DH Kaninchen	Geschenk von Dr. Krauth-Siegel
Anti-Kaninchen IgG, FITC-Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG, AP-Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Anti-β-Tubulin Maus	Roche, Mannheim
Anti-Maus IgG, AP-Konjugat Ziege	Sigma, Deisenhofen

2.1.2.4. Kits

In situ Cell Death Detection Kit	Roche (Boehringer), Mannheim
----------------------------------	------------------------------

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- & 96-well Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem [®] -Cups	Plano, Marburg
BioMax MR-1 & Light-1	Kodak, Stuttgart
Centricon [®] YM-10	Millipore Cosp, Bedford, USA

Film Kodak Plus-X-Plan 120	Kodak, Stuttgart
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Glasfaserfilter GF/C	Whatman, Maidstone, USA
Hybond N ⁺ -Membran	Amersham, Braunschweig
Immunfluoreszenz-Objektträger	bioMerieux, Nürtingen
Kieselgel 60F DC-Platten	Merck, Mannheim
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kupfernetzchen, 400 mesh	Plano, Marburg
Küvetten 10 x 10 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, SFCA-Membran	Nalge, Hereford (UK)
Szintillationsgefäße	PerkinElmer, MA, USA
Whatman 3MM Paper	Whatman, Maidstone, USA

2.1.4. Geräte

Autoklav Dampfsterilisator	Münchener Mechanik, Stadlern
Beckmann Mikrofuge B	Beckmann, München
Brutschrank (27°C)	Köttermann, Uetze
Brutschrank mit CO ₂ Begasung (37°C)	Heraeus, Osterode
Elektrophoretetransfer-Kammer	BioRad, München
Elisa Reader MRX-II Revelation	Dynex, Chantilli, USA
FACSCalibur [®]	Becton Dickinson & Co, USA
Filtrationssystem 1225	Millipore, Bedford, USA
Flüssigszintillationszähler LSC 1600CA	Packard, Frankfurt a. M.
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg
Heraeus Sepatech Biofuge A	Heraeus, Hanau
Hybridisierungssofen BFD 53 WTP	Binder, Tuttlingen
Invertmikroskop ID 02	Zeiss, Oberkochen
LKB 2249 LC Gradient Pump	Pharmacia, Bromma, Sweden
LKB 11800 Pyramitone [®]	LKB, Stockholm, Schweden
Microfuge E	Beckmann, München
Mikrozentrifuge MC-13	Heraeus, Osterode

Mikropipetten	Gilson, France
Variable Wavelength Monitor	Pharmacia, Bromma, Sweden
8-Kanal-Mikropipette	Eppendorf, Deutschland
Minigel-Elektrophorese System (Mighty Small II, SE 250)	Hoefel Scientific Instruments, San Francisco, USA
Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)	Brand, Wertheim
Raster-EM Phillips,	
Shimadzu Spektrophotometer UV-120-01	Shimadzu, Duisburg
Sigma Laborzentrifuge 302 K	Sigma, Deisenhofen
Sterilbank, LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus, Hanau
Sterilpumpe	Microgon, NJ, USA
Transmissionselektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom OM U3 C.	Reichert, Wien, Austria
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Zellkammer Neubauer, Tiefe 20 µm	Brand, Wertheim

2.1.5. Medien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1. Kulturmedien für Trypanosomen

Das Minimum Essential Medium (MEM) wurde nach Eagle 1959 mit Modifikationen nach Hamm *et al.*, 1990 hergestellt.

Grundmedium

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

Die Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und den pH-Wert der entstandenen Lösung wurde auf 7,4 einstellen. Anschließend wurden die folgenden Substanzen zugegeben:

L-Arginin/ HCl	126
L-Histidin/ HCL x H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin/ HCl	10
Adenosin	12
Phenolrot	10

Die folgenden kommerziellen Stammlösungen wurden danach zugegeben:

	[ml/l]
MEM nicht essentielle	
Aminosäurenlösung (100x)	10
MEM Vitamin-Lösung (100x)	10

Das Grundmedium wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Es ist bis zu 3 Monate haltbar.

Blutformmedium

Zur Herstellung von Blutformmedium wurde das Grundmedium mit den folgenden Reagenzien ergänzt:

	[ml/l]
NaHCO ₃ (75 mg/ml H ₂ O dest.)	30
L-Cystein (3,03 mg/ml H ₂ O dest.)	10
BCS (0,56 mg/ml H ₂ O dest.)	1
2'Desoxythymidin (0,39 mg/ml H ₂ O dest.)	10
L-Glutamin (29,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Hypoxanthin (1,36 mg/ml 0,1 M NaOH)	10
Myristinsäure/BSA-Lösung *	20
Pen/Strep-Lösung (10.000U ml bzw 10 mg/ml)	5
Fötale Kälberserum (FCS) **	150
D-Glucose	5405 mg/l

Prozyklischesmedium

Zur Herstellung von Procyklischesmedium wurde das Grundmedium mit den folgenden Reagenzien ergänzt:

	[ml/l]
Pyruvat (22 mg/ml H ₂ O dest.)	10
L-Glutamin (29,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Hämin (2,5 mg/ml 0,1 M NaOH)	3
Prolin (60 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Pen/Strep-Lösung (10.000U/ ml bzw 10 mg/ml)	5
Fötale Kälberserum (FCS) **	100

Das Blutform- und Procyklische- Medium sind für 3 bis 4 Wochen bei 4°C haltbar. Erst nach einem Tag Lagerung kann das Medium verwendet werden.

MEM-Transformationsmedium pH 7,4 (Hamm *et al.*, 1990)

Das Transformationsmedium ermöglicht die *in vitro* Transformation von Blutformen in procyclische Fliegenformen. Zu dem Grundmedium werden die folgenden Lösungen gegeben:

	[ml/l]
L-Glutamin (29,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
L-Cystein (3,03 mg/ml H ₂ O dest.)	10
2'Desoxythymidin (0,39 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Pen/Strep-Lösung (10.000U/ml bzw 10 mg/ml)	5
Hypoxanthin (1,36 mg/ml 0,1 M NaOH)	10
cis-Aconitat (52,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Na-Citrat (88,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Fötale Kälberserum (FCS) **	100
Glucose	5,4 g/l

* Herstellung der Myristinsäure/BSA-Lösung: 1 g entfettetes BSA in 20 ml destilliertem Wasser lösen. Danach unter ständigem Rühren 100 µl von einer Myristinsäurelösung (240 mg/ml im 95% Ethanol) langsam zugeben (Ferguson und Cross, 1984).

** Das Serum musste vorher 30 min bei 56°C inaktiviert werden. Die Zugabe von FCS wird nach dem Sterilfiltrieren des Mediums unter dem Sterilbank durchgeführt.

2.1.5.2. Puffern zur Trypanosomen Isolierung aus Blut***Trypanosome dilution buffer (TDB); pH 7,7 (Cross, 1975)***

KCl	5 mM
NaCl	80 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	20 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2 mM
D-Glucose	20 mM

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

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

Separations-Puffer (SB); pH 8,0

Na ₂ HPO ₄	57 mM
KH ₂ PO ₄	3 mM
NaCl	44 mM
D-Glucose	55 mM

Einfrriermedium für Stabilate (EFM)

77 ml TDB und 23 ml Glycerin (87%), frisch gemacht

25 mM HEPES-Puffer; pH 7,4

HEPES	25 mM
NaCl	145 mM
D-Glucose	0,5 mM

25 mM HEPES gepufferte Saline (HBS); pH 7,4

HEPES	25 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM

2.1.5.3. Puffer zur Herstellung von Trypanosomenlysat**Protease-Inhibitor-Mix (PI, 1000x)**

Pepstatin	1 mM
(inhibiert saure Proteasen, Aspartat-Proteasen)	

Chymostatin	1 mM
(inhibiert Chymotrypsin, Cathepsin B, H & L)	
Leupeptin	
(inhibiert Serin- & Thiolproteasen)	1 mM

Die drei Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

10 mM Phosphat-gepufferte Saline (PBS); pH 7,4

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

Lysepuffer

PBS	10 mM
Protease-Inhibitor-Mix	1x
Triton X100	0,1%

2.1.5.4. Lösungen zur Trypsinierung von Fibroblasten

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 in EBSS gelöst. Die Lösungen mussten frisch angesetzt werden.

2.1.5.5. SDS-PAGE Gele-Herstellung und Färbung**SDS-Probenpuffer (2x)**

Tris/ HCl Puffer; pH 6,8	100 mM
DTT	100 mM
SDS	4,0%
Bromphenolblau	0,1%
Glycerol	20,0%

Gelherstellung

Acrylamid/Bisacrylamid	37,5%
SDS	10 %
Tris/HCl, pH 8,8	1 M
Tris/HCl, pH 6,8	1 M
APS	10 %
TEMED	99 %

Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1%

Coomassie-Färbung

Coomassie brilliant G-250	25%
Ethanol	25%
Eisessig	10%

Zur Entfärbung der Gele wird eine Lösung aus 25% Ethanol und 10% Eisessig gebraucht.

2.1.5.6. Puffer für *Western Blot*. Entwicklung mit Alkalischer Phosphatase**Transferpuffer, pH 9,2**

Tris/HCl	48 mM
Glycerin	39 mM
SDS	0,00375%
Methanol	20%

Blocking Puffer

Entfettetes Milchpulver in 2x PBS

PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	80 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	120 mM

PBS-Tween

0,1% Tween 20 in PBS

TBS (*Tris buffered saline*), pH 7,4

Tris/HCl	25 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM

Waschpuffer

Tris/HCl	10 mM
NaCl	120 mM
KCl	8,7 mM
Tween 20	0,1%

AP-Puffer (alkalische Phosphatase), pH 8,9

Tris/HCl	20 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	10 mM

Färbelösung für alkalische Phosphatase (AP)

BCIP (Bromo-chloro-indolyl-phosphat)	0,38 mM
NBT (Nitro-tetrazoliumblau)	0,4 mM
AP-Puffer	100 ml

2.1.5.7. Giemsa-Färbung**Weise-Puffer, pH 7,2**

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

2.1.5.8. TUNEL-Färbung

Das TUNEL-Reaktionsmix und der DAB-Substrat werden jeweils frisch im Puffer des TUNEL-Kit's 1:10 verdünnt.

0,3% H₂O₂ in Methanol

H ₂ O ₂ (30%)	100 µl
Methanol	10 ml

Permeabilisierungslösung

Triton X-100	1 g
Na-Citrat	1 g
H ₂ O bidest.	ad 1l

2.1.5.9. Immunfluoreszenz**Fixierlösung**

Paraformaldehyd	4%
Glutaraldehyd	0,1%

Das Paraformaldehyd wird in PBS unter leichtem Erwärmen gelöst. Es kann bis zu einer Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Das Glutaraldehyd wird frisch zugesetzt.

Neutralisierungs-Puffer, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	100 mM
Glycin	100 mM

Permeabilisierung-Lösung

0,2% Triton-X100 in PBS.

BSA-Lösung

1% BSA (Albumin Fraktion V, *bovine blood*) in PBS.

Bisbenzimid-Stammlösung

Bisbenzimid 1 mg/ml in H₂O dest.

Diese Stammlösung kann im Dunkeln bei 4°C einen Monat gelagert werden. Als Färbelösung dient eine 1:500 Verdünnung.

2.1.5.10. Cytotoxizität assay (nach Bodley *et al.*, 1995)**Lysepuffer, pH 5,5**

Natriumacetat	1 M
Triton X-100	1 %
p-Nitrophenyl-Phosphat	20 mg/ml

Das p-Nitrophenyl-Phosphat wird frisch zugesetzt.

2.1.5.11. Elektronenmikroskopie**0,2 M Na-Cacodylatpuffer (2x), pH 7,4**

Na-Cacodylat x 3H ₂ O	2,14 g
Sucrose	4 g
H ₂ O bidest.	ad 50 ml

Fixierlösung (2% Glutaraldehyd)

0,2 M Cacodylatpuffer (2x)	1,5 ml
Glutaraldehyd (8%)	0,75 ml
H ₂ O bidest.	0,75 ml

3% Osmiumtetroxid-Stammlösung (OsO₄)

Glasampulle Osmiumtetroxid (0,25 g) in 8,14 ml H₂O bidest.

Die Lösung muss im Dunkeln gelagert werden. Bei RT ist sie mehrere Monate haltbar.

1,5% OsO₄-Lösung

Verdünnung 1:1 der 3%igen OsO₄-Stammlösung mit 0,2 M Na-Cacodylatpuffer (2x; pH 7,4). Diese Lösung muss frisch angesetzt werden.

Uranylacetat-Lösung

0,5% Uranylacetat in H₂O bidest.

Die Lösung muss 2 Tage vor dem Gebrauch angesetzt und sterilfiltriert werden. Sie ist im Dunkeln bei RT etwa drei Wochen verwendbar.

EPON-Einbettungs-Lösung (ausreichend für eine Einbettung)

Agar 100 Resin (EPON 128)	2,00 g
DDSA (Dodecenylnsuccininanhydrid)	1,00 g
MNA (Methyl-nadic-anhydrid)	1,08 g
BBMA (Benzoldimethylamin)	0,04 g

Bleicitrat-Lösung für die Grids

Blei-Citrat	10 mg
-------------	-------

H ₂ O bidest.	ad 10 ml
NaOH 10 M	20 bis 50 µl

Uranylacetat-Lösung für Grids

5% Uranylacetat in H₂O bidest.

2.1.5.12. Lösungen für Dünnschichtchromatographie

Laufmittel

Diethylether	98,5 ml
Methanol	1 ml
Eisessig	0,5 ml

Färbereagenz

MnCl ₂ x 4H ₂ O (0,2 g/30 ml)	30 ml
Methanol	30 ml
H ₂ SO ₄ konz.	2 ml

Die Färbelösung wurde täglich frisch angesetzt. Die Zugabe der Schwefelsäure erfolgte wegen der stark exogenen Reaktion in mehreren Schritten.

2.1.5.13. Trennung und Identifizierung von Prostaglandinen

Laufmittel für die *High performed liquid chromatography* (HPLC) Analyse, Einstellung des pH-Wertes auf 4,0 mit Ammonium Hydroxid

Acetonitril	300 ml
H ₂ O bidest.	600 ml
Eisessig	0,5 ml

Laufmitteln für die *liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry* (LC-ESI/MS) Analyse

Mobile Phase A	10 mM Triethylamin in Wasser
Mobile Phase B	65:35 (v/v) Acetonitril:Methanol

2.1.5.14. Lösungen zur FACS-Analyse

Tetramethylrhodaminester (TMRE) Stammlösung

TMRE 25 μ M in H₂O dest.

Dichlorodihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA) Stammlösung

DCFH-DA 10mM in DMSO

Lysepuffer zur Analyse des DNA-Gehaltes

Na ₂ HPO ₄	7,7 mM
KH ₂ PO ₄	2,3 mM

Digitonin Stammlösung

Digitonin 6,4 mM in H₂O dest.

Färbelösung zur Analyse des DNA-Gehaltes

PBS	2 ml
Propidiumjodid (10 mg/ml)	4 μ l

Annexin-V-Puffer, pH 7,4

Hepes	10 mM
NaCl	140 mM

CaCl₂ 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

2.1.5.15. Puffer zur Sauerstoffverbrauchbestimmung

Elektrodenpuffer, pH 7,4

NaH ₂ PO ₄	443 mg/l
Na ₂ HPO ₄	2313 mg/l
KCl	370 mg/l
NaCl	4680 mg/l
MgCl ₂	191 mg/l
BSA	1500 mg/l
Glucose	900 mg/l

SHAM-Stammlösung

100 mM SHAM in 0,1 M NaOH

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht und Isolierung der Trypanosomen aus dem Blut

Die Ratten wurden mit 5×10^7 Trypanosomen aus Stabilaten (s. unten) intraperitoneal infiziert. Bei Mäusen wurden entsprechend 5×10^6 Trypanosomen pro Tier injiziert. Die Parasitämie wurde durch Blutabnahme aus dem Schwanz kontrolliert. Nach etwa 2,5 Tagen erreicht die Parasitämie circa 1×10^9 Trypanosomen pro ml. Nachfolgend wurden die Tiere mit CO₂ getötet, der Thorax geöffnet und nach Vorlegen von etwas kaltem CGA in den Brustraum die *Vena cava inferior* abgeschnitten. Das Blut (etwa 10 ml aus Ratten und 1 ml aus Mäusen) wurde in 15 ml Falconröhrchen gesammelt. Das Gefäßsystem wurde durch Herzpunktion noch mit 1 ml CGA gespült. Die Blutsuspension wurde abzentrifugiert (1.300 g, 10 min, 4°C) und nachdem das Serum mittels einer sterilen Pasteurpipette abgenommen wurde, wurden die im *buffy coat* enthaltene Trypanosomen in 2 ml CGA resuspendiert. Wenn notwendig, wurde zur weiteren Aufreinigung der Trypanosomen aus dem Blut eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Da die Trypanosomen auf Grund der VSG-Moleküle bei pH 8,0 ungeladen sind, können sie von den negativ geladenen Blutzellen getrennt werden. Nach der Äquilibration der DEAE-Cellulose (5 ml) mit 25 ml kaltem Separationspuffer wurde den *buffy coat* auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf der Trypanosomen erschien nach Spülen der Säule mit Separationspuffer. Die dadurch erhaltene Trypanosomen-Suspension wurde wieder abzentrifugiert und in Medium aufgenommen.

2.2.2. Herstellung von Stabilaten

Zur Herstellung von Ratten-Stabilaten wurde das CGA-Blut-Gemisch aus einer Ratte mit einer Parasitämie von ca. 5×10^8 Trypanosomen pro ml im Verhältnis 1:1 mit eisgekühltem Einfriermedium vermischt (Endkonzentration ca. $1-2 \times 10^8$ Trypanosomen/ml) und in 0,5 ml-Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt.

Zur Produktion der Blutform-Stabilate wurde der *buffy coat* in 4 ml CGA, 6 ml Blutformmedium und 2 ml Vetren[®]200 aufgenommen. Die Dichte der Trypanosomen-Suspension wurde mittels einer Zählkammer nach Neubauer (Tiefe 0,02 mm) bestimmt und mit Blutformmedium bei 2×10^8 Trypanosomen/ml eingestellt. Folgend wurde diese Suspension 1:1 mit Einfriermedium gemischt und in 0,5 ml-Aliquots auf Kryoröhrchen aliquotiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Ratten- Stabilate sowie die Blutform- Stabilate in Styrophorschachtel 1 h bei -20°C und über Nacht bei -70°C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gestellt.

2.2.3. Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen

Zur Kultivierung von Blutform-Trypanosomen wurden Stabilate (Blutform-Stabilate) verwendet. Die Stabilate wurden rasch unter warmem Wasser aufgetaut, 10 ml kaltem Blutformmedium zugegeben und bei 1.500 g (5 min, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in ca. 0,5 ml Blutformmedium aufgenommen. Nachdem die Zelldichte festgestellt wurde, konnten die entsprechenden Volumina dem vorgewärmten Kulturmedium zugegeben werden, so dass sich eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml ergab (Vorkultur). Die Vorkultur wurde in einem CO_2 -Brutschrank etwa 16 h bei 37°C inkubiert bis sie eine Zelldichte von ca. 8×10^5 Zellen/ml erreichte. Zum Ansetzen der jeweiligen Experimente wurde die Vorkultur erneut auf 2×10^5 Zellen/ml mit Blutformmedium herunter verdünnt. Die Zellen wurden täglich zweimal gezählt. Je nach Serum- Typ erreichen die Trypanosomen in Kultur bis zu 4×10^6 Zellen/ml innerhalb von 30-36 h, bevor sie in die stationäre Phase eintreten und dann zu Grunde gehen.

2.2.4. Transformation der Blutform von *Trypanosoma brucei* zur prozyklischen Form

Zur Transformation der frisch isolierten Blutformen zur prozyklischen Formen wurden die Zellen direkt in MEM-Transformationsmedium überführt. T25-Kulturflaschen mit 10 ml Medium wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml angeimpft und bei 27°C inkubiert. Innerhalb von 2 Tagen erfolgte die Transformation zu einer homogenen Population an prozyklischen Formen. Die Trypanosomen konnten dann in Prozyklischesmedium überführt werden (Hamm *et al.*, 1990). Etablierte Prozyklische-Kulturen zeigten eine Generationszeit von 15 h und konnten eine maximale Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml erreichen. Für die Herstellung von Prozyklische-Stabilaten wurden die Trypanosomen aus der logarithmischen Phase genommen, zu einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml mit frischem Prozyklischesmedium eingestellt und mit Einfriermedium 1:1 gemischt. Die Lagerung der Prozyklische-Stabilate erfolgte wie bei Ratten- und Blutform- Stabilaten.

2.2.5. *In vitro* Kultivierung der prozyklischen Form

Zur Kultivierung von prozyklischen Trypanosomen wurden ebenfalls wie bei der Blutform, Stabilate (Prozyklische-Stabilaten) verwendet. Nach Auftauen, Abwaschen und Zelldichtebestimmung des Stabilates wurden die verschiedenen Kulturen in Prozyklischesmedium auf 2×10^5 Zellen/ml angesetzt und bei 27°C im Brutschrank kultiviert. Um ständig über eine Prozyklische-Dauerkultur zu verfügen, wurde die Kultur routinemäßig wöchentlich auf 2×10^4 Zellen/ml subkultiviert.

2.2.6. Kultivierung der *Microtus montanus* Fibroblasten

Die *Microtus* Zellen wurden aus den im flüssigem Stickstoff gelagerten Stabilaten zur Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen gewonnen. Nach Auftauen, Abwaschen und Zelldichtebestimmung des Stabilates wurde die Kultivierung

in Blutformmedium durchgeführt. Die Kulturen wurden auf 1×10^5 Zellen/ml angesetzt und in einem CO₂-Inkubator bei 37°C kultiviert. Die Fibroblasten setzen sich auf dem Boden ab und innerhalb von 2-3 Tagen wachsen sie zu einem geschlossenen Zellrasen heran. Das Medium musste alle 3 Tage gewechselt werden, um die Nahrungsstoffe zu erneuern. Wöchentlich wurden die Kulturen trypsiniert und ausgezählt. Die absterbenden Zellen wurden durch Färbung mit Trypanblau (0,04%) erkannt und nicht für die neue Kultur berücksichtigt. Anschließend wurde die Zelldichte auf 1×10^5 Zellen/ml erneut eingestellt. Ohne Mediumwechsel sind die Fibroblasten etwa 8-10 Tage in Kultur stabil.

2.2.7. Trypsinierung von MEF Kulturen

Zur Subkultivierung von MEF-Zellen mussten sie durch Behandlung der Kultur mit Trypsin aus dem Boden herausgenommen werden. Nach einer Woche Wachstum wurde das Medium entfernt und die Zellen 2 min mit *Earle`s balanced salt solution* (EBSS) gewaschen. Die Fibroblasten wurden durch 15-20 min Inkubation mit 15 ml Trypsin-Lösung (siehe 2.1.5.4.) bei 37°C von der Kulturflasche abgelöst. Sobald die Zellen sich vereinzeln, wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Trypsin-Inhibitor-Lösung (siehe 2.1.5.4.) gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann abzentrifugiert (500 g, 10 min) und das Pellet in Blutformkulturmedium aufgenommen.

2.2.8. Kultivierung vom pleomorphen Trypanosomen Stamm AnTat 1.1.

Zur Erreichung des Zellwachstums vom pleomorphen Trypanosomen-Stamm AnTat 1.1 wird ein bestimmtes Medium mit einer festen Matrix (Methylcellulose) benötigt (Vassella und Boshart, 1996). Sie können jedoch in nicht axenischen Kulturen kultiviert werden. Die hier durchgeführten Experimente mit pleomorphen Trypanosomen wurden entweder auf Microtus Fibroblasten durchgeführt oder sie wurden in Blutformmedium mit den verschiedenen Substanzen inkubiert. Die pleomorphen Trypanosomen wurden aus der Maus isoliert, nachdem die Tiere mit 5×10^6 Trypanosomen infiziert wurden. Eine Maus Infektion kann mehrere Monate dauern.

Es bildet sich im Blut das typische wellenförmige Verhalten der Parasitämie, wobei eine proliferierende Phase mit einem hohen Anteil an *long slender* Formen (LS) und eine stationäre Phase, von *short stumpy* Formen (SS) dominiert, zu erkennen ist. Die Parasitämie wurde mindestens alle 3 Tage durch Blutentnahme bestimmt und die LS- und SS-Morphologie durch Giemsa-Färbung unterschieden. Die Isolierung wurde unter Sterilitätsbedingungen wie beschrieben (siehe 2.2.1.) ausgeführt. Die Kulturen wurden parallel auf Fibroblasten-Kultur und in Blutformmedium mit 4×10^5 Trypanosomen/ml gestartet.

2.2.9. Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Substanzen auf das Wachstum von *Trypanosoma brucei* unter *in vitro* Kultivierung

Für diesen Zweck wurde die Vorkultur auf 2×10^5 Trypanosomen/ml verdünnt und zum Zeitpunkt null die verschiedenen Substanzen zugegeben. Die Kulturen wurden zweimal täglich ausgezählt bis alle Zellen abgestorben waren. Zusätzliche Experimente wurden mit Zellen aus der stationären Phase durchgeführt. In diesem Fall fand keine Behandlung zum Zeitpunkt null statt, sondern die Zellen wurden bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert, die Zelldichte auf 3×10^6 Trypanosomen/ml eingestellt und dann mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Die Kontroll-Kulturen wurden immer mit der höchsten Konzentration des Lösungsmittels inkubiert.

2.2.10. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC₅₀) (nach Bodley *et al.*, 1995)

Zur Bestimmung der IC₅₀ wurde ein Cytotoxizitätsassay durchgeführt. Dazu wurde aus einer konzentrierten Stammlösung vom jeweiligen Wirkstoff eine Konzentrationsreihe angesetzt. Die Trypanosomen aus der Vorkultur wurden auf 2×10^5 Zellen/ml mit frischem Blutformmedium ohne Phenolrot verdünnt und 199 µl dieser Suspension in einer 96-well-Platte pipettiert. Dazu wurde 1 µl der entsprechenden Konzentration pro well zugegeben und 24 h in einem CO₂-Brutschrank bei 37°C

inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde zu jedem *well* 20 µl Lysepuffer (siehe 2.1.5.10.) mit *p*-Nitrophenyl-Phosphat gegeben, um die Saure-Phosphatase-Aktivität der überlebenden Zellen zu messen. Die Inkubation wurde 6 h bei 37 °C weitergeführt und anschließend die Extinktion des Nitrophenols bei 405 nm gemessen. Die Extinktionswerte sind direkt proportional zu der Zelldichte. Jede Konzentration wurde als Quadruplikat getestet.

2.2.11. Proliferationsassay mit methyl-³H-Thymidin

Zur Ermittlung der DNA-Synthese-Rate wurden Trypanosomen 24 h mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Daraufhin wurde 1 ml der entsprechenden Kultur entnommen, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 30 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. Dann wurden 750 µl des Überstandes verworfen und die Zellen in den restlichen 250 µl resuspendiert. Jeweils 200 µl der entsprechenden Trypanosomen-Suspensionen wurden dann auf eine 96-*well*- Platte aufgetragen und mit 2 µCi Methyl-³H-Thymidin pulsiert, bevor es für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert wurde. In ein Eppendorfgefäß wurden 150 µl von jeder Probe überführt und mittels Zentrifugation (30 s, 13000 rpm) zweimal mit TDB-Puffer gewaschen. Um das in die DNA inkorporierte Methyl-³H-Thymidin freizusetzen, wurden die Zellen mit 100 µl SDS (5%) lysiert. Anschließend wurden die Proben in Szintillationsgefäße pipettiert und 2,5 ml Ultima Gold zugegeben. Die Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.2.12. Transmissions- (TEM) und *Scanning*- (SEM) Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der Zell Morphologie durch TEM und SEM wurden die Zellen bis zum Entwässerungsschritt (100% Ethanol) nach dem gleichen Protokoll präpariert. Danach wurden die Zellen für die SEM auf einen Träger gespottet, beschichtet und im Arbeitskreis von Prof. Bardele vorbereitet. Für die TEM wurden die Zellen in EPON eingebettet.

Zur Präparation wurden 1×10^8 Trypanosomen verwendet. Die Zellen wurden zweimal in TDB gewaschen, bevor sie in 0,5 ml Fixierlösung 1 h bei 4°C fixiert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen dreimal in Cacodylat-Puffer (1x) gewaschen und 1 h in 0,5 ml 1,5%igem Osmiumtetroxid bei 4°C inkubiert. Erneut wurden die Zellen einmal mit Cacodylat-Puffer (1x) und dreimal mit H₂O bidest. gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit 0,5% Uranylacetat (0,5 ml) 1 h bei RT. Der folgende Waschschrift wurde mit H₂O bidest. ausgeführt. Zur Entwässerung der Zellen wurde eine aufsteigende Reihe von Ethanol-Lösungen (jeweils 1 ml) verwendet. Die Zellen wurden jeweils 5 min in jeder Lösung (50%, 70%, 95% und 100% Ethanol) entwässert. Die Entwässerung in 100% Ethanol wurde dreimal wiederholt. Das Ethanol wurde durch dreimaliges Inkubieren mit Propylenoxid ausgetauscht, bevor es zur Einbettung der Präparation kam. Die Einbettung wurde mittels dem Epoxidharz Epon 812 vorgenommen (Luft, 1961). Dazu wurden die Proben Schritterweise 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 Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zum Wechseln der Lösungen wurden die Zellen jeweils 30 s in einer Beckman Microfuge B abzentrifugiert (13.000 g, 30 s, RT).

Die eingebetteten Zellen wurden mit einem LKB 11800 Pyramitone[®] zu Trapezen (ca. 0,5 mm Basislänge) getrimmt und mit einem Ultramikrotom OM U3 (Reichert) geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit Kupfernetzchen aufgefischt.

Zum Kontrastieren der Schnitte wurden die Netzchen (Schnitte nach unten) auf einen 50 µl 5%igem Uranylacetat-Tropfen 60 min bei RT gesetzt (Lewis und Knight, 1977). Die Netzchen wurden mit H₂O bidest. gewaschen. Anschließend wurden sie 45 s bei RT in eine Bleicitratlösung getaucht, wieder gewaschen und getrocknet, bevor sie am Elektronenmikroskop eingeschleust wurden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss EM 109 Transmissions-Elektronenmikroskop mit TFP-Großbildkamera oder an einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde der Negativfilm Kodak Plus-X-Plan 120 (125 ASA, 60 x 70 mm) verwendet.

2.2.13. Immunfluoreszenz

Um die Immunfluoreszenz auszuführen, wurden $2-4 \times 10^6$ Zellen pro Probe zweimal mit HBS-Puffer gewaschen und in 0,2 ml HBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe der Fixierungslösung 2 h auf Eis fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 45 s in einer Beckman Microfuge E abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS gewaschen. Dann erfolgte eine 15 min-Inkubation in 0,5 ml Neutralisierungspuffer, bevor der Permeabilisierungspuffer (0,5 ml) zugegeben wurde. Die Permeabilisierung dauerte genau 5 min. Danach wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/BSA gewaschen und in 100 μ l der entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers 1h bei 4°C inkubiert. Der darauffolgende Waschschrift wurde mit 1 ml PBS/BSA durchgeführt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte für 1 h bei 4°C im Dunkeln. Die Antikörper wurden jeweils in frischem PBS/BSA verdünnt. Anschließend wurden 0,5 μ l Bisbenzimid-Stammlösung zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 0,5 ml PBS/BSA, dann mit PBS und zum Schluss mit H₂O dest. gewaschen, bevor etwa 5×10^5 Zellen pro Feld auf den Immunobjektträger aufgetragen und getrocknet wurden.

Die Auswertung fand an einem Olympus BH2 Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer ColorView12 Digitalkamera und der analySIS-Software von Soft Imaging System GmbH (Münster), statt.

2.2.14. TUNEL-Test

Zum Nachweis von Strangbrüchen in der DNA wurde das *in situ cell death detection* Kit von Roche verwendet. Ein modifiziertes Protokoll nach Madeo *et al.*, 1997 wurde durchgeführt. Die Zellen wurden wie bei der Immunfluoreszenz mit 4% Formaldehyd fixiert und nacheinander 2x in HBS- Puffer und 2x in 1% BSA/H₂O gewaschen. Danach wurden 5×10^5 Zellen pro Feld auf den Immunobjektträger aufgetragen und getrocknet. Nachdem die Zellen 2x mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit einer 0,3%igem H₂O₂-Lösung (siehe 2.1.5.8.) 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Objektträger mit PBS gewaschen und

getrocknet, bevor die Zellen für genau 2 min mit Permeabilisierungslösung behandelt wurden. Die Präparation wurde zwei weitere Male mit PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Darauf erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C mit 10 µl TUNEL-Reaktionsreagenz pro Feld in einer feuchten Kammer. Die Proben wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und 10 µl Converter-POD pro Feld zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min. Vor der Entwicklungsreaktion wurde der Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Für die Färbung wurden 30 µl DAB-Substrat-Lösung pro Feld pipettiert und für 10 min bei RT entwickelt. Anschließend wurde der Objektträger gewaschen und getrocknet, die Zellen in Gelatine eingebettet und am Mikroskop ausgewertet. Für die Auswertung wurden mindestens 100 Zellen gezählt.

2.2.15. Färbung mit Monodansylcadaverin

Monodansylcadaverin ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der spezifisch Autophagie-Vakuolen färbt (Biederbick *et al.*, 1995). Für den Nachweis dieser Vakuolen wurden 1×10^6 Trypanosomen in Blutformkulturmedium mit 10 µM Monodansylcadaverin für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch ein dreimaliges Waschen mit TDB-Puffer der nicht in die Vakuolen inkorporierte Farbstoff entfernt. Die Beurteilung der Färbung wurde an einem Olympus BH2 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

2.2.16. Färbung des Mitochondriums mittels TMRE

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde der Farbstoff Tetramethylrhodaminester (TMRE) verwendet. Dazu wurde 1 µl von der TMRE-Stammlösung (25 µM, in H₂O dest.) zu 1ml Kultur (mit 1×10^6 Zellen/ml) zugegeben und für 30 min unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und die Fluoreszenz der lebenden Zellen in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur) im roten Kanal gemessen. Die Auswertung wurde mit der CellQuest-Software durchgeführt. Die Färbung kann auch

am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Für die Quantifizierung ist jedoch das Zytometer notwendig.

2.2.17. Annexin-V-Färbung

Für den Nachweis von Phosphatidylserin-Exposition wurde die Bindungsfähigkeit von Annexin-V an diesem Molekül ausgenutzt. Hierzu wurden 500 µl Trypanosomensuspension (Zelldichte ~ $2-3 \times 10^6$ Zellen/ml) einmal mit Annexin-V-Puffer (siehe 2.1.3.14.) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50 µl Farbelösung (siehe 2.1.3.14.) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Bevor die Zellen am Durchflusszytometer gemessen wurden, wurden 450 µl Annexin-V-Puffer pro Probe zugegeben. Diese Doppelfärbung mit Propidiumjodid diente für die Ausschließung von Nekrose, da dieser Farbstoff nur nekrotische Zellen färbt. Die Annexin-V-Fluoreszenz wurde im grünen Kanal des Zytometers gemessen. Da das Emissionsspektrum der Propidiumjodid-Fluoreszenz sehr breit ist und in den grünen Kanal eindringen kann, war eine elektronische Kompensation des Gerätes erforderlich, um die Überlappung der zwei Fluoreszenzen zu vermeiden.

2.2.18. Färbung mit Propidiumjodid zur Analyse des DNA-Gehaltes

Zur Detektion von niedrigem DNA-Gehalt aufgrund von Degradationsprozessen wurde eine Propidiumjodid-Lösung verwendet. Je Kultur wurde 1 ml in Eppendorfgläser überführt und mit PBS einmal gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl Lysepuffer plus 1 µl Digitonin-Stammlösung (siehe 2.1.3.14.) aufgenommen und 30 min auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurden 100 µl Farbelösung (Propidiumjodid 20 µg/ml, in PBS) zugegeben. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und anschließend im roten Kanal gemessen. Gleichzeitig wurde damit die Analyse des Zellzyklus durchgeführt, da durch diese Methode die verschiedenen Phasen des Zellzyklus erkannt werden können.

2.2.19. Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mittels DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein Diacetat)

Für diesen Zweck wurden die Zellen mit dem nicht fluoreszierenden Farbstoff, Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DHFH-DA) behandelt. DCFH-DA besitzt zwei Acetat-Gruppen und ist deshalb zellpermeabel. Allerdings werden die Acetat-Gruppen intrazellulär durch Esterasen gespalten und dadurch das Molekül unpermeabel gemacht (DCFH). Wenn die Zelle intrazelluläre Sauerstoffspezies (ROS, reaktiv oxygen species) enthält, wird DCFH zum Fluoreszenz-Farbstoff DCF oxidiert. Trypanosomen-Kulturen wurden 1h bei 37°C mit 10 µM DCFH-DA inkubiert. Dann wurden 500 µl der Kultur in FACS-Röhrchen zur Messung überführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im grünen Kanal bestimmt.

2.2.20. Färbung des Kernes und der Kinetoplast mittels DAPI

Das 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) verfügt über eine hohe Sensibilität zur Detektion von Nukleinsäure. Nach dem Waschen der Zellen mit TDB-Puffer wurden sie auf einem Objektträger mit eiskaltem Methanol fixiert und getrocknet. Danach wurde die DAPI- Färbelösung (1 µg/ml in H₂O dest.) aufgetropft und 5 min bei RT in Dunkel inkubiert. Anschließend wurde den Objektträger mit H₂O dest. gewaschen und getrocknet, bevor am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde. Die Auswertung erfolgte an einem Olympus BH2 Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer ColorView12 Digitalkamera und der analySIS-Software von Soft Imaging System GmbH (Münster), durch Auszählung von Kinetoplasten und Kernen aus mindestens 100 Zellen.

2.2.21. Extraktion und Dünnschichtchromatographie (DC) von Prostaglandinen

Zur Untersuchung der Metabolisierung von Prostaglandinen wurde die Dünnschichtchromatographie angewendet. Das Blutformmedium wurde mit den verschiedenen Prostaglandinen bei 37°C inkubiert. Vor der Extraktion wurde der pH-Wert der Proben mit HCl auf pH 4,0 eingestellt. Für die Prostaglandin-Extraktion wurden dann die angesäuerten Proben mit Ethylacetat (Ethylacetat-Probe Verhältnis 2:1) in einem Scheidetrichter stark geschüttelt und dieser dann ruhen gelassen. Nach einer Wartezeit von etwa 2 min waren die wässrige Phase und die Ethylacetat-Phase deutlich erkennbar und gut getrennt. Die Ethylacetat-Phase wurde in ein Falcon-Röhr überführt und die wässrige Phase noch mal wie vorher extrahiert. Das gesamte extrahierte Volumen wurde in der SpeedVac getrocknet. Die Pellets wurden in 50 µl eiskaltem Ethanol aufgenommen und mindestens 30 min auf Eis gestellt. Das Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie wurde 2 h vor dem Lauf angesetzt und in der zugedeckten Chromatographie Kammer bei -20°C stehen gelassen. Unter einem Luftstrom wurden 10 µl pro Probe auf die DC-Platte (Kieselgel 60F Platten; 20 x 20 cm) aufgetragen und direkt in die Chromatographie-Kammer hineingestellt. Nach 45 min wurde die Platte getrocknet, kurz in das Färbereagenz getaucht und bei 120°C 10 min entwickelt. Die Detektion der Prostaglandine wurde unter einer Fluoreszenzlampe bei 224 nm durchgeführt.

2.2.22. Bestimmung der PGD₂-Abnahme durch HPLC

Zur Bestimmung der PGD₂-Abnahme wurde [³H]-PGD₂ verwendet. Das radioaktive Prostaglandin wurde mit kalten PGD₂ gemischt und im Kulturmedium inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0, 12, 24 h) wurden die Prostaglandine aus der Probe (2 ml) mit 4 ml Ethylacetat (1:2, v/v) dreimal extrahiert. Die organischen obere Phasen wurden vereinigt und in der SpeedVac getrocknet. Die Proben wurden in Ethanol resuspendiert, bevor sie auf die HPLC Säule injiziert wurden. Hierbei wurde ein modifiziertes Protokoll nach Haberl durchgeführt (Haberl *et al.*, 1998). Die Prostaglandine wurden mit einer C18 Hypersil Säule (4,6 x 250 mm; 5 µm

Teilchen; Grom, Deutschland) und C18 Hypersil Vorsäule getrennt. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure (40:60:0,1). Der pH-Wert der mobilen Phase wurde mit Ammoniumhydroxid auf pH, 4,0 eingestellt. Die Flussrate war 1 ml/min und das Probenvolumen 100 µl. Die Prostaglandine wurden durch *liquid scintillation counting* detektiert und durch Comigration mit nicht markierten Standards bei 190 nm identifiziert.

2.2.23. Trennung und Identifizierung der PGD₂-Metabolite durch Liquid Chromatographie und Elektrospray Ionisation/Masse Spektrometrie (LC-ESI/MS)

Zur Analyse des PGD₂-Metabolismus wurde dieses Prostaglandin im Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0, 20, 40 h) wurden die Prostaglandine aus der Probe (2 ml) mit 4 ml Ethylacetat (1:2, v/v) dreimal extrahiert. Die organischen obere Phasen wurden vereinigt und in der SpeedVac getrocknet. Vor der LC-ESI/MS Analyse wurden die Proben, die in 50 µl Acetonitril:Methanol (65:35, v/v) aufgenommen waren, 1:10 (v/v) mit 10 mM Triethylamin verdünnt und davon wurden 10 µl direkt in die Säule injiziert. LC wurde auf eine 0.5 x 50-mm Sapphire 110 C18 (5 µm) Säule (Grom, Herrenberg, Germany) gebunden an einem HP1100 capillary HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Die mobile Phase A und B waren 10 mM Triethylamin in Wasser bzw. 65:35 (v/v) Acetonitril:Methanol. Die Proben wurden durch einen Gradient getrennt: 0-5 min 10% von der mobilen Phase B, und 5-30 min 10-40% von der mobilen Phase B bei einer Flussrate von 15 µl/min. Der Ausgang der Säule war direkt gekoppelt mit der Elektrospray-Ionization-Quelle vom Esquire 3000plus Ionen Falle Masse Spektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Der Masse Spektrometer wurde in negative Ion Mode gehandhabt. Die folgenden Parameter wurden eingestellt: Temperatur des trocknen Gases (6 l/min), 275°C; Druck, 20 Psi; Elektrospray Spannung, + 3000 V; höchste Akkumulationszeit, 200 msec. Die Masse-Spektren wurden im Bereich 150-750 m/z genommen.

2.2.24. Bestimmung der Albuminbindung von Prostaglandin D₂

Die Bindung von Prostaglandin D₂ an das Albumin des Kulturmediums wurde durch ein modifiziertes Protokoll nach Olsen gemessen (Olsen *et al.*, 2004). Dafür wurden Centricon Y10 Filter und radioaktives ³H-Prostaglandin D₂ verwendet. Das Blutformmedium wurde 1 h bei 37°C mit verschiedenen PGD₂-Konzentrationen in den Centricon Y10- Filtern inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 8000 g, 4°C in einer Mikrozentrifuge (Biofuge A, Heraeus) abzentrifugiert. In Szintillationsgefäße, die bereits mit 2,5 ml Ultima Gold- Lösung gefüllt waren, wurden 100 µl des Filtrats zugegeben und die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.2.25. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Dazu wurden 3×10^7 Trypanosomen zweimal mit eiskaltem Elektrodenpuffer gewaschen, dann in 60 µl des selbem Puffers aufgenommen und auf Eis gestellt. In eine thermostatisch kontrollierte (25°C) Kammer wurden 350 µl Phosphatpuffer pipettiert. Die Kammer war mit einer Sauerstoffelektrode vom Clark-Typ ausgestattet. Nach der Stabilisierung des Sauerstoffgehalts im Puffer wurden 20 µl der Trypanosomen-Suspension in die Kammer gespritzt und der Sauerstoffverbrauch in den nächsten 10 min registriert. Die Hemmung der Zellatmung wurde durch Zugabe von 500 µM Salicylhydroxamsäure (SHAM) erreicht.

2.2.26. SDS-PAGE Gele und Western Blot Analyse

Zur Herstellung der Gele wurden alle Komponenten mit Ethanol gründlich gereinigt und montiert. Das Trenngel und das Sammelgel wurden nach dem folgendem Pipettiertschema hergestellt. Die Polymerisierungszeit beträgt ca. 30 min für jedes Gel.

Für 8 Mini-Gele (10%ig) (8x10 cm)	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	15,2 ml	4 ml
Aqua bidest.	13,2 ml	16,8 ml
10% SDS in H ₂ O dest.	456 µl	240 µl
1M Tris/ HCl Puffer; pH 8,8	17,2 ml	-
1M Tris/ HCl Puffer; pH 6,8	-	3 ml
10% Ammonium-peroxodisulfat (APS)	156 µl	120 µl
TEMED	48 µl	24 µl

Die Trypanosomen wurden in einem hypoosmotischen Puffer mit Proteaseinhibitoren lysiert und auf Eis gestellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford vorgenommen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Zugabe von Probepuffer und 5 min Kochzeit bei 100°C. Darauf wurde das für 10 µg entsprechende Proteinvolumen auf jede Tasche aufgetragen und die Elektrophorese bei 200 V vollzogen. Das System wurde mit einem Leitungswasserfluss gekühlt. Nach 45 min wurde der Lauf beendet und das Gel konnte gefärbt oder geblottet werden. Für den *Western Blot* wurden 3 Lagen Whatman-M3-Papier mit Transferpuffer befeuchtet und auf die Anodenplatte gelegt. Darauf wurde die Immobilonmembran gelegt, welche zuvor kurz in Transferpuffer getaucht wurde. Auf die Membran wurde das Gel und 3 weitere mit Transferpuffer befeuchteten Whatman-M3-Papier hingelegt. Der Transfer wurde mit einer Spannung von 20 V durchgeführt. Nach 1 h wurde die Membran in *blocking*-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran erfolgte 1 h Inkubation mit der entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers. Folgend wurde die Membran mit PBS/Tween gewaschen und mit dem zweiten Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit AP-Puffer gewaschen und die Farbelösung zugegeben. Die Entwicklung wurde mit PBS gestoppt.

3 Ergebnisse

3.1. Untersuchung des *in vitro* Effektes von Prostaglandinen auf das Zellwachstum monomorpher Trypanosomen

Die Entdeckung eines erhöhten PGD₂-Spiegels im *Liquor cerebrospinalis* führte zu der Vermutung, dass der Wirt infolge der Infektion eine gesteigerte PG-Produktion durchführt (Pentreath *et al.*, 1990). Frühere Arbeiten in unserem Labor zeigten aber überraschenderweise, dass Trypanosomen Prostaglandine auch unabhängig vom Wirt in *in vitro* Kulturen aus Arachidonsäure produzieren (Kubata *et al.*, 2000; 2002). Wenngleich hier vermutlich eine positive Beeinflussung der Umgebungsbedingungen durch den Parasiten im Vordergrund steht (Immunsuppression, Schlafinduktion etc.), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die sezernierten PGs im Sinne einer parakrinen oder endokrinen Regulation auch den Parasiten selbst beeinflussen und vielleicht sogar die Differenzierung beeinflussen.

3.1.1. Wachstumshemmung von monomorphen Trypanosomen durch Prostaglandine

Trypanosomen produzieren hauptsächlich Prostaglandin F_{2α}, E₂ und D₂, wenn sie mit Arachidonsäure inkubiert werden. Es wurde bereits publiziert (Kubata *et al.*, 2002, Rawer, 2004), dass verschiedene Stadien des Parasiten unterschiedliche Prostaglandine produzieren. *Long slender* Formen synthetisieren vor allem Prostaglandin F_{2α}, das jedoch kaum freigesetzt wird und im Cytoplasma der Zelle verbleibt, wo es möglicherweise eine Funktionen als Proliferationsfaktor erfüllt (Jimenez *et al.*, 1983; Sauane *et al.*, 2000). Dagegen wird Prostaglandin D₂ hauptsächlich von der *short stumpy* Form synthetisiert und ins Medium sezerniert. Diese unterschiedliche Prostaglandin-Produktion der einzelnen Trypanosomen-Formen könnte von physiologischer Bedeutung sein, die vermutlich Funktionen sowohl für das Überleben im Wirt als für den Parasiten selbst besitzt. Zur Untersuchung der

Prostaglandin-Effekte auf die Blutformen des monomorphen Stammes MITat 1.2 wurden Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen von PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α} inkubiert. Dabei induzierte PGD₂ eine Hemmung des Zellwachstums, das abhängig von der eingesetzten Konzentration war. Bei Konzentrationen unter 5 μM wuchsen die behandelten Trypanosomen bis zu 12 h wie die Kontroll-Zellen, gingen danach aber rasch in die stationäre Phase über und starben dann etwa einen Tag früher als die Kontrollen (Abb. 3.1.). Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe von PGE₂ und PGF_{2α} zu Trypanosomen-Kulturen keine Inhibierung des Zellwachstums, selbst dann nicht, wenn die Zellen mit Konzentrationen von 15 bzw. 20 μM inkubiert wurden (Abb. 3.1 B und C). Das spricht für einen spezifischen Effekt von PGD₂ auf die Blutform von *Trypanosoma brucei*. Da der Effekt von PGD₂ bei der Kultivierung erst nach etwa 12 h in Erscheinung trat, wurde durch Zugabe nach verschiedenen Inkubationszeiten getestet, ob die Wirkung dieses Prostaglandins in Abhängigkeit vom Alter der Kultur zunahm. Dabei zeigte sich, dass die Zellen um so sensibler reagierten, je älter die Kultur war (Abb. 3.1 D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Zellen aus der stationären Phase empfindlicher für PGD₂ sind, als Zellen aus der logarithmischen Phase.

3.1.2. Bestimmung der halbinhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Prostaglandinen

Um die genaue Hemmwirkung der von Trypanosomen produzierten PGs auf den Parasiten zu analysieren, wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden Trypanosomen für jeweils 24 h mit einer Konzentrationsreihe der Prostaglandine D₂, E₂ und F_{2α} inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der sauren Phosphatase in den lebenden Trypanosomen spektrophotometrisch bestimmt. Dieser Test ist eine etablierte Methode zur Erfassung der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Konzentration toxischer Verbindungen (Bodley *et al.*, 1995). Abbildung 3.2 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Effekte der verwendeten Prostaglandine auf die Parasiten. Interessanterweise sind diese drei Verbindungen strukturell sehr ähnlich: Prostaglandin F_{2α} besitzt zwei Hydroxyl-Gruppen in der Position 9 und 11 seines Cyclopentanrings, während Prostaglandin D₂ und Prostaglandin E₂ isomere

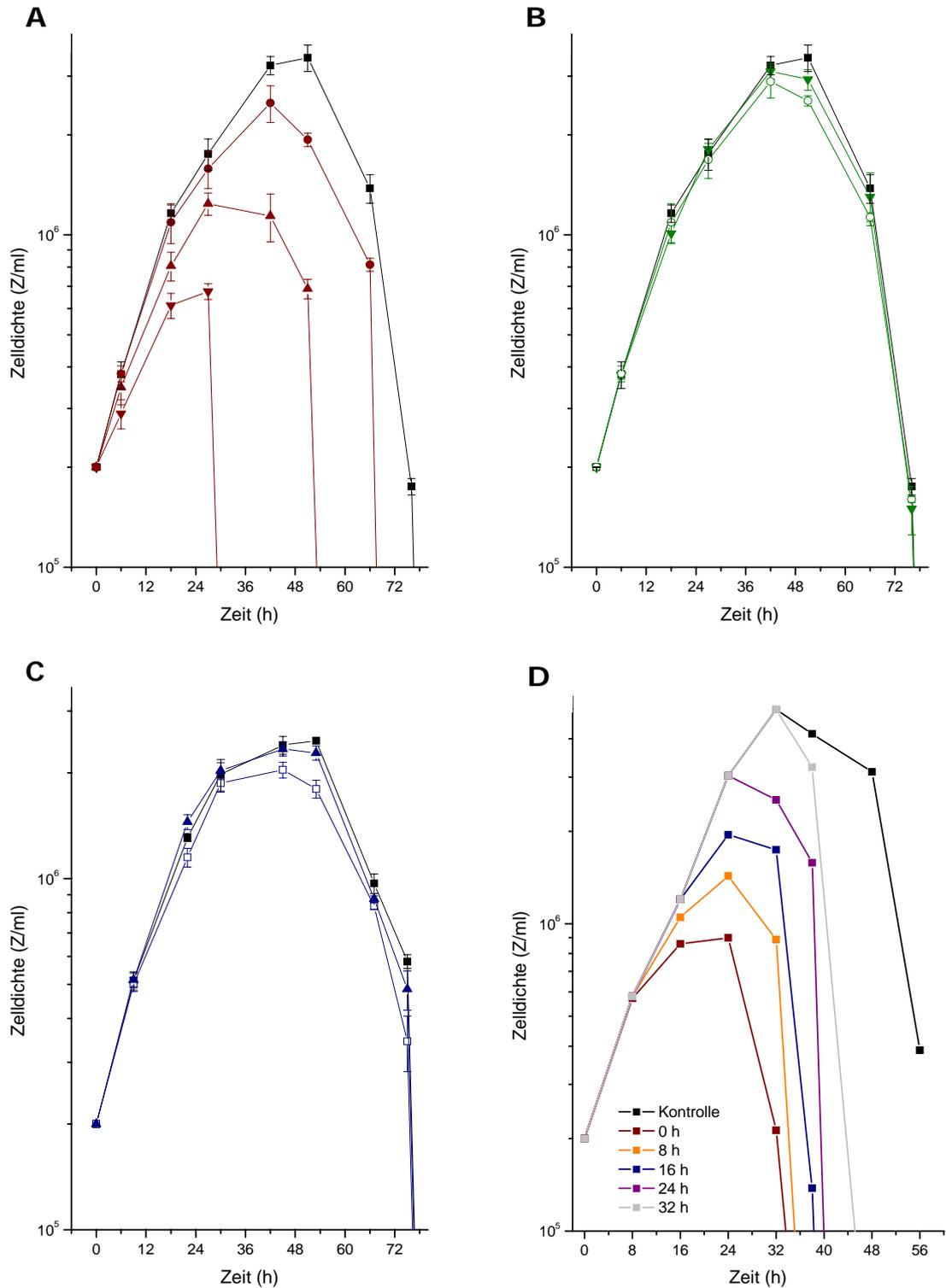


Abbildung 3.1. Wirkung von Prostaglandinen auf die Blutform in Kultur. A: Hemmung des Zellwachstums mit verschiedenen PGD₂-Konzentrationen. **B:** Behandlung mit PGF_{2α}. **C:** Inkubation mit PGE₂. (● 2,5 μM; ▲ 5 μM; ▼ 10 μM; □ 15 μM; ○ 20 μM; ■ Kontrolle). **D:** Verhalten der Kultur nach der Zugabe 5 μM PGD₂ zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten.

Moleküle sind, bei denen nur die funktionellen Keto- und Hydroxyl-Gruppen an C9 und C11 vertauscht sind. Dennoch war der IC_{50} -Wert von PGD_2 etwa 43 bzw. 54 Mal niedriger als die IC_{50} -Werte von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$. Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für einen spezifischen Effekt von PGD_2 auf die Blutform von *Trypanosoma brucei* und schließen eine unspezifische Reaktion aufgrund seines hydrophoben Charakters aus.

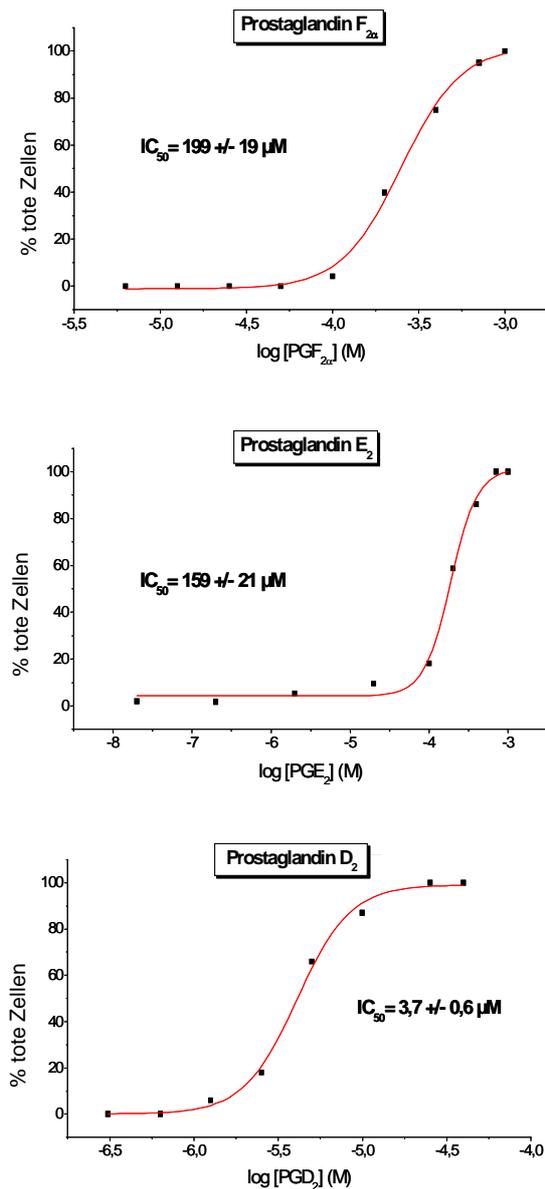


Abbildung 3.2. IC_{50} von Prostaglandinen. Die IC_{50} wurde nach 24 h Inkubation mit $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 und PGD_2 bestimmt.

3.1.3. Bestimmung der Zellproliferation

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden auch durch einen unabhängigen Proliferations-Assay bestätigt. Dazu wurde die Inkorporation von Methyl- ^3H -Thymidin in neu synthetisierte DNA gemessen. Den Zellen wurde nach 24 h PG-Behandlung jeweils 2 $\mu\text{Ci}/\text{Feld}$ Methyl- ^3H -Thymidin zugesetzt, dann wurden sie für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, in einer 1%er SDS-Lösung lysiert, und einer Radioaktivitätsmessung am Szintillationszähler zugeführt. Abbildung 3.3 zeigt deutlich, dass Prostaglandin D₂ eine starke Hemmung der Proliferation induzierte. Dieser PGD₂-Effekt war konzentrationsabhängig. Diese Methode ergab eine Hemmung auf 50% bei 2,5 μM PGD₂, was darauf hindeutet, dass dieses Verfahren im Vergleich mit dem manuellen Auszählen der Kulturen mittels Hämocytometer erheblich genauer ist. Im Gegensatz zu PGD₂ führten PGE₂ und PGF_{2 α} auch hier zu keiner signifikanten Hemmung der Proliferation; sie führten sogar zu geringfügig (aber signifikant) höheren Werten als die unbehandelten Kontroll-Zellen. Das spricht für eine schnellere Vermehrungsrate, was auch schon für andere Zelltypen berichtet wurde (Jimenez *et al.*, 1983; Sauane *et al.*, 2000).

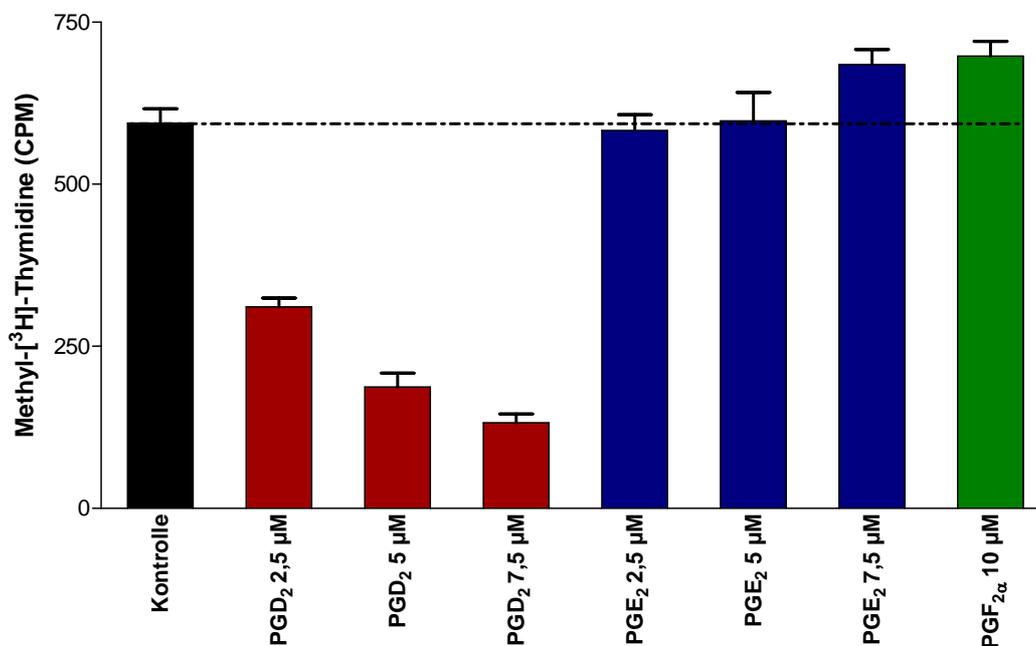


Abbildung 3.3. Bestimmung der zellulären Proliferation. Die Vermehrungsrate wurde durch Messung der Inkorporation von Methyl- ^3H -Thymidin nach 24 h Behandlung mit den verschiedenen Prostaglandinen bestimmt.

3.2. Wirkung von Prostaglandinen auf das Zellwachstum pleomorpher Trypanosomen

Für dieses Experiment wurde der Stamm AnTat 1.1 verwendet. Die pleomorphen Trypanosomen wurden aus infizierten Mäusen isoliert und entweder auf Fibroblasten oder in axenischer Kultur mit den PG inkubiert. Der Zweck dieses Ansatzes war die Isolierung einer Trypanosomen-Population aus infiziertem Blut, die einen großen Anteil an *long slender* oder *short stumpy* Formen enthielt. Nach der Infektion einer Maus wurde die Parasitämie regelmäßig durch Blutentnahme aus der Schwanzvene kontrolliert. Dazu wurde die Morphologie der Parasiten durch Giemsa-Färbung eines Blutausriches beurteilt. Die Isolierung der Parasiten erfolgte, wenn ein hoher Anteil des jeweiligen Stadiums vorlag. Die Abbildungen 3.4 und 3.5 stellen den Infektionsverlauf von zwei Mäusen dar. Aus Maus A (Abb. 3.4 A) wurden *slender* Formen isoliert (*slender* Anteil: 70%). Dagegen bestand die Parasitämie in Maus B zum Zeitpunkt der Präparation zu 97% aus der *stumpy* Form (Abb. 3.5 A). Die Abbildungen zeigen zusätzlich die typische Morphologie von den aus den jeweiligen Mäusen isolierten Trypanosomen. Nach der Isolierung der Trypanosomen wurde zur Kontrolle eine Transformation zur prozyklischen Fliegenform durchgeführt. Tatsächlich konnten die Trypanosomen aus Maus A nicht gut transformieren und infolge dessen auch nicht in PC-Medium wachsen (Abb. 3.4 B). Dagegen konnten Trypanosomen aus Maus B nicht nur problemlos transformieren, sie wuchsen auch nach der Überführung in glucosefreies prozyklisches Medium spontan mit hoher Proliferationsrate (Abb. 3.5 B) und zeigten die für prozyklische Zellen charakteristische Morphologie. Parallel zur Transformation wurden die Trypanosomen auch in Gegenwart von Fibroblasten (*feeder cells*) kultiviert. Unter diesen Bedingungen führte die Behandlung von *long slender* Trypanosomen mit PGD₂ innerhalb von 24 h Inkubation zu einer Hemmung des Zellwachstums. Danach war das Verhalten der Kulturen ähnlich wie bei monomorphen Trypanosomen, d.h. die Zellen gingen in die stationäre Phase über und starben dann rasch ab. Die Unterschiede zwischen den Trypanosomen-Kulturen auf Fibroblasten und ohne diese waren gering, außer dass die auf Fibroblasten kultivierten Trypanosomen höher gewachsen sind und länger in Kultur überlebt haben als die ohne Fibroblasten (Abb. 3.4 C und D). Im Gegensatz dazu waren die *stumpy* Formen empfindlicher gegenüber PGD₂, vor allem in Kulturen ohne Fibroblasten (Abb. 3.5 C und D).

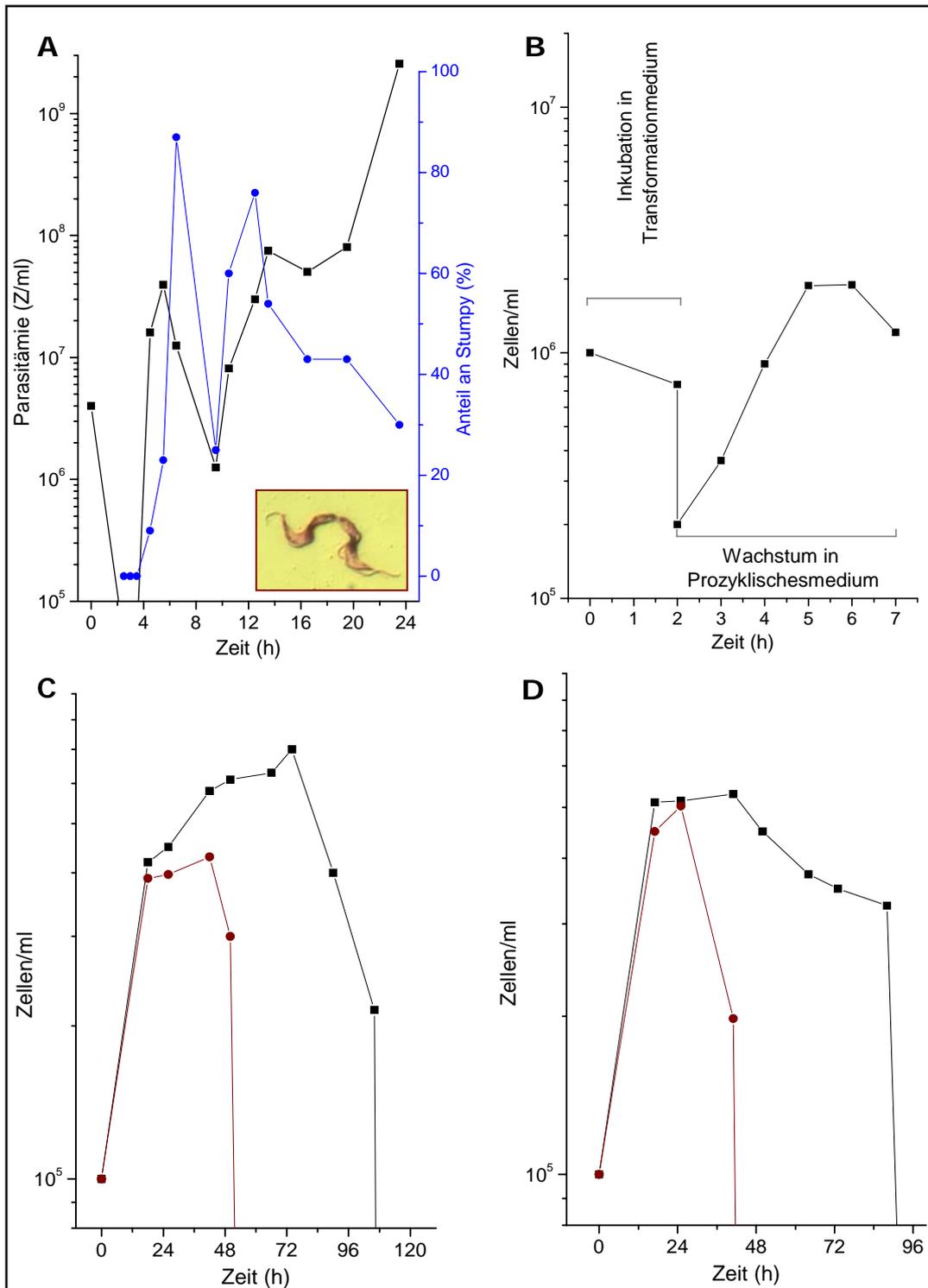


Abbildung 3.4. Isolation und Behandlung von pleomorphen Trypanosomen aus der Maus A (Anteil an der *slender* Form: 70%). **A:** Darstellung der Parasitämie (■) und Prozent der *stumpy* Form (●). Unten sieht man *kissing* Trypanosomen (Teilungsstadium) mit der typischen *slender* Morphologie. **B:** Transformation von isolierten Trypanosomen. **C** und **D:** Wachstumskurven von Trypanosomen mit (C) und ohne Fibroblasten (D) in Blutformmedium mit (●) und ohne (■) PGD₂-Behandlung (5 μM).

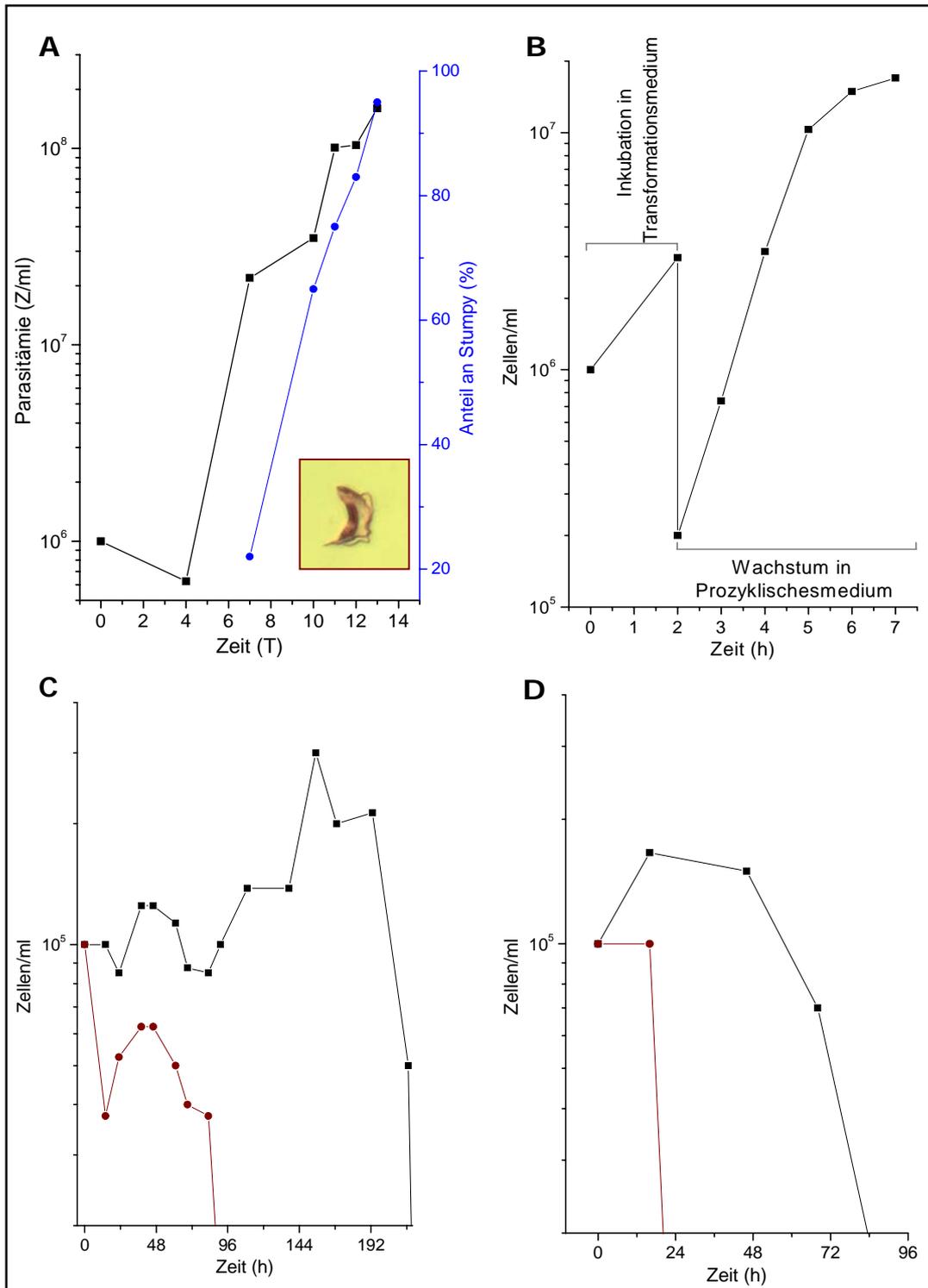


Abbildung 3.5. Isolierung und Behandlung von pleomorphen Trypanosomen aus der Maus B (Anteil an der *stumpy* Form: 97%). **A:** Darstellung der Parasitämie (■) und Prozent der *stumpy* Form (●). Unten sieht man eine Zelle mit der typischen *stumpy* Morphologie. **B:** Transformation von isolierten Trypanosomen. **C** und **D:** Wachstumskurven von Trypanosomen mit (C) und ohne Fibroblasten (D) in Blutformmedium mit (●) und ohne (■) PGD₂-Behandlung (5 μM).

3.3. Effekt von PGD₂ auf cAMP-induzierte Trypanosomen

Für diese Versuche wurde das cAMP-Analogon 8-Bromo-cAMP verwendet. Diese Substanz induzierte in einem monomorphen Stamm von *Trypanosoma brucei* die Differenzierung von der *long slender* zur *short stumpy* Form (Breidbach *et al.*, 2002). In diesen Versuchen wurden unsere monomorphen Trypanosomen (MITat 1.2) mit und ohne 100 μ M 8-Bromo-cAMP (Br-cAMP) für 24 h inkubiert, bevor sie mit PGD₂ behandelt wurden. Wie Abbildung 3.6 A zeigt, verursachte eine 24 h Inkubation die Inhibierung des Wachstums der Br-cAMP-behandelten Trypanosomen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und löste morphologische Veränderungen aus. Außerdem führte die Vorbehandlung mit Br-cAMP zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit der Parasiten gegenüber PGD₂. Diese Ergebnisse passen gut zu den mit pleomorphen Trypanosomen erhaltenen Daten und deuten darauf hin, dass die *stumpy* Form erheblich empfindlicher auf PGD₂ reagiert als die *slender* Form (Abb. 3.6 B).

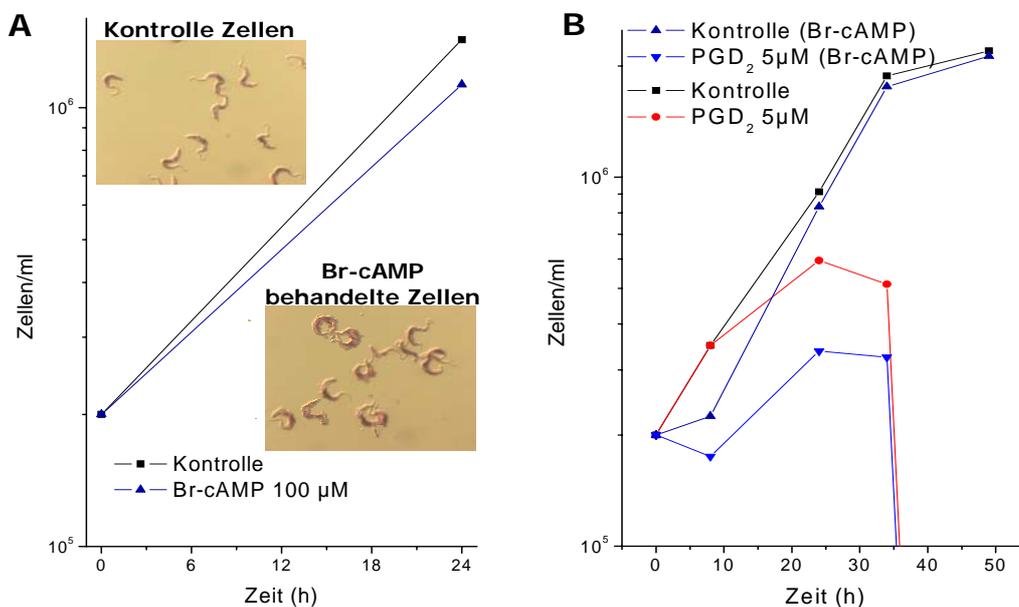


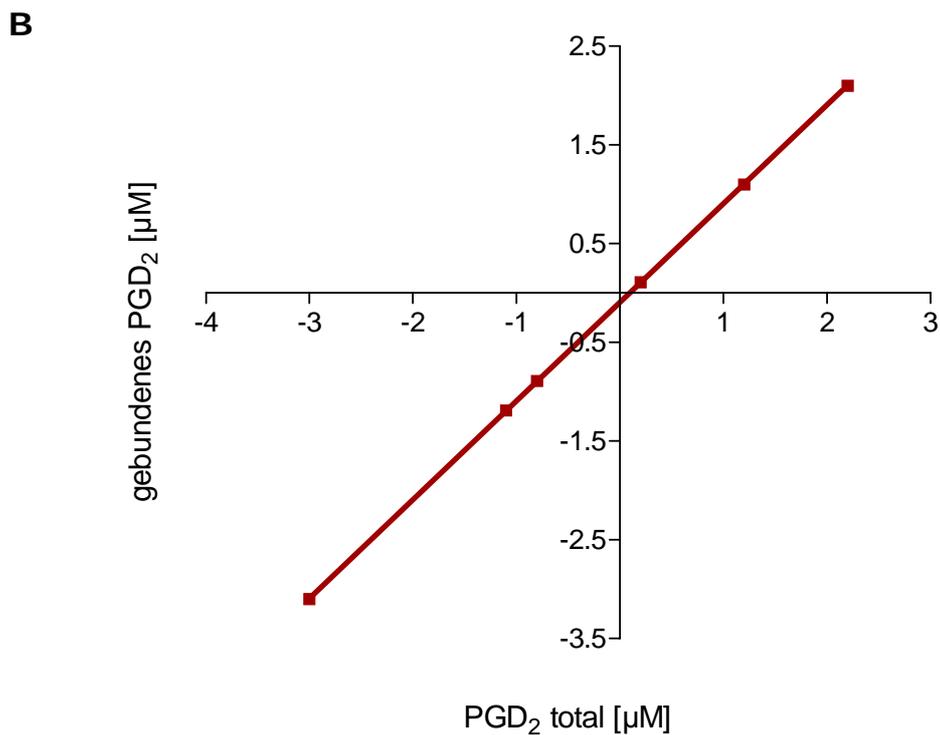
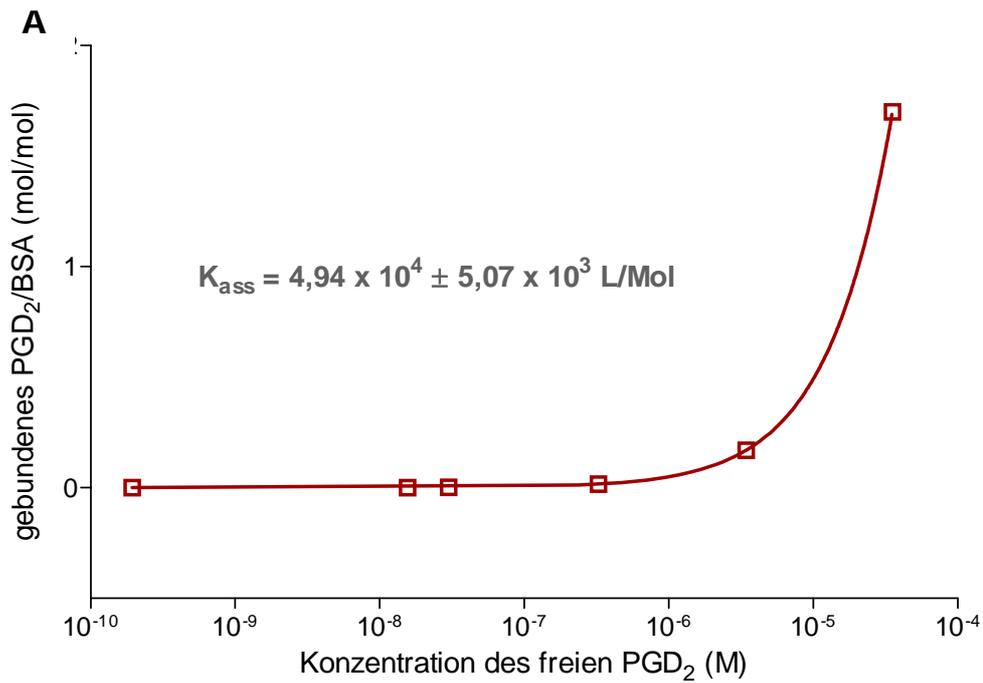
Abbildung 3.6. Verstärkung des PGD₂ Effektes nach der Behandlung mit 8-Bromo-cAMP. **A:** Vorbehandlung mit Br-cAMP. Aufnahmen von Kontroll- und behandelten Zellen zeigen die Morphologie nach 24 h Inkubation. Ein höherer Anteil der behandelten Trypanosomen hatte die charakteristische *stumpy* Morphologie. **B:** Effekt von PGD₂ auf Br-cAMP behandelte und unbehandelte Zellen. Alle Zellen wurden nach 24 h gewaschen und verdünnt, bevor beide Kulturen mit 5 μ M PGD₂ behandelt wurden. Ein Aliquot jeder Kultur wurde nach der Verdünnung ohne PGD₂ Behandlung als Kontrolle weiter kultiviert.

3.4. Bestimmung der Prostaglandin D₂-Bindung an Albumin

Obwohl die physiologische PGD₂-Konzentration im piko- bis nanomolaren Bereich liegt, existiert eine große Anzahl von Veröffentlichungen über die Effekte von Prostanoiden unter *in vitro* Bedingungen, die nur bei mikromolaren Konzentrationen vorkommen. Da diese Moleküle einen lipophilen Charakter besitzen, können sie an die Proteine des Serums binden. *De facto* sind einige Studien durchgeführt worden, die über die Bindung von Prostaglandinen an einzelne Proteine berichten. Diese Bindung erfolgt speziell an Serumalbumin und führt zu einer Inaktivierung durch unspezifische proteinkatalysierte Umsetzung. Tatsächlich bindet eine Albuminlösung von 4 mg/ml 43% PGE₂ und 76% PGA₂ (Raz, 1972a; 1972b). Aufgrund des Serumanteils im Kulturmedium (10%), ist Albumin hier ebenfalls in signifikanter Menge vorhanden.

Um die tatsächliche Konzentration von PGD₂, die zur Hemmung des Zellwachstums bei Trypanosomen führt, im Kulturmedium zu bestimmen, wurde die Bindung von radioaktiven PGD₂ an Albumin durch eine Zentrifugationsmethode gemessen. Dazu wurden verschiedene PGD₂-Konzentrationen in Centricon Y10 Filtern mit je 5 mg/ml Albumin für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in den Filtern für 15 min bei 5000 g zentrifugiert, und ein definiertes Volumen (100 µl) des Filtrates zur Radioaktivitätsbestimmung mittels Szintillationsmessung (LSC) eingesetzt. In Abbildung 3.7 (A) ist die Konzentration des freien PGD₂ in einer log-Skala gegen die Konzentration des an Albumin gebundenen PGD₂ (Mol zu Mol) aufgetragen. Daraus wurde die Assoziationskonstante (K_{Ass}) von PGD₂ berechnet, wobei ein Interaktionssystem von 1:1 (Albumin-Prostaglandin) angenommen wurde. Der K_{Ass} -Wert betrug für PGD₂ $4,94 \times 10^4 \pm 5,07 \times 10^3$ L/mol, und war somit ähnlich wie die für PGA₂, PGE₂ und PGF_{2 α} berichteten Konstanten (Raz, 1972b).

Zur Bestimmung der freien PGD₂-Konzentration, welche die beobachteten Effekte unter den experimentellen Bedingungen auslöst, wurde eine PGD₂-Konzentrationsreihe in Kulturmedium angesetzt und wie oben beschrieben behandelt. Die Daten wurden logarithmisch dargestellt, um eine lineare Abhängigkeit zu erhalten (Abb. 3.7 B). Daraus wurde mit Hilfe einer statistischen Regression die freie PGD₂-Konzentration im Medium berechnet. Wie die Ergebnisse zeigten, binden bei 37°C innerhalb von 1 h $80.3\% \pm 0,08\%$ des zugesetzten PGD₂ an die Proteine bzw. das Albumin des Mediums.



$$3,7 \mu\text{M PGD}_2 \text{ total} = 0,729 \mu\text{M PGD}_2 \text{ frei}$$

Abbildung 3.7. Bindung von Prostaglandin D₂ an Albumin. **A:** Bindung von PGD₂ (verschiedene Konzentrationen) an Albumin (5mg/ml) **B:** Lineare Regression zur Ermittlung des Anteils an gebundenem PGD₂. Die Inkubation erfolgte 1 h in Blutformmedium bei 37°C.

3.5. Untersuchung des PGD₂-Stoffwechsels in Trypanosomen-Kulturen

Prostaglandine besitzen eine sehr kurze Halbwertszeit. Sie können durch enzymatische Aktivitäten oder durch spontane Umwandlung andere Moleküle generieren. Einige dieser Metabolite sind biologisch aktiver als das ursprüngliche Prostaglandin, andere dagegen besitzen gar keine Aktivität mehr. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte von PGD₂ selbst oder von aktiveren Metaboliten ausgelöst werden, wurde seine Metabolisierung im Medium durch Dünnschichtchromatographie, HPLC und LC-ESI/MS analysiert.

3.5.1. Dünnschichtchromatographie

Hierzu wurde PGD₂ (5 µM) in Medium bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Proben mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet und in Ethanol aufgenommen. Die Proben wurden auf Kieselfolie aufgetragen und getrennt; als authentische Standards wurden käufliche PGs eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass PGD₂ schnell im Medium umwandelt wurde: innerhalb von 20 h war die PGD₂-Bande fast nicht mehr sichtbar. Die Bildung von Umwandlungsprodukten (Metaboliten) wurde durch das Auftreten anderer Banden bestätigt. Ihre Identifizierung durch die Standards war jedoch nicht möglich, da keine vollständige Trennung erreicht wurde (Abb. 3.8 A). Es ist bekannt, dass Albumin nicht nur die Fähigkeit hat, PGD₂ (u.a.) zu binden, sondern auch es in andere Metabolite umzuwandeln. Zur Untersuchung dieser Tatsache wurde das PGD₂ in TDB-Puffer, in Grundmedium und in Blutformmedium inkubiert. Die ersten zwei Lösungen waren Albumin-frei, während das Blutformmedium 5 mg/ml Albumin enthielt. Die Ergebnisse zeigten, dass Albumin die Umwandlung von PGD₂ in andere Metabolite tatsächlich beschleunigt, da die Inkubation von PGD₂ für 5 h in Grundmedium oder in TDB-Puffer nur jeweils eine geringe Abnahme verursachte, während sie in Blutformmedium praktisch vollständig verschwand (Abb. 3.8 B).

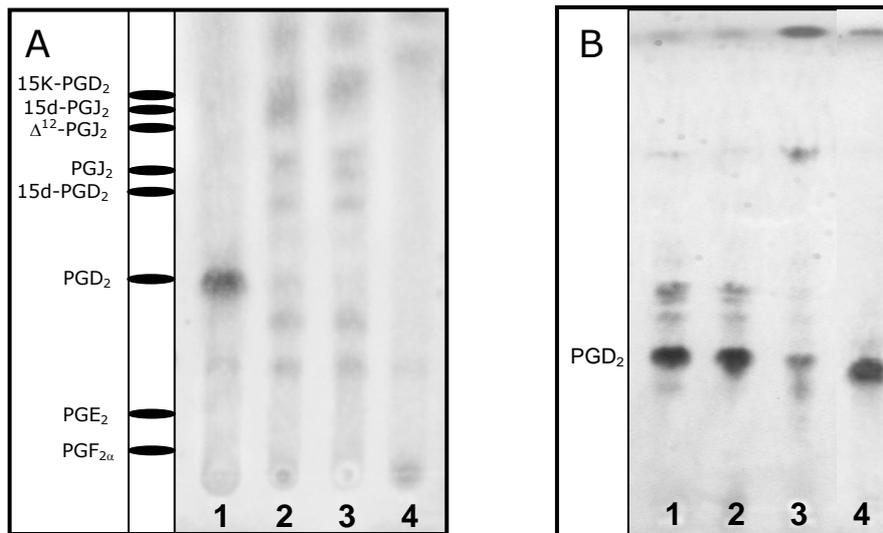


Abbildung 3.8. A: Dünnschichtchromatographie von PGD₂-Proben. Die Trennung fand nach verschiedenen Inkubationszeiten (nach 0 h [1], 20 h [2], 40 h [3]) statt. Medium ohne PGD₂ wurde als Kontrolle verwendet (4). **B:** Effekt vom Albumin auf die Metabolisierung von PGD₂. Die Inkubation von PGD₂ wurde für 5 h in TDB-Puffer (1), in Grundmedium (2) und in Blutformmedium (3) bei 37°C durchgeführt. PGD₂ zeigt keine Metabolisierung nach 0 h in Blutformmedium (4).

3.5.2. Trennung und Identifizierung der PGD₂-Metabolite durch HPLC und LC-ESI/MS

Zur Untersuchung des PGD₂-Metabolismus durch HPLC wurden die Proben wie bei der Dünnschichtchromatographie vorbereitet, allerdings wurden sie anstelle von Ethanol in Acetonitril/Methanol (65:35) aufgenommen. Zum Auftrag auf die Säule wurden die Proben 1/10 in H₂O verdünnt und dann in 10 µl Aliquots über ein manuelles Injektionsventil appliziert. Das Laufmittel bestand aus (A) 10 mM Triethylamin und (B) Acetonitril/Methanol [65:35]. Die verschiedenen PGD₂-Derivate wurden über einen Gradienten (5 min 10% B; 5-30 min 10-40% B) auf einer C18 Säule (Grom Sapphire 110: 0,5 x 50 mm) getrennt. Die Flussrate betrug 15 µl/min. Abbildung 3.9 zeigt die Retentionszeiten der kommerziell erhältlichen Standards. Zur Identifizierung der verschiedenen Derivate wurden zwei Parameter berücksichtigt: die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster.

Die Inkubation von PGD₂ im Kulturmedium führte zu einer schnellen Abnahme dieses Prostanoids: bereits nach 12 h Inkubation bei 37°C waren etwa 80% des

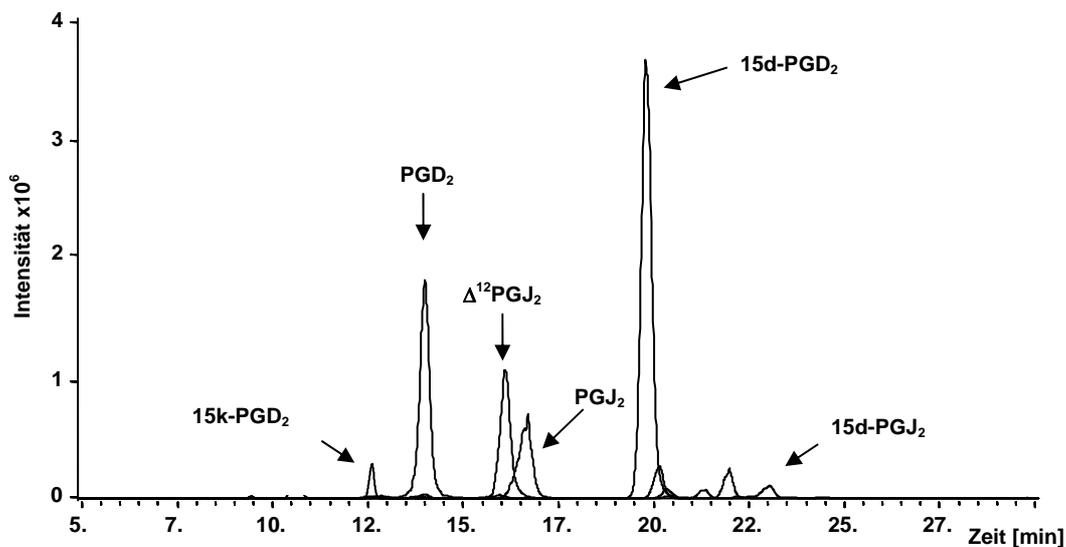


Abbildung 3.9. Analyse der kommerziell verfügbaren Standards durch HPLC.

vorhandenen PGD_2 in andere Derivate umgewandelt (*data not shown*). Die Ergebnisse der Electrospray Ionization Chromatographie (EIC) zeigten, dass PGD_2 ein m/z von 351 aufwies, während seine Hauptabbauprodukte Molekulargewichte von m/z gleich 333 bzw. 315 besaßen. Die Analyse des Kulturmediums zeigte, dass keiner der Metabolite im reinen Medium vorhanden war. Aufgrund des Vergleichs mit den Standard-Verbindungen ergab sich, dass die Ionen mit einem m/z von 351 nicht nur PGD_2 sondern auch dem 15k-PGD_2 entsprachen (Abb. 3.10). Im Verlauf der Inkubationszeit kam es zu einer Abnahme an PGD_2 und zu einer Zunahme an 15k-PGD_2 . Die 333-Ionen wurden als $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$, PGJ_2 und 15d-PGD_2 identifiziert (Abb. 3.11). Nach 20 h Inkubation wurde ein klares Signal von PGJ_2 und 15d-PGD_2 gemessen, das bis zu 40 h noch deutlich zunahm. Im Gegensatz dazu konnte $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ erst nach 40 h nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Anschließend ergab die Analyse des Ions mit einem m/z -Wert von 315 eine Identifizierung als 15d-PGJ_2 . Interessanterweise war im Kontroll-Medium ein Molekül mit ähnlichem Molekulargewicht vorhanden (Abb. 3.12), die Bildung von 15d-PGJ_2 aus PGD_2 konnte aber zweifelsfrei nachgewiesen werden, da eine Zunahme dieses Prostaglandins mit der Inkubationszeit erfolgte (Abb. 3.12). Die zusätzlichen Ionen mit einem m/z -Wert von 315, die in der Abbildung 3.12 zu sehen sind, stellen keine neuen Derivate sondern Fragmentierungsprodukte von PGD_2 , PGJ_2 und $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ dar, die während der EIC-Analyse gebildet werden.

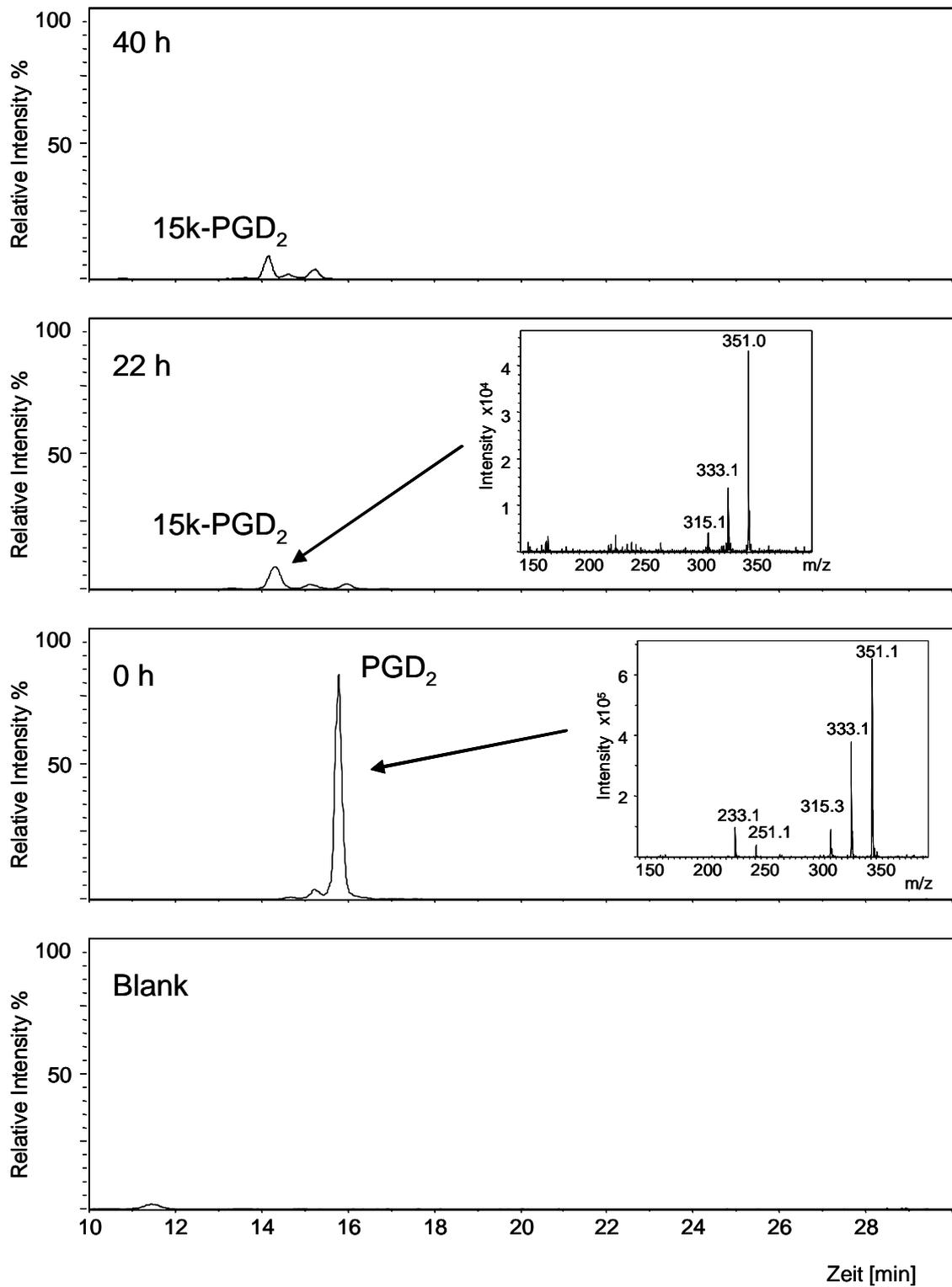


Abbildung 3.10. Abnahme von PGD₂ im Verlauf der Inkubation bei 37°C und Auftreten von 15k-PGD₂. Die Blank-Probe repräsentiert die Analyse des Blutformmediums ohne PGD₂-Zugabe.

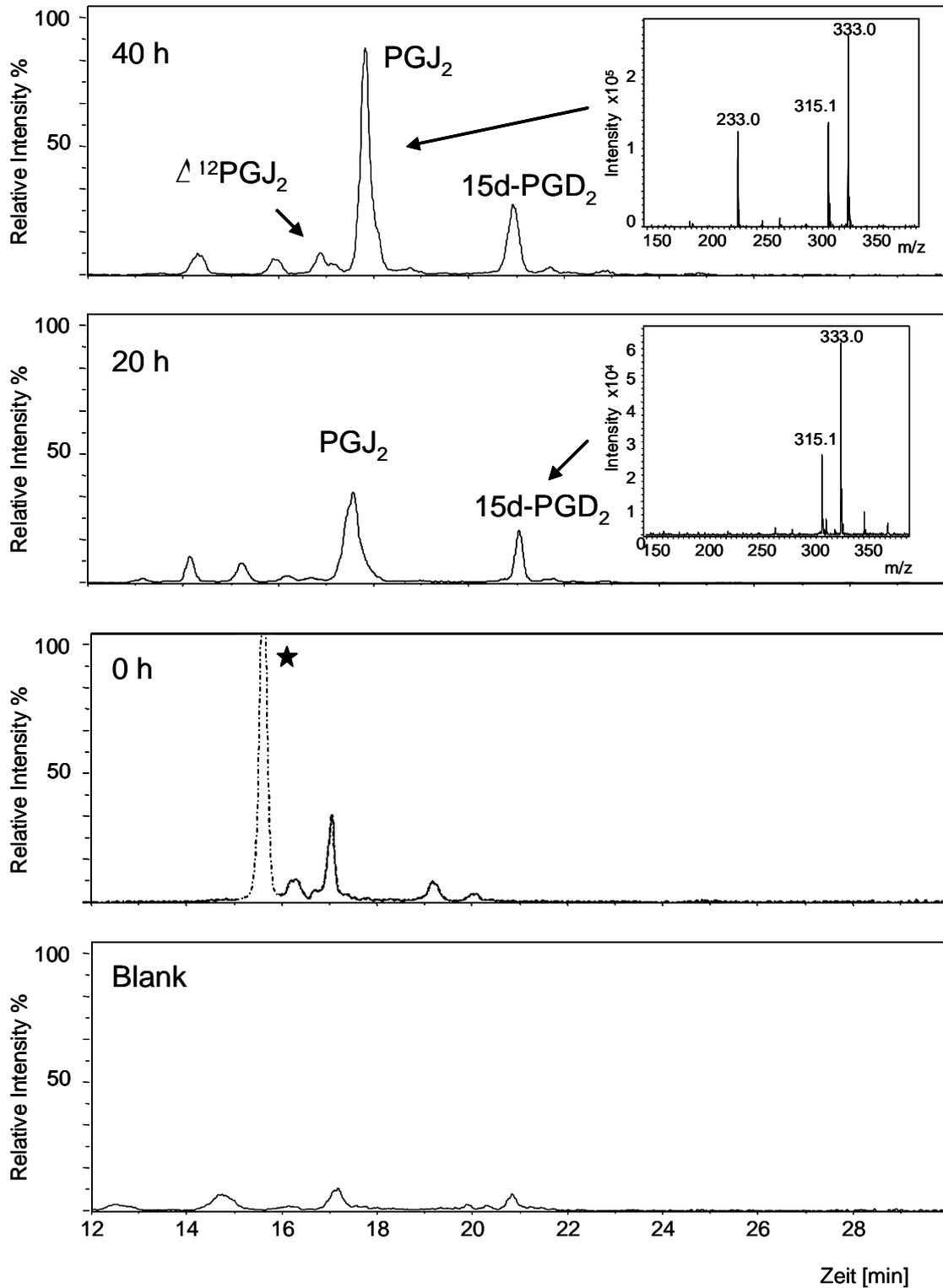


Abbildung 3.11. Analyse von PGD_2 -Derivate mit einem Molekulargewicht m/z von 333 g/mol. Die Bildung der Metaboliten PGJ_2 , $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ und 15d-PGD_2 wurde nach 20 h und 40 h Inkubation in Blutformmedum nachgewiesen. Der im Chromatogramm (0 h) gezeigte Stern repräsentiert die 333-Fragmente, die durch Fragmentierung aus PGD_2 gebildet werden.

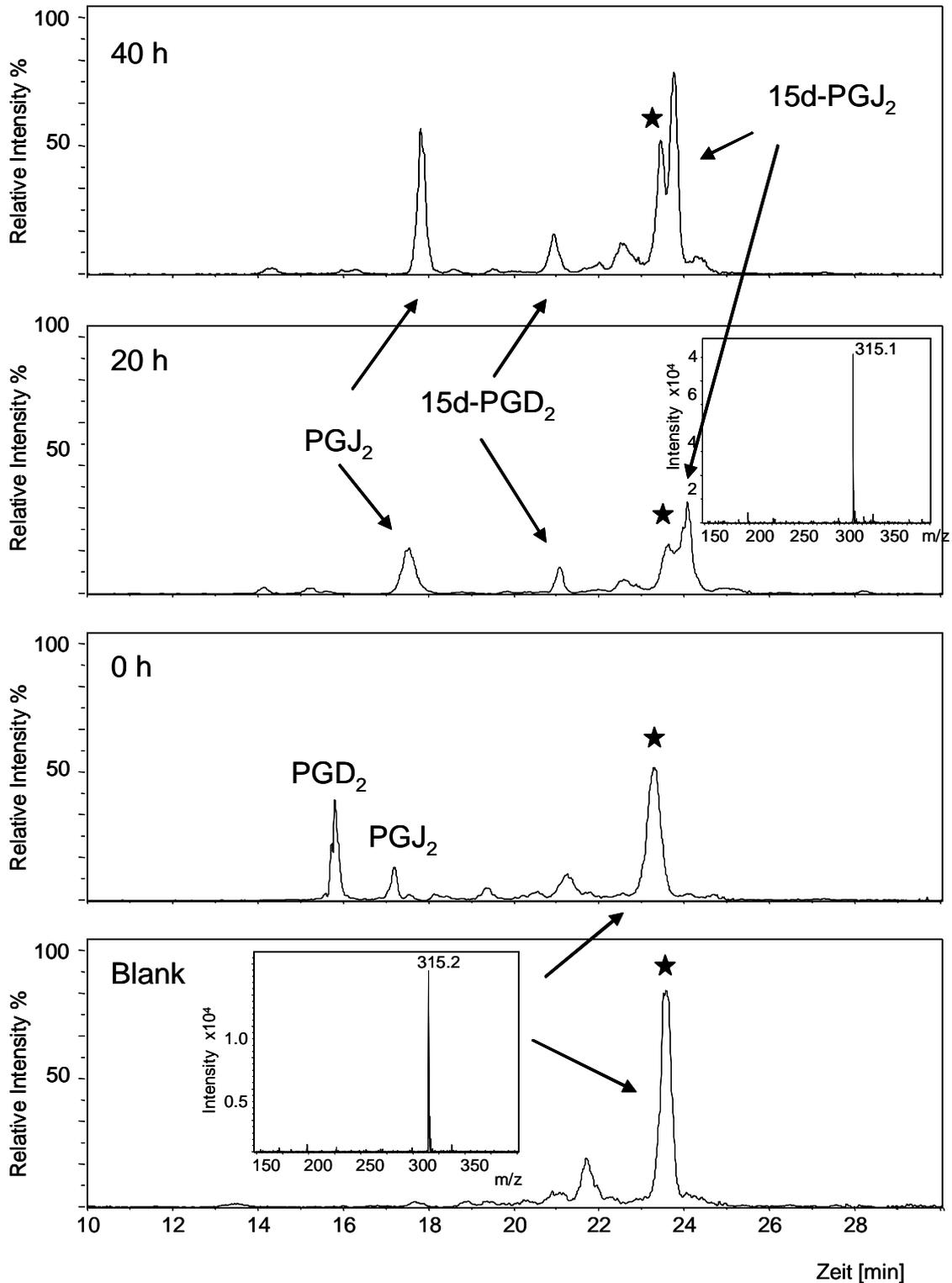


Abbildung 3.12. Analyse der PGD₂-Derivate mit einem Molekulargewicht m/z von 315 g/mol. Es zeigt die Bildung von 15d-PGJ₂ nach 20 und 40 h Inkubation in Blutformmedium. Der gezeigte Stern stellt ein Molekül dar, das nicht aus PGD₂ gebildet wurde, sondern bereits im Blutformmedium vorhanden ist. Die zusätzlichen *Peaks* in den Chromatogrammen repräsentieren die 315er-Fragmente, die durch Fragmentierung aus PGD₂ und seiner Metaboliten gebildet werden.

3.6. Untersuchung des Effektes der verschiedenen PGD₂-Metabolite auf das Zellwachstum monomorpher Trypanosomen

Der bereits in der Literatur beschriebene und durch Albumin induzierte PGD₂-Abbau wurde auch unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen bestätigt. Die dabei hauptsächlich gebildeten Derivate waren die Metabolite der D-Serie (15k-PGD₂ und 15d-PGD₂), sowie die der J-Serie (PGJ₂, Δ^{12} PGJ₂ und 15d-PGJ₂). Aus der Literatur ist dabei bekannt, dass die PGD₂-Metabolite stärker als das PGD₂ selbst wirken. Vor allem die Metabolite der J-Serie wurden als aktive Substanzen erkannt. Sie induzieren ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten wie Hemmung der Zellzyklusprogression, Aufhebung von viraler Replikation, Expression von *heat shock* Proteinen und Stimulierung der Osteogenese (Fukushima, 1992). Das Ziel der hier vorgestellten Experimente war, festzustellen, ob PGD₂ selbst die Hemmung des beobachteten Zellwachstums von Trypanosomen hervorruft oder ob die nach Umwandlung gebildeten Metabolite die eigentlich auslösenden Agenzien sind. Zusätzlich wurde hierbei ein PGD₂-Analogon, das 17-phenyl-trinor PGD₂, eingesetzt. Diese Verbindung war im Verlauf der Inkubation stabiler als PGD₂. Zur Untersuchung der Effekte der PGD₂-Derivate und des 17-phenyl-PGD₂ auf die Blutform von *Trypanosoma brucei* wurden Kulturen angesetzt, die mit Konzentrationen bis zu 5 μ M des jeweiligen Prostanoids inkubiert wurden. Die Metabolite der D-Serie induzierten dabei keine Hemmung des Zellwachstums und die damit behandelten Zellen verhielten sich wie Kontroll-Zellen. In Gegensatz dazu waren die Metabolite der J-Serie sehr aktiv. Ihre Effekte konnten bereits wenige Stunden nach der Prostaglandin-Zugabe beobachtet werden, und riefen eine Inhibierung des Wachstums sogar bei Konzentrationen von unter 5 μ M hervor. 17-phenyl-PGD₂ verursachte ebenso wie PGD₂ eine Hemmung des Zellwachstums, allerdings wurde dieser Effekt erst bei einer Konzentration erreicht, die doppelt so hoch war wie bei PGD₂ (Abb. 3.13 A).

Ein Proliferationsassay wurde durchgeführt, um die Hemmung des Zellwachstums mit einem alternativen Verfahren zu analysieren. Bei diesem Assay wurde der Einbau von radioaktivem [³H]-Thymidin in die DNA nach 24 h Behandlung mit den verschiedenen Metaboliten gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Metabolite der D Serie keinen Einfluss auf die Proliferation der Trypanosomen hatten, während die Behandlung mit den Metaboliten der J Serie zur einer starken Inhibierung der DNA-

Replikation führte (Abb. 3.13 B). Dabei erwies sich PGJ₂ als das aktivste Derivat, da es gleich nach Zugabe seine inhibitorische Wirkung entfaltetete (*data not shown*). Der Effekt von 15d-PGJ₂ war ähnlich wie der Effekt, der durch das PGD₂ selbst induziert wurde.

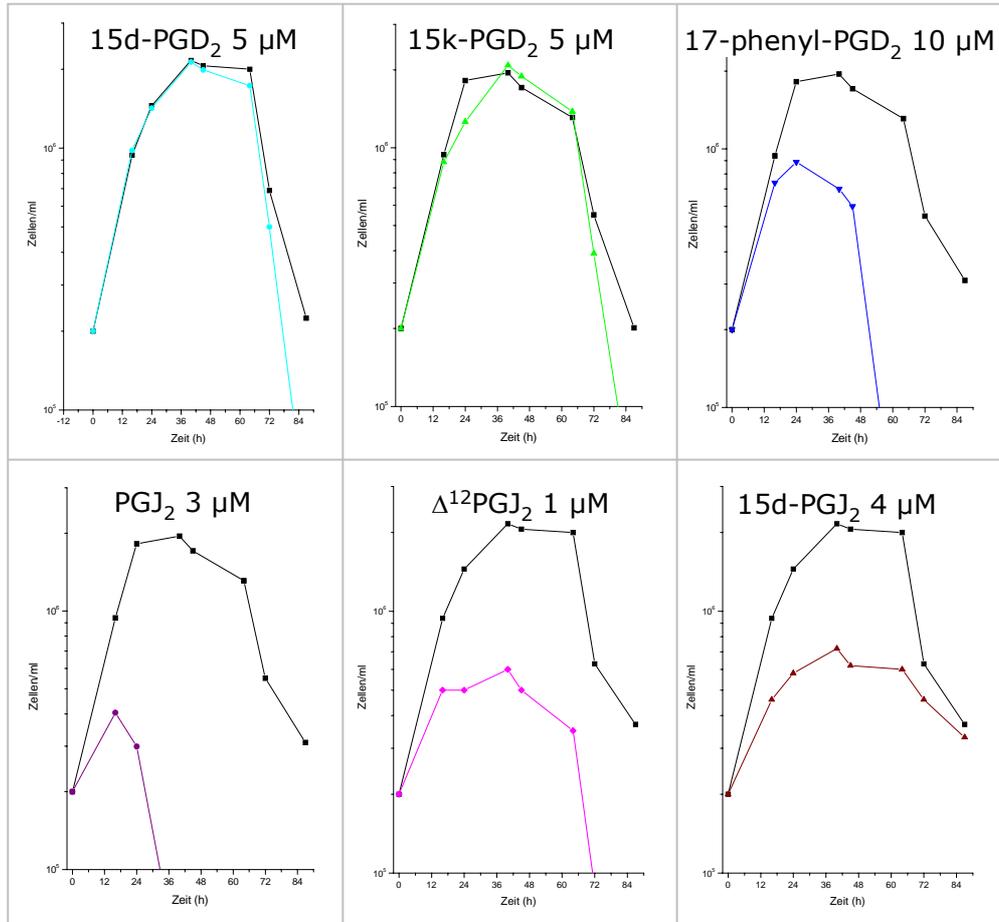
Um den effektiven Konzentrationsbereich genauer abzugrenzen, wurde die halb-inhibitorische Konzentration (IC₅₀) jedes einzelnen Prostanoids bestimmt. Dazu wurden die Parasiten 24 h mit dem jeweiligen Metaboliten inkubiert und dann lysiert, um die Aktivität der sauren Phosphatase zu messen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1. IC₅₀ der verschiedenen Prostaglandin D₂-Metabolite.

	Prostaglandin	IC ₅₀ (µM)
D-Serie	15d-PGD ₂	31,6 ± 4,4
	15k-PGD ₂	104 ± 8,7
J-Serie	PGJ ₂	2,7 ± 0,3
	Δ ¹² PGJ ₂	0,7 ± 0,4
	15d-PGJ ₂	3,5 ± 0,3
PGD ₂ -Analogon	17-phenyl-PGD ₂	7,7 ± 1,3

Die IC₅₀ Werte der Metabolite der D-Serie waren 10 bis 30 Mal höher als der IC₅₀ Wert von PGD₂. Alle bisher erhaltenen Ergebnisse mit den Metaboliten der D-Serie sprechen für eine geringere Wirkung dieser Moleküle auf die Trypanosomen. Dadurch zeigte sich, dass die Umwandlung von PGD₂ zu 15d-PGD₂ und 15k-PGD₂ keine Verstärkung des Effektes hervorruft. Dagegen verfügen die Metabolite der J-Serie generell über eine höhere Aktivität. Die IC₅₀-Werte dieser Substanzen waren entweder ähnlich (15d-PGJ₂) oder niedriger (PGJ₂ und Δ¹²PGJ₂) als die von PGD₂. Zusätzlich konnten sie auch das Wachstum der Trypanosomen sowie die DNA-Synthese stärker als PGD₂ inhibieren. Die Ergebnisse zeigen, dass PGJ₂ und Δ¹²PGJ₂ aktiv auf Trypanosomen einwirken und dass ihre Bildung aus PGD₂ zu einer Erhöhung des PGD₂-Effektes führt. Andererseits war die IC₅₀ von 17-phenyl-PGD₂ etwa 2,5mal höher als die IC₅₀ von PGD₂. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass PGD₂ auch selbst einen Effekt auf die Trypanosomen ausübt. Allerdings spielt seine Metabolisierung zu PGJ₂ und Δ¹²PGJ₂ offenbar eine wichtige Rolle bei der Inhibierung der Proliferation.

A



B

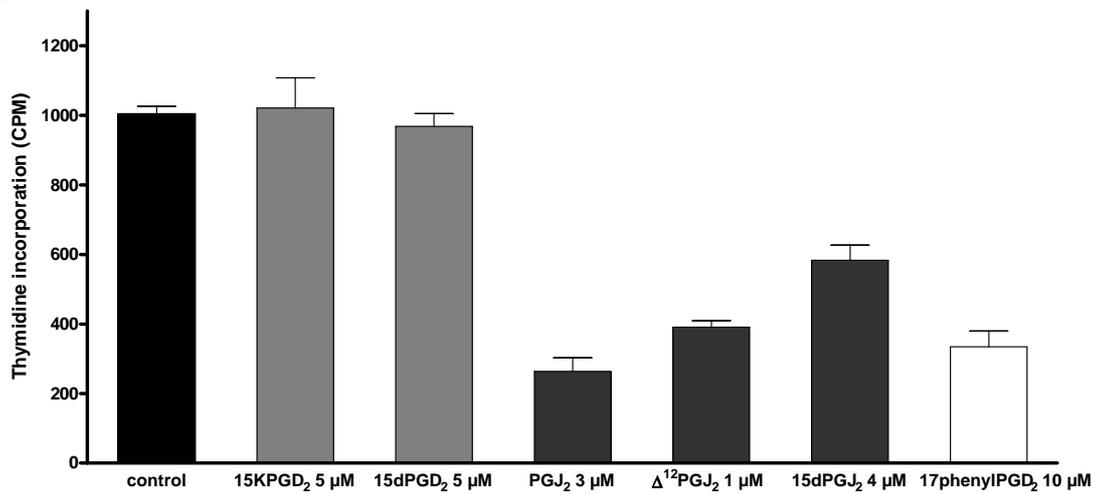


Abbildung 3.13. A: Wachstumskurven der Blutform von *Trypanosoma brucei* nach Behandlung mit den Metaboliten von Prostaglandin D₂ (■ Kontrolle; andere Symbole stellen jeweils die behandelte Zellen dar) **B:** Bestimmung der zellulären Proliferation durch Messung der Thymidin-Inkorporation nach 24h Behandlung mit den PGD₂-Derivaten.

3.7. Untersuchung der Differenzierung nach Behandlung mit PGD₂ oder seiner Metabolite

Die ausgelöste Inhibierung der Proliferation könnte auf zwei Phänomene zurückzuführen sein. Entweder auf die Induktion des Zelltodes, welche vor allem bei PGD₂ und PGJ₂ zu vermuten war, da die damit behandelten Zellen plötzlich zu Grunde gegangen waren. Oder auf die Auslösung der Differenzierung zu der für die Fliege voradaptierten *stumpy* Form. Diese Form ist im Zellzyklus arretiert, so dass sie teilungsunfähig ist. Die *stumpy* Form kann bis zu 3 Tage *in vivo* überleben, stirbt dann aber, sofern sie nicht von der Fliege aufgenommen wird. Die Behandlung von Trypanosomen mit den Metaboliten 15d-PGJ₂ und Δ^{12} PGJ₂ löste eine Hemmung des Wachstums aus. Allerdings wurde keine deutliche Absterbphase bei der Kultivierung beobachtet. Daher wurde eine Induktion der Differenzierung nach Behandlung mit diesen Metaboliten vermutet. Zur Untersuchung dieses Prozesses wurde das Transformationsprotokoll zur prozyklischen Form durchgeführt. Nach 20 bis 24 h Behandlung mit 15d-PGJ₂ und Δ^{12} PGJ₂ wurden die Zellen in Transformationsmedium (mit Citrat und cis-Aconitat) überführt und dann 48 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden sie in glucosefreiem prozyklischen Medium für 5 Tage kultiviert. In der Literatur wurde über eine Differenzierung eines monomorphen Stammes von *Trypanosoma brucei* durch Behandlung mit einem cAMP-Analogen berichtet (Breidbach *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde bei der Durchführung dieses Experiments eine Kontrolle mit einem membrangängigen cAMP-Analogen (Br-cAMP) durchgeführt. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen verdoppelte die mit Br-cAMP behandelte Kultur die Zelldichte während der Inkubation in Transformationsmedium zweimal und zeigte dann auch signifikante Unterschiede in Bezug auf das Wachstum in prozyklischem Medium, was für eine Induktion der Differenzierung in diesen Zellen spricht. In Gegensatz dazu löste die Behandlung mit den Metaboliten der J-Serie 15d-PGJ₂ und Δ^{12} PGJ₂ (aber auch mit PGD₂) keine Differenzierung aus, da sie weder in Transformationsmedium noch im prozyklischen Medium signifikant wachsen konnten (Abb. 3.14). Die PG behandelten Zellen zeigten auch nicht die für prozyklischen Formen typische Morphologie und starben wenige Tagen später (*data not shown*). Trotz dieser Ergebnisse wurde die Expression eines

Enzyms untersucht, das während der Differenzierungsprozesse hochreguliert wird. Es handelt sich dabei um die Dihydroliponamid Dehydrogenase (DHHA-DH). Sie ist im Mitochondrium lokalisiert und kommt bei der *slender* Form nur in geringer Aktivität vor. Da die *stumpy* Form über ein besser entwickeltes Mitochondrium verfügt, ist dieses Enzym in diesem Stadium deutlich höher exprimiert. Die Expression der DHHA-DH wurde mittels Western Blot untersucht. Nach 20 bis 24 h PG-Behandlung wurden die Zellen in TDB-Puffer gewaschen und in Gegenwart von Proteaseinhibitoren hypoton lysiert. Pro Probe wurde 10 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der Proteinmenge wurde zusätzlich ein Western Blot für Tubulin durchgeführt (Abb. 3.15). Inkubation mit den hier benutzten Prostaglandinen führte zu keiner Erhöhung der Expression von DHHA-DH. Die PGD₂ behandelten Zellen zeigten sogar eine niedrige Expression dieses Enzyms als die Kontroll-Zellen (Abb. 3.15). Tatsächlich führte die Behandlung mit Br-cAMP zu einer Zunahme der Expression der DHHA-DH, was auch den publizierten Daten entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Blutformen mit PGD₂ bzw. mit seinen Metaboliten bei den verwendeten Konzentrationen keine Differenzierung auslöst. Folglich muss man die Induktion eines Prozesses annehmen, der letztendlich zum Zelltod führt.

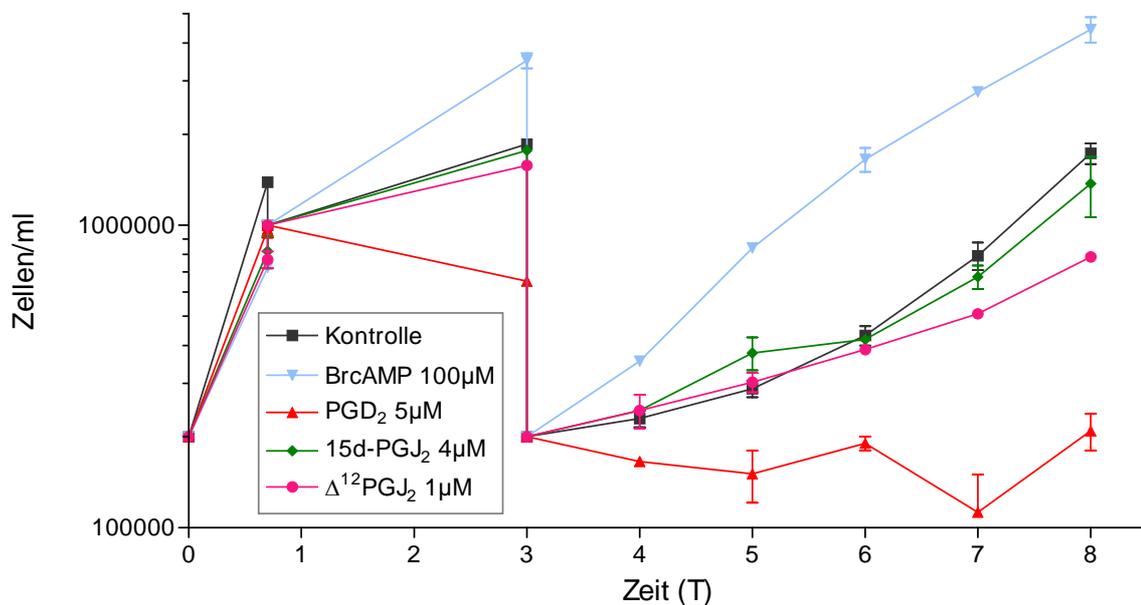


Abbildung 3.14. Transformation zur prozyklischen Form nach Behandlung mit Prostaglandinen.

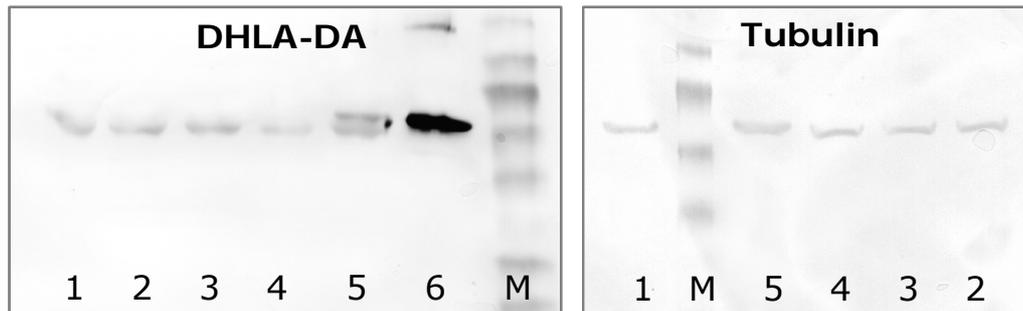


Abbildung 3.15. Western Blot zum Nachweis der Dihydrolipoamid Dehydrogenase (DHLDH) und Tubulin. Die Trypanosomen wurden für 20 h mit 4 μM 15d-PGJ₂ [2], 1 μM $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ [3], 5 μM PGD₂ [4] oder 100 μM Br-cAMP [5] behandelt und dann für den Western Blot vorbereitet. Das isolierte Enzym [6] wurde als Kontrolle verwendet. [1] Kontroll-Zellen und [M] Proteinmarker.

3.8. Untersuchung der Morphologie nach Behandlung mit Prostaglandinen

Die Induktion eines programmierten Zelltodes verursacht in den Zellen typische morphologische Veränderungen. Um zu untersuchen, ob PGD₂ oder seine Metabolite der J-Serie diese Art von Modifikationen induzieren können, wurden die Zellen für 16-20 h (für Metabolite der J Serie) bzw. für 24 h (für PGD₂) mit den Substanzen behandelt und anschließend für Lichtmikroskopie, Raster- (REM) und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) präpariert.

3.8.1. Morphologie von PGD₂ behandelten Trypanosomen

Die ersten Untersuchungen wurden mit PGD₂ behandelten Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich im Lichtmikroskop, dass die Anzahl von Zellen, die einen Nukleus aber zwei oder mehrere Flagellen besaßen, deutlich erhöht war (Abb. 3.16 A). Diese Beobachtung wurde durch Raster-Elektronenmikroskopie bestätigt. Etwa 70 bis 80% der behandelten Trypanosomen waren scheinbar in Teilungsprozesse involviert und zeigten zwei oder mehrere Flagellen (Abb. 3.16 B).

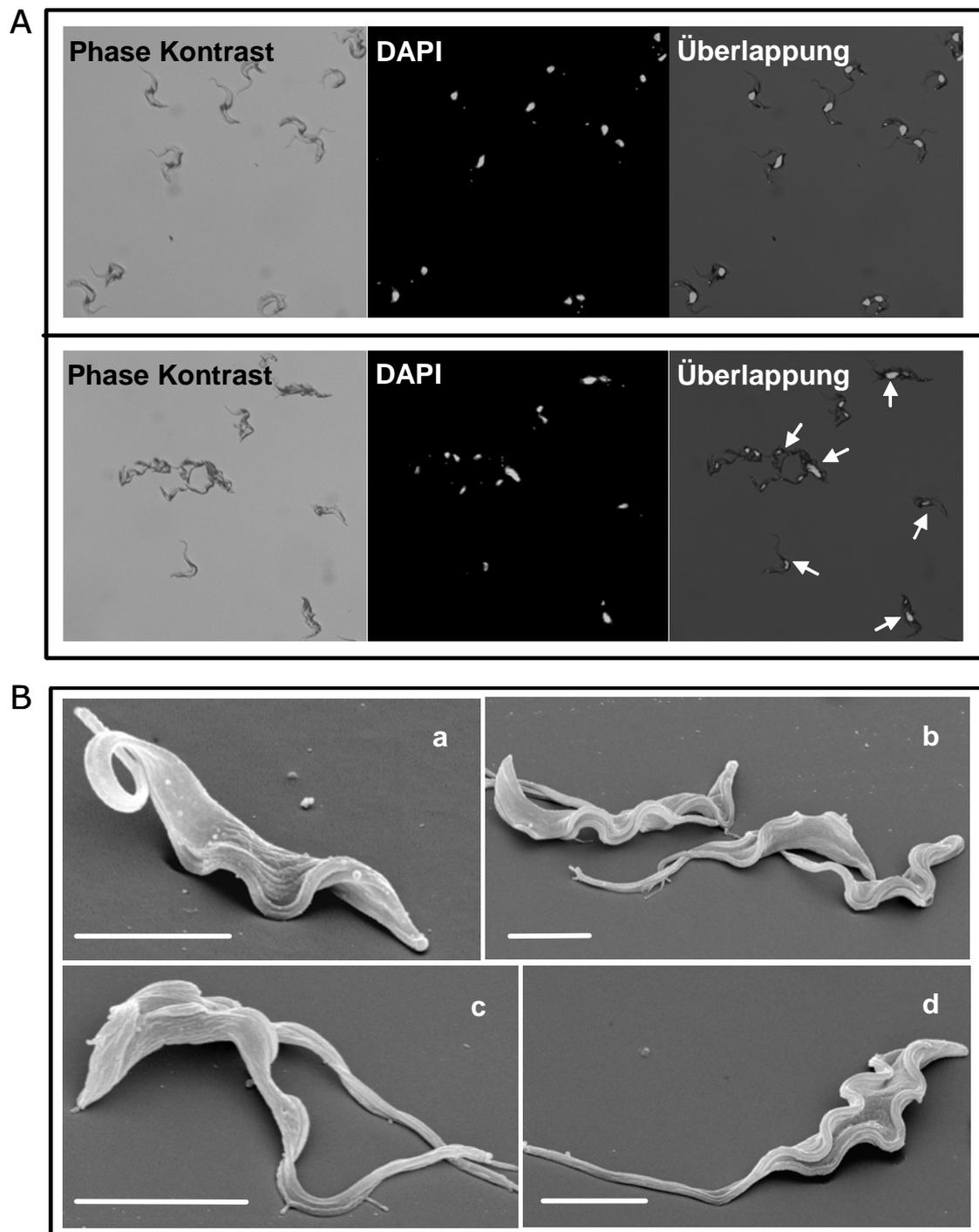


Abbildung 3.16. Morphologie von behandelten und unbehandelten Trypanosomen im Lichtmikroskop (A) und Raster-Elektronenmikroskop (B) nach 24 h in Kultur. Die Pfeile in A zeigen behandelte Trypanosomen, die zwei oder mehrere Flagellen aber nur einen Nukleus besitzen. Die oberen Fotos in A sind Kontroll-Zellen. Die Rasteraufnahmen zeigen eine Kontroll-Zelle (a) und behandelte Zellen (b-d). Die behandelten Zellen befinden sich in Zellteilung und verfügen über zwei oder mehrere Flagellen. Die Maßstäbe in B repräsentieren jeweils 5 μm .

Außerdem wurde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie häufig auch mehr als ein Flagellum in einer Flagellumtasche gefunden (Abb. 3.17 f, g). Diese zusätzlichen Veränderungen wurden bei TEM beobachtet: Die Präsenz zweier Flagellen, die aus der gleichen Flagellumtasche auftauchen (h); Chromatinkondensation in verschiedenen Gebieten des Nukleus (b-d); ein segmentierter Kern (c); eine Dilatation des Mitochondriums (k, m, n); eine Vergrößerung der Flagellumtasche (g); und eine Zunahme der vakuolären Strukturen (b, d, f, k). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass die PGD₂ Behandlung eine abnormale Zellteilung induziert, bei der zwar die Bildung eines neuen Flagellums erfolgt, die Teilung des Nukleus jedoch nicht mehr stattfindet.

3.8.2. Morphologie der mit J-Metaboliten behandelten Trypanosomen

Wie bereits gezeigt, ist PGD₂ ein instabiles Molekül, das unter unseren in vitro Bedingungen in verschiedene Metabolite umgewandelt wird. Von den gebildeten Derivaten waren dabei die Metabolite der J Serie aktive Substanzen, die das Wachstum und die DNA-Synthese bei der Blutform hemmen. Deshalb wurde hierbei zusätzlich die Zellmorphologie nach Behandlung mit den Metaboliten PGJ₂, Δ^{12} PGJ₂ und 15d-PGJ₂ untersucht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen behandelter Trypanosomen zeigen praktisch die gleichen Veränderungen wie die PGD₂ behandelten Trypanosomen (Abb. 3.18). Allerdings führten diese Substanzen bereits bei geringeren Konzentrationen und nach kürzeren Inkubationszeiten zu den geschilderten morphologischen Änderungen. Nach Inkubation mit PGJ₂ war vor allem die Chromatinkondensation charakteristisch (d-g). Bei den Δ^{12} PGJ₂ behandelten Trypanosomen wurde sehr häufig eine Erweiterung der Flagellumtasche und die Präsenz mehrerer Flagellen pro Zelle gefunden (o, p). Die Behandlung mit 15d-PGJ₂ führte besonders zur Dilatierung des Mitochondriums (k-n). Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Lysosomenzahl (g, j) und die Zunahme von vakuolären Strukturen (h, i) sowie von *multivesicular bodies* (i) gefunden. Alle diese internen Umwandlungen der Zellmorphologie sind typisch bei einer Induktion von verschiedenen Typen des programmierten Zelltods. Diese Ergebnisse sprechen für die Auslösung eines Prozesses

in der Blutform von *Trypanosoma brucei*, die physiologische und morphologische Veränderungen induzieren, die letztendlich den Zelltod verursachen.

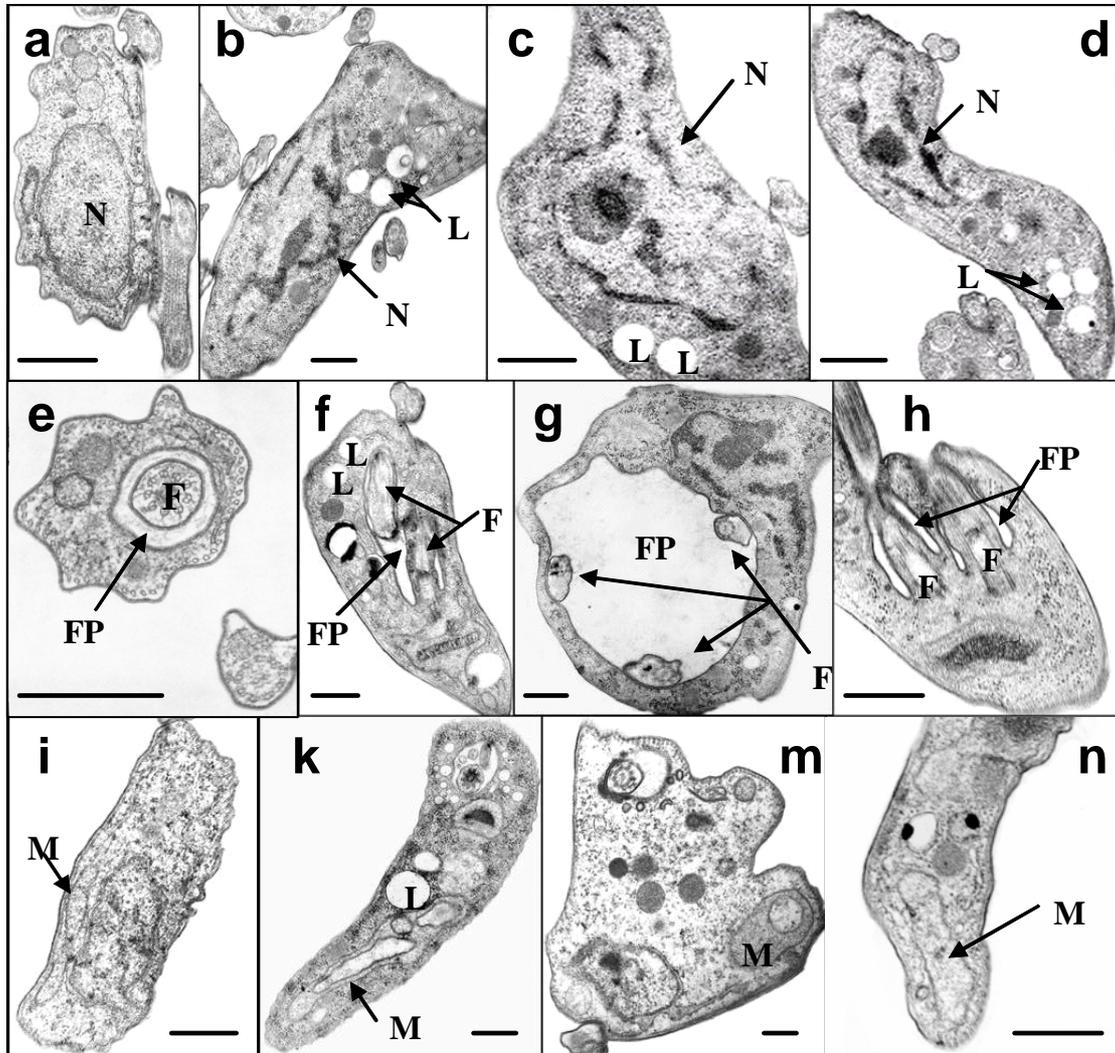
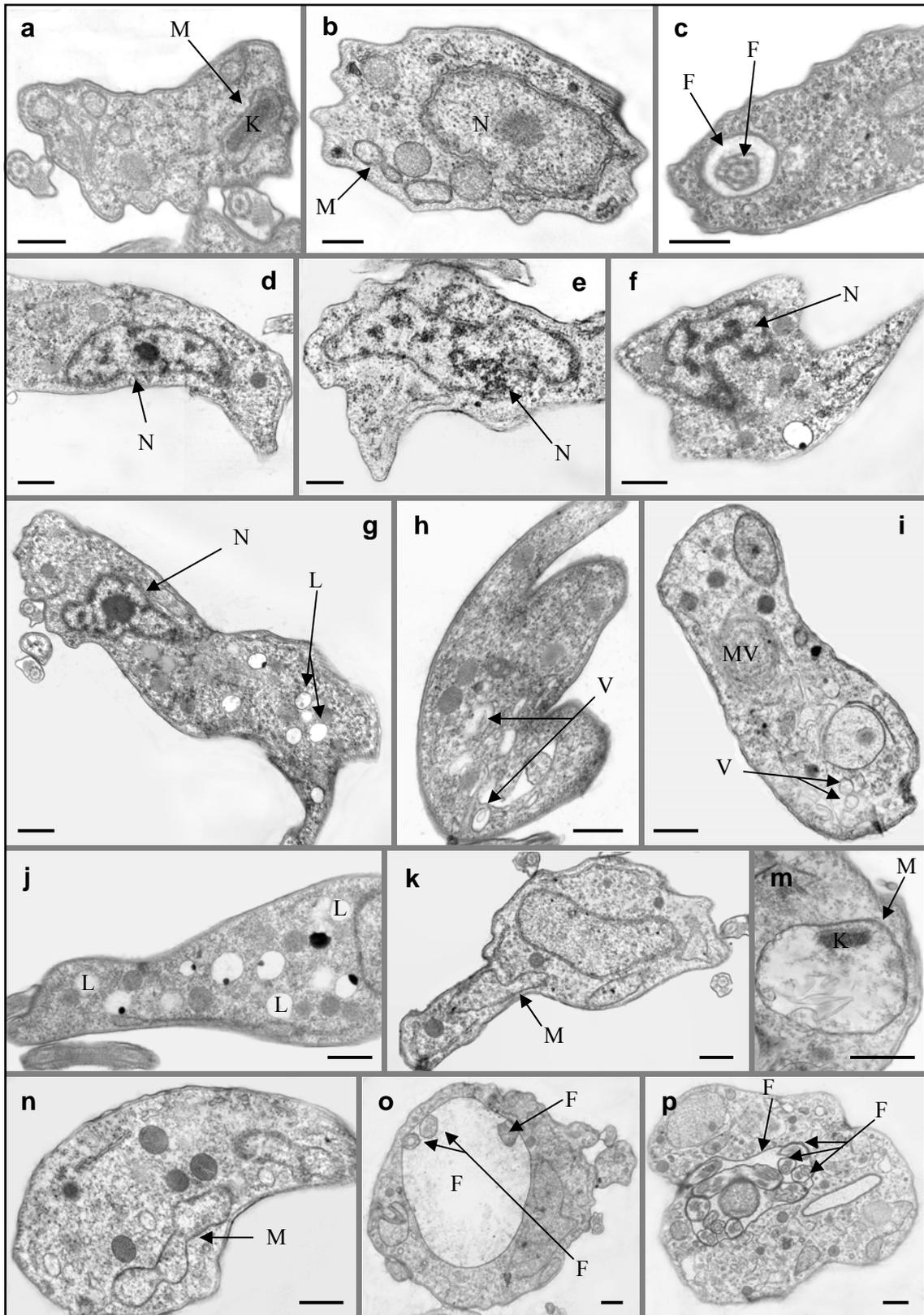


Abbildung 3.17. Transmissions-Elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Kontroll- und PGD₂ behandelten Zellen. Die in der Regel beobachteten Veränderungen betrafen: Segmentierter Kern (b, c); Chromatinkondensation (b-d, g); Erscheinung zweier oder mehrerer Flagellen in einer Flagellumtasche (f, g); Auftauchen von zwei Flagellen in einer Flagellumtasche (h); Dilatation des Mitochondriums (k-n) und der Flagellumtasche (g); Zunahme der Lysosomen (b, d, f, k). Alle diese Parameter wurden mit den Kontroll-Zellen (a, e, i) verglichen. Die Maßstabsbalken repräsentieren 0,5 µm. Abkürzungen: Lysosom (L), Nucleus (N), Flagellum (F), Flagellumtasche (FP), Mitochondrium (M).



← **Abbildung 3.18.** TEM Aufnahmen von Trypanosomen nach Behandlung mit 3 μM PGJ_2 , 1,5 μM $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ oder 4 μM 15d- PGJ_2 . Die Kontroll-Zellen sind in a, b und c dargestellt. Die häufig beobachteten Veränderungen waren: segmentierter Kern (f); Chromatinkondensation (d-g); Zunahme der Lysosomen (g, i, j); Dilatation des Mitochondriums (k-n) und der Flagellumtasche (o); und Erscheinung von zwei oder mehreren Flagellen in einer Flagellumtasche (o, p). Alle diese Parameter wurden mit den Kontroll-Zellen (a, e, i) verglichen. Die Maßstabsbalken repräsentieren 0,5 μm . Abkürzungen: Lysosom (L), Nukleus (N), Flagellum (F), Flagellumtasche (FP), Mitochondrium (M). Die Maßstäbe repräsentieren 0,5 μm . Abkürzungen: Lysosom (L), Nukleus (N), Flagellum (F), Flagellumtasche (FP), Mitochondrium (M), *multivesicular bodies* (MVB), Vesikel (V).

3.9. Untersuchung des programmierten Zelltodes II (Autophagie) in PGD_2 behandelten Trypanosomen

Autophagie ist ein Degradationsmechanismus von intrazellulären Makromolekülen, der sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen stattfindet. Morphologisch ist dieser Vorgang durch Bildung von autophagischen Vakuolen im Zytoplasma der Zelle charakterisiert. In dieser Arbeit wurde die Autophagie untersucht, da bei den TEM Aufnahmen PGD_2 behandelter Trypanosomen eine Zunahme von Lysosomen gefunden wurde. Hierbei wurde Monodansylcadaverin (MDC) verwendet, eine Verbindung die Autofluoreszenz besitzt. Dieses Molekül wird von den Zellen aufgenommen und färbt auf spezifische Weise die autophagischen Vakuolen (Biederbick *et al.*, 1995). Autophagie kann durch Aminosäuremangel induziert werden (Munafo und Colombo, 2001). Die 24 h Inkubation von Trypanosomen mit 5 μM PGD_2 führte allerdings zu keiner Zunahme von MDC positiven Strukturen (Abb. 3.19 A). Unterschiede zwischen den Kontroll- und den PGD_2 -behandelten Zellen konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hat die Inkubation von Trypanosomen in einem Puffer mit Glucose aber ohne Aminosäuren eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas verursacht, was durch eine deutliche MDC-Färbung sichtbar wurde (Abb. 3.19 A [*starvation*]).

Es wurde schon berichtet, dass die Autophagie durch verschiedene Substanzen aufgehoben werden kann. Diese Substanzen vermitteln ihre Effekte durch die Hemmung verschiedener Schritte der Autophagie-Kaskade. Wortmannin und 3-Methyladenine, zwei Inhibitoren der Phosphatidylinositol-Kinase, halten die Autophagie durch die Blockierung der Stoffaufnahme in die Vakuolen auf (Seglen und Jordan, 1982; Munafo und Colombo, 2001). Eine ATP-Senkung führt ebenso zur Hemmung der Autophagie durch Zunahme der intrazellulären AMP- und Adenosin-Konzentrationen. *De facto* wurde durch Inkubation mit Adenosin und einigen seiner Thiol- oder Methyl-Derivate die Autophagie in Ratten-Hepatozyten inhibiert (Samari und Seglen, 1998). In Abbildung 3.19 B sind die Wachstumskurven von Kontroll-, PGD₂-behandelten Zellen und von Trypanosomen, die mit PGD₂ und den entsprechenden Inhibitoren zusammen behandelt wurden, dargestellt. Wortmannin (50 nM) und 3-Methyladenine (100 µM) konnten den Effekt von PGD₂ auf das Wachstum von Trypanosomen nicht aufheben. Adenosin (50 µM) war zwar fähig das Überleben der Zellen nach PGD₂-Behandlung um etwa 6 h zu verlängern, höhere Adenosin-Konzentrationen führten jedoch selbst zu einer Hemmung der Proliferation von Kontroll-Zellen, während niedriger Konzentrationen das Wachstumsverhalten von PGD₂ behandelten Zellen nicht veränderte. Um weiter den möglichen Effekt von Adenosin zu untersuchen, wurden die Trypanosomen mit Deoxycoformycin (Nipent®) plus Adenosin und PGD₂ inkubiert. Deoxycoformycin verstärkt den hemmenden Effekt von Adenosin auf die autophagischen Zellen (Samari und Seglen, 1998). Allerdings wurde durch Verwendung von Deoxycoformycin keine Aufhebung des PGD₂-Effektes erreicht (Abb. 3.19 B). Deoxycoformycin allein oder zusammen mit Adenosin hatte keinen Einfluss auf das Wachstum bei den verwendeten Konzentrationen (*data not shown*). Durch alle diese Befunde wurde die Autophagie als beteiligter Mechanismus ausgeschlossen.

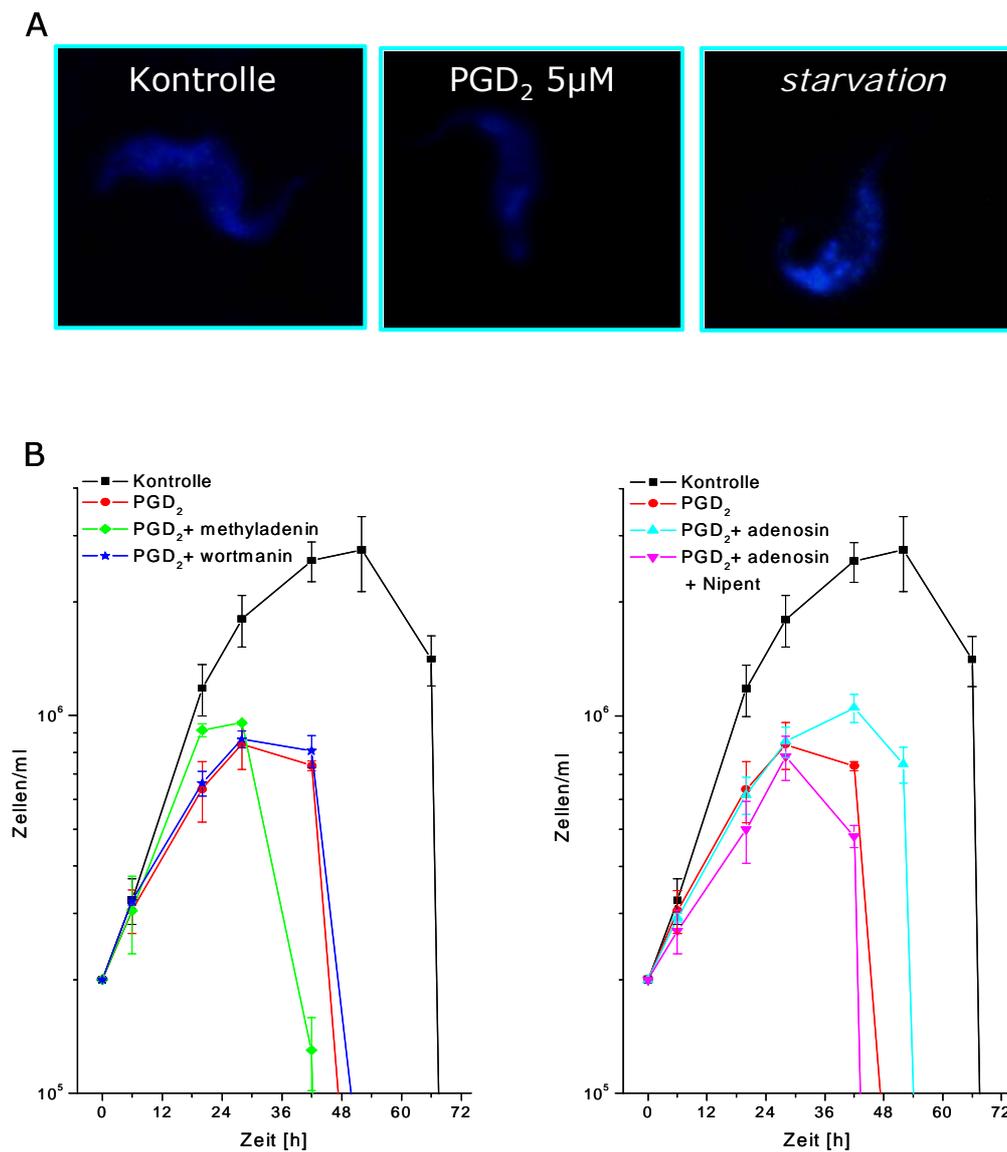


Abbildung 3.19. Analyse der Autophagie bei PGD₂-behandelten Trypanosomen. **A:** Färbung von autophagischen Vakuolen mit Monodansylcadaverin (MDC) bei Kontroll- und behandelten Zellen nach 24 h Inkubation. Der Hunger-Phänotyp (starvation) wurde durch eine 3 h Inkubation in TDB-Puffer (mit Glucose, ohne Aminosäure) von unbehandelten Trypanosomen induziert. **B:** Wachstumskurven von Kontroll-Zellen und PGD₂-behandelten Trypanosomen mit den Autophagie Inhibitoren Wortmannin (50 nM), 3-Methyladenin (100 µM), Adenosin (50 µM) und Deoxycoryformycin [Nipent®] (100 µM).

3.10. Untersuchung des programmierten Zelltodes I (Apoptose-like PCD) nach Behandlung mit Prostaglandinen mittels FACS Analyse

Verschiedene Publikationen deuten darauf hin, dass Prostaglandine in verschiedenen Zelltypen die Inhibierung der Proliferation durch die Induktion von Apoptose hervorrufen (Kim *et al.*, 1993; Bishop-Bailey und Hla, 1999; Keelan *et al.*, 1999; Hortelano *et al.*, 2000; Mullally *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Nencioni *et al.*, 2003). Apoptose bzw. Apoptose-like PCD sind aktive Mechanismen, die physiologisch oder nach Induktion durch verschiedene Stimuli erfolgen. Diverse Ereignisse treten bei der Entwicklung eines programmierten Zelltodes ein, wobei das Mitochondrium eine wichtige Rolle spielt. Es kommt zur Fragmentierung der DNA und die Aktivierung einer Familie von Proteasen, die Caspasen, führt zu einem gesteigerten Proteinabbau. Allerdings wurde in einer vorherigen Arbeit in unserer Gruppe bereits gezeigt, dass Caspase-Inhibitoren den PGD₂-Effekt auf den Parasiten nicht hemmen können (Rawer, 2004). Eines der ersten Ereignisse von PCD ist die Exposition von Phosphatidylserin im äußeren *leaflet* der Zellmembran. Während der Aktivierung des Zelltod-Prozesses wird das Mitochondrium geschädigt, was zum Verlust des Membranpotentials führt. Währenddessen bleibt die Permeabilität der Zellmembran unverändert, da sie erst in der letzten PCD-Phase, der sogenannten Degradationsphase, beschädigt wird. Diese Parameter können durch verschiedene Methoden analysiert werden. Dabei ist das *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) die am häufigste angewandte Methode zur Untersuchung von programmiertem Zelltod. Deshalb wurden zur Analyse dieses Parameters bei den prostaglandin-behandelten Trypanosomen Fluoreszenzfärbestoffe verwendet. Die Quantifizierung wurde mittels der CellQuest® Software durchgeführt.

3.10.1. PCD Nachweis nach PGD₂-Behandlung

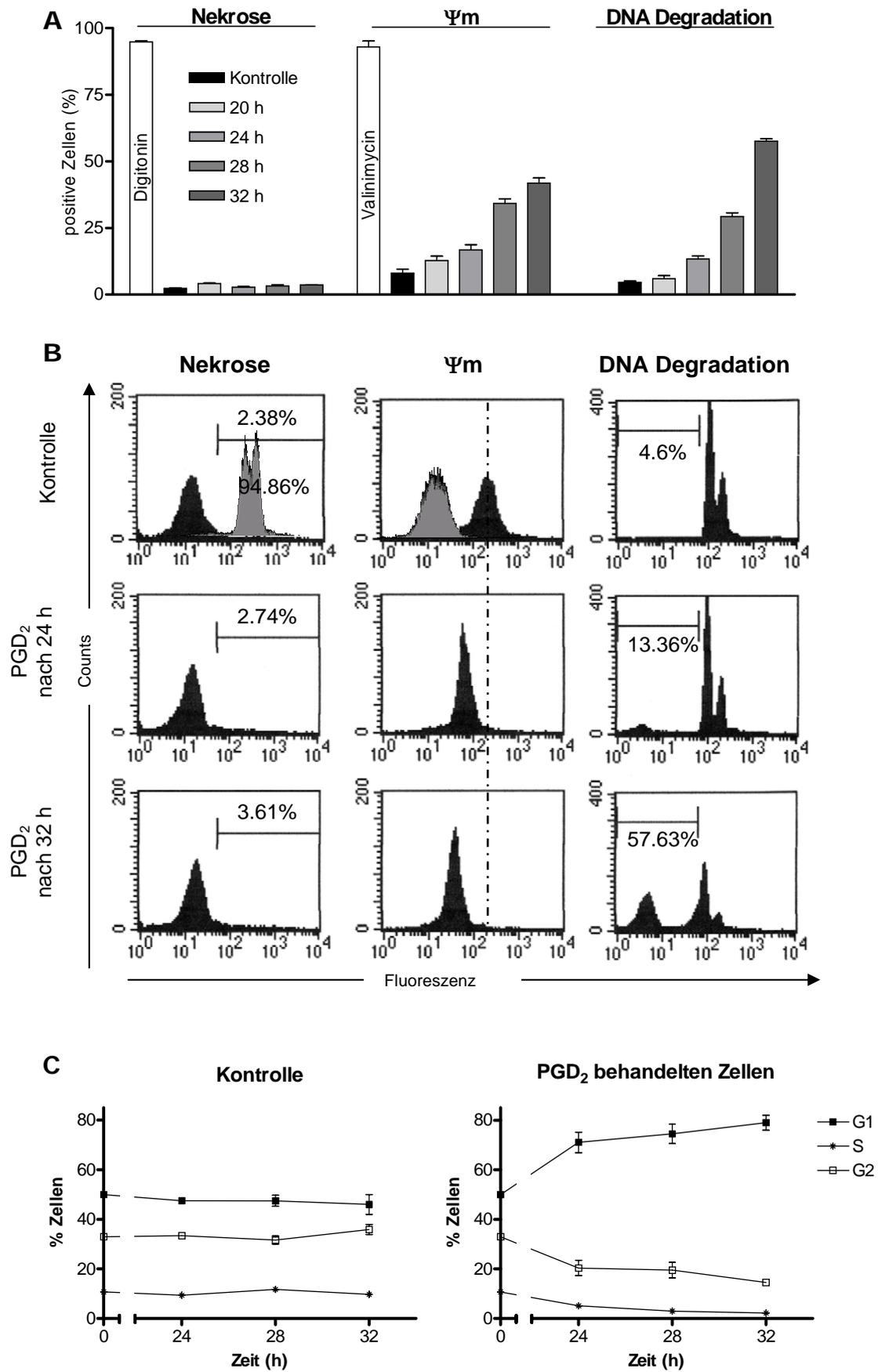
Die Untersuchung des PCD wurde nach PGD₂-Behandlung durch eine Kinetik durchgeführt. Dazu wurden die Trypanosomen mit 5 µM PGD₂ für 20, 24, 28 und 32 h inkubiert und dann für die FACS Analyse vorbereitet. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Zellen hypoton lysiert. Dadurch wurden die Nuclei freigesetzt, die

anschließend mit Propidiumjodid gefärbt wurden. Es wurden jeweils 20.000 Nuclei nach Größe und Fluoreszenz sortiert. Die Histogramme zeigten die typische Verteilung von Nuclei in der G1, S und G2 Phase des Zellzyklus, sowie Nuclei mit einem geringen DNA-Gehalt, wie sie bei DNA Degradationsprozessen vorkommen (Abb. 3.20). Dabei wurden bis zu einer 20 h Inkubation keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll-Zellen und PGD₂-behandelten Zellen gefunden. Allerdings wurde nach 24 h eine deutliche DNA-Degradation bei den behandelten Zellen detektiert. Die Quantifizierung ergab, dass 13% bzw. 58% der Nuclei der behandelten Zellen eine DNA-Degradation nach 24 bzw. 32 h zeigten. Kontroll-Zellen zeigten dagegen nach 24 h eine 4,6%ige DNA-Degradation, die während der ganzen Inkubationszeit stabil blieb.

Die Analyse der Phasen des Zellzyklus zeigte eine Erhöhung von Zellen in der G1 Phase. Nach 24 h waren etwa 15% mehr Zellen in der G1 Phase als in Kontroll-Zellen. Dies wurde durch eine Reduktion von 10% bzw. 5% in der G2 und S Phase kompensiert. Die Unterschiede nahmen mit der Zeit zu. Nach 32 h Inkubation befanden sich etwa 80% der PGD₂-behandelten Zellen in der G1 Phase, im Vergleich mit ca. 50% der Kontroll-Zellen.

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (Ψ_m) wurden die Kulturen mit Tetramethylrhodamin (TMRE) für 30 min inkubiert, bevor die Messung im Cytometer durchgeführt wurde. Inkubation mit PGD₂ rief einen Verlust des Ψ_m von 42% nach 32 h in Vergleich mit 8% bei den Kontrolle Zellen hervor (Abb. 3.20). Valinomycin (100 nM) wurde als positive Kontrolle verwendet.

Nekrose wurde durch den Gebrauch von Propidiumjodid ausgeschlossen. Diese Substanz färbt nur Zellen, bei denen die Integrität der Zellmembran beschädigt ist. Digitonin behandelte Trypanosomen wurden als positive Kontrolle verwendet. Die Mehrheit dieser Zellen (95%) zeigte eine positive Färbung nach nur 5 min Inkubation. In Gegensatz dazu wurden nach 24 h Inkubation 2,7% bzw. 2,4% der PGD₂-behandelten und der Kontroll-Trypanosomen durch Propidiumjodid gefärbt. Die nekrotische Population blieb auch nach 32 h Inkubation mit PGD₂ unter 5% (Abb. 3.20).



←

Abbildung 3.20. FACS Analyse von Blutform-Trypanosomen nach der Färbung mit Propidiumjodid oder Tetramethylrhodamin. **A:** Darstellung der Nekrose-Kinetik, des Ψ_m und des DNA-Gehalts nach Behandlung mit 5 μM PGD_2 . Die Werte der Kontroll-Zellen sind während der ganzen Inkubationszeit (32 h) stabil geblieben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. **B:** Originale Histogramme nach 24 und 32 h Behandlung. Die grauen Histogramme stellen die Ergebnisse der positiven Kontrolle mit Digitonin (Nekrose) und Valinomycin (Ψ_m) dar. **C:** Prozent von Zellen in der G1, S und G2 Phase des Zellzyklus nach 0, 24, 28, 32 h Inkubation.

3.10.2. PCD-Nachweis nach Behandlung mit Metaboliten der J-Serie

Die FACS Analyse zusammen mit den beobachtenden Veränderungen der Morphologie bei Lichtmikroskopie, REM und TEM deuten darauf hin, dass PGD_2 einen programmierten Zelltod in der Blutform von *Trypanosoma brucei* auslöst. Allerdings wurde schon gezeigt, dass dieses Molekül unter unseren experimentellen Bedingungen zu aktiven Derivaten der J-Serie umgewandelt wird. Um zu untersuchen, ob der von PGD_2 induzierte Prozess ursprünglich von diesem Prostanoid ausgelöst wird oder ob es durch die Bildung stärkerer Metabolite induziert wird, wurde die Membranpermeabilität, das mitochondriale Membranpotential und der DNA-Gehalt auch bei mit J-Derivaten behandelten Trypanosomen nach 24 h gemessen. Hierbei wurde zusätzlich auch 17-phenyl- PGD_2 verwendet, ein PGD_2 -Analogon, das stabiler ist als PGD_2 , um feststellen zu können, ob das PGD_2 die Effekte selbst vermittelt kann.

Durch Verwendung von Propidiumjodid wurde nachgewiesen, dass die Inkubation mit diesen Metaboliten keine Veränderung der Zellmembran auslöste (*data not shown*). Allerdings führte die Behandlung mit J-Serie Metaboliten zur Schrumpfung der Zelle (Abb. 3.21 A). Der Phänotyp schloss einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ein. Während Kontroll-Zellen nur zu 6,1% eine Abnahme des Ψ_m nach 24 h Inkubation zeigten, führte die Inkubation mit PGJ_2 zu einer Senkung des Ψ_m von 24,5% der Population, die Behandlung mit $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ von 18,3% und Verwendung von 15d-PGJ_2 von 12,8%. Andererseits führte aber auch die Inkubation mit 17-phenyl- PGD_2 zu einem signifikanten Verlust des Ψ_m (Abb. 3.21 B).

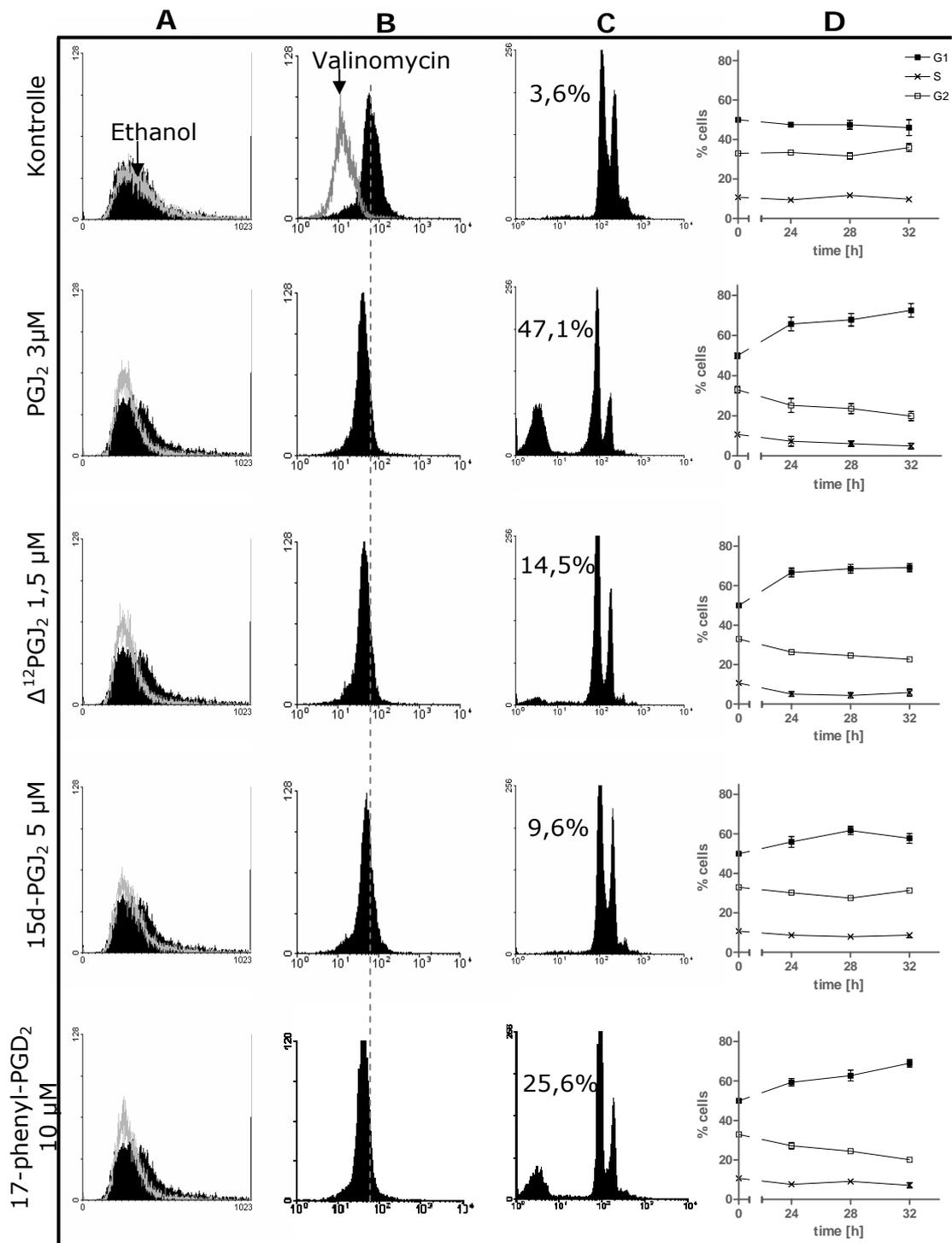


Abbildung 3.21. FACS Analyse nach 24 h Behandlung mit Prostaglandinen. **A:** Darstellung der Zellgröße. Die schwarzen Histogramme stellen die Kontroll-Zellen dar, während die graue Linien die Histogramme der behandelten Zellen repräsentieren. Ethanol wurde als Kontrolle des verwendeten Lösungsmittels verwendet. **B:** Ψm . Die vertikale Linie stellt den Mittelwert der Kontroll-Zellen dar. **C:** DNA Degradation. **D:** Darstellung der G1, S und G2 Phase des Zellzyklus nach 0, 24, 28, 32 h Inkubation.

Außerdem rief die Behandlung von Trypanosomen mit diesen PG-Derivaten Veränderungen im DNA-Gehalt hervor. So wurde eine deutliche DNA-Degradation beobachtet (Abb. 3.21 C). Ein signifikanter Anteil der Nuclei der behandelten Zellen hatte einen niedrigeren DNA-Gehalt im Vergleich zu Nuclei aus Kontroll-Zellen: 47,1% für PGJ₂ und 14,5% für Δ¹²PGJ₂ vs. 3,9% für Kontroll-Zellen. Längere Inkubation mit Δ¹²PGJ₂ führte zu 36,9% DNA-Degradation (*data not shown*). Erstaunlicherweise führte die Inkubation mit 15d-PGJ₂ zu keiner Degradation der DNA, selbst nach 32 h Inkubation, obwohl Konzentrationen bis zu 5 μM verwendet wurden. Allerdings induzierte 15d-PGJ₂, in Zellen aus der stationären Phase, eine DNA-Degradation von 16,2% nach 4 h Inkubation vs. 2,5% für Kontroll-Zellen. Auf der anderen Seite zeigte die Analyse des Zellzyklus Unterschiede zwischen Kontroll- und behandelten Zellen (Abb. 3.21 D). Ebenso wie nach PGD₂ Behandlung wurde ein Arrest in der G1 Phase auch nach Behandlung mit den J-Derivaten induziert. Etwa 70% der PGJ₂-, Δ¹²PGJ₂- und 17-phenyl-PGD₂-behandelten Zellen befanden sich nach 32 h Inkubation in der G1 Phase. Der durch 15d-PGJ₂ induzierte Zellzyklusarrest war mäßig. Nach 32 h waren 60% der Zellen in der G1 Phase vs. 45% der Kontroll-Zellen.

3.10.3. Nachweis von DNA-Brüchen nach Behandlung mit Prostaglandinen durch den Tunel-Test

In einem weiteren Set von Experimenten wurde die DNA-Degradation nach Behandlung mit den verschiedenen Prostaglandinen durch einen TUNEL-Test (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*) bestätigt. Hierbei wurden Strangbrüche mit Hilfe einer terminalen Transferase und Biotin-dUTP markiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Antikörper gegen Biotin, der mit einer Peroxidase gekoppelt war. Eine positive Färbung war mikroskopisch durch das Auftreten einer dunkelbraunen Farbe im Zellkern zu erkennen. Zur Quantifizierung der Färbung wurden je 100 Zellen ausgezählt. Die Abbildung 3.22 fasst die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammen. Beispiel-Zellen jeder Bedingung wurden zusätzlich zugefügt. Nach 24 h Inkubation zeigten die prostaglandin-behandelten Kulturen einen höheren Anteil von Zellen mit einer positiven Färbung: 50% ± 9,5% mit

5 μM PGD_2 , $41\% \pm 5,3\%$ mit 3 μM PGJ_2 , $20\% \pm 3,3\%$ mit 3 μM $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$, $12\% \pm 2,4\%$ mit 5 μM 15d- PGJ_2 und $39\% \pm 9,8\%$ mit 10 μM 17-phenyl- PGD_2 vs. $4,5\% \pm 1,5\%$ bei unbehandelten Kontroll-Zellen.

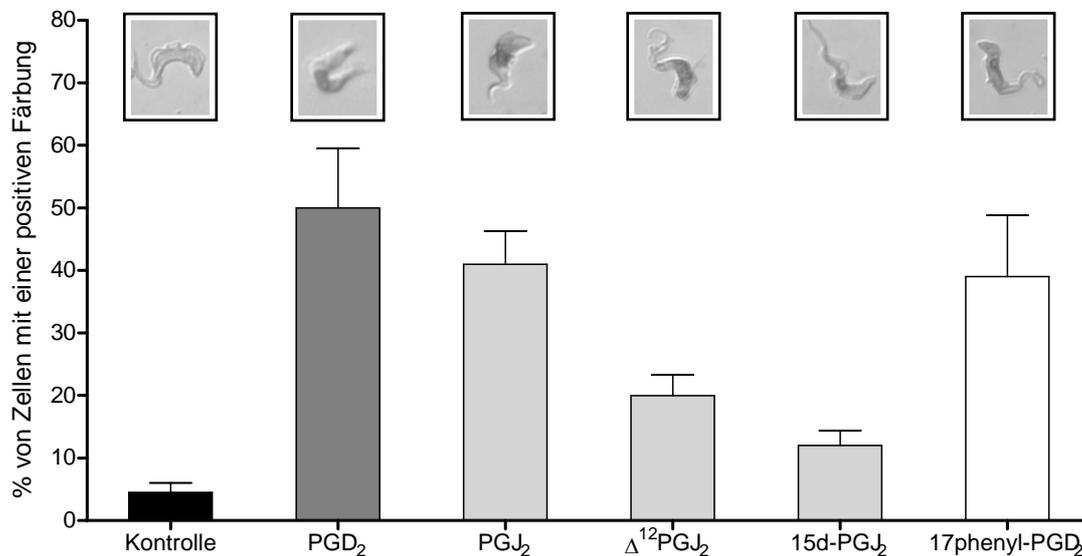


Abbildung 3.22. TUNEL-Färbung nach 24 h Inkubation. Die Bilder zeigen behandelte Zellen mit einer positiven Färbung. Unter Kontroll-Bedingung trat praktisch keine Kernfärbung auf.

3.10.4. Bestimmung der Phosphatidylserin-Exposition nach PG-Behandlung

Eines der ersten Ereignisse, das nach der Induktion des programmierten Zelltods stattfindet, ist die Exposition von Phosphatidylserin (PS) im äußeren *leaflet* der Zellmembran (Bratton *et al.*, 1997). Zur Untersuchung dieses Parameters wurden Zellen aus der stationären Phase verwendet, da sie schneller einen Phänotyp zeigten. Um Phosphatidylserin nachweisen zu können, wurde Annexin V verwendet. Annexin V ist ein Protein, das in Ca^{2+} -haltigen Lösungen über eine höhere Affinität zu PS Resten verfügt. Nekrotische Zellen wurden von der apoptotischen Population durch die doppelt Färbung Annexin V/Propidiumjodid unterschieden. In Abbildung 3.23 sind die *dot plots* von Kontroll- und behandelten Zellen dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung von Trypanosomen mit PGD_2 und mit den Metaboliten der J-Serie die Exposition von Phosphatidylserin auslöste. Der Effekt war am stärksten bei den PGJ_2 behandelten Zellen. Nach 2 h Inkubation mit diesem Prostaglandin waren $59,1\%$ der

Zellen positiv für Annexin V, während nach einer 4 h Inkubation 45,9% der Δ^{12} PGJ₂- und 42,2% der 15d-PGJ₂-behandelten Trypanosomen eine PS-Exposition zeigten. Die schwächste Wirkung zeigte PGD₂ und 17-phenyl-PGD₂, die nach 6 h Inkubation und bei höheren Konzentrationen nur eine PS-Exposition von 39,94% (PGD₂) bzw. 44,06% (17-phenyl-PGD₂) zeigten (Abb. 3.23).

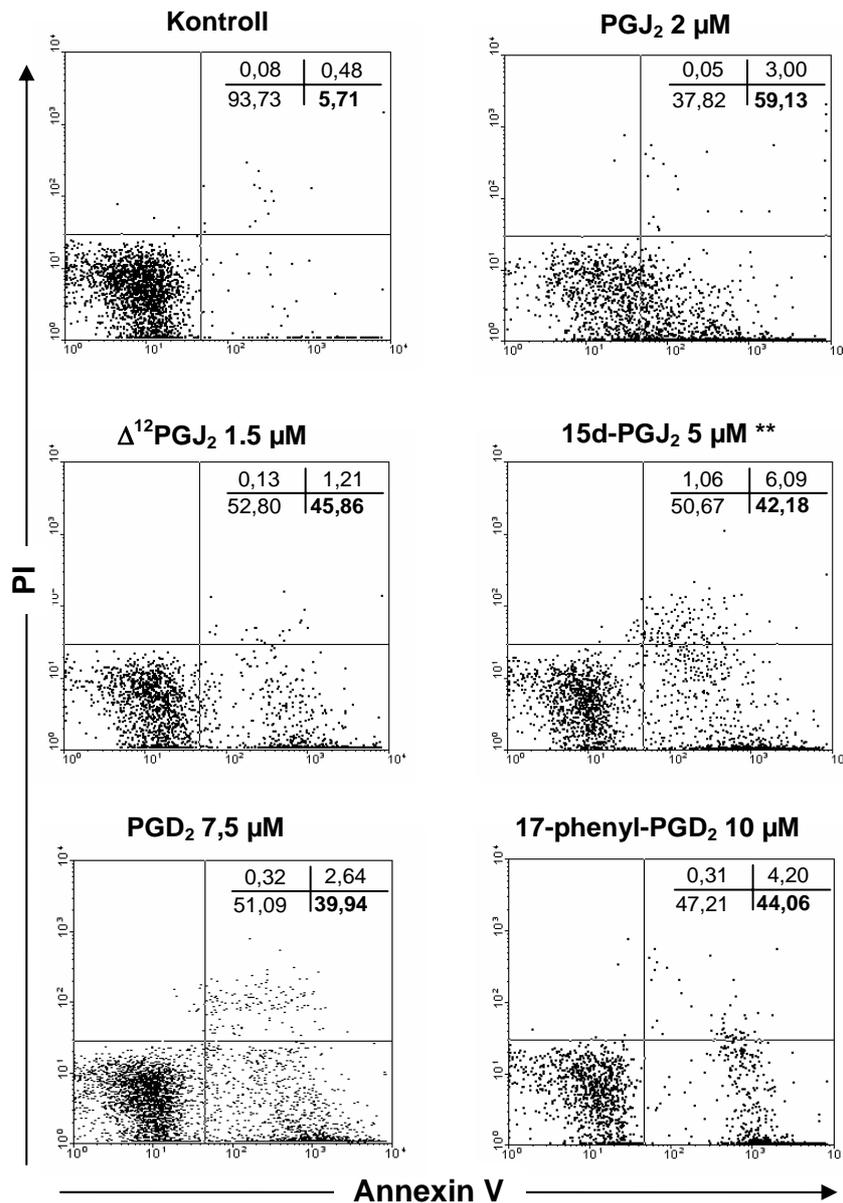


Abbildung 3.23. Nachweis der Phosphatidylserin-Exposition nach Behandlung mit Prostaglandinen mittels Annexin V. Die doppelte Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid führt zur Unterscheidung der nekrotischen und apoptotischen Populationen. Die Messungen wurden nach 2 h (*), 4 h (**) und 6 h (***) Inkubation durchgeführt. Die Werte für die Kontroll-Zellen lagen während der gesamten Inkubationszeit unter 10%.

3.11. Aufhebung des Prostaglandin-induzierten PCD durch Cycloheximid

Zur Untersuchung des Mechanismus, durch den die Prostaglandine einen induzierten Zelltod in der Blutform von *T. brucei* auslösen, wurde Cycloheximid (CHX), ein Inhibitor der Proteinsynthese verwendet. Trypanosomen aus der stationären Phase wurden für 1 h mit 10 µg/ml CHX inkubiert, bevor sie dann mit den jeweiligen Prostaglandinen behandelt wurden. Anschließend wurde stündlich (insgesamt bis 6 h) die Zelldichte der verschiedenen Kulturen bestimmt. Wie oben beschrieben, führte die Behandlung mit PGD₂ und den Prostaglandinen der J-Serie bereits nach kurzer Inkubation zum Absterben der Zellen. Interessanterweise konnte die Vorinkubation mit CHX diesen Effekt aufheben (*data not shown*). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde die Phosphatidylserin-Exposition nach Vorinkubation mit CHX und anschließender Behandlung mit den jeweiligen Prostaglandinen analysiert. Abbildung 3.24 zeigt die Werte der PS-Exposition mit und ohne CHX-Behandlung. Cycloheximid verhinderte dabei in potenter Weise die Phosphatidylserin-Exposition und auch den Zelltod. Diese Ergebnisse sprechen für die Notwendigkeit einer *de novo* Proteinsynthese für die Auslösung des PCD durch Prostaglandine in der Blutform von *Trypanosoma brucei* und deuten auf einen aktiven Prozess im Zellgeschehen hin.

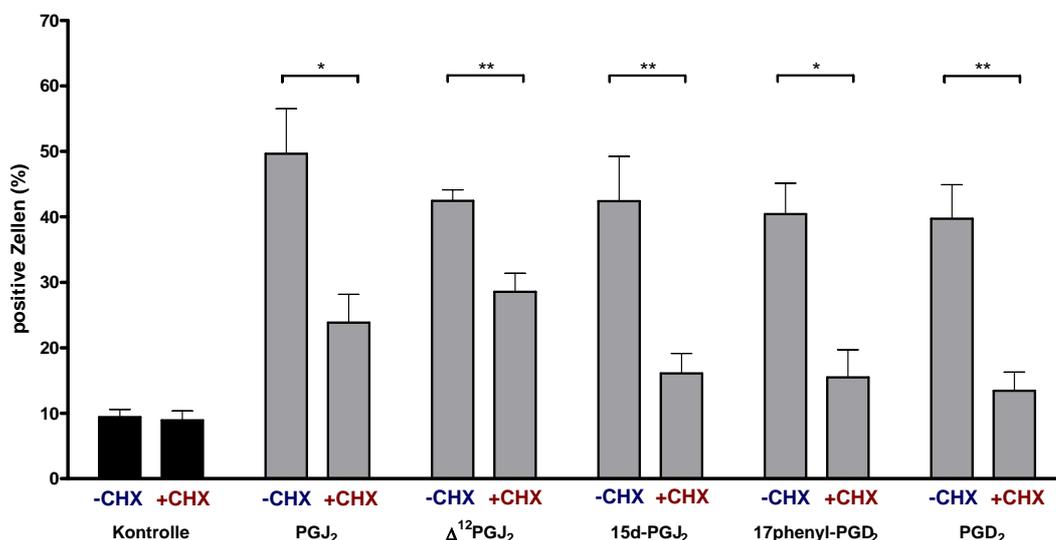


Abbildung 3.24. Hemmung des Prostaglandin-Effektes durch Inhibierung der Protein-Synthese durch Cycloheximid (CHX). Die Bestimmung wurde nach 2 h (PGJ₂), 4 h (Δ¹²PGJ₂ und 15d-PGJ₂) und 6 h (PGD₂ und 17-phenyl-PGD₂) Inkubation durchgeführt. Die Werte für die unbehandelten Kontroll- und CHX-behandelten Zellen blieben während der gesamten Inkubationszeit stabil. [(p<0,05 (*)); p<0,01 (**)].

3.12. Untersuchung des intrazellulären oxidativen Stresses nach PG-Behandlung

Prostaglandine wurden in der Literatur als starke Induktoren von intrazellulärem oxidativen Stress durch die Erhöhung der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben (Kondo *et al.*, 2001, Pignatelli *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen auch bei dem durch PGD₂ und seiner J-Derivate induzierten PCD eine Rolle spielt, wurden die Trypanosomen mit zwei verschiedenen ROS *scavengers* (N-Acetyl-L-Cysteine [NAC] und Glutathion) und Prostaglandinen zusammen und getrennt inkubiert. Beide ROS *scavengers* konnten dabei gleichermaßen den PG-Effekt verhindert, allerdings sind in Abbildung 3.25 nur die Ergebnisse mit NAC dargestellt. Die Zellen, die mit NAC plus PG behandelt wurden, sind höher gewachsen und haben länger überlebt als die Zellen nach PG-Behandlung ohne NAC. Diese Ergebnisse deuten auf die Induktion der ROS-Produktion durch die Behandlung mit PGs in Trypanosomen hin.

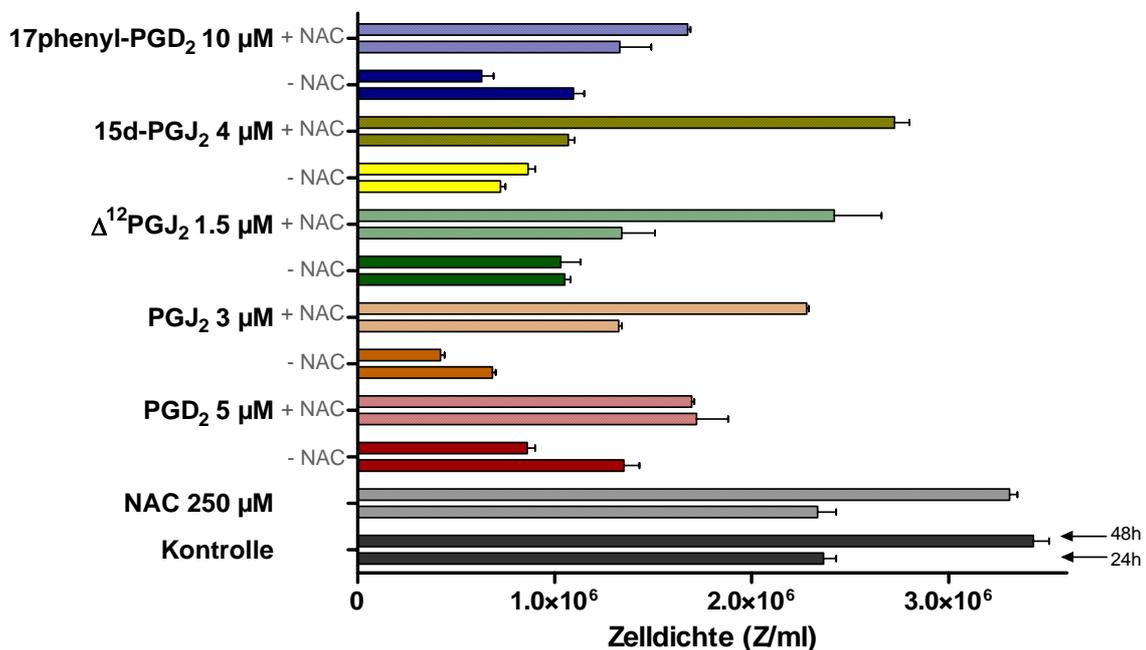


Abbildung 3.25. Hemmung des Prostaglandin-Effektes durch ROS *scavenger*. Zellen aus der logarithmischen Phase wurden mit Prostaglandinen und N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) inkubiert und die Zelldichte jeder Kultur wurde nach 24 und 48 h bestimmt.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Substanz Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) verwendet. Diese Substanz ist ein nicht fluoreszierendes Molekül, das durch die Zellmembran diffundieren kann. Intrazellulär wird DCFH-DA durch die Abspaltung der zwei Acetyl-Gruppen zu Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) umgewandelt. In Gegenwart von ROS wird DCFH schnell zum stark fluoreszierendem Molekül Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Für diese Experimente wurden Zellen aus der stationären Phase mit dem jeweiligen Prostaglandin behandelt und zur ROS-Bestimmung vorbereitet. Die Behandlung mit 2 μM PGJ_2 rief nach 2 h Inkubation eine starke ROS-Bildung hervor. Dieser Effekt wurde auch durch Behandlung mit den anderen Prostaglandinen, allerdings erst nach einer längeren Inkubationszeit induziert: nach 4 h Inkubation mit 1,5 μM $\Delta^{12}\text{PGJ}_2$ oder 5 μM 15d- PGJ_2 und nach 6 h Inkubation mit 7,5 μM PGD_2 oder 10 μM 17-phenyl- PGD_2 (Abb. 3.26).

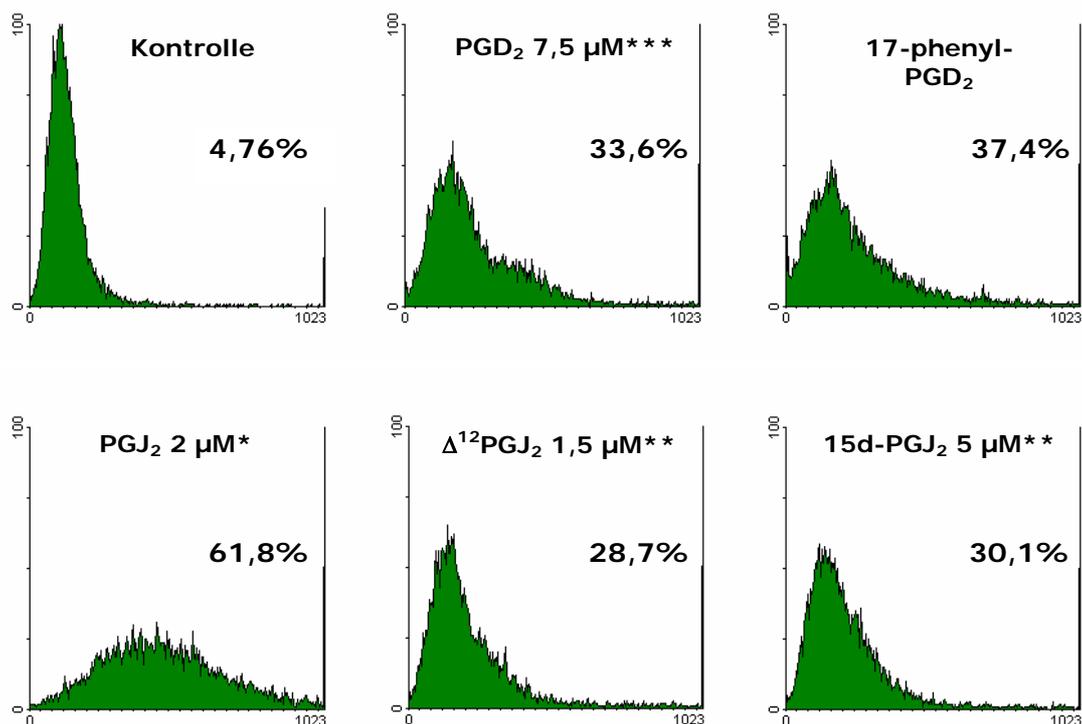


Abbildung 3.26. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Behandlung mit Prostaglandinen mittels Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFH-DA). Zellen aus der stationären Phase wurden mit den jeweiligen Prostaglandinen behandelt. Nach 2 h (*), 4 h (**) und 6 h (***) Inkubation wurde die ROS Produktion bestimmt.

Anschließend an diese Versuche wurde dann festgestellt, dass durch Inkubation mit den Thiolhaltigen-Substanzen NAC und Glutathion die ROS Produktion verhindert werden kann (Abb. 3.27). Dadurch wurde auch der Zelltod aufgehoben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PGJ₂ ebenso wie auch die anderen Prostaglandine ihre Effekte durch einen Mechanismus, der die Störung des intrazellulären Redox-Status involviert, vermitteln.

Die publizierten Daten zeigen zudem, dass die ROS Formation die Überexpression einiger Proteine, vor allem von Enzym, die an der ROS-Bildung beteiligt sind, benötigt (Herrera *et al.*, 2004; Thannickal and Fanburg, 2000). Interessanterweise führte die Vorinkubation der Trypanosomen mit Cycloheximid zu einer signifikanten Hemmung der ROS-Bildung (Abb. 3.27). Diese Resultate zeigen, dass die Protein-Biosynthese auch bei der PCD-Induktion durch Prostaglandine bei der Blutform von *T. brucei* erforderlich ist.

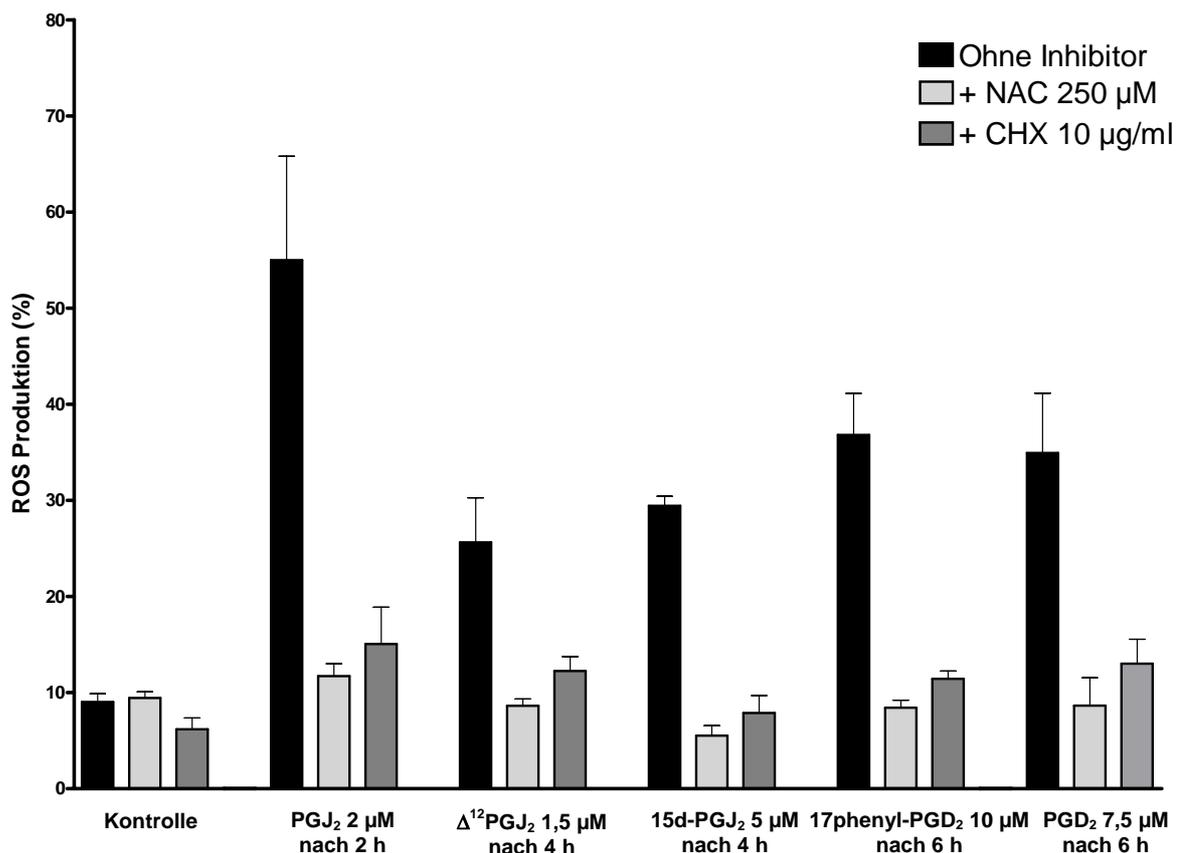


Abbildung 3.27. Inhibierung der ROS-Bildung durch Vorbehandlung mit N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) oder Cycloheximid (CHX).

3.13. Untersuchung der Funktionalität des Mitochondriums

In der Literatur ist das Mitochondrium als eine der wichtigsten Quellen von ROS beschrieben worden (Dröge, 2002). Um die Funktionalität dieses Organells in Trypanosomen zu untersuchen, wurde der Sauerstoffverbrauch der Kontroll- und der PGJ₂-behandelten Zellen bestimmt. Trypanosomen aus der stationären Phase wurden 2 h mit 2 µM PGJ₂ behandelt. Anschließend wurde der Sauerstoffverbrauch von 1 x 10⁷ Trypanosomen innerhalb von 10 min gemessen. Die Abbildung 3.28 zeigt deutlich, dass der O₂-Verbrauch bei den behandelten Trypanosomen niedriger war, als bei den Kontroll-Zellen. Die statistische Analyse ergab dabei, dass die PGJ₂-behandelten Zellen etwa 30% weniger Sauerstoff als die Kontroll-Zellen verbrauchten. Durch TEM wurde zudem ein dilatiertes Mitochondrium beobachtet und mittels FACS-Analyse wurde ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen. Diese Ergebnisse sprechen für die Beteiligung dieses Organells an den durch Prostaglandine induzierten Zelltodprozess.

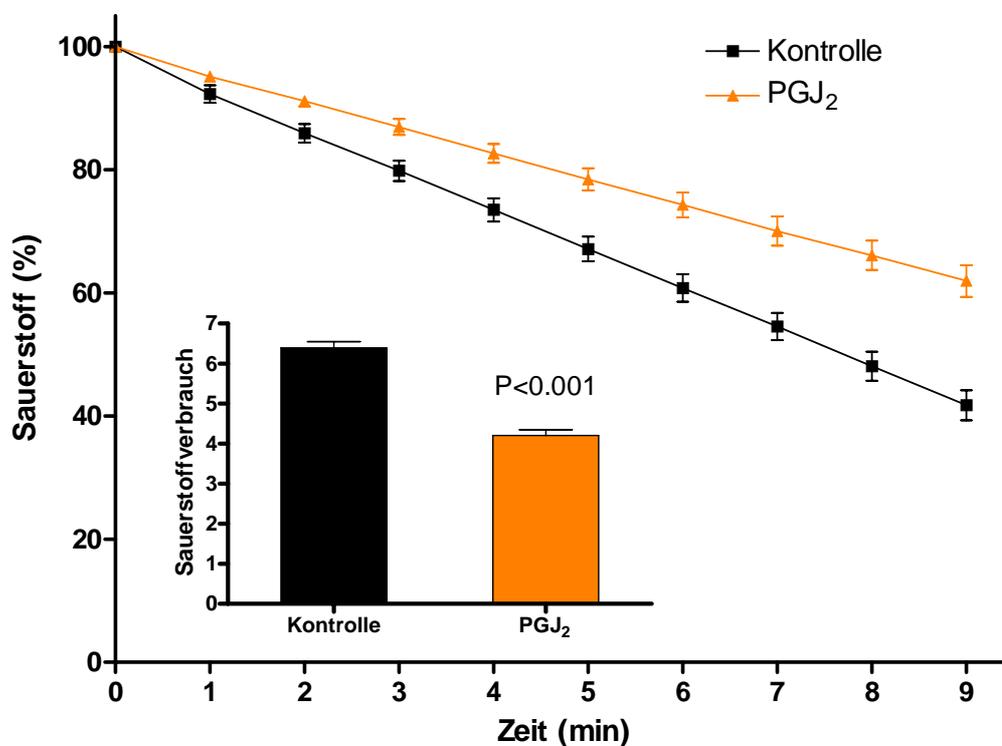


Abbildung 3.28. Sauerstoffverbrauch der Blutform von *T. brucei* nach Behandlung mit 2 µM PGJ₂. Die statistische Analyse wurde mittels Student-t Test durchgeführt.

Bei der Suche nach einem molekularen Mechanismus für die ROS-Produktion kam insbesondere die Reaktion der Alternativen Oxidase (TAO) in Frage. TAO überträgt Reduktionsäquivalente vom Ubiquinol auf Sauerstoff, wodurch das in der Glycolyse reduzierte NAD regeneriert wird, damit die Glycolyse weiterlaufen kann. Die Alternative Oxidase wurde schon bei der prozyklischen Form von *Trypanosoma brucei* als *scavenger* für das Superoxid-Anion vorgeschlagen (Fang und Beattie, 2003). Wenn dieses Enzym auch an der ROS-Bildung beteiligt ist, würde man eine Verstärkung des Prostaglandin-Effektes durch seine Hemmung vermuten. Darum wurden Trypanosomen mit 2 μM PGJ_2 allein und zusammen mit Salicylhydroxamsäure (SHAM), ein TAO-Inhibitor, behandelt und die Zelldichte nach 1 h kontrolliert. Die Behandlung mit SHAM allein hatte keine sichtbaren Effekte auf die Parasiten. PGJ_2 -Behandlung reduzierte die Zelldichte um etwa 20%. Interessanterweise führte aber die Inkubation mit PGJ_2 plus SHAM zu einer 75% Reduzierung der Zelldichte (Abb. 3.29). Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für einen synergistischen Effekt zwischen den Prostaglandinen und SHAM und deuten darauf hin, dass TAO eine wichtige Rolle bei der Auslösung von PCD in Trypanosomen spielt.

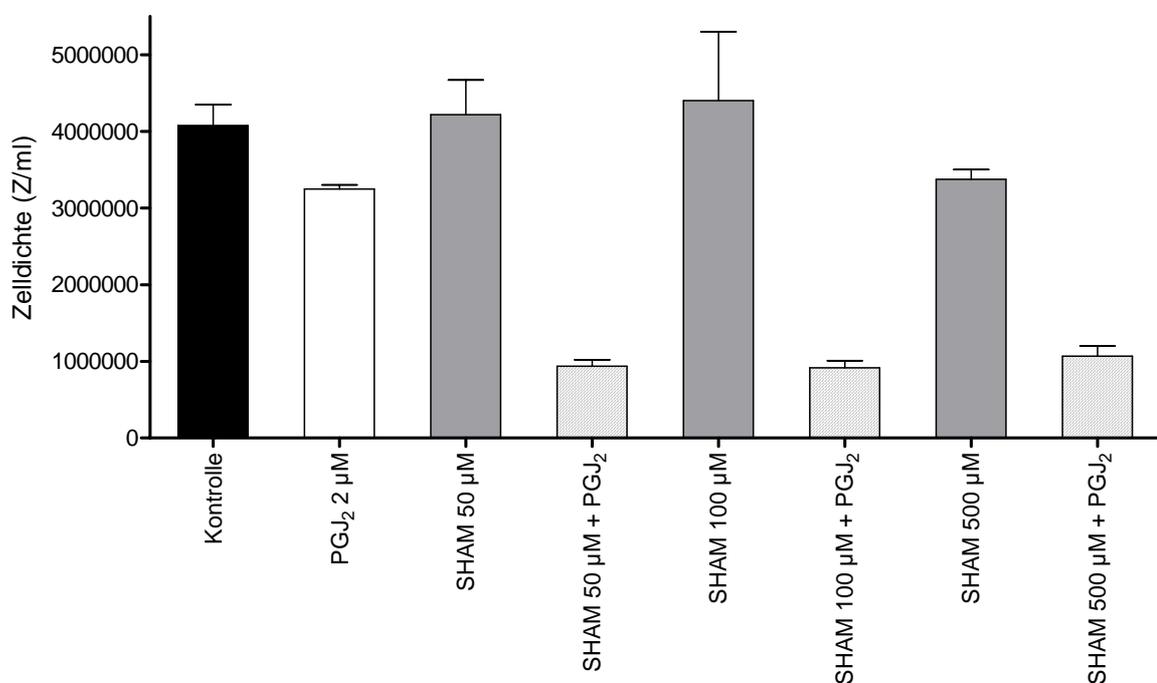


Abbildung 3.29. Synergistischer Effekt von Salicylhydroxamsäure (SHAM) auf PGJ_2 -behandelte Trypanosomen.

4 Diskussion

4.1. Hemmung des Zellwachstums von *Trypanosoma brucei* durch Behandlung mit PGD₂

In einer früheren Arbeit wurde von unserer Gruppe in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Kubata in Japan festgestellt, dass Trypanosomen über die Fähigkeit verfügen, einige Prostaglandine (zumindest PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α}) zu produzieren (Kubata *et al.*, 2000). Diese Moleküle beeinflussen insbesondere vermutlich die Parasit-Wirt-Wechselwirkungen. Außer z.B. Immunsuppression und Schlafinduktion, die sie im infizierten Wirt auslösen, haben diese Prostaglandine aber sicherlich auch einen Einfluss auf den Parasiten selbst. In dieser Arbeit wurden vor allem die Effekte der Prostaglandine auf die Parasiten unter Kultur-Bedingungen untersucht. Zugabe von PGE₂ und PGF_{2α} hatte keine sichtbaren Effekte auf das Wachstum der Parasiten, d.h. sie sind wie die Kontrollzellen gewachsen und haben keine morphologischen Veränderungen gezeigt. In Gegensatz dazu führte die Zugabe von PGD₂ zu einer starken Hemmung des Zellwachstums. Die IC₅₀-Werte dieser Prostaglandine zeigten, dass PGD₂ etwa 50-fach stärker wirkte als PGE₂ oder PGF_{2α}. Dies bestätigt einen spezifischen Effekt von PGD₂ auf den Parasiten, der nicht einfach auf seiner Hydrophobizität beruht.

Zellen aus der stationären Phase waren empfindlicher als Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Die Hemmung des Zellwachstums erfolgte nach 8 bis 12 h, wenn Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet wurden, aber bereits nach 2 h, wenn Zellen aus der stationären Phase eingesetzt wurden. Entsprechend induzierte eine Vorbehandlung der Trypanosomen mit 8-Bromo-cAMP, einem zellpermeablen cAMP-Analogen, das die Differenzierung von der *long slender* zur *short stumpy* Form hervorruft, eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Parasiten gegen PGD₂. Diese Daten deuten darauf hin, dass PGD₂ insbesondere auf die *short stumpy* Form wirkt.

Die Konzentration von PGD₂, die zur Inhibierung des Wachstums von *T. brucei* notwendig war, lag im mikromolaren Bereich. Der IC₅₀-Wert für PGD₂ betrug 3,7 µM, und lag damit ähnlich oder niedriger als die Prostanoid-Konzentrationen, die Effekte in anderen Eukaryonten hervorrufen (Fukushima, 1990; Haberl *et al.*, 1998; Padilla *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004). Allerdings könnte unter Kultur-Bedingungen die aktive Konzentration an freiem Prostaglandin signifikant niedriger sein, da die Prostaglandine an Proteine, speziell das Serum-Albumin binden (Raz, 1972a; Raz, 1972b; Fitzpatrick und Waynald, 1981; Fitzpatrick *et al.*, 1984). Wir haben darum unter unseren Bedingungen bestimmt, wie viel PGD₂ an Albumin bindet, wobei sich zeigte, dass bei 37°C bereits innerhalb der ersten Stunde der Inkubation in Blutformmedium 80% des eingesetzten PGD₂ an Albumin gebunden war. Zudem wurde bereits gezeigt, dass Albumin auch die Umwandlung von PGD₂ zu anderen Derivaten katalysiert (Fitzpatrick und Waynald, 1983). Auf diese Weise liegt die effektive PGD₂ Konzentration im nanomolaren Bereich, was durchaus vergleichbar mit den relevanten physiologischen Konzentrationen ist.

4.2. Induktion von Zellzyklus-Arrest und Zelltod durch PGD₂

Nach den Ergebnissen der FACS Analyse führte die PGD₂-Behandlung zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus'. Diese Daten passten gut mit unseren mikroskopischen Beobachtungen (Lichtmikroskopie, REM und TEM) zusammen, wobei sich eine hohe Anzahl an Zellen nach 24 h Inkubation mit PGD₂ im Teilungsprozess befanden. Durch DAPI-Färbung ließ sich dabei zeigen, dass die Zellen mehr als ein Flagellum, jedoch nur einen Kern enthielten. Somit führt die PGD₂-Behandlung zum Zellzyklus-Arrest, wobei zwar noch ein neues Flagellum gebildet wird, die Kernteilung aber ausbleibt. Diese Ergebnisse sprechen für die Beteiligung von PGD₂ an der Regulation des Zellzyklus' von *Trypanosoma brucei*, was auch schon für verschiedene andere Zelltypen beschrieben wurde (Hughes-Fulford *et al.*, 1985; Bhuyan *et al.*, 1986; Ohno *et al.*, 1988).

Da durch den Gebrauch von Propidiumjodid kein Anzeichen von Nekrose gefunden wurde, wurde als Arbeitshypothese die Induktion eines programmierten Zelltodes nach PGD₂-Behandlung angenommen. PCD ist ein aktiver Prozess, der in

einer Zelle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Signalen ausgelöst werden kann und die Expression spezifischer Gene bedingt (Sperandio *et al.*, 2000; Lockshin und Zakeri, 2004). Interessanterweise blockierte die Behandlung mit Cycloheximid den PGD₂-Effekt, was dafür spricht, dass der durch PGD₂ induzierte Zelltod auch in Trypanosomen ein aktiver Prozess ist, der durch die Inhibierung der Proteinbiosynthese angehalten werden kann.

PCD kann als Caspase-abhängige oder Caspase-unabhängige Apoptose, als Autophagie, als PCD III (Bursch *et al.*, 2000) oder als Paraptose (Sperandio *et al.*, 2004) erfolgen. In dieser Arbeit wurde ein Set gut beschriebener Kriterien verwendet, um diese Formen von PCD unterscheiden zu können. Autophagie wurde wegen der Zunahme an lysosomalen Strukturen untersucht. Durch Verwendung von Monodansylcadaverin konnte Autophagie aber ausgeschlossen werden, da keine Autophagosomen gefärbt wurden. Dies wurde auch durch Verwendung der Autophagie-Inhibitoren 3-Methyladenin, Wortmannin, Adenosin, oder Adenosin plus Nipent bestätigt, die ebenfalls nicht zu einer Aufhebung des PGD₂-Effektes führten. PCD III ist durch eine Auflösung der Zelle in Fragmente ohne Beteiligung von Lysosomen charakterisiert, was in unseren Fall aber ebenfalls nicht beobachtet wurde. Da *Trypanosoma brucei* keine Caspasen exprimiert, wurden die Caspase-abhängige Apoptose und die Paraptose ausgeschlossen. Interessanterweise wurden in *T. brucei* fünf Metacaspase-Gene entdeckt. Sie wurden kloniert und in Hefe exprimiert. Keine dieser Metacaspasen besitzt aber eine messbare Proteaseaktivität und oder ist an der Apoptose in Trypanosomen beteiligt, auch wenn die Expression von Metacaspase 4 in *Saccharomyces cerevisiae* zum Zelltod der Hefen führte (Szallies *et al.*, 2002). Nach neueren Beobachtungen unserer und anderer Gruppen könnten die Metacaspasen in Trypanosomen in der Modulierung von membranassoziierten Proteine involviert sein (Szallies und Duszenko, *in preparation*; Mottram *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit erbrachten Daten zeigen statt dessen, dass PGD₂-behandelte Zellen durch einen PCD-Prozess sterben, der viel Ähnlichkeit mit der Apoptose in Säugerzellen aber auch anderen Protozoen hat (Mpoke und Wolfe, 1996; Wang und Wang, 1999; Arnoult *et al.*, 2001; Nasirudeen *et al.*, 2001). Durch TEM, FACS und

TUNEL-Test konnten wir zeigen, dass nach PGD₂-Behandlung eine Fragmentierung des Kerns mit Chromatinkondensation und DNA-Degradation auftrat. Zusätzlich wurde die Dilatierung des Mitochondriums mittels TEM-Aufnahmen beobachtet und durch FACS-Analyse eine Senkung des mitochondrialen Membranpotentials und die Exposition von Phosphatidylserin beobachtet. Caspase-Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf den durch PGD₂ induzierten Zelltod (Rawer, 2004). Aus diesem Grund und weil die Trypanosomen keine Caspase besitzen, ist der PGD₂-induzierte PCD ein Caspase-unabhängiger Prozess. Dieser Typ von Zelltod wurde bereits bei *Dictyostelium* (Olie *et al.*, 1998), T-Lymphozyten (Jaattela und Tschopp, 2003) und anderen Zelltypen (Lorenzo und Susin, 2004) beschrieben. Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Produktion und Sekretion von PGD₂ bei Trypanosomen mit der Regulierung des Zellzyklus assoziiert ist und bieten Evidenzen für die Auslösung eines Caspase-unabhängigen PCD in der Blutform von *Trypanosoma brucei* durch PGD₂.

4.3. Metabolismus von Prostaglandin D₂

Die Instabilität von PGD₂ in Gegenwart von Albumin ist seit langer Zeit bekannt (Fitzpatrick und Wynalda, 1983). Zusätzlich wurde bereits berichtet, dass die PGD₂ – abhängige Wachstums-Hemmung von Leukämie-Zellen der Maus tatsächlich durch die Bildung eines Derivats von PGD₂, nämlich Δ^{12} PGJ₂, hervorgerufen wird und dass PGD₂ selbst dabei keine Rolle spielt (Narumiya and Fukushima 1985). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Produktion der Metabolite aus PGD₂ unter unseren Bedingungen untersucht, um zu messen, ob der durch PGD₂ induzierte PCD auf die Bildung stärkerer Derivate zurückzuführen ist. Durch Dünnschichtchromatographie konnte dabei bestätigt werden, dass das Serum-Albumin des Mediums die PGD₂-Metabolisierung beschleunigt. Nach 5 h Inkubation in Blutformmedium war bereits etwa die Hälfte des PGD₂ umgewandelt, während die Inkubation in Medium oder in Puffer ohne Albumin nur zu einer geringen Abnahme dieses Prostaglandins führte. Mittels eines MS-gekoppelten HPLC-Systems wurde dann gemessen, dass PGD₂ bei 37°C in Blutformmedium rasch in weitere Verbindungen umgewandelt wird. Nach 12 h Inkubation wurde das eingesetzte PGD₂ hier zu mehr als 80% in verschiedene Derivate der J- und D-Serie metabolisiert.

4.4. Induktion von programmiertem Zelltod durch J-Serie Derivate

Die durch Vergleich mit kommerziell erhältlichen authentischen Verbindungen identifizierten Derivate wurden schließlich in Kultur getestet. Es ist aus der Literatur bekannt, dass diese Moleküle, vor allem die Metabolite der J-Serie, stärker als PGD₂ wirken. Prostaglandine der J-Serie besitzen eine reaktive α,β -ungesättigte Ketogruppe am Cyclopentanring und bieten ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten wie Hemmung der Zellzyklusprogression, Aufhebung der viralen Replikation, Induktion von *heat shock* Proteinen und Stimulierung der Osteogenese (Fukushima, 1992).

Zugabe von Metaboliten der D-Serie zu Trypanosomenkulturen induzierte keine Effekte bei den Parasiten, d.h. die Zellen wuchsen normal und zeigten keine morphologischen Veränderungen. Entsprechend waren die IC₅₀-Werte dieser Metabolite 10 bis 30mal höher als der IC₅₀-Wert von PGD₂. In Gegensatz dazu führte die Behandlung von Trypanosomen mit Metaboliten der J-Serie zur einer signifikanten Inhibierung der Proliferation. Die IC₅₀-Werte von PGJ₂ und Δ^{12} PGJ₂ waren signifikant niedriger, während 15d-PGJ₂ einen ähnlichen IC₅₀-Wert wie PGD₂ zeigte. Durch TEM Aufnahmen und FACS-Analyse wurde zudem klar, dass diese Metabolite ebenso wie das PGD₂ einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus auslösten. Diese Daten belegen, dass die Metabolisierung von PGD₂ zu den J-Serie Derivaten auch von physiologischer Bedeutung sein könnte.

Behandlung mit den Metaboliten der J-Serie rief in den Trypanosomen charakteristische PCD-Veränderungen hervor. Durch TEM, TUNEL-Test und FACS-Analyse wurde eine starke Vakuolisierung des Zytoplasmas, die nukleare Segmentierung, Chromatinkondensation und DNA-Degradation beobachtet. Zusätzlich wurde durch FACS-Analyse ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen, was mit der Beobachtung eines dilatierten Mitochondriums zusammenpasst. Wenn Zellen aus der stationären Phase verwendet wurden, konnte man feststellen, dass die Exposition von Phosphatidylserin einer der ersten sichtbaren Effekte des J-Serie induzierten PCD war. Hier wurde durch Verwendung von Cycloheximid zudem bestätigt, dass eine funktionierende Protein-Biosynthese notwendig ist, um den PCD

auszulösen. Alle diese Daten stimmen mit den Beobachtungen nach PGD₂-Behandlung überein und zeigen, dass Derivate der J-Serie, namentlich PGJ₂, Δ^{12} PGJ₂ und 15d-PGJ₂, stärker und schneller den programmierten Zelltod in der Blutform von *T. brucei* auslösen können als PGD₂.

Der durch die J-Serie-Metabolite induzierte Zelltod war von der Wachstumsphase abhängig. Diese Prostaglandine lösten den Zelltod schneller in Zellen der stationären Phase aus als in solchen der logarithmischen Wachstumsphase. Das war besonderes auffällig bei 15d-PGJ₂. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach PGD₂-Behandlung gefunden. Außerdem hatte die Induktion der Differenzierung mit 8-Bromo-cAMP zur stumpy Form eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Trypanosomen gegenüber PGD₂ zur Folge. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Prostaglandine vor allem auf die stumpy Form wirken. Wir vermuten, dass dieser Mechanismus eine Bedeutung für die beobachtete zell-dichte-abhängige Wachstumsregulation der Parasiten besitzt.

17-phenyl PGD₂, ein synthetisches Analogon von PGD₂, ist ein stabiles Molekül, das unter unseren experimentellen Bedingungen nicht ungewandelt wurde. Die Zugabe dieser Substanz zu Trypanosomenkulturen induzierte den gleichen Phänotyp wie PGD₂, was andeutet, dass PGD₂ selbst auch einen Effekt auf die Trypanosomen ausübt. Allerdings war die Konzentration, die zu den gleichen Ergebnissen führte, etwa zweimal höher als die Konzentration von PGD₂. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PGD₂ teilweise die Effekte bei der Blutform verursacht, jedoch die Bildung aktiverer Metabolite den beobachteten Phänotyp verstärkt.

4.5. Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Prostaglandine

Als reaktive Sauerstoffspezies entdeckt wurden, wurden sie nur als schädliches Molekül beschrieben (Harman, 1956). Heute weiß man aber, dass sie bei verschiedenen physiologischen Ereignissen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen (White *et al.*, 1976; Mittal und Murad, 1977; Roth und Dröge, 1987; Schreck *et al.*, 1991; Thannickal und Fanburg, 2000; Dröge, 2001). Zusätzlich wurde schon oft über ihre Beteiligung an der Signalkaskade, die während des PCD aktiviert wird, berichtet

(Chadhri *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Pignatelli *et al.*, 2005). Interessanterweise sind Prostaglandine als starke Induktoren von intrazellulärem oxidativen Stress beschrieben worden. Die Änderung des Redox-Gleichgewichts ist die Basis vieler ihrer biologischen Effekte und ist in der Aktivierung von PCD in verschiedenen Zelltypen involviert (Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Pignatelli *et al.*, 2005). 15d-PGJ₂ löst durch Induktion von oxidativem Stress Apoptose in Makrophagen, humanen hepatischen Myofibroblasten, Neuroblastoma-Zellen und Lymphozyten aus (Hortelano *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Nencioni *et al.*, 2003). PGD₂ und PGJ₂ sowie seine Metabolite (aber nicht PGE₂ und PGF_{2a}) rufen Apoptose in humanen Leukämie-Zellen durch ROS-Produktion und Caspase 3-Aktivierung hervor (Chen *et al.*, 2005). Deshalb wurde in dieser Arbeit analysiert, ob die PCD-Induktion durch PGD₂ und deren Metabolite der J-Serie in *Trypanosoma brucei* mit der Bildung von ROS assoziiert ist. Die FACS-Analyse mit DCFH-DA zeigte eine Stimulierung der ROS-Produktion nach Behandlung mit den drei J-Metaboliten. PGJ₂ war dabei der stärkste ROS-Induktor, gefolgt von Δ^{12} PGJ₂ und 15d-PGJ₂. Interessanterweise hing diese Reihenfolge immer mit der Fähigkeit zusammen, PCD zu induzieren. PGD₂ und 17-phenyl-PGD₂ riefen ebenfalls eine Erhöhung des ROS-Niveaus hervor. Die Erscheinung von ROS ging dabei stets dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der DNA-Degradation voraus.

4.6. Aufhebung des Prostaglandin-Effektes

Verschiedene biologische Effekte, sogar PCD, die Prostaglandine mittels ROS Produktion hervorrufen, konnten durch Behandlung mit Antioxidanzien inhibiert werden (Kondo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Vorbehandlung mit *scavengers* für reaktive Sauerstoffspezies, nämlich NAC oder Glutathion, verhinderte bei den Trypanosomen vollständig die ROS-Bildung und hob effizient den Zelltod auf. Diese Ergebnisse sprechen für die Beteiligung von ROS bei der PCD Signalkaskade, die in der Blutform von *T. brucei* durch Behandlung mit PGD₂ und den J-Derivaten induziert wird.

Die Empfindlichkeit von PCD gegen Inhibitoren der Proteinbiosynthese ist ein wichtiges Charakteristikum, welches die Abhängigkeit dieses Phänomens von der Genexpression zeigt. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die durch PGD₂ und den Metaboliten der J-Serie induzierte ROS-Produktion abhängig von der Proteinbiosynthese war. Parasiten, die nach einer Vorbehandlung mit Cycloheximid mit diesen Prostanoiden inkubiert wurden, zeigten weder höhere ROS-Niveaus noch eine Exposition von Phosphatidylserin und starben deutlich später. Diese Ergebnisse passen gut mit den in der Literatur berichteten Daten für verschiedene neuronale Zelltypen zusammen, wobei die Apoptose durch ROS induziert wird und ihre Produktion völlig oder teilweise mit Transkriptions- oder Translations-Inhibitoren blockiert wurde (Schulz *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1998). Oxidativer Stress ist ein wichtiger Parameter, der Zelltod als Antwort auf verschiedene Stimuli auslöst. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutliche Evidenzen für die Existenz eines aktiven PCD-Prozesses in *T. brucei*, bei dem eine *de novo* Proteinbiosynthese und oxidativer Stress involviert sind.

4.7. Mögliche Beteiligung des Mitochondriums an der ROS-Produktion

Im Lauf des normalen Metabolismus werden im Mitochondrium ROS generiert, wenn Sauerstoff in der Atmungskette reduziert wird. Das Mitochondrium der Blutform von *T. brucei* ist allerdings nicht gut entwickelt, obwohl bei der stumpy Form das mRNA-Niveau einiger Enzyme der Atmungskette erhöht und diverse Enzyme des Citratzyklus exprimiert werden (Stojdl und Clarke, 1996; Beattie und Howton, 1996; Hendriks *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde die Beteiligung dieses Organells am PCD durch Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs untersucht. In Zellen aus der stationären Phase verursachte die Behandlung mit PGJ₂ eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs von 30% nach 2 h Inkubation. Andererseits ist im Mitochondrium der Blutform (auch in der PC-Form) ein Enzym lokalisiert, das die Reduktionsäquivalente des NADH der Glycolyse auf den Sauerstoff transferiert. Hierbei handelt es sich um die Alternative Oxidase (TAO). Sie wurde in der prozyklischen Form als *scavenger* für das Superoxid-Anion beschrieben (Fang und Beattie, 2003). Inkubation von Trypanosomen mit SHAM, einem TAO-Inhibitor, zusammen mit PGJ₂ hatte einen synergistischen Effekt auf die Parasiten zur Folge, was darauf hindeutet, dass die Hemmung der TAO zu einer

Verstärkung der ROS Bildung durch PGJ₂-Behandlung führen kann. *De facto* wurde kürzlich gezeigt, dass in der Blutform von *T. brucei rhodesiense* die Inhibierung der TAO mit Ascofuranon zum PCD führt und dass die Überexpression dieses Enzyms sogar einen schützenden Effekt ausübt (Tsuda *et al.*, 2005). Alle diese Daten sprechen für die Beteiligung des Mitochondriums an der ROS-Produktion in *Trypanosoma brucei*. Allerdings sollte die Beteiligung anderer Enzyme zur ROS-Bildung, wie z.B. die NAD(P)H-Oxidasen und andere Enzyme, die an Redoxprozessen teilnehmen, nicht ausgeschlossen werden.

4.8. Schlussfolgerungen

Auf der Suche nach einem physiologischen Zusammenhang für die Produktion von Prostaglandinen bei Trypanosomen wurden in der vorliegenden Arbeit ihre Effekte auf diese Parasiten unter *in vitro* Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Auslösung eines Caspase-unabhängigen PCD in der Blutform von *Trypanosoma brucei* nach Behandlung mit PGD₂. Die Umsetzung dieses Prostaglandins wurde durch Inkubation im Kulturmedium untersucht. Die dabei gebildeten Metabolite der J-Serie lösten bei niedrigen Konzentrationen schneller PCD aus als PGD₂, was darauf hindeutet, dass unter physiologischen Bedingungen die Bildung dieser Derivate von großer Bedeutung ist.

Blutformen von afrikanischen Trypanosomen differenzieren von der teilungsfähigen *slender* Form zur teilungsunfähigen *stumpy* Form, die für die Transfektion in der Fliege präadaptiert ist. Wenn die *stumpy* Form nicht durch die Tsetse-Fliege aufgenommen wird, können sie im Blut des Wirtes nur noch 2 bis 3 Tage überleben (Turner *et al.*, 1995). Insbesondere die *stumpy* Form produziert PGD₂ (Kubata *et al.*, 2000), das durch seine direkte Wirkung, aber vor allem durch seine Umwandlung in die aktiven Metabolite der J-Serie, PCD auslöst. Alle diese Daten lassen uns einen zweistufigen Mechanismus zur Kontrolle der Parasitämie in infizierten Tieren vorschlagen. 1) Die *slender* Form produziert einen bislang unbekanntem Differenzierungsfaktor (Hamm *et al.*, 1990; Hesse *et al.*, 1995), der die Differenzierung zur *stumpy* Form abhängig von der Zelldichte induziert (Vassella *et al.*, 1997; Tyler *et*

al., 2001). 2) Die *stumpy* Form sezerniert PGD₂, das nach seiner Metabolisierung einen Zellzyklus-Arrest auslöst und Zelltod hauptsächlich in *stumpy* Zellen hervorruft. Auf diese Weise könnte die PGD₂-Sekretion und seine darauffolgende Umwandlung eine wichtige Rolle als Regulator der Zelldichte im Wirt spielen. Dies wäre ein auto-limitierender Prozess, da die Prostaglandine, die im PCD involviert sind, hauptsächlich von dieser Form des Parasiten produziert wird.

5 Zusammenfassung

Trypanosomen sind seit dem Anfang des letzten Jahrhunderts als Erreger einer Reihe schwerer Tropenkrankheiten bei Mensch und Tier bekannt. Von großer Bedeutung ist dabei im tropischen Afrika die Artengruppe *Trypanosoma brucei*, die Erreger der Schlafkrankheit. Bei Patienten mit *Trypanosoma gambiense* Infektion nimmt im *Liquor cerebrospinalis* die Konzentration von Prostaglandin D₂ stark zu (Pentreath *et al.*, 1990). Dieses Ergebnis wurde zunächst als eine Überregulation der Prostaglandinproduktion des Wirtes während der afrikanischen Trypanosomiasis gedeutet. Im Jahr 2000 wurde jedoch festgestellt, dass auch Trypanosomen die Fähigkeit haben, Prostaglandine zu produzieren (Kubata *et al.*, 2000). Prostaglandine wirken bei Säugetieren als starke Mediatoren bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Reaktionen, wie Erniedrigung des vaskulären Tonus, Fehlgeburt, Infertilität, Immunsuppression, ovariale Dysfunktion, Müdigkeit, Bronchokonstriktion und anderen Symptomen (Mathé *et al.*, 1977; Samuelsson, 1980; Oliw, 1983; Glew, 1992; Dubois *et al.*, 1998; Hayaishi, 2000; Nencioni *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002). In *Schistosoma mansoni* wurde die Bildung von Prostaglandinen mit der Transformation von der cercaria- zur schistosomalen Form assoziiert (Fusco *et al.*, 1986), während in *Amoeba proteus* die Prostaglandine in der Phagozytose eine wichtige Rolle spielen (Prusch, 1989).

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Prostaglandine auf die Blutform von *Trypanosoma brucei* untersucht. Die Behandlung der Trypanosomen mit PGD₂ (aber nicht mit PGE₂ und PGF_{2α}) führte zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums und der DNA Synthese. Die halbinhibitorische Konzentration (IC₅₀) von Prostaglandin D₂ nach 24 h Inkubation betrug 3,7 µM. Allerdings war die effektive Konzentration viel niedriger, da diese Verbindung einen hydrophoben Charakter besitzt und deswegen an das Albumin bindet. Nach 1 h Inkubation blieb nur etwa 20% freies PGD₂ übrig. Bei der Auslösung der Proliferationsinhibition waren PGE₂ und PGF_{2α} etwa 43 bzw. 54 Mal schwächer als PGD₂. Die Behandlung von Trypanosomen mit diesen Prostaglandinen induzierte bei Konzentrationen bis 5 µM sogar eine Erhöhung der DNA Synthese um

etwa 20%, so dass man vermuten könnte, dass PGE₂ und PGF_{2α} eine Rolle bei der Proliferation spielen. Durch Beobachtung morphologischer Veränderungen und die Anwendung spezifischer Färbungen konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin D₂ zum Zelltod der Blutform dieses Parasiten führt. Autophagie wurde dabei als Zelltod-Mechanismus durch Verwendung von Monodansylcadaverin und spezifischen Inhibitoren ausgeschlossen. Zudem zeigte der PGD₂-induzierte Zelltod ähnliche Charakteristika wie die Apoptose, war jedoch Caspase-unabhängig, da die Trypanosomen über keine Caspase verfügen und Caspase-Inhibitoren den Effekt nicht aufheben konnten.

PGD₂ ist als ein sehr instabiles Molekül bekannt. Deshalb wurde seine Metabolisierung unter den verwendeten experimentellen Bedingungen untersucht. Die Umwandlung von PGD₂ erwies sich als ein sehr schneller Prozess, da mehr als 80% des eingesetzten PGD₂ bereits nach 12 h Inkubation metabolisiert war. Nach 20 h und 40 h Inkubation wurden die Metabolite der D-Serie (15d-PGD₂ und 15k-PGD₂) und der J-Serie (15d-PGJ₂, Δ¹²PGJ₂ und PGJ₂) im Medium identifiziert. Die Metabolite der D-Serie induzierten keine Veränderungen in den Trypanosomen. Im Gegensatz dazu riefen die Derivate der J-Serie eine starke Inhibierung der Proliferation hervor. Sie induzierten morphologische Veränderungen, einen Zellzyklusarrest, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, DNA Degradation und die Exposition von Phosphatidylserin schneller, effektiver und bei niedrigeren Konzentrationen als PGD₂. Allerdings konnte festgestellt werden, dass PGD₂ selbst auch einen Effekt auf die Trypanosomen ausübt, da das stabile synthetische Analogon 17-phenyl-PGD₂ den gleiche Phänotyp wie PGD₂ induzierte. Physiologisch betrachtet ist jedoch die Metabolisierung von PGD₂ von großer Bedeutung für die Verstärkung der Zelltodinduktion.

Der Effekt von Prostaglandin D₂ und den Metaboliten der J-Serie war stark von der Wachstumsphase der Parasiten abhängig. Trypanosomen aus der stationären Phase waren empfindlicher als die Trypanosomen aus der logarithmischen Phase. Behandlung von monomorphen Trypanosomen mit Br-cAMP, das die Differenzierung von der *slender* zur *stumpy* Form induziert, erhöhte ebenfalls die Empfindlichkeit der Trypanosomen gegenüber diesen Prostaglandinen. Zusätzlich wirkte PGD₂ auch stärker

auf stumpy als auf slender Trypanosomen, wenn diese bei Verwendung eines pleomorphen Stammes aus der Maus isoliert wurden. Das deutet ebenfalls darauf hin, dass diese Prostaglandine vor allem auf die *stumpy* Form des Parasiten wirken.

Da Prostaglandine als starke Induktoren des intrazellulären oxidativen Stress beschrieben wurden, wurde die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) am Prozess des induzierten Zelltods untersucht. Dazu wurden zwei ROS *scavenger*, N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) und Glutathion, eingesetzt, die den induzierte Zelltod verhinderten und das Überleben der Parasiten signifikant verlängerten. Mittels Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) konnte dann auch direkt bestimmt werden, dass die Prostaglandine der J-Serie die Bildung von intrazellulärem ROS verursachen. Vorinkubation mit NAC oder Glutathion verhinderte die ROS Generation und somit den Zelltod. Die Produktion von ROS wurde ebenso durch Vorinkubation mit Cycloheximid gehemmt, was darauf hindeutet, dass der induzierte Prozess ein aktives Ereignis ist, das eine *de novo* Proteinbiosynthese erfordert.

Die hier erzielten Ergebnisse sprechen für einen stumpy Form-spezifischen induzierten Zelltodprozess, der als Apoptosis-like PCD bezeichnet wird und durch Bildung von Sauerstoffradikalen hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Ergebnisse schlagen wir vor, dass die Sekretion von PGD₂ aus den Parasiten und seine Umwandlung in Derivate der J-Serie als ein Mechanismus zur Regulierung der Zelldichte im Wirt dienen könnte und somit eine wichtige physiologische Funktion besitzt. Die hier vorgestellten Untersuchungen öffnen neue Türen für die Aufklärung der PCD-Maschinerie in *Trypanosoma brucei* und liefern somit unter Umständen neue Targetmoleküle für die Behandlung der Schlafkrankheit.

6. Literaturverzeichnis

- Aboagye-Kwarteng T, Ole-MoiYoi OK, Lonsdale-Eccles JD (1991): Phosphorylation differences among proteins of bloodstream developmental stages of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochemical Journal* 275:7-14.
- Alam M (1986): Ionophore A23187 stimulates *Entamoeba histolytica* to release prostaglandin F₂ alpha. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine* 22:259-264.
- Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H (2002): Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. [erratum appears in *Int J Parasitol.* 2003: 33(1):105]. *International Journal for Parasitology* 32:1133-1143.
- Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouiassi A (1995): Apoptosis in an unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation.* 2:285-300.
- Ameisen JC (1996): The origin of programmed cell death. *Science* 31:1278-1279.
- Arnoult D, Tatischeff I, Estaquier J, Girard M, Sureau F, Tissier JP, Grodet A, Dellinger M, Traincard F, Kahn A, Ameisen, J. C., Petit PX (2001): On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death. *Molecular Biology of the Cell.* 12:3016-3030.
- Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC (2002): On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death and Differentiation.* 9:65-81.

- Baker JR (1995): The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *Parasite* 2:3-12.
- Barcinski MA, Costa-Moreira ME (1994): Cellular response of protozoan parasites to host-derived cytokines. *Parasitology Today*. 10:352-325.
- Barrois M, Riou G, Galibert F (1981): Complete nucleotide sequence of minicircle kinetoplast DNA from *Trypanosoma equiperdum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:3323-3327.
- Barry JD, Emery DL (1984): Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology* 88:67-84.
- Beattie DS, Howton MM (1996): The presence of rotenone-sensitive NADH dehydrogenase in the long slender bloodstream and the procyclic forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *European Journal of Biochemistry* 241:888-894.
- Belley A, Chadee K (2000): Production of prostaglandin E(2) by *Entamoeba histolytica* via a novel cyclooxygenase. *Archives of Medical Research* 31:74-75.
- Berberof M, Vanhamme L, Tebabi P, Pays A, Jefferies D, Welburn S, Pays E (1995): The 3'-terminal region of the mRNAs for VSG and procyclin can confer stage specificity to gene expression in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal* 14:2925-2934.
- Bhuyan BK, Adams EG, Badiner GJ, Li LH, Barden K (1986): Cell cycle effects of prostaglandins A1, A2, and D2 in human and murine melanoma cells in culture. *Cancer Research* 46:1688-1693.
- Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP (1995): Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *European Journal of Cell Biology*. 66:3-14.

- Bienen EJ, Maturi RK, Pollakis G, Clarkson AB, Jr. (1993): Non-cytochrome mediated mitochondrial ATP production in bloodstream form *Trypanosoma brucei brucei*. *European Journal of Biochemistry*. 216:75-80.
- Billaut-Mulot O, Fernandez-Gomez R, Loyens M, Ouaisi A (1996): *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1-alpha: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene* 174:19-26.
- Bishop-Bailey D, Hla T (1999): Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *Journal of Biological Chemistry*. 274:17042-17048.
- Black SJ, Sendashonga CN, O'Brien C, Borowy NK, Naessens M, Webster P, Murray M (1985): Regulation of parasitaemia in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 117:93-118.
- Black SJ, Sendashonga CN, Webster P, Koch GL, Shapiro SZ (1986): Regulation of parasite-specific antibody responses in resistant (C57BL/6) and susceptible (C3H/HE) mice infected with *Trypanosoma (trypanozoon) brucei brucei*. *Parasite Immunology*. 8:425-442.
- Blagosklonny MV (2000): Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14:1502-1508.
- Bodley AL, McGarry, M.W., Shapiro, T.A. (1995): Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *Journal of Infections Disease*. 172:1157-1159.
- Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M (1995): Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270:18910-18916.
- Borner C, Monney L (1999): Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death and Differentiation* 6:497-507.

- Borst P (1986): Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annual Review of Biochemistry* 55:701-732.
- Borst P (1991): Molecular genetics of antigenic variation. *Immunology Today* 12:29-33.
- Borst P, Rudenko G, Taylor MC, Blundell PA, Van Leeuwen F, Bitter W, Cross M, McCulloch R (1996): Antigenic variation in trypanosomes. *Archives of Medical Research* 27:379-388.
- Borst P, Bitter W, Blundell PA, Chaves I, Cross M, Gerrits H, van Leeuwen F, McCulloch R, Taylor M, Rudenko G (1998): Control of VSG gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 91:67-76.
- Braissant O, Juge-Aubry C, Keller H, Saladin R, Staels B, Auwerx J, Burger AG, Meier CA, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 804:231-251.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM (1997): Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry* 272:26159-26165.
- Bratton SB, Cohen GM (2001): Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22:306-315.
- Breidbach T, Ngazoa E, Steverding D (2002): *Trypanosoma brucei*: in vitro slender-to-stumpy differentiation of culture-adapted, monomorphic bloodstream forms. *Experimental Parasitology* 101:223-230.
- Brown L, Hines JC, Ray DS (1992): The *Crithidia fasciculata* CRK gene encodes a novel cdc2-related protein containing large inserts between highly conserved domains. *Nucleic Acids Research* 20:5451-5456.

- Brun R, Schonenberger M (1981): Stimulating effect of citrate and cis-Aconitate on the transformation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms to procyclic forms in vitro. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 66:17-24.
- Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R (2000): Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 926:1-12.
- Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C, Meijer AJ (1988): 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *European Journal of Biochemistry*. 175:325-329.
- Carrasco MA, Marambio P, Jaimovich E (1997): Changes in IP3 metabolism during skeletal muscle development in vivo and in vitro. *Comparative Biochemistry & Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 116:173-181.
- Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L (2000): Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Molecular & Cellular Biology* 20:1692-1698.
- Cattand P, Jannin J, Lucas P (2001): Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Tropical Medicine & International Health* 6:348-361.
- Chaudhri G, Hunt NH, Clark JA, Ceredig R (1988): Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T-Lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cellular Immunology*. 115:204-213.
- Chen J, Rauch CA, White JH, Englund PT, Cozzarelli NR (1995): The topology of the kinetoplast DNA network. *Cell* 80:61-69.
- Chen YC, Shen SC, Tsai SH (2005): Prostaglandin D2 and J2 induce apoptosis in human leukemia cells via activation of caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1743:291-304.

- Chimelli L, Scaravilli F (1997): Trypanosomiasis. *Brain Pathology* 7:599-611.
- Chinery R, Coffey RJ, Graves-Deal R, Kirkland SC, Sanchez SC, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD (1999): Prostaglandin J2 and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 induce proliferation of cyclooxygenase-depleted colorectal cancer cells. *Cancer Research* 59:2739-2746.
- Choung J, Taylor L, Thomas K, Zhou X, Kagan H, Yang X, Polgar P (1998): Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E2 regulated expression of type I collagen alpha1, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 71:254-263.
- Christ EJ, van Dorp DA (1972): Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 270:534-545.
- Christensen ST, Kemp K, Quie H, Rasmussen L (1996): Cell death, survival and proliferation in *Tetrahymena thermophila*. Effects of insulin, sodium nitroprusside, 8-Bromo cyclic GMP, NG-methyl-L-arginine and methylene blue. *Cell Biology International* 20:653-666.
- Clarke PG (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy & Embryology* 181:195-213.
- Clarke PG, Clarke S (1995): Historic apoptosis. *Nature* 378:230.
- Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE, Trimboli AJ, Fonteh AN, Dawson PA, Chilton FH (1999): Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20:1905-1911.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994): International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews* 46:205-229.

- Comini M, Menge U, Flohe L (2003): Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biological Chemistry* 384:653-656.
- Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD, Golstein P (1994): Programmed cell death in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science* 107:2691-2704.
- Crider JY, Griffin BW, Sharif NA (1998): Prostaglandin-stimulated adenylyl cyclase activity via a pharmacologically defined EP2 receptor in human nonpigmented ciliary epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics* 14:293-304.
- Cross GA (1975): Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71:393-417.
- Cross GA (1996): Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *Bioessays* 18:283-291.
- Das M, Mukherjee SB, Shaha C (2001): Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Cell Science* 114:2461-2469.
- Das UN, Padma MC (1977): Presence of prostaglandins A & E in *Entamoeba histolytica*. *Indian Journal of Experimental Biology* 15:1227-1228.
- Davis JS, Alila HW, West LA, Corradino RA, Weakland LL, Hansel W (1989): Second messenger systems and progesterone secretion in the small cells of the bovine corpus luteum: effects of gonadotropins and prostaglandin F2a. *Journal of Steroid Biochemistry* 32:643-649.
- Degtarev A, Boyce M, Yuan J (2003): A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567.
- Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K (2003): Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13561-13566.

- Doyle JJ, Hirumi H, Hirumi K, Lupton EN, Cross GA (1980): Antigenic variation in clones of animal-infective *Trypanosoma brucei* derived and maintained in vitro. *Parasitology* 80:359-369.
- Droege W (2001): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82:47-95.
- Dubois R, Lapillonne A, Laine X, Claris O, Bouvier R, Chappuis JP, Tsujii M (1998): Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.[erratum appears in *Cell* 1998 Jul 24;94(2):following 271]. *Pediatric Surgery International* 13:346-349.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B (1997): Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO Journal* 16:2590-2598.
- Duszenko M, Muhlstadt K, Broder A (1992): Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 50:269-273.
- Englund PT, Hajduk SL, Marini JC (1982): The molecular biology of trypanosomes. *Annual Review of Biochemistry* 51:695-726.
- Esposito F, Cuccovillo F, Vanoni M, Cimino F, Anderson CW, Appella E, Russo T (1997): Redox-mediated regulation of p21waf/cip1 expression involves a post-transcriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *European Journal of Biochemistry*. 245:730-737.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A (1985): Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227:1485-1487.
- Fairlamb AH (1989): Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology* 99 Suppl:93-112.

- Fairlamb AH, Cerami A (1992): Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology* 46:695-729.
- Fang J, Beattie DS (2003): Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 414:294-302.
- Farber E, Liang H, Shinozuka H (1971): Dissociation of effects on protein synthesis and ribosomes from membrane changes induced by carbon tetrachloride. *American Journal of Pathology* 64:601-617.
- Fedyk ER, Phipps RP (1996): Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:10978-10983.
- Ferguson MA, Cross GA (1984): Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 259:3011-3015.
- Fevre EM, Coleman PG, Welburn SC, Maudlin I (2004): Reanalyzing the 1900-1920 sleeping sickness epidemic in Uganda. *Emerging Infectious Diseases* 10:567-573.
- Fitzpatrick FA, Wynalda MA (1981): Albumin-lipid interactions: prostaglandin stability as a probe for characterizing binding sites on vertebrate albumins. *Biochemistry* 20:6129-6134.
- Fitzpatrick FA, Wynalda MA (1983): Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 258:11713-11718.
- Fitzpatrick FA, Liggett WF, Wynalda MA (1984): Albumin-eicosanoid interactions. A model system to determine their attributes and inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 259:2722-2727.

- Flohe S, Obertacke U, Schroder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade FU, Stuber F, Bosch-Morell F (1999): 4-Hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Annals of Surgery* 230:207-214.
- Flynn IW, Bowman IB (1973): The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes. *Comparative Biochemistry & Physiology - B: Comparative Biochemistry* 45:25-42.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995): 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812.
- Fraser A, James C (1998): Fermenting debate: do yeast undergo apoptosis? *Trends in Cell Biology* 8:219-221.
- Frohlich KU, Madeo F (2000): Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* 473:6-9.
- Fukushima M (1990): Prostaglandin J2--anti-tumour and anti-viral activities and the mechanisms involved. *Eicosanoids* 3:189-199.
- Fukushima M (1992): Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 47:1-12.
- Fusco AC, Salafsky B, Delbrook K (1986): *Schistosoma mansoni*: production of cercarial eicosanoids as correlates of penetration and transformation. *Journal of Parasitology* 72:397-404.
- Gilmour RS, Mitchell MD (2001): Nuclear lipid signaling: novel role of eicosanoids. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226:1-4.
- Glauert AM, Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V (1978): The mechanism of antibody-dependent, eosinophil-mediated damage to schistosomes of

- Schistosoma mansoni in vitro: a study by phase- contrast and electron microscopy. Journal of Cell Science. 34:173-192.
- Goldblatt MW (1933): A depressor substance in seminal fluid. Journal of the Society of Chemistry Industrial. 52:1056-1061.
- Gommel DU, Nogoceke E, Morr M, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L (1997): Catalytic characteristics of tryparedoxin. European Journal of Biochemistry 248:913-918.
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD (1995): Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. Gene Expression 4:281-299.
- Gull K (1999): The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annual Review of Microbiology 53:629-655.
- Haberl C, Hultner L, Flugel A, Falk M, Geuenich S, Wilmanns W, Denzlinger C (1998): Release of prostaglandin D2 by murine mast cells: importance of metabolite formation for antiproliferative activity. Mediators of Inflammation. 7:79-84.
- Hamm B, Schindler A, Mecke D, Duszenko M (1990): Differentiation of Trypanosoma brucei bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. Molecular & Biochemical Parasitology 40:13-22.
- Harman D (1956): A theory based on free radical and radiation biology. Journal of Gerontology. 11:298-300.
- Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ (1974): Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183:46-51.
- Hayaishi O (2000): Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: a role of prostaglandin D2. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences 355:275-280.

- Hebert RL (1994): Cellular signalling of PGE₂ and its selective receptor analogue sulprostone in rabbit cortical collecting duct. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 51:147-155.
- Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I (1994): A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:370-374.
- Hemphill A, Lawson D, Seebeck T (1991): The cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Parasitology* 77:603-612.
- Henderson GB, Yamaguchi M, Novoa L, Fairlamb AH, Cerami A (1990): Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 29:3924-3929.
- Hendriks E, van Deursen FJ, Wilson J, Sarkar M, Timms M, Matthews KR (2000): Life-cycle differentiation in *Trypanosoma brucei*: molecules and mutants. *Biochemical Society Transactions* 28:531-536.
- Herrera B, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Beltran J, Fernandez M, Fabregat I (2004): Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 36:16-26.
- Hesse F, Selzer PM, Muhlstadt K, Duszenko M (1995): A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro. *Molecular & Biochemical Parasitology* 70:157-166.
- Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S (1991): Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature* 349:617-620.

- Hirata M, Kakizuka A, Aizawa M, Ushikubi F, Narumiya S (1994): Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11192-11196.
- Hirsch JG, Fedorko ME (1968): Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and "postfixation" in uranyl acetate. *Journal of Cell Biology* 38:615-627.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336.
- Hortelano S, Castrillo A, Alvarez AM, Bosca L (2000): Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages. *Journal of Immunology* 165:6525-6531.
- Hotz HR, Lorenz P, Fischer R, Krieger S, Clayton C (1995): Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 75:1-14.
- Hotz HR, Biebinger S, Flaspohler J, Clayton C (1998): PARP gene expression: control at many levels. *Molecular & Biochemical Parasitology* 91:131-143.
- Hug M, Carruthers VB, Hartmann C, Sherman DS, Cross GA, Clayton C (1993): A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 61:87-95.
- Hughes-Fulford M, Wu J, Kato T, Fukushima M (1985): Inhibition of DNA synthesis and cell cycle by prostaglandins independent of cyclic AMP. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, & Leukotriene Research* 15:401-404.
- Issemann I, Green S (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.

- Jaattela M, Tschopp J (2003): Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Cell* 114:181-190.
- Jannin J, Cattand P (2004): Treatment and control of human African trypanosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17:565-571.
- Jaso-Friedmann, L. L, J. H., 3rd, , Evans DL (2000): Role of nonspecific cytotoxic cells in the induction of programmed cell death of pathogenic protozoans: participation of the Fas ligand-Fas receptor system. *Experimental Parasitology* 96:75-88.
- Jimenez de Asua L (1983): The stimulation of the initiation of DNA synthesis and cell division in Swiss mouse 3T3 cells by prostaglandin F2 alpha requires specific functional groups in the molecule. *Journal of Cellular Physiology* 115:15-22.
- Jimenez de Asua L, Goin M, Ortiz M, Gomez de Alzaga MB (1997): A mitogenic and hormonal signalling network regulate mammalian cell division commitment time. *Advances in Experimental Medicine and Biology*:449-454.
- Jones RL (1972): Properties of a new prostaglandin. *British Journal of Pharmacology* 45:144-145.
- Kato T, Fukushima M, Kurozumi S, Noyori R (1986): Antitumor activity of delta 7-prostaglandin A1 and delta 12-prostaglandin J2 in vitro and in vivo. *Cancer Research* 46:3538-3542.
- Keelan JA, Sato TA, Marvin KW, Lander J, Gilmour RS, Mitchell MD (1999): 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 262:579-285.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239-257.
- Kikawa Y, Narumiya S, Fukushima M, Wakatsuka H, Hayaishi O (1984): 9-Deoxy-delta 9, delta 12-13,14 dihydroprostaglandin D2, a metabolite of prostaglandin D2

formed in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:1317-1321.

Kilunga KB, Inoue T, Okano Y, Kabututu Z, Martin SK, Lazarus M, Duszenko M, Sumii Y, Kusakari Y, Matsumura H, Kai Y, Sugiyama S, Inaka K, Inui T, Urade Y (2005): Structural and mutational analysis of *Trypanosoma brucei* prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases. *Journal of Biological Chemistry* 280:26371-26382.

Kim IK, Lee JH, Sohn HW, Kim HS, Kim SH (1993): Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Letters* 321:209-214.

Kinabo LD (1993): Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. *Acta Tropica* 54:169-183.

King KL, Cidlowski JA (1995): Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *Journal of Cellular Biochemistry* 58:175-180.

Kitanaka C, Kuchino Y (1999): Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death and Differentiation* 6:508-515.

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994): Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7355-7359.

Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995): A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-819.

Koenig K, Menge U, Kiess M, Wray V, Flohe L (1997): Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Journal of Biological Chemistry* 272:11908-11915.

- Kojima A, Shiraki M, Takahashi R, Orimo H, Morita I, Murota S (1980): Prostaglandin D2 is the major prostaglandin of arachidonic acid metabolism in rat bone marrow homogenate. *Prostaglandins* 20:171-176.
- Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K (2001): Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 276:12076-12083.
- Kong JY, Rabkin SW (2000): Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. *Biochimica et Biophysica Acta* 1485:45-55.
- Krauth-Siegel RL, Schmidt H (2002): Trypanothione and tryparedoxin in ribonucleotide reduction. *Methods in Enzymology* 347:259-266.
- Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C (2000): Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology* 35:542-552.
- Kubata BK, Eguchi N, Urade Y, Yamashita K, Mitamura T, Tai K, Hayaishi O, Horii T (1998): Plasmodium falciparum produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans. *Journal of Experimental Medicine* 188:1197-1202.
- Kubata BK, Duszenko M, Kabututu Z, Rawer M, Szallies A, Fujimori K, Inui T, Nozaki T, Yamashita K, Horii T, Urade Y, Hayaishi O (2000): Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in Trypanosoma brucei. *Journal of Experimental Medicine* 192:1327-1338.
- Kubata BK, Duszenko M, Kabututu Z, Rawer M, Szallies A, Inui T, Urade Y, Hayaishi O (2002): Enzymatic formation of prostaglandin D2, E2, and F2a in the parasitic protozoan Trypanosoma brucei. *International Congress Series* 1233:461-466.
- Kumar (1999): Apoptosis: Biology and mechanisms. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Paris, Singapore, Tokyo.

- Kuzoe FA (1991): Perspectives in research on and control of African trypanosomiasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 85:33-41.
- Kuzoe FA (1993): Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Tropica* 54:153-162.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848-853.
- Lamont GS, Tucker RS, Cross GA (1986): Analysis of antigen switching rates in *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 92:355-367.
- Lee JH, Kim HS, Jeong SY, Kim IK (1995): Induction of p53 and apoptosis by delta 12-PGJ2 in human hepatocarcinoma SK-HEP-1 cells. *FEBS Letters* 368:348-352.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL (2002): Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation* 9:53-64.
- Leist M, Jaattela M (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2:589-598.
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W (1996): Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 12:335-363.
- Lewis GP, Westwick J, Williams TJ (1977): Microvascular responses produced by the prostaglandin endoperoxide PGG2 in vivo [proceedings]. *British Journal of Pharmacology* 59:442.
- Lewis K (2000): Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:503-514.
- Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ, 2nd (1982): Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *Journal of Immunology* 129:1627-1631.

- Li L, Tao J, Davaille J, Feral C, Mallat A, Rieusset J, Vidal H, Lotersztajn S (2001): 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin j2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. a pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276:38152-38158.
- Lillico SG, Mottram JC, Murphy NB, Welburn SC (2002): Characterisation of the QM gene of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiology Letters* 211:123-128.
- Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z (2000): Cell death in the third millennium. *Cell Death and Differentiation* 7:2-7.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004): Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:2405-2419.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999): Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase- independent effector of cell death. *Cell Death and Differentiation* 6:516-524.
- Lorenzo HK, Susin SA (2004): Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Letters* 557:14-20.
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9:409-414.
- Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT (2002): Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell* 1:495-502.
- Madeo F, Frohlich E, Frohlich KU (1997): A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *Journal of Cell Biology* 139:729-734.
- Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Frohlich KU (1999): Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology* 145:757-767.

- Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S, Frohlich KU (2002a): Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Current Genetics* 41:208-216.
- Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Frohlich KU (2002b): A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell* 9:911-917.
- Maggi LB, Jr., Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA (2000): Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes* 49:346-355.
- Mahan SM, Black SJ (1989): Differentiation, multiplication and control of bloodstream form *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in mice. *Journal of Protozoology* 36:424-428.
- Mahmud I, Smith DL, Whyte MA, Nelson JT, Cho D, Tokes LG, Alvarez R, Willis AL (1984): On the identification and biological properties of prostaglandin J2. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine* 16:131-146.
- Mancini PE, Patton CL (1981): Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei brucei* in the rat. *Molecular & Biochemical Parasitology* 3:19-31.
- Marks F, (eds.) FG (1999): *Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: From biogenesis to clinical application*. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Martin SJ, Green DR (1995): Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 18:137-153.
- Mathe AA, Yen SS, Sohn R, Hedqvist P (1977): Release of prostaglandins and histamine from sensitized and anaphylactic guinea pig lungs--changes in cyclic AMP levels. *Biochemical Pharmacology* 26:181-188.

- Matthews KR, Tschudi C, Ullu E (1994): A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Development* 8:491-501.
- Matthews KR (1999): Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Today* 15:76-80.
- Mittal CK, Murad F (1977): Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:4360-4364.
- Moreira ME, Del Portillo HA, Milder RV, Balanco JM, Barcinski MA (1996): Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Journal of Cellular Physiology* 167:305-313.
- Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M (2003): Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends in Parasitology* 19:182-187.
- Mowatt MR, Clayton CE (1988): Polymorphism in the procyclic acidic repetitive protein gene family of *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Cellular Biology* 8:4055-4062.
- Mpoke S, Wolfe J (1996): DNA digestion and chromatin condensation during nuclear death in *Tetrahymena*. *Experimental Cell Research* 225:357-365.
- Mullally JE, Moos PJ, Edes K, Fitzpatrick FA (2001): Cyclopentenone prostaglandins of the J series inhibit the ubiquitin isopeptidase activity of the proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276:30366-30373.
- Munafò DB, Colombo MI (2001): A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of Cell Science* 114:3619-3629.

- Murdoch WJ (1996): Differential effects of indomethacin on the sheep ovary: prostaglandin biosynthesis, intracellular calcium, apoptosis, and ovulation. *Prostaglandins* 52:497-506.
- Mutomba MC, Wang CC (1996): Effects of aphidicolin and hydroxyurea on the cell cycle and differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Molecular & Biochemical Parasitology* 80:89-102.
- Mutomba MC, Wang CC (1998): The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Molecular & Biochemical Parasitology* 93:11-22.
- Nagata S, Golstein P (1995): The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.
- Nakahata N, Abe MT, Nakanishi H (1990): PGJ2 and delta 12PGJ2 inhibit cell growth accompanied with inhibition of phosphoinositide turnover in human astrocytoma cells. *Prostaglandins* 40:405-416.
- Nakamura K, Hori T, Sato N, Sugie K, Kawakami T, Yodoi J (1993): Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene*. 8:3133-3139.
- Narumiya S, Fukushima M (1985): Delta 12-prostaglandin J2, an ultimate metabolite of prostaglandin D2 exerting cell growth inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 127:739-745.
- Narumiya S, Fukushima M (1986): Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. I. Active transport and intracellular accumulation of cyclopentenone prostaglandins, a reaction leading to growth inhibition. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 239:500-505.
- Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M (1987): Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 in nuclei. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 242:306-311.

- Narumiya S, Hirata N, Namba T, Hayashi Y, Ushikubi F, Sugimoto Y, Negishi M, Ichikawa A (1993): Structure and function of prostanoid receptors. *Journal of Lipids Mediators* 6:155-161.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79:1193.
- Nasirudeen AM, Tan KS, Singh M, Yap EH (2001): Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 123:235-246.
- Nelson DL, Cox MM (2000): Lipid Biosynthesis: "Lehninger Principles of Biochemistry." New York: Worth Publishers, pp 784-787.
- Nelson RG, Parsons M, Newport G, Stuart K, Agabian N (1983): Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 9:241-254.
- Nencioni A, Lauber K, Grunebach F, Van Parijs L, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P (2003): Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. *Journal of Immunology* 171:5148-5156.
- Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM (2004): Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends in Parasitology* 20:375-380.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *The Journal of Immunological Methods* 139:271-279.
- Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L (1997): A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biological Chemistry* 378:827-836.

- Nolan DP, Rolin S, Rodriguez JR, Van Den Abbeele J, Pays E (2000): Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *European Journal of Biochemistry* 267:18-27.
- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Hermann R (1993): Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *Journal of Cell Science* 104:317-326.
- Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M, Narumiya S (1988): Induction of 68,000-dalton heat shock proteins by cyclopentenone prostaglandins. Its association with prostaglandin-induced G1 block in cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry* 263:19764-19770.
- Oida H, Hirata M, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohishi H, Mizuno N, Ichikawa A, Narumiya S (1997): Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. *FEBS Letters* 417:53-56.
- Okano Y, Inoue T, Kubata BK, Kabututu Z, Urade Y, Matsumura H, Kai Y (2002): Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of *Trypanosoma brucei* prostaglandin F(2 alpha) synthase. *Journal of Biochemistry* 132:859-861.
- Olie RA, Durrieu F, Cornillon S, Loughran G, Gross J, Earnshaw WC, Golstein P (1998): Apparent caspase independence of programmed cell death in *Dictyostelium*. *Current Biology* 8:955-958.
- Oliva JL, Perez-Sala D, Castrillo A, Martinez N, Canada FJ, Bosca L, Rojas JM (2003): The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 binds to and activates H-Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4772-4777.
- Oliw EH (1983): Oxygenation of linolenic and linoleic acid to novel vicinal dihydroxy acids by hepatic microsomes of the rabbit. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 111:644-651.

- Olsen H, Andersen A, Nordbo A, Kongsgaard UE, Borner OP (2004): Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC Clinical Pharmacology* 4:4.
- Opperdoes FR, Borst P (1977): Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* 80:360-364.
- Overath P, Czichos J, Haas C (1986): The effect of citrate/cis-aconitate on oxidative metabolism during transformation of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* 160:175-182.
- Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH (2002): A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 277:35853-35861.
- Padilla J, Kaur K, Phipps RP (2000): Effects of 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 on B lineage cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 905:322-325.
- Palkova Z, Janderova B, Gabriel J, Zikanova B, Pospisek M, Forstova J (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390:532-536.
- Pardee AB (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
- Parsons M, Stuart K, Smiley BL (1991): *Trypanosoma brucei*: analysis of codon usage and nucleotide composition of nuclear genes. *Experimental Parasitology* 73:101-105.
- Parsons M, Valentine M, Carter V (1993): Protein kinases in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2656-2660.
- Parsons M, Ledbetter JA, Schieven GL, Nel AE, Kanner SB (1994): Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with

tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 63:69-78.

Pays E (1988): Expression of variant-specific antigen genes in African trypanosomes. *Biology of the Cell* 64:121-130.

Pentreath VW, Rees K, Owolabi OA, Philip KA, Doua F (1990): The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84:795-799.

Pepin J, Milord F (1994): The treatment of human African trypanosomiasis. *Advances in Parasitology* 33:1-47.

Peregrine AS (1994): Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Veterinary Parasitology* 54:223-248.

Piacenza L, Peluffo G, Radi R (2001): L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:7301-7306.

Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P (1997): Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 91:590-591.

Pignatelli M, Sanchez-Rodriguez J, Santos A, Perez-Castillo A (2005): 15-deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 induces programmed cell death of breast cancer cells by a pleiotropic mechanism. *Carcinogenesis* 26:81-92.

Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO, Gull K (1999): Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *Journal of Cell Science* 112:4641-4650.

- Pollard VW, Rohrer SP, Michelotti EF, Hancock K, Hajduk SL (1990): Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 63:783-790.
- Priest JW, Hajduk SL (1994): Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* 26:179-191.
- Prusch RD, Goette SM, Haberman P (1989): Prostaglandins may play a signal-coupling role during phagocytosis in *Amoeba proteus*. *Cell & Tissue Research* 255:553-557.
- Rawer M (2004): Prostaglandinstoffwechsel in *Trypanosoma brucei*: Klonierung und Charakterisierung der Prostaglandin F2a Synthase und der PGD2 induzierte Zelltod: "Fakultät für Chemie und Pharmazie." Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen, pp 91-93.
- Raz A (1972a): Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins. I. Binding of prostaglandin E2 to humanplasma proteins and its effect on the physiological activity of prostaglandin E2 in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 280:602-613.
- Raz A (1972b): Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins. Comparative binding of prostaglandins A2, F2a and E2 to human plasma proteins. *Biochemical Journal* 130:631-636.
- Reuner B, Vassella E, Yutzy B, Boshart M (1997): Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Molecular & Biochemical Parasitology* 90:269-280.
- Ridgley EL, Xiong ZH, Ruben L (1999): Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal* 340:33-40.
- Robinson DR, Gull K (1991): Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* 352:731-733.

- Roditi I, Schwarz H, Pearson TW, Beecroft RP, Liu MK, Richardson JP, Buhring HJ, Pleiss J, Bulow R, Williams RO (1989): Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology* 108:737-746.
- Rolin S, Hancocq-Quertier J, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP, Pays E (1998): Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 93:251-262.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001): If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates* 4:303-313.
- Ross R, Thomson D (1910): A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: regular periodical increase of the parasites disclosed. *Proceedings of the Royal Society of London* 82:411-425.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000): Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 403:103-108.
- Roth S, Droege W (1987): Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cellular Immunology*. 108:417-424.
- Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, O'Connor PM, Anderson CW, Appella E (1995): A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 270:29386–29391.
- Samari HR, Seglen PO (1998): Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273:23758-23763.
- Samuelsson B (1963): Prostaglandins of human seminal plasma. *The Blue sheet* 89:34.

- Samuelsson B (1979): Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. *Harvey Lectures* 75:1-40.
- Sauane M, Correa L, Rogers F, Krasnapolski M, Barraclough R, Rudland PS, de Asua LJ (2000): Prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) induces cyclin D1 expression and DNA synthesis via early signaling mechanisms in Swiss mouse 3T3 cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 270:11-16.
- Saunders JW, Jr. (1966): Death in embryonic systems. *Science* 154:604-612.
- Scammell T, Gerashchenko D, Urade Y, Onoe H, Saper C, Hayaishi O (1998): Activation of ventrolateral preoptic neurons by the somnogen prostaglandin D2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:7754-7759.
- Schleifer KW, Mansfield JM (1993): Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Immunology* 151:5492-5503.
- Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA (1992): Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Molecular Endocrinology* 6:1634-1641.
- Schofield CJ, Maudlin I (2001): Trypanosomiasis control. *International Journal for Parasitology* 31:614-619.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO Journal* 10:2247-2258.
- Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF (1995): Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *The Journal of Neurochemistry* 64:2239-2247.

- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998): Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* 254:439-459.
- Schurch N, Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I (1994): Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Molecular & Cellular Biology* 14:3668-3675.
- Schurch N, Furger A, Kurath U, Roditi I (1997): Contributions of the procyclin 3' untranslated region and coding region to the regulation of expression in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 89:109-121.
- Scutt A, Zeschnigk M, Bertram P (1995): PGE₂ induces the transition from non-adherent to adherent bone marrow mesenchymal precursor cells via a cAMP/EP2-mediated mechanism. *Prostaglandins* 49:383-395.
- Seed JR, Black SJ (1997): A proposed density-dependent model of long slender to short stumpy transformation in the African trypanosomes. *Journal of Parasitology* 83:656-662.
- Seglen PO, Gordon PB (1982): 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:1889-1892.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL (2001): Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 45:2064-2069.
- Shapiro JA (1995): The significances of bacterial colony patterns. *Bioessays* 17:597-607.
- Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ (1993): cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32:5598-5604.

- Shibata T, Kondo M, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K (2002): 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *Journal of Biological Chemistry* 277:10459-10466.
- Simpson L (1987): The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology* 41:363-382.
- Simpson L, Thiemann OH (1995): Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. *Cell* 81:837-840.
- Sinha D, Addya S, Murer E, Boden G (1999): 15-Deoxy-delta(12,14) prostaglandin J2: a putative endogenous promoter of adipogenesis suppresses the ob gene. *Metabolism: Clinical & Experimental* 48:786-791.
- Slater TF, McDonald-Gibson RG (1987): Introduction to the Eicosanoids. In Information Printing O (ed): "Prostaglandins and related substances: a practical approach." Oxford., pp 1-4.
- Smith DH, Pepin J, Stich AH (1998): Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *British Medical Bulletin* 54:341-355.
- Smith SK (1989): Prostaglandins and growth factors in the endometrium. *Baillieres Clinical Obstetrics & Gynaecology* 3:249-270.
- Smith SK, Ahmed A (1992): Eicosanoid synthesis and Helicobacter pylori associated gastritis: increase in leukotriene C4 generation associated with H. pylori colonization. *Prostaglandins* 44:457-470.
- Sogin ML (1991): Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development* 1:457-463.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000): An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14376-14381.

- Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE (2004): Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death and Differentiation* 11:1066-1075.
- Stanley DW, Miller JS, Howard RW (1998): The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology* 44:157-164.
- Stanley-Samuelson DW (1991): Comparative eicosanoid physiology in invertebrate animals. *American Journal of Physiology* 260:R849-853.
- Sternberg MJ, Mabbott NA (1996): Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon-gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology* 26:539-543.
- Stojdl DF, Clarke MW (1996): *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Experimental Parasitology* 83:134-146.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000): 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4844-4849.
- Straus DS, Glass CK (2001): Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21:185-210.
- Sturm NR, Simpson L (1990): Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61:879-884.
- Sutton RE, Boothroyd JC (1986): Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47:527-535.

- Szallies A, Kubata BK, Duszenko M (2002): A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 517:144-150.
- Szallies A, Duszenko M (in preparation): A network of WW and SH3 domain proteins link metacaspase action to ubiquitin-protein ligase Rsp5 function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D (1998): The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *Journal of Cell Biology* 141:1423-1432.
- Tatischeff I, Petit PX, Grodet A, Tissier JP, Duband-Goulet I, Ameisen JC (2001): Inhibition of multicellular development switches cell death of *Dictyostelium discoideum* towards mammalian-like unicellular apoptosis. *European Journal of Cell Biology.* 80:428-441.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology* 279:1005-1028.
- Thompson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: key mediators of apoptosis. *Science* 281:1312-1316.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development* 8:1224-1234.
- Tsuda A, Witola WH, Ohashi K, Onuma M (2005): Expression of alternative oxidase inhibits programmed cell death-like phenomenon in bloodstream form of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Parasitology International* 54:243-251.

- Turner CM, Aslam N, Dye C (1995): Trypanosoma brucei: inheritance of kinetoplast DNA maxicircles in a genetic cross and their segregation during vegetative growth. *Parasitology* 111:289-300.
- Tyler KM, Higgs PG, Matthews KR, Gull K (2001): Limitation of Trypanosoma brucei parasitaemia results from density- dependent parasite differentiation and parasite killing by the host immune response. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 268:2235-2243.
- Tyler KM (2003): Maintenance of parasitaemia - is it to die for? *Kinetoplastid Biology and Disease* 2:2.
- Ujihara M, Urade Y, Eguchi N, Hayashi H, Ikai K, Hayaishi O (1988): Prostaglandin D2 formation and characterization of its synthetases in various tissues of adult rats. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 260:521-531.
- Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K, Hayaishi O (1989): The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *Journal of Immunology* 143:2982-2989.
- Urade Y, Kitahama K, Ohishi H, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O (1993): Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9070-9074.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000): Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*. 6:961-967.
- Van der Ploeg LH, Cornelissen AW, Michels PA, Borst P (1984): Chromosome rearrangements in Trypanosoma brucei. *Cell* 39:213-221.

- Van Hellemond JJ, Neuville P, Schwarz RT, Matthews KR, Mottram JC (2000): Isolation of *Trypanosoma brucei* CYC2 and CYC3 cyclin genes by rescue of a yeast G(1) cyclin mutant. Functional characterization of CYC2. *Journal of Biological Chemistry* 275:8315-8323.
- Van Parijs L, Abbas AK (1998): Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-248.
- Vanhamme L, Pays E (1995): Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiological Reviews* 59:223-240.
- Vanhamme L, Pays E (1998): Controls of the expression of the Vsg in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 91:107-116.
- Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A, Levine A (1999): Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Current Biology* 9:1061-1064.
- Vassella E, Braun R, Roditi I (1994): Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Research* 22:1359-1364.
- Vassella E, Boshart M (1996): High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Molecular & Biochemical Parasitology* 82:91-105.
- Vassella E, Reuner B, Yutzy B, Boshart M (1997): Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *Journal of Cell Science* 110:2661-2671.
- Vergnes B, Sereno D, Madjidian-Sereno N, Lemesre JL, Ouaiissi A (2002): Cytoplasmic SIR2 homologue overexpression promotes survival of *Leishmania* parasites by preventing programmed cell death. *Gene* 296:139-150.

- Vickerman K (1969): The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase. *Journal of Protozoology* 16:54-69.
- Vickerman K (1985): Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin* 41:105-114.
- Virchow, R (1871): *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre*. 4. Auflage. Hirschwald. Berlin.
- von Euler US, Gaddum JH (1931): An unidentified depressor substance certain tissue extracts. *Journal of Physiology* 72:74-87.
- von Euler US (1934): Zun Kenntnis der pharmacologischen Wirkingen von nativesekreten und extraxzten mannlichen accessorischen Geschlectdrüsen. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 175:78-95.
- Wang HY, Zhang R, Chen L, Li BA, Liu SQ, Cao HF, Qiu XH, Shan YF, Yan ZH, Wu HP, Tan YX, Wu MC, Wang Y (2004): An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *Hepatology* 40:618-628.
- Wang TH, Pan JY (1999): Apoptosis: (2) characteristics of apoptosis. *Sheng Li Hsueh Pao - Acta Physiologica Sinica* 51:660-666.
- Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG (2002): Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of I kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *Journal of Immunology* 168:6232-6243.
- Webster P, Russo DC, Black SJ (1990): The interaction of *Trypanosoma brucei* with antibodies to variant surface glycoproteins. *Journal of Cell Science* 96:249-255.

- Welburn SC, Dale C, Ellis D, Beecroft R, Pearson TW (1996): Apoptosis in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro. *Cell Death and Differentiation* 3:229-236.
- Welburn SC, Murphy NB (1998): Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. *Cell Death and Differentiation* 5:615-622.
- Welburn SC, Lilico, S., Murphy, N.B. (1999): Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense*- Identification of differentially expressed genes during Con A induced death. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 94:229-234.
- White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ (1976): Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 251:7304-7312.
- Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA (2001): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annual Review of Biochemistry* 70:341-367.
- Woodward R, Gull K (1990): Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 95:49-57.
- Wyllie AH (2001): More than one way to go.[comment]. *Journal of Experimental Medicine* 194:F19-22.
- Yumoto N, Hatanaka M, Watanabe Y, Hayaishi O (1986): Involvement of GTP-regulatory protein in brain prostaglandin E2 receptor and separation of the two components. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 135:282-289.
- Zangger H, Mottram JC, Fasel N (2002): Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death and Differentiation* 9:1126-1139.

Akademische Lehrer

Biochemie: Michael Duszenko
Dario Simarro
Teresa Meza
Néstor Uzcátegui
Raimundo Cordero
Nora Pérez
Miguel Chávez

Parasitologie: María Virginia Pérez de Galindo
Eva Pérez de Suárez

Physiologie: Alicia Ponte-Sucre
Arelis Torres
Simón Amaro

Mykologie: Hilda Romero

Immunologie: Mariangel Ochoa

Toxikologie: Marisol Borges

Kurs "Citometría de Flujo" am CIEMAT und CNIC, Madrid, Spanien:

Juan Carlos Segovia
Alberto Alvarez-Barrientos

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Katherine del Carmen Figarella Araujo
Geburtsdatum: 15. Januar 1978, in Puerto Ordaz
Familienstand: verheiratet
Stadtangehörigkeit: Venezolanerin

Schule und Studium:

1994 Abschluss-Abitur, Colegio Nazaret, Puerto Ordaz-Venezuela
09/1994-09/1999 Studium an der Universidad Central de Venezuela [UCV]
(Licenciado en Bioánalisis), Caracas-Venezuela
09/1998-09/1999 Diplomarbeit an der Universidad Central de Venezuela, Instituto
de Medicina Experimental. Prof. Dr. Alicia Ponte-Sucre
01/2000-09/2001 Forschungstätigkeit am Instituto de Medicina Experimental,
UCV, Caracas-Venezuela
10/2001-03/2002 Vorbereitung für die Deutsche Sprachprüfung für den
Hochschulzugang (DSH) am Goethe Institut, Mannheim.
(bestanden)
Seit 04/2002 Promotion am Interfakultären Institut für Biochemie der
Universität Tübingen, AG molekulare Parasitologie, Prof. Dr.
Michael Duszenko „Rolle der Prostaglandinproduktion in
afrikanischen Trypanosomen: Charakterisierung des Effektes von
Prostaglandin D₂ und seiner Metabolite auf die Blutform von
Trypanosoma brucei“
10/2002 Prüfung zur Anerkennung als Diplom Biochemikerin bei den
Professoren D. Mecke und H. Probst
02/2003-07/2003 Betreuung des Praktikums „Biochemie für Mediziner“

Kongresse:

Figarella, K., García, N., Ponte-Sucre, A. Changes in pyruvate kinase and p-glycoprotein expression in glibenclamide resistant *Leishmania mexicana*. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e.V. Abs. 24, pp. 91. Stuttgart, Germany, 2000.

Silva, N., **Figarella, K.,** Ponte-Sucre, A. Glibenclamide resistant phenotype and the host cell *Leishmania* parasite infection. 3rd COST B9 meeting, Abs. 23, Brügge, Belgien, 2000.

Figarella, K., Moll, H., Ponte-Sucre, A. Correlación entre la acción leishmanicida de glibenclamida y la expresión de moléculas de superficie de macrófagos murinos. Libro de resúmenes de la I Convención Anual de Asovac. Acta Científica Venezolana, 51: 175, Caracas, Venezuela, 2000.

Figarella, K., Uzcátegui, N., Ponte-Sucre, A. Glibenclamide induced drug resistance induce metabolic changes in *Leishmania mexicana*. Second World Congress in leishmaniasis (Leish2), Abs. 122, pp. 32. Kreta, Griechenland, 2001.

Figarella, K., Uzcátegui, N., Ponte-Sucre, A. La resistencia inducida por glibenclamida promueve cambios metabólicos en *Leishmania mexicana*. Jornadas del Instituto de Medicina Experimental, Caracas, Venezuela, 2001 (ohne Abstrakt-Buch).

Uzcátegui, N., **Figarella, K.,** Ponte-Sucre A. ABC transporters function in *Leishmania mexicana*: Implications in glucose transport. Annual Meeting on Basic Research on Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 93: Abs. 496-CB1, Caxambu, Brasilien, 2001.

Figarella, K., Uzcátegui, N., Ponte-Sucre, A. La resistencia inducida por glibenclamida promueve cambios metabólicos en *Leishmania mexicana*. Libro de resúmenes de la II Convención Anual de Asovac. Acta Científica Venezolana, 52: 198, Caracas, Venezuela, 2001.

Figarella, K., Rawer, M., Kubata, B., Duszenko, M. Role of prostaglandins in African Trypanosomes. Molecular Parasitology Meeting XIV, Abs 233A. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2003.

Uzcátegui, N., **Figarella, K.,** Camacho, N., Ponte-Sucre, A. Changes in substrate preferences, glucose uptake and enzymatic activities in a glibenclamide-resistant *Leishmania mexicana* strain. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e.V. Abs. 167PB, pp. 108. Würzburg, Germany, 2004.

Denninger, V., **Figarella, K.,** Duszenko, M. The Effect of Troglitazone in *Trypanosoma brucei*. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e.V. Abs. 161PB, pp. 107. Würzburg, Germany, 2004.

Uzcátegui, N., Carmona-Gutiérrez, D., Bassarak, B., **Figarella, K.**, Duszenko, M. Permeability of *Trypanosoma brucei* Aquaglyceroporins for non conventional solutes: As III, Sb III, and dihydroxyacetone. Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting I, Abs. 230C. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2005.

Denninger, V., **Figarella, K.**, Duszenko, M. Induction of differentiation in kinetoplastids by thiazolidinediones. Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting I, Abs. 204C. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2005.

Figarella, K., Uzcátegui, N., Duszenko, M. Induction of programmed cell death in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* by PGD₂ and its metabolites. Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting I, Abs. 207A. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA, 2005.

Veröffentlichungen:

García N, **Figarella K**, Mendoza-León A, Ponte-Sucre A. Changes in the infectivity, pyruvate kinase and acid phosphatase activity and p-glycoprotein expression in glibenclamide resistant *Leishmania mexicana*. Parasitology Research, 86: 899-904, 2000.

Ponte-Sucre A, **Figarella K**, Moll H. Experimental Leishmaniasis: The glibenclamide-triggered decrease in parasite growth correlates with changes in macrophage features. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 23(3): 477-486, 2001.

Figarella K, Uzcátegui N, García N, Silva N, Camacho N, Ponte-Sucre A. Molecular pharmacology of chemo-resistant Leishmania. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica ISSN 0798-0264, 22(1), January, 2003.

Silva N, Camacho N, **Figarella K**, Ponte-Sucre A. Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in an ABC-transporter blocker resistant strain. Parasitology, 128(6): 629-634, 2004.

Uzcátegui NL, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, Palmada M, **Figarella K**, Boehmer C, Lang F, Beitz E, Duszenko M. Cloning, heterologous expression and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. Journal of Biological Chemistry, 279(41): 42669-42676, 2004.

Figarella K, Rawer M, Uzcátegui NL, Kubata B, Lauber K, Madeo F, Wesselborg S and Duszenko M. Prostaglandin D₂ induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. Cell Death and Differentiation, 12(4): 335-346, 2005.

Uzcátegui NL/**Figarella K** (joint first authors), Camacho A and Ponte-Sucre A. Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. Comparative biochemistry and physiology, Part C 140: 395-402, 2005.

Figarella K, Uzcategui NL, Beck A, Schoenfeld C, Kubata BK, Lang F, and Duszenko M. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma brucei* by prostaglandins of J series involves oxidative stress, *submitted*.

Denninger V, **Figarella K**, Schmidt M, Jungwirth H and Duszenko M. Troglitazone induces slender to stumpy differentiation in a monomorphic strain of *Trypanosoma brucei*, *manuscript in preparation*.