

Charakterisierung der Aquaglyceroporphine von *Trypanosoma brucei*

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von

Björn Bassarak

Tag der mündlichen Prüfung:

26. August 2010

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Duszenko

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Florian Lang

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko danke ich für die interessante Themenstellung, die kollegiale Betreuung, die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die guten Arbeitsbedingungen im Labor.

Herrn Prof. Dr. Florian Lang danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Prof. Dr. Christine Clayton (Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, Heidelberg) für die PC 1313-514 Zelllinie und den p2T7TAblue Vektor sowie Professor George Cross (Rockefeller University, New York) für die SMB Zelllinie und den pLEW100 Vektor.

Bei Néstor Uzcátegui bedanke ich mich herzlich für seine Vorarbeiten und die profunde Einführung in die Thematik. Sein Arbeitsstil und seine Arbeitsmoral waren mir Vorbild und Hilfe bei der Laborarbeit.

Ich möchte weiter allen meinen Dank aussprechen, die mit ihrem Einsatz zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke Caroline Schönfeld für ihre unerschütterliche Geduld und ihre tatkräftige Hilfsbereitschaft, Witta Kaiser und Derya Demirsal für ihre Hilfe bei Trypanosomen-Kulturen, Stefan Mogk für seine Zusammenarbeit zu Blutform-Knockdowns, Patrick Merkel und Rudolf Koopmann für ihre Molekularbiologie-Tipps, Khalid Muhammad für seine Hilfsbereitschaft, Viola Denninger für ihre Gesprächsbereitschaft, Björn Buchholz und Torsten Barth für ihre Kameradschaft und der Laborgruppe Duszenko allgemein für das nette Arbeitsklima.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mich immer bedingungslos unterstützt haben.

Abkürzungen

AQP	Aquaglyceroporin
AGO	Argonaut
ATUB	α -Tubulin
BF	Blutform der Trypanosomen
BLE	Phleomycin bindendes Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGA	Citrat-Glucose-Anticoagulans
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid 5'-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HYG	Hygromycin Phosphotransferase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPS	<i>impacts per second</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MIP	<i>major intrinsic protein</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MITat	<i>Molteno institute trypanozoon antigenic type</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NEO	Neomycin Phosphotransferase
nt	Nukleotide
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Procyclische Form der Trypanosomen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGPEET ^{Ti}	Tetracyclin induzierbarer GPEET Procyclin Promoter
RISC	<i>RNAi inducing silencing complex</i>
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMB	<i>single marker bloodstream form</i>
SSC	<i>standard saline citrate</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA
T7PRO ^{Ti}	Tetracyclin induzierbarer T7 Promoter
T7RNAP	T7 RNA Polymerase
TDB	<i>trypanosome dilution buffer</i>
Tet	Tetracyclin
TETR	Tetracyclin Repressor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.1	Krankheitsbild und Behandlungsmöglichkeiten	2
1.1.2	Taxonomie und Morphologie	3
1.1.3	Lebenszyklus.....	4
1.1.4	Ungewöhnliche biologische Eigenschaften	6
1.1.4.1	Energiestoffwechsel	6
1.1.4.2	VSG Antigenvariation.....	8
1.1.4.3	Genom, polycistronische Transkription und Transsplicing	8
1.1.4.4	RNA Interferenz	9
1.2	<i>Wassertransport</i>	11
1.2.1	Major Intrinsic Proteins	11
1.2.1.1	Proteinstruktur	13
1.2.1.2	Permeabilitätsmechanismus	15
1.2.2	Aquaglyceroporine in <i>Trypanosoma brucei</i>	16
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	<i>Material</i>	19
3.1.1	Versuchsorganismen	19
3.1.1.1	Trypanosomen	19
3.1.1.2	Bakterien	22
3.1.2	Antikörper	22
3.1.3	Oligonukleotide	22
3.1.4	Plasmide	24
3.1.5	Kits.....	25
3.1.6	Chemikalien.....	25
3.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.8	Medien, Puffer und Lösungen	28
3.1.8.1	Medien	28
3.1.8.2	Puffer und Lösungen	33
3.1.9	Geräte.....	36
3.1.10	Software und Datenbanken	37
3.2	<i>Methoden</i>	38
3.2.1	Kultivierung von Organismen	38
3.2.1.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	38
3.2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	41
3.2.2	Umgang mit Nukleinsäuren.....	42
3.2.2.1	Isolierung	42
3.2.2.2	Fällung	43
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung	43
3.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
3.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktionen.....	44
3.2.2.6	DNA-Modifikationen.....	45
3.2.2.7	Klonierung	47

3.2.2.8	Sequenzierung und Sequenzanalyse	47
3.2.3	Immunfluoreszenz.....	47
3.2.4	Herstellung von Knockdown-Trypanosomen	48
3.2.5	Northern Blot	49
3.2.6	Hypoosmolarer Schock.....	51
3.2.7	Enzymassays.....	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	<i>Lokalisierung der Aquaglyceroporine</i>	53
4.1.1	Immunfluoreszenz-Aufnahmen.....	53
4.1.2	AQP2-Überexpression	55
4.1.2.1	Klonierung	55
4.1.2.2	Herstellung der Überexpressions-Trypanosomen	56
4.1.2.3	Immunfluoreszenz-Aufnahmen.....	57
4.1.2.4	Verifizierung der Überexpression	57
4.1.2.5	Hypoosmotischer Schock.....	58
4.2	<i>AQP-RNAi-Trypanosomen</i>	60
4.2.1	Auswahl der Knockdown-Sequenzen	60
4.2.2	Klonierung der Knockdown-Vektoren	61
4.2.3	Herstellung der RNAi-Transformanten.....	63
4.2.4	Dokumentation der Knockdown-Rate.....	64
4.2.4.1	Beispiel eines Knockdown-Verlaufs.....	65
4.2.4.2	Verifizierung der verschiedenen PC-AQP-Knockdowns.....	66
4.2.4.3	Verifizierung der verschiedenen BF-AQP-Knockdowns	70
4.2.4.4	Zusammenfassung.....	72
4.2.5	Wachstumskurve.....	72
4.2.6	Hypoosmotischer Schock	73
4.2.7	Glycerin-Überlebens-Test.....	75
4.2.8	Arsen- und Antimon-Transport	77
5	Diskussion.....	79
5.1	<i>Lokalisierung der Aquaglyceroporine</i>	80
5.2	<i>AQP-RNAi-Trypanosomen</i>	81
5.2.1	AQP1.....	83
5.2.2	AQP2.....	83
5.2.3	AQP3.....	85
5.2.4	AQP1-3	85
5.3	<i>Resümee und Ausblick</i>	88
6	Abstract	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Akademische Lehrer	99

1 Einleitung

Trypanosomen sind parasitär lebende, eukaryontische Einzeller. Ihr Name setzt sich aus den griechischen Wörtern *trypanon* für Bohrer sowie *soma* für Körper zusammen und bezieht sich auf die länglich gewundene Zellform und die Art ihrer Fortbewegung. Zur Gattung *Trypanosoma* werden weltweit mehrere hundert Arten gezählt [BioLib 2010].

1.1 *Trypanosoma brucei*

Afrikanische Trypanosomen der Art *Trypanosoma brucei* wurden zum ersten Mal vor über 100 Jahren von Sir David Bruce näher beschrieben und als Krankheitserreger identifiziert [Bruce 1895; Bruce et al. 1903]. Die Erreger sind verantwortlich für die afrikanische Schlafkrankheit beim Menschen und die Tierseuche Nagana. Der Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* umfasst neben einem Säugerwirt, in dem sie als Blutformen (BF) bezeichnet werden, ein Stadium als procyclische Parasitenform (PC) in Stechfliegen der Gattung *Glossina* (Tsetsefliegen). Die drei *Trypanosoma brucei*-Unterarten werden von verschiedenen *Glossina*-Arten übertragen. Das Verbreitungsgebiet der Erkrankungen ist auf das begrenzte Lebensgebiet der Insektenvektoren beschränkt [Frey et al. 2001].



Abbildung 1 Geographische Verbreitung der Tsetsefliegen [Sept 1999]

Trypanosoma brucei gambiense ist verantwortlich für die chronische Form der Schlafkrankheit in Zentral- und Westafrika. Das mit Abstand wichtigste Reservoir für *Trypanosoma brucei gambiense* ist der Mensch, obwohl Haustiere wie Hund und Schwein sowie Wildtiere diese Trypanosomen-Unterart beherbergen können. *Trypanosoma brucei rhodesiense* verursacht die akute Form der Schlafkrankheit in Ostafrika und ist fast immer eine Zoonose; Reservoir sind Nutztiere oder verschiedene Wildtiere wie Warzenschwein oder Buschbock. *Trypanosoma brucei brucei* ist einer der Erreger der Nagana-Seuche. In Wildtieren wie Antilopen verursachen die Parasiten relative milde Infektionen, während die Infektion in domestizierten Nutztieren wie Rinder, Schafe und Schweine, einen schweren und oft tödlichen Verlauf nimmt.

Trypanosoma brucei brucei ist nicht humanpathogen, da die Parasiten durch das im menschlichen Serum vorkommende Apolipoprotein L-I lysiert werden [Pays et al. 2008]. Das Protein bindet an *high density lipoprotein*-Partikel, die auch das menschliche *haptoglobin-related protein* inkorporiert haben. *Trypanosoma brucei brucei* besitzt einen spezifischen Oberflächenrezeptor für den Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex, um Häm für Hämproteine einzufangen. Der Rezeptor unterscheidet nicht zwischen Haptoglobin und *haptoglobin-related protein*, weshalb *haptoglobin-related protein* enthaltende *high density lipoprotein*-Partikel vom Parasiten effizient endozytiert werden. Im Lysosom integriert sich Apolipoprotein L-I dann in die Membran und formt einen Anionen-Kanal aus. Es kommt zur Depolarisation der Membran, zu einem andauernden Einstrom von Chlorid aus dem Cytosol und subsequent zum osmotischen Anschwellen der Lysosomen. Der ansteigende interne Druck kompromittiert wahrscheinlich die physikalische Integrität der Plasmamembran, was zur Lyse der Trypanosomen führt [Perez-Morga et al. 2005]. Diese Serumresistenz des Menschen wird von *Trypanosoma brucei rhodesiense* mittels des *serum resistance associated*-Faktors überwunden, da das *serum resistance associated*-Protein das Apolipoprotein L-I bindet und dessen trypanolytische Wirkung neutralisiert [Lecordier et al. 2009]. *Trypanosoma brucei gambiense* besitzt kein *serum resistance associated*-Protein; der Mechanismus der Serumresistenz bei dieser Unterart ist unbekannt [Pays et al. 2008].

Die afrikanische Trypanomiasis bedroht zur Zeit geschätzte 70 Millionen Menschen und circa 50 Millionen Rinder in 36 Ländern südlich der Sahara. Jedes Jahr erliegen etwa drei Millionen Rinder; für Menschen liegt die Anzahl der gemeldeten jährlichen Neuinfektionen inzwischen aufgrund umfangreicher medizinischer Maßnahmen unter 18.000 und die Gesamtanzahl der aktuell Infizierten wird auf 50.000 bis 70.000 Fälle geschätzt [WHO 2006].

1.1.1 Krankheitsbild und Behandlungsmöglichkeiten

Der Verlauf der Schlafkrankheit kann in zwei klar unterscheidbare Phasen eingeteilt werden. Die frühe Phase der Erkrankung, auch als hämolympathische Phase bekannt, ist gekennzeichnet durch das Vorkommen der Trypanosomen im Blut und im Lymphsystem. Die Symptome in dieser Phase sind Fieberschübe, geschwollenen Lymphknoten, Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerz und Juckreiz. Die Parasitämie im Blut nimmt einen wellenförmigen Verlauf wie in Abbildung 2 beschrieben an. Hierfür werden verschiedene Gründe diskutiert.

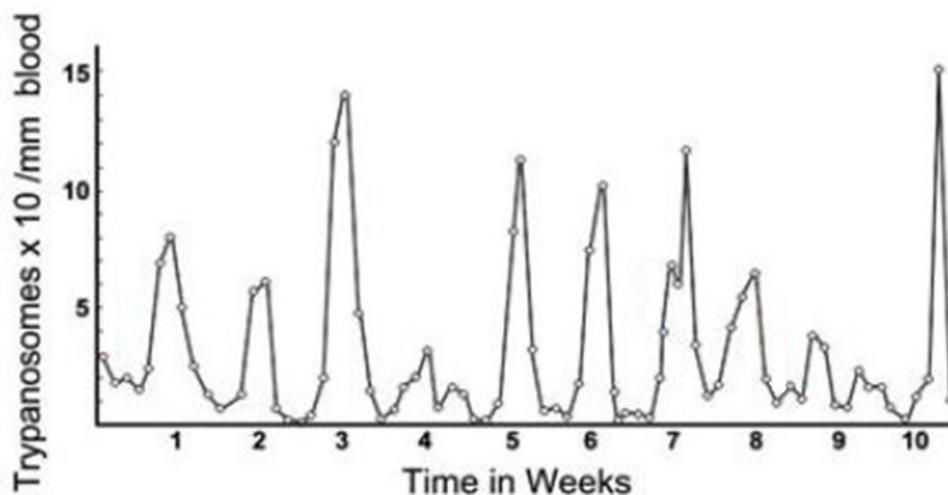


Abbildung 2 Verlauf der Blut-Parasitämie im Schlafkrankheit-Patienten; modifiziert nach [Despommier et al. 2000]

Zum einen betreibt der Parasit selbst eine Zelldichteregulation mittels *quorum sensing*, welches ein übermäßiges Anwachsen der Population und damit eine nicht zu kompensierende Schädigung des Wirts verhindert [Duszenko et al. 2006]; zum anderen wird der Parasit vom Immunsystem des Wirts bis zum nächsten *antigenic switching* des *variant surface glycoprotein*-Typs erfolgreich bekämpft.

Die späte Phase der Infektion ist auch bekannt als neurologische Phase, in der die Trypanosomen in der Cerebrospinalflüssigkeit auftreten. Dies geschieht bei *Trypanosoma brucei rhodesiense* nach einigen Wochen oder Monaten und bei *Trypanosoma brucei gambiense* nach mehreren Monaten oder Jahren. Der Mechanismus des Durchtritts ins Zentralnervensystem ist noch nicht eindeutig geklärt. Mit dem Eindringen ins das ZNS kommt es zu vielfältigen Ausfallerscheinungen ausgelöst durch eine Meningoenzephalitis. Typisch ist der veränderte Schlaf-Wach-Rhythmus, welcher der Erkrankung ihren Namen gegeben hat, Verwirrtheit, tagsüber Apathie und nachts Schlaflosigkeit, Schwierigkeiten beim Laufen und Sprechen sowie Koma [Kennedy 2004]. Unbehandelt führt die Erkrankung zum Tod.

Eine Behandlung der Schlafkrankheit ist, eingeschränkt auf relativ wenige Chemotherapeutika, möglich. Im Anfangsstadium der Krankheit, wenn die Erreger die Blut-Hirn-Schranke noch nicht überwunden haben, wirkt Pentamidin gegen *Trypanosoma brucei gambiense* und Suramin gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Die Medikamente für die späteren Stadien müssen zusätzlich in der Lage sein ins Zentralnervensystem überzutreten. Verwendung findet Melarsoprol, welches gegen *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense* wirkt. Dieses arsenhaltige Medikament ist toxisch und führt bei bis zu 15% der Patienten zu einer reaktiven Enzephalopathie, die zu etwa 50% tödlich verläuft [Pepin et al. 1994]. Eflornithin ist weniger toxisch als Melarsoprol; es wirkt allerdings nur gegen *Trypanosoma brucei gambiense*.

In den letzten Jahren wurde Pentamidin in Kombination mit Eflornithin als Behandlungsmethode gegen *Trypanosoma brucei gambiense*-Infektionen in der neurologischen Phase getestet. Eine große, kürzlich abgeschlossene Phase-III-Studie hat ergeben, dass die Effektivität der Pentamidin-Eflornithin-Kombinationstherapie nicht schlechter ist als die der Behandlung mit Eflornithin alleine. Die Kombinationstherapie ist aber einen sicherere, billigere und einfacher zu applizierende Behandlungsmethode [Steverding 2010].

DB289, Prodrug des Pentamidin-Analogons DB75, befindet sich zurzeit in einer klinischen Phase-III-Studie. Es ist als erstes Medikament oral einsetzbar, wirkt aber nur gegen *Trypanosoma brucei gambiense* in der hämolympathischen Phase.

1.1.2 Taxonomie und Morphologie

Trypanosoma brucei sind *Protozoa*. Sie gehören zum Stamm der *Sarcomastigophora*, zum Unterstamm der *Flagellata*, zur Klasse der *Zoomastigophora* und somit zur Ordnung *Kinetoplastida*, einem der frühesten Seitenäste in der Eukaryonten-Evolution. Weiterhin werden sie eingeordnet in die Familie der *Trypanosomatidae*, die sich durch das Vorhandensein eines einzelnen Flagellums und eines kleinen Kinetoplasten auszeichnet. Sie gehören in die Gattung *Trypanosoma* und zur Sektion *Salivaria*. In dieser findet sich die Art *Trypanosoma brucei* mit ihren drei Unterarten *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei brucei* [Levine 1980].

Afrikanischer Trypanosomen sind je nach Phase ihres Lebenszyklus zwischen 15-40 µm lang und 0,5 bis 2 µm breit. In Abbildung 3 ist ihr schematischer Aufbau dargestellt. Die äußere Gestalt des

gestreckten spindelförmigen Flagellaten wird durch parallel zur Längsachse der Zelle verlaufende Mikrotubuli direkt unterhalb der Plasmamembran stabilisiert. Bei den Blutform-Trypanosomen ist die Zellmembran zusätzlich von einem Mantel aus *variant surface glycoprotein* (VSG) umgeben, das in Fliegenformen gegen Procyclin ausgetauscht ist. In der Membran gehalten werden beide Oberflächenmoleküle durch Glycosylphosphatidylinositol-Anker. Die einzelne Geißel der Zelle, das Flagellum, ist durch den Basalapparat im Cytoplasma verankert und tritt in der Flagellumtasche, einer Einstülpung der Plasmamembran, aus der Zelle hervor. Sie wird von der Flagellummembran umhüllt und ist über Fleckdesmosomen an der Zellmembran angeheftet. Bei der Bewegung des Flagellums entsteht so der Eindruck einer undulierenden Membran.

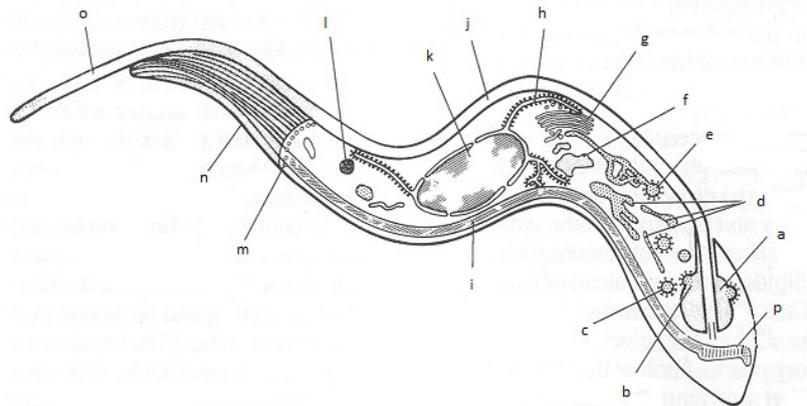


Abbildung 3 a) Flagellumtasche b) Vesikelbildung durch Einstülpung der Flagellumtaschenmembran c) abgeschnürter Vesikel d) Endosomen e) Vesikel-Endosom-Fusion f) Lysosom g) Golgi-Apparat h) Raues Endoplasmatisches Retikulum i) Mitochondrium j) Flagellum (angeheftet) k) Zellkern l) Glycosom m) Mikrotubuli n) Varianten-spezifisches Glycoprotein Oberflächenmantel o) Flagellum (frei) p) Kinetoplast; modifiziert nach [ILRAD 1989]

Aufgebaut ist das Flagellum aus einem Netzwerk von Filamenten, die entlang des Axonems verlaufen [Mehlhorn et al. 1998]. Die Flagellumtasche am hinteren Ende der Zelle ist der einzige Ort für Endo- und Exocytose [Landfear et al. 2001]. Die subzelluläre Lokalisation der Flagellumtasche variiert abhängig vom Stadium des Lebenszyklus. In der trypomastigoten Form liegt die Flagellumtasche hinter dem Nukleus, während sie bei der in der Tsetsefliege vorkommenden epimastigoten Form vor den Kern rückt. Stets in der Nähe des Basalapparates befindet sich der Kinetoplast, ein Bereich ineinander verflochtener mitochondrialer DNA-Ringe. Der Kinetoplast ist Bestandteil des Mitochondriums, welches sich entlang der ganzen Zelle erstreckt und in Blutformen wenige, in Fliegenformen hingegen sehr viele Cristae besitzt. Der Zellkern ist in der Regel 1,5 µm im Durchmesser und enthält einen großen zentralen Nukleolus. Der Großteil des Endomembransystems liegt zwischen dem Zellkern und dem Kinetoplast. Der Golgikomplex, die Lysosomen und die Endosomen liegen somit im hinteren Teil der Zelle. Das endoplasmatische Retikulum, das Mitochondrium und spezielle peroxisomale Organellen, die Glycosomen, sind über die Zelle verteilt. In letzteren läuft ein Großteil der Glycolyse ab. Acidocalcisomen sind wichtige Polyphosphat- und Calcium-Speicher [Docampo et al. 2005].

1.1.3 Lebenszyklus

Afrikanische Trypanosomen sind extrazelluläre Parasiten die während ihres komplexen Lebenszyklus große morphologische und metabolische Veränderungen durchlaufen. Es ist von vitaler Bedeutung für die Trypanosomen, sich schnell an neue Lebensräume, so verschieden wie Säugerblut und Mitteldarm der Tsetsefliege, anzupassen.

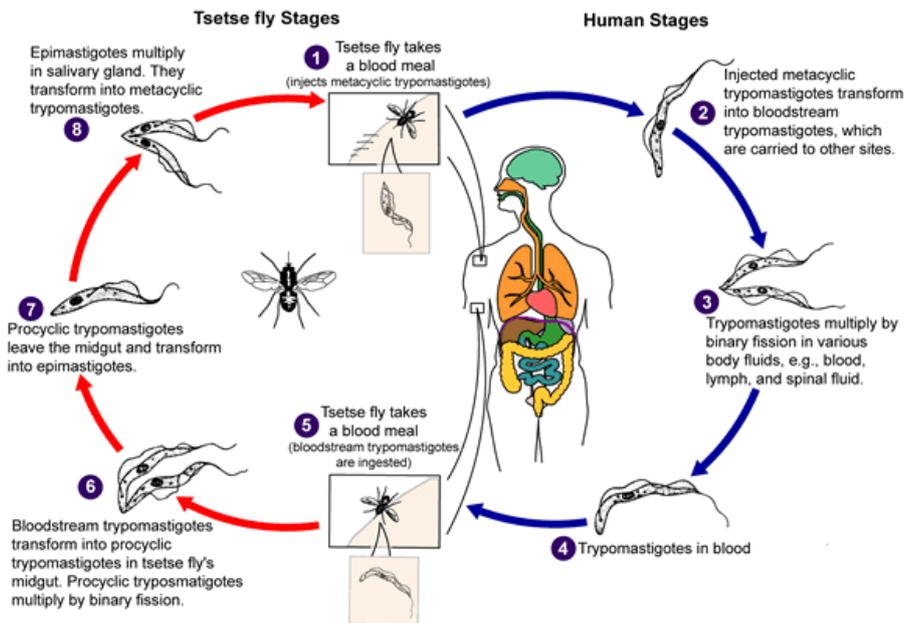


Abbildung 4 Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*; modifiziert nach [CDC 2010]

Durch den Stich einer infizierten Tsetsefliege gelangen mit dem Speichel bis zu 40.000 nicht teilungsaktive infektiöse metazyklische Trypanosomen ins Gewebe des Säugetierwirtes, wo sie sich in der Extrazellulärflüssigkeit zu schlanken (*slender*) Blutformen umwandeln und durch Längsteilung vermehren. Von dort gelangen die Zellen ins lymphatische System und in die Blutbahn, wo sich die Parasitämie etabliert. Als einzige Energiequelle verstoffwechseln sie Glucose aus dem Blut ihres Wirtes. Ihr degeneriertes Mitochondrium ist nicht aktiv an der Energieproduktion beteiligt und die meisten Enzyme der Atmungskette fehlen. Die Population im Blut verdoppelt sich etwa alle sechs Stunden. Bei Erreichen einer hohen Parasitendichte entwickeln sich die zunächst *slender*-Formen zu intermediären und anschließend zu teilungsdefizienten gedrungenen (*stumpy*) Formen weiter, die für die Transmission in der Tsetsefliege präadaptiert sind. Sie exprimieren bereits einige Enzyme der Atmungskette und haben dementsprechend ein weiter entwickeltes Mitochondrium als die *slender*-Form. *Stumpy*-Trypanosomen gehen apoptotisch innerhalb von drei bis vier Tagen zu Grunde, wobei Prostaglandine und deren Metabolite eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [Figarella et al. 2006]. Es wird davon ausgegangen, dass das Auftreten von zellzyklusarrestierten *stumpy*-Formen auch wichtig für die Kontrolle der Parasitämie ist und einen frühen Tod des Wirtes verhindert. Da nur ein Teil der *slender*-Zellen zur *stumpy*-Form differenziert, ist die Blutform-Population eine Mischung aus beiden Zellformen.

Stumpy-Blutform-Trypanosomen, die von einer Tsetsefliege bei einem Blutmahl aufgenommen wurden, differenzieren im Mitteldarm der Fliege zu langgestreckten procyclischen Formen. Die Zelloberfläche der procyclischen Form ist nun mit *procyclic acidic repetitive protein* (Procyclin) bedeckt [Roditi et al. 1999]. Der procyclische Oberflächenmantel ist weniger kompakt als das VSG-Gegenstück und stellt in erster Linie einen Schutz vor den Verdauungsenzymen im Fliegendarm dar. Procyclische Zellen sind länger als Blutformzellen, und sie haben ein sehr großes Mitochondrium, das metabolisch aktiv ist und die komplette Atmungskette vorweist [van Weelden et al. 2003; Riviere et al. 2004]. Ebenfalls aufgenommene *slender*-Formen gehen im Fliegendarm zu Grunde. Als Nahrungsquelle fungieren den Trypanosomen die in der Fliege reichlich vorkommenden Aminosäuren, insbesondere Prolin. Im Laufe der Infektion gelangen die Parasiten zur Speicheldrüse,

Damit das NAD/NADH Verhältnis im Glycosom erhalten bleibt, muss das in der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion entstehende NADH innerhalb des Glycosoms reoxidiert werden. Hierzu bedient sich der Parasit eines besonderen Shuttle-Systems. Das in der Fructose-bisphosphat-Aldolase-Reaktion entstehende Dihydroxyacetonphosphat wird zunächst im Glycosom durch die Glycerinphosphat-Dehydrogenase unter NAD-Bildung zu Glycerin-3-phosphat reduziert. Anschließend wird letzteres aus dem Glycosom transportiert, zum Mitochondrium befördert und dort durch die trypanosomale Alternative-Oxidase wiederum zu Dihydroxyacetonphosphat reoxidiert. Als Endakzeptor der Elektronen fungiert molekularer Sauerstoff, wodurch man auch im Medium von Blutform-Trypanosomen trotz nicht vorhandener Atmungskette einen erheblichen Sauerstoffverbrauch nachweisen kann [Clarkson et al. 1989]. Das Dihydroxyacetonphosphat wird abschließend aus dem Mitochondrium ins Glycosom transportiert.

Bei Sauerstoffmangel oder wenn durch Salicylhydroxamsäure-Gabe die trypanosomale Alternative-Oxidase gehemmt wird, entstehen äquimolare Mengen Pyruvat und Glycerin, um das Redoxgleichgewicht im Glycosom aufrecht zu erhalten [Clayton et al. 1996]. Das Glycerin-3-phosphat kann nicht mehr zu Dihydroxyacetonphosphat umgesetzt werden und so kommt es stattdessen zu einer Dephosphorylierung des Glycerin-3-phosphats durch die Glycerokinase zu Glycerin unter ATP Gewinnung. Damit die Reaktion nicht zum Erliegen kommt, muss das entstehende Glycerin ins Cytosol und weiter ins Blut abgegeben werden.

Das Abschalten der Glycolyse durch blockieren der Pyruvat- oder Glycerin-Ausscheidung ist offensichtlich ein möglicher therapeutischer Ansatz gegen die Schlafkrankheit [Wiemer et al. 1995; Bakker et al. 2000].

Eine Verstoffwechslung von Glycerin im Glycosom ist unter aeroben Bedingungen auch möglich. Dabei wird Glycerin nach Phosphorylierung durch die Glycerokinase in Form von Glycerin-3-phosphat in die Glycolyse eingeschleust. Glycerin-3-phosphat kann im Glycosom nicht direkt mittels NAD zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert werden, da nicht genügend NAD zur Verfügung steht, sondern wird im Mitochondrium unter Verbrauch von $\frac{1}{2}$ O₂ zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, welches dann wieder ins Glycosom transportiert wird. Es wird dort wieder zu Glycerin-3-phosphat reduziert, um NADH zu NAD zu oxidieren. Das Glycerin-3-phosphat wird erneut im Mitochondrium oxidiert und anschließend in Form von Dihydroxyacetonphosphat im Glycosom zu Glycerinaldehyd-3-phosphat isomerisiert, das nun unter NAD-Verbrauch zu 1,3-Bisphosphoglycerat und weiter über 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt und ausgeschieden wird.

Kehrt man durch Zugabe von Glycerin zu einer *in vitro* Trypanosomenkultur den Glyceringradienten in Gegenwart von Salicylhydroxamsäure (SHAM) um, so sterben die Parasiten [Wille et al. 1998]. Eine therapeutische Ausbeutung dieser Glycerinsensitivität war bisher allerdings noch nicht erfolgreich [Brohn et al. 1978; Bakker et al. 2000].

Der Energiestoffwechsel der procyclischen Trypanosomen ist deutlich weniger Glucose-abhängig, da sie, wie bereits erwähnt, ATP auch durch oxidative Phosphorylierung gewinnen können. Das in den Glycosomen anfallende NADH wird in diesem Lebensstadium durch einen anderen Mechanismus als bei den Blutformen oxidiert. Eine NADH-abhängige Fumaratreduktase sorgt unter Succinatproduktion für die Bereitstellung von NAD [Besteiro et al. 2002]. Hauptsächlich verarbeiten sie zur Energiegewinnung aber Prolin, welches in der Fliege – anders als Glucose – ausreichend verfügbar ist.

1.1.4.2 VSG Antigenvariation

Trypanosoma brucei benutzt Antigenvariation (*antigenic switching*), einen Mechanismus, der es dem Parasiten erlaubt, der Immunantwort des Wirtes durch häufigen Wechsel des Zelloberflächenmantels zu entkommen [Cross et al. 1998]. Jede *Trypanosoma brucei*-Zelle ist komplett mit etwa 10^7 Molekülen einer Form des varianten-spezifischen Glycoproteins bedeckt. Aufgrund seiner dichten Packung verhindert VSG das Erkennen anderer membranständiger Komponenten des Parasiten durch das Immunsystem [Cross 1975]. Nach einigen Tagen entstehen Antikörper gegen die aktuelle exprimierte Form des VSG und gleichzeitig kommt es bei einem kleinen Teil der Parasitenpopulation zum sogenannten *antigenic switching*.

Hier gerät ein zuvor nicht exprimiertes VSG-Gen durch Rekombinationsprozesse in eine telomerständige VSG *expression site* und das Produkt dieses Gens löst in der Folge die zuvor exprimierte VSG-Variante ab [Borst 2002]. Der komplette Wechsel eines bestimmten VSG-Typs zu einer anderen Variante kommt, unabhängig von der Immunantwort des Wirts, etwa 10^{-4} mal pro Generation vor [Aitcheson et al. 2005]. Der Parasit verfügt über etwa 20 VSG Expressionsloki in jeder Zelle, aber immer nur eine ist aktiv. Von den etwa 1.000 VSG-Genen im *Trypanosoma brucei*-Genom sind 7% voll funktionsfähig, 9% sind atypisch, 66% sind Pseudogene und 18% sind Genfragmente [Berriman et al. 2005]. Innerhalb einer Population können unterschiedliche Ausführungen präsent sein. Allerdings existiert im Blut des Säugerwirtes zu einem bestimmten Zeitpunkt stets eine prädominante Form, gegen die jeweils ein Antikörper produziert wird. Die Unterschiede innerhalb der einzelnen VSG-Moleküle begründen sich in der dem Lumen des Blutgefäßes zugewandten variablen N-terminalen Region, während der C-terminale Bereich relativ konserviert ist. In procyclischen Formen existieren nur inaktive VSG *expression sites* [Pays et al. 2001].

1.1.4.3 Genom, polycistronische Transkription und Transsplicing

Trypanosomen haben neben dem Zellkerngenom, welches gut 80 % der Gesamt-DNA des Organismus ausmacht, auch ein chromosomales Netzwerk im Kinetoplasten, das aus maschenartig verbundenen *maxicircles* und *minicircles* besteht. Die *maxicircles* sind vergleichbar mit der mitochondrialen DNA anderer Eukaryonten, während die *minicircles* in sogenannte *guide-RNAs* transkribiert werden, die für den für *RNA-editing*, die post-transkriptionelle Modifikation der Nukleotidsequenz mitochondrialer prä-mRNAs durch Einfügen und Entfernen von Uracil, benötigt werden. Das Genom des Zellkerns kann, je nach ihrer Größe in der Pulsfeld-Gelelektrophorese, in drei Chromosomen-Kategorien unterteilt werden: Elf Megabasen-Chromosomenpaare (je 0,9 - 5,7 Mb) sind nummeriert I bis XI vom kleinsten zum größten und eine nicht genau definierte Anzahl von kleinen (50 - 100 kb) und intermediären (300 - 900 kb) Chromosomen. Die elf diploiden Megabasen-Chromosomen des *Trypanosoma brucei*-Stammes TREU927/4 GUTat10.1 wurden vollständig sequenziert. Dieses Genom umfasst insgesamt 26 Mb und enthält ungefähr 8.100 proteinkodierende Gene [Berriman et al. 2005; El-Sayed et al. 2005].

Nur in Ausnahmefällen sind die Gene in *Trypanosoma brucei* als monocistronische Transkriptionseinheiten angelegt, ansonsten liegen sie durch kurze nicht codierende Sequenzen voneinander getrennt, als polycistronische Einheiten vor. Trotz gemeinsamer Transkription in Clustern können einzelne Gene vollkommen unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, was aufzeigt, dass die Expressionsregulation der einzelnen Gene auf post-transkriptioneller Ebene erfolgen muss [Bringaud et al. 1993]. Die 3' *untranslated regions* (UTR) der mRNAs besitzen zum

Beispiel sowohl Einfluss auf die Geschwindigkeit der RNA-Degradierung als auch auf die Translationseffizienz des betroffenen Gens [Blattner et al. 1995; Robles et al. 2008; Archer et al. 2009]. Zunächst werden also alle Gene einer Transkriptionseinheit zu einer prä-RNA abgelesen.

Zwischen den einzelnen Genen liegen keine Introns, sondern uridinreiche Poly-Pyrimidineinheiten, die als Erkennungssignal für das Transsplicing dienen und den Akzeptor-Stellen für eine 39 Nukleotide lange Mini-Exon-RNA (*spliced leader*) vorangehen. Durch das Fehlen von Introns erfolgt das Spleißen der prä-mRNA nicht durch das bei höheren Eukaryonten übliche *cis-splicing*, sondern durch *trans-splicing*. Transsplicing führt zum Anfügen der *spliced leader* RNA ans 5'-Ende der prä-mRNA. Die *spliced leader*-RNA enthält am 5'-Ende eine Kappe aus vier aufeinander folgenden methylierten Nukleotiden, die dem 7-Methylguanosin-Rest folgen [Ullu et al. 1995]. Außerdem erfolgt eine Polyadenylierung am 3'-Ende der prä-mRNA in einem Abstand von 100-400 bp *upstream* des Spleiß-Signals [Matthews et al. 1994].

1.1.4.4 RNA Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) als Arbeitstechnik wurde zum ersten Mal 1998 von Andrew Fire und Craig Mello in *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Noch im selben Jahr wurde die Technik das erste Mal in *Trypanosoma brucei* erfolgreich angewandt [Ngo et al. 1998]. RNA Interferenz ist ein posttranskriptioneller *gene silencing* Mechanismus bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) zur sequenzspezifischen Degradation homologer RNA-Moleküle führt (Abbildung 6).

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus in eukaryontischen Zellen. Als zielerkennende RNA kann microRNA (miRNA) oder *small interfering* RNA (siRNA) wirken. Der Unterschied der beiden RNAs liegt in ihrer Herkunft. Beide RNA-Typen sind aus Trypanosomen bekannt, wobei microRNA auf zelleigenen pri-miRNA-Genen kodiert wird [Mallick et al. 2008] und siRNAs aus längerer freier dsRNA entsteht, die von mobilen genetischen Elementen oder aus viralem Ursprung stammt [Clayton 2004; Ullu et al. 2004].

Reife miRNA ist strukturell vergleichbar mit siRNA. Die miRNA wird von einem erheblich längeren RNA-kodierenden Gen in Form der pri-miRNA transkribiert, welche dann mit einer 5'-Cap-Struktur und einem 3'-Poly-A-Schwanz versehen wird. Die pri-miRNA wird noch im Zellkern durch einen Enzymkomplex (microprocessor complex) zur prä-miRNA, einer 60-75 Nukleotide langen Haarnadelstruktur, prozessiert. Der Komplex besteht aus einem RNase III Enzym, genannt Drosha, und dem dsRNA bindenden Protein Pasha. Die prä-miRNA wird ins Cytosol exportiert und der dsRNA-Teil der prä-miRNA wird durch die Ribonuklease Dicer gebunden und zu reifer miRNA zertrennt, welche dann in den *RNAi inducing silencing complex* (RISC-Komplex) inkorporiert werden kann.

Die Ribonuklease Dicer bindet ebenfalls von Transposons oder Viren gebildete dsRNA und zerteilt sie in siRNAs. Diese können dann in den RISC-Komplex inkorporiert werden.

Die siRNAs unterscheiden sich von miRNAs vor allem durch die Tatsache, dass miRNAs typischerweise keine perfekte Basenpaarung mit der Ziel-RNA haben und sie die Translation vieler verschiedener mRNAs mit ähnlichen Sequenzen inhibieren. Im Gegensatz dazu haben siRNAs typischerweise eine perfekte Basenpaarung und führen zur Zerteilung von nur einer einzelnen spezifischen Ziel-mRNA. In *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* werden miRNAs und siRNAs von verschiedenen Dicer-Enzymen beziehungsweise Argonaut-Proteinen prozessiert.

Im Detail fußt der RNAi Mechanismus auf zwei Ribonukleasen bekannt aus Eukaryonten: Dicer und Slicer.

Dicer- und Dicer-like-Proteine gehören zur RNase III Familie der dsRNA spezifischen Endoribonukleasen und zertrennen doppelsträngiger RNA in *small interfering RNAs* (siRNAs), die am 3'-Ende einen circa 1-2 Nukleotide langen Überhang aufweisen [Djikeng et al. 2001; Best et al. 2005]. *Trypanosoma brucei* besitzt mit dem überwiegend cytosolischen TbDCL1 und dem im Nukleus vorkommenden TbDCL2 zwei rudimentäre Enzyme mit *Dicer-like* Domänen [Shi et al. 2006; Patrick et al. 2009]. Dicer bindet dsRNA und zwei benachbarte RNase III Domänen zerschneiden die doppelsträngige RNA in siRNAs, die in *Trypanosoma brucei* 24-26 nt wenige Nukleotide länger sind als zum Beispiel in *Drosophila* mit 21-23 nt [Balana-Fouce et al. 2007].

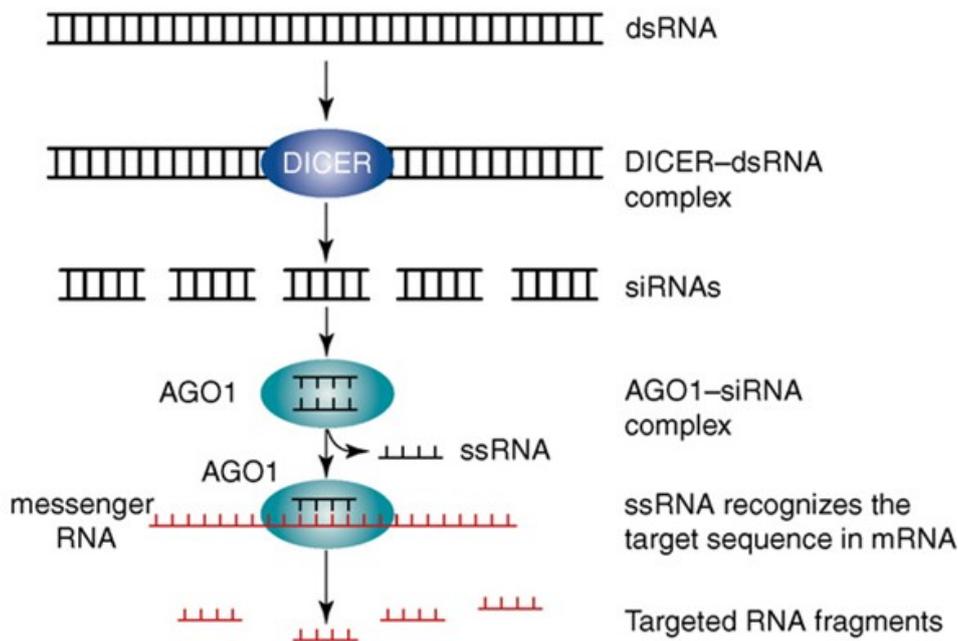


Abbildung 6 RNA Interferenz in *Trypanosoma brucei*; modifiziert nach [Balana-Fouce et al. 2007]

Einer der Stränge des siRNA Duplexes hat aufgrund seiner Basenpaarung am 5' Ende eine thermodynamisch leicht geringere Stabilität. Dieser *guide*-Strang wird als *RNA silencing*-Matrize in den *RNAi inducing silencing complex* (RISC) eingebaut, während der andere Strang abgebaut wird. Das katalytische Zentrum des RISC ist Slicer, ein Protein aus der Argonaut (AGO)-Familie mit einer RNase H Endonukleaseaktivität. *Trypanosoma brucei* AGO-Protein (TbAGO1) enthält eine PAZ-Domäne (benannt nach den Proteinen Piwi, Argonaut und Zwillie) und eine PIWI-Domäne (benannt nach Protein Piwi) [Cerutti et al. 2000; Shi et al. 2009]. Die PAZ Domäne bindet den 3'-Überhang des *guide*-Stranges und positioniert ihn in Relation zur RNA-schneidenden *RNase H-like* PIWI-Domäne [Durand-Dubief et al. 2003; Shi et al. 2004]. Anschließend erfolgt die Hybridisierung von RNA komplementärer Basenpaarung und die RNase H-Aktivität der PIWI-Domäne schneidet die mRNA. Die resultierenden Fragmente werden vermutlich in unspezifischen Degradationsprozessen abgebaut.

RNA Interferenz kann auch als experimentelles Werkzeug für die Erzeugung von *loss-of-function*-Phänotypen verwendet werden. RNA Interferenz ermöglicht vererbare, induzierbare Gen-Knockdowns in *Trypanosoma brucei*. Allgemein können BF- und PC-Trypanosomen durch DNA-

Transfektion genetisch manipuliert werden. Stabile Transformanten werden normalerweise durch homologe Rekombination erzeugt.

Verschiedene Methoden für das Einbringen doppelsträngiger RNA in Trypanosomen wurden erfolgreich angewandt. Doppelsträngige RNA wurde schlicht transfiziert [Ngo et al. 1998] oder sie wurde als *inverted repeats* von einem transfizierten *stem-loop*-Vektor transkribiert [Bastin et al. 2000; Shi et al. 2000]. Der simpelste Weg ist es dsRNA von einem Vektor mit zwei einander gegenüber liegende Promotoren zu transkribieren. Ein Vektor diesen Typs, p2T7TAbblue, wurde in dieser Arbeit für induzierbare Gen-Knockdowns verwendet [Alibu et al. 2005].

1.2 Wassertransport

Wasser ist das Medium des Lebens. Soweit wir wissen, ist ein Leben ohne Wasser nicht möglich. Der menschliche Körper besteht zu etwa 60-70 % aus Wasser. Die Regulation der Wasserpermeabilität von Zellmembranen eine fundamentale Voraussetzung für Leben ist [Yasui 2004]. Biologische Membranen sind hochselektive Permeabilitätschranken, die aufgrund ihres hydrophoben Inneren für die meisten Moleküle undurchlässig sind. Sie verhindern den unkontrollierten Ein- und Austransport von Stoffwechselprodukten und sorgen so für die Aufrechterhaltung eines konstanten Milieus innerhalb der Zelle sowie innerhalb der einzelnen Kompartimente. Austauscher und Transporter wurden erst in den 1950er Jahren entdeckt und zeigten eine molekulare Grundlage für den Stofftransport über die Membran hinweg [Agre et al. 2002].

Da Wasser jedoch ein kleines ungeladenes Molekül ist und in so überwältigend hoher Konzentration in allen Lebewesen vorkommt, wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts angenommen, dass der Transport von Wasser durch die Lipiddoppelschicht auf einfache Diffusion zurückzuführen ist. Obwohl Wasser durch die Phospholipiddoppelschicht diffundieren kann, stellte sich heraus, dass reine Diffusion für physiologische Prozesse nicht schnell genug ist. Die hohe Wasserleitfähigkeit bestimmter Zellen, etwa im Sammelrohr der Niere, in der Speicheldrüse oder die roten Blutkörperchen, deutete bereits seinerzeit an, dass es Membrankanäle für den Wassertransport geben muss. Die Wasserdurchlässigkeit der Membranen in diesen Zellen war so hoch, als wäre zwischen Zellinnerem und Zelläußerem keine Membran vorhanden.

Im Jahr 1992 schließlich wurde die Existenz von spezifischen Wassertransportproteinen mit der Entdeckung des menschlichen Aquaporin 1 (hAQP1) bestätigt [Preston et al. 1992]. Heute ist bekannt, dass die Diffusion von Wasser über Zellmembranen hinweg ein Prozess mit relativ niedriger Geschwindigkeit ist und dass das Vorhandensein von Aquaporinen in der Phospholipiddoppelschicht ihre Wasserdurchlässigkeit um das 10- bis 1.000-fache erhöht. Für viele Aquaporine ist ein Wert von etwa 5 kcal mol^{-1} als Aktivierungsenergie für die Wasserpassage realistisch, was der Energie für die Diffusion von Wassermolekülen in Lösung sehr nahe kommt [Borgnia et al. 1999].

1.2.1 Major Intrinsic Proteins

Aquaporin 1 gehört zur großen Protein-Familie der *major intrinsic proteins* (MIP). Bis zur Entdeckung von hAQP3, einem Homolog von hAQP1, im Jahr 1994, ging man davon aus, dass alle Aquaporine selektiv nur für Wasser durchlässig sind. hAQP3 ist aber permeabel für Wasser, Glycerin, einige Polyole und Harnstoff [Echevarria et al. 1994a; Echevarria et al. 1994b; Ishibashi et al. 1994; Ma et al. 1994]. In der Aquaporin-Superfamilie der *major intrinsic proteins* gab es somit zwei Unterfamilien, eingeteilt nach Selektivität: orthodoxe Aquaporine, die den Durchtritt von Wasser ermöglichen, und

Aquaglyceroporine, die für Wasser und kleine ungeladene Stoffe wie Glycerin und Harnstoff durchlässig sind.

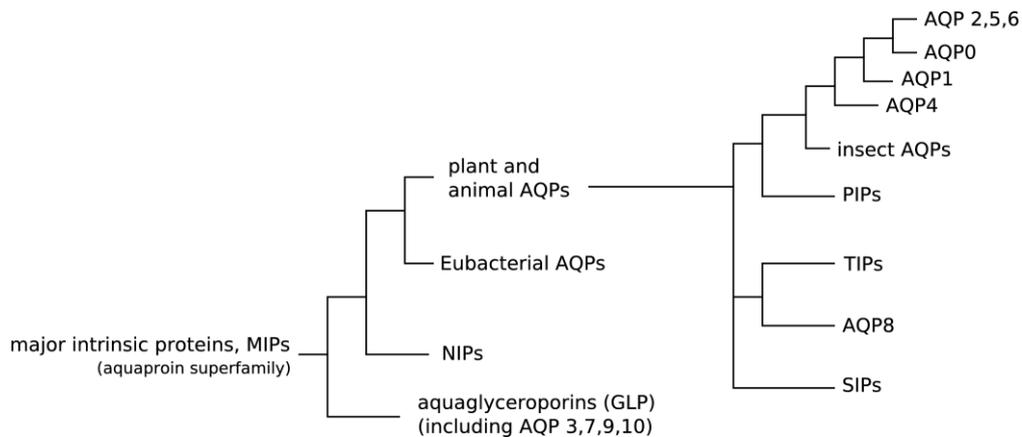


Abbildung 7 Vereinfachter Abstammungsbaum der Aquaporin-Superfamilie [Hub 2008]

Leider wird die Nomenklatur in vielen Publikationen mehrdeutig verwendet, zum Beispiel alle MIPs als Aquaporine tituiert und die Aquaglyceroporine eher als Unterfamilie in der Aquaporin-Superfamilie beschrieben werden.

Aktuelle Veröffentlichungen zeigen auf, dass bestimmte MIPs auch Stoffe wie NH_3 und CO_2 [Tyerman et al. 2002; Jahn et al. 2004], $\text{As}(\text{OH})_3$ und $\text{Sb}(\text{OH})_3$ [Meng et al. 2004] oder Dihydroxyaceton [Uzcategui et al. 2007] transportieren können.

Im Menschen sind aktuell elf MIPs eindeutig beschrieben (AQP0 bis AQP10), acht in der Unterfamilie der orthodoxen Aquaporine (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8) und drei in der Unterfamilie der Aquaglyceroporine (AQP3, 7, 9, 10). Sie besitzen, wie alle MIPs, zwei hochkonservierte Asparagin-Prolin-Alanin (NPA)-Motivboxen, die wichtig für die Ausbildung der wasserselektiven Pore sind.

Mitglieder der MIP-Familie sind in der ganzen Biosphäre entdeckt worden, in Organismen von Archaeen und Bakterien bis zu Pilzen, Pflanzen, Insekten und Säugetieren. Im Jahr 2005 fanden sich 463 verschiedene Aminosäuresequenzen in den Datenbanken [Zardoya 2005].

Nur 20 der 463 bekannten nicht redundanten Sequenzen weisen ein nicht kanonisches NPA-Motiv in der Schleife B auf und circa 30 haben Veränderungen im NPA-Motiv der Schleife E [Zardoya 2005].

Phylogenetische Analysen zeigen, dass sie alle von einem Ur-Aquaporin-Prototyp abstammen. Demzufolge tauchten die MIPs schon sehr früh in der Evolutionsgeschichte auf, was wiederum die außerordentliche Bedeutung des Wasseraustauschs über biologische Membranen hinweg hervorhebt. Weiterhin zeigt sich, dass es früh in der Stammesgeschichte der MIPs zur Aufzweigung kam, die zu den unterschiedlichen Substratspezifitäten von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen führte.

In Vertebraten und den höheren Pflanzen kam es zu einer großen Diversifikation der MIP-Proteine [Zardoya et al. 2001; Zardoya et al. 2002]. So haben Wirbeltiere typischerweise 11 bis 13 verschiedene Aquaporingene [Agre et al. 2002], die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) besitzt 38 [Maurel 2007] und im Reis finden sich 33 [Sakurai et al. 2005]. Die MIPs der Pflanzen werden in vier Unterfamilien eingeteilt. Die Gruppe der *tonoplast intrinsic proteins* (TIP) und die Gruppe der *plasma membrane intrinsic proteins* (PIP) sind reine Wasserkanäle. Die dritte Gruppe der *small-basic*

intrinsic proteins (SIP) unterscheidet sich ziemlich von anderen Pflanzen-MIPs und zeigt signifikante Sequenzunterschiede in der Schleife B, wo das NPA-Motiv aus NPT oder NPL besteht. Da der Wechsel der Aminosäure im Motiv der Schleife B Einfluss auf die Pore des Proteins hat, können SIPs gänzlich andere Transportselektivitäten zeigen [Tyerman et al. 2002]. Nur Mitglieder der vierten Gruppe, die *Nod26-like intrinsic proteins* (NIP), können Glycerin transportieren [Wallace et al. 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass NIPs orthodoxe Aquaporine sind, die heutzutage Glycerin in Pflanzen transportieren. Es gibt keine echten Aquaglyceroporine in Pflanzen; es wird aber vermutet, dass NIPs zu Beginn der Pflanzenevolution vor etwa 1,2 Milliarden Jahren aus Bakterien durch einen horizontalen Gentransfer in die Pflanzen gelangten [Zardoya et al. 2002].

Mit den akkumulierten Sequenzdaten vieler neuer Genomprojekte wurde immer deutlicher, dass es eine weitere Unterfamilie mit geringer Homologie zu anderen MIPs gibt. Dabei handelt es sich um eine Anzahl an schwach konservierten *AQP-like*-Proteinen, drei in Insekten, zwei in Pflanzen und zwei im Menschen (hAQP11 und hAQP12). Die in Aquaporinen und Aquaglyceroporinen hochkonservierten NPA-Boxen sind in der neuen Unterfamilie im höchsten Maße abweichend, mit einer Gesamthomologie von weniger als 20%. Diese Proteine stellen somit eine eigene Unterfamilie der Aquaporin-Superfamilie dar, die Superaquaporine [Morishita et al. 2004]. Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt, wobei AQP11 Knockout-Mäuse an einer Urämie als Resultat von polyzystischen Nieren starben. Die AQP10 Knockout-Mäuse hingegen können ohne größere Einschränkungen leben [Ishibashi 2009; Ishibashi et al. 2009].

Obwohl sie in eine einzelne Superfamilie gruppiert wurden, gibt es nur geringe Homologien unter den Superaquaporinen. Es ist recht wenig über ihre Funktion bekannt, obwohl einige als Wasserkanäle fungieren [Ishikawa et al. 2005].

1.2.1.1 Proteinstruktur

Die Strukturen verschiedener MIPs wurden in hoher Auflösung mittels Röntgen- oder Elektronenkristallographie aufgeklärt [Walz et al. 1997; Mitsuoka et al. 1999; de Groot et al. 2000; Fu et al. 2000; Stahlberg et al. 2000; Nollert et al. 2001; Sui et al. 2001; Savage et al. 2003; Harries et al. 2004; Lee et al. 2005; Hiroaki et al. 2006; Horsefield et al. 2006; Fischer et al. 2009], und sie zeigen alle eine einheitliche Struktur beziehungsweise Faltung. In Abbildung 8 sind vier MIPs aus sehr unterschiedlichen Organismen dargestellt.

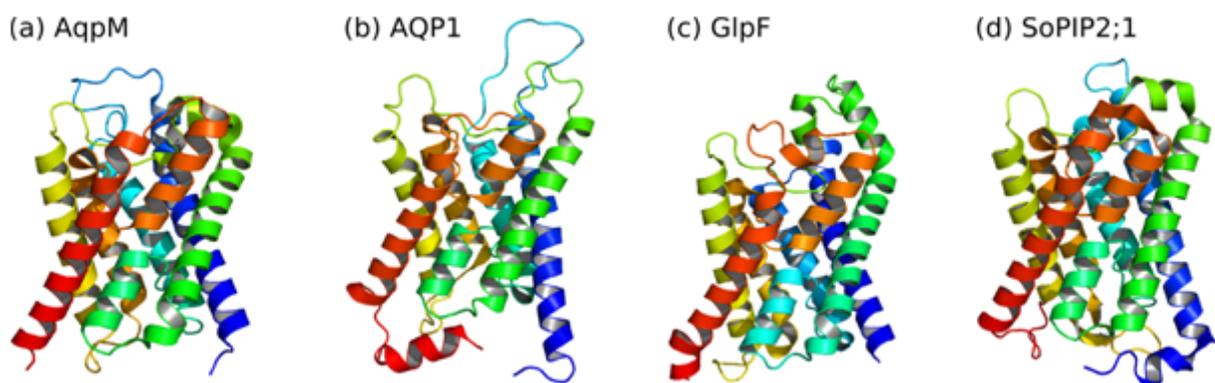


Abbildung 8 Aquaporin-Kristallstrukturen (a) AqpM aus Archaeon (b) AQP1 aus Mensch (c) GlpF aus Bakterium (d) SoPIP2;1 aus Pflanze [Hub 2008]

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist enthält jedes MIP sechs Transmembranhelices (1-6), die über fünf Schleifen (A-E) miteinander verbunden sind. Jedes Monomer ist quasi-symmetrisch aufgebaut. Die Helices 1-3 haben eine hohe Sequenzhomologie zu den Helices 4-6. Eine besondere Rolle spielen die cytosolische Schleife B und die extrazelluläre Schleife E, welche beide eine kurze α -Helix aufweisen, die von beiden Seiten bis zur Mitte in die Membran eintauchen. Auf jeder der beiden Schleifen, am Ende der beiden kurzen Helices, befindet sich ein charakteristisches Strukturmotiv, bestehend aus den drei Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin.

Die gebildete Pore ist etwa 25 Ångström lang, ist in der Mitte circa 0,3 nm eng und der Durchmesser an den beiden Öffnungen beträgt etwa 2 nm.

Die zwei NPA-Motive bilden das Zentrum der Pore aus und tragen wesentlich zur Selektivität des Wasserkanals bei. Die carboxy- und aminoterminalen Enden liegen auf der cytosolischen Seite. Weiter gibt es eine einzelne N-Glycosylierungsstelle in der Schleife C und ein Cystein in der Schleife E, die für die Quecksilbersensitivität der meisten MIPs verantwortlich sind [Preston et al. 1993]. In biologischen Membranen bilden MIPs Homotetramere, wobei jedes Monomer einen operativen Wasserkanal beisteuert.

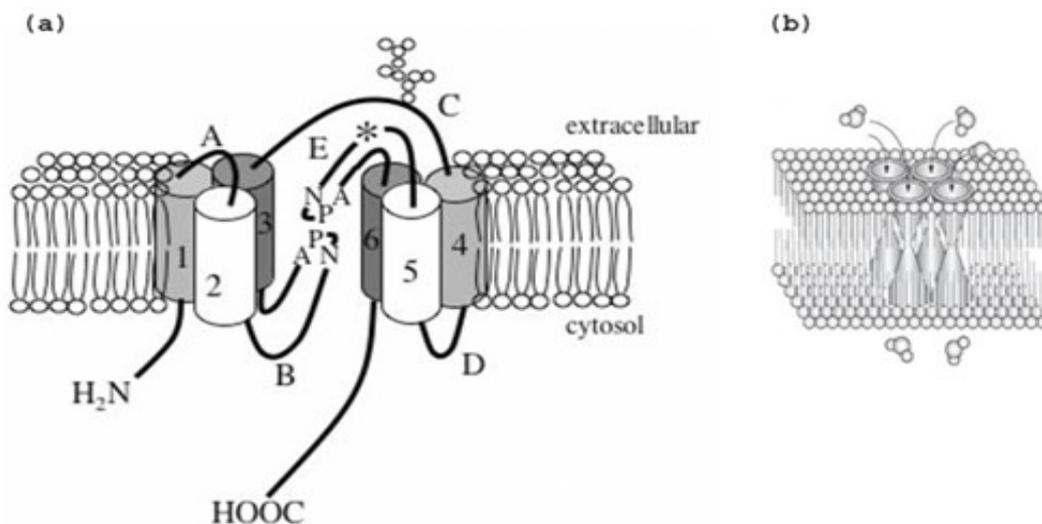


Abbildung 9 (a) Organisation des Aquaporin-Monomers in der Membran [Zardoya 2005] (b) AQP Homotetramer in Membran aufgebaut aus AQP-Monomeren als Sanduhrmodelle [Maeda et al. 2008]

Das am stärksten konservierte Motiv in MIPs ist die NPA-Box in den Schleifen B und E, mit weiteren hochkonservierten Aminosäuren sowohl in direkter Nachbarschaft, als auch weiter entfernt. Abgebildet auf die Kristallstruktur von hAQP1 ergeben sich folgende konservierte Motive. Die Konsensus-Sequenz für die erste NPA-Box ist S-G-x-H-x-N-P-A-V-T, während sie für die zweite NPA-Box G-x-x-x-N-P-A-R(S/D)-x-G lautet. Das hochkonservierte Arginine (R) direkt nach der zweiten NPA-Box liegt an der engsten Stelle der Pore [Heymann et al. 2000; Murata et al. 2000; Zardoya et al. 2001].

In der dreidimensionalen Darstellung des Proteins wird deutlich, dass die konservierten Bereiche im Zentrum des Proteins liegen. Sie zeigen alle nach innen, außer einem Phenylalanin-Rest in Helix 1 und einem Tryptophan-Rest in Helix 6. Diese zwei konservierten Reste sind wahrscheinlich an der Oligomerisierung des Tetramers beteiligt [Zardoya 2005].

1.2.1.2 Permeabilitätsmechanismus

Mitglieder der Aquaporin-Superfamilie sind hochgradig selektiv. Welche Stoffe MIPs passieren können, hängt von zwei für den Durchtritt sehr wichtigen Strukturen ab. Es handelt sich zum einen um die zwei Asparaginreste in den konservierten NPA-Motiven am Ende der zwei Halbhelices im Zentrum der Pore, welche starke Wasserstoffbrücken mit dem durchtretenden Stoff ausbilden, und zum anderen um die etwa zehn Ångström näher zur extrazellulären Seite liegende engste Stelle des Kanals, die durch ein konserviertes Arginin (R) zusammen mit aromatischen Aminosäureresten (ar) ausgebildet wird [de Groot et al. 2001].

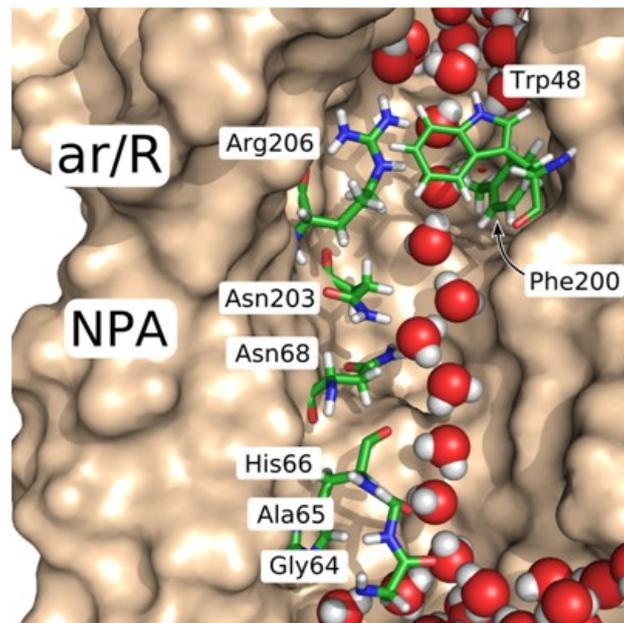


Abbildung 10 *single-file*-Wassertransport in der Pore des bakteriellen Aquaglyceroporins GlpF [Hub 2008]. Einige mit dem Wasser interagierende Aminosäurereste sind näher dargestellt. Die beiden Asparagine Asn68 und Asn203 der NPA-Motive bilden starke Wasserstoffbrücken zu den vorbeiwandernden Wassermolekülen aus. Die Region aus Arginin und aromatischen Resten (ar/R) bildet die engste Stelle des Kanals aus.

Stoffe, die durchgelassen werden, wie Wassermoleküle, können den Kanal bidirektional, ein Molekül ans nächste gereiht (*single-file*), durchdringen.

Dabei verhindern Aquaporine jedoch die Leitung von Protonen über die Membran, damit der für Zellen wichtige Protonengradient nicht zerstört wird. Dies ist nicht selbstverständlich, da Wasser in der flüssigen Phase nicht als Einzelmolekül vorliegt, sondern als ein über Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängendes Netzwerk. Entlang dieser Wasserstoffbrücken können Protonen von Molekül zu Molekül hüpfen (Grotthuß-Mechanismus). Die zwei Asparagine, im jeweiligen NPA-Motiv, sind die endständigen Aminosäuren am positiven Ende der ins Zentrum ragenden Halbhelix-Dipole. Sie sind in die Pore orientiert und wirken als Wasserstoffdonatoren für die Sauerstoffatome der durchtretenden Stoffe, das heißt, sie bilden starke Wasserstoffbrücken zu den vorbeiwandernden Wassermolekülen aus. Das elektrostatische Potential der Dipole wirkt auf die Dipole der Wassermoleküle, die sich beim Durchdringen der Pore, infolgedessen um 180° umorientiert [de Groot et al. 2001], so dass Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Wassermolekülen in der Kette unterbrochen werden. Neuere Arbeiten bezweifeln diese Interpretation und stellen die vom Protein erzeugte elektrostatische Barriere in den Vordergrund, die das Proton entlang des Kanals überwinden muss [Eisenberg 2003; Burykin et al. 2004]. Andere heben hervor, dass das Protein die

Solvatationshülle eines Protons/Hydroniumions in Wasser nicht ersetzen kann [de Groot et al. 2005; Kato et al. 2006].

Die ar/R Engstelle ist in orthodoxen Aquaporinen etwa 2,8 Ångström im Durchmesser, was dem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht. Gelöste Stoffe größer als ein Wassermolekül können die Pore nicht passieren [Murata et al. 2000; Unger 2000]. In Aquaglyceroporinen ist die Engstelle circa 3,4 Ångström breit und weist damit den gleichen Durchmesser wie Glycerin mit seinen an Kohlenstoff gebundenen Hydroxyl-Gruppen auf [Walz et al. 2009]. Die außerordentliche Bedeutung der ar/R Engstelle für die Selektivität der Aquaporine wurde in Mutationsexperimenten aufgezeigt. Punktmutationen in der ar/R Engstelle in hAQP1 ermöglichten den Durchtritt von Harnstoff, Glycerin, Ammoniak und Protonen durch den Kanal [Beitz et al. 2009].

Die geordnete Bewegung der Wassermoleküle entlang der Pore wird durch die regelmäßige Anordnung von Wasserstoffbrückendonatoren und Akzeptoren garantiert [Sui et al. 2001]. Hydrophile Gruppen sind auf einer Seite der Pore angeordnet, wo sie eine regelmäßige Abfolge von potentiellen Wasserstoffbrückenpartnern für die Wassermoleküle ausbilden. Die andere Seite der Pore ist hydrophob, was die gut geordnete Aufreihung der Wassermoleküle entlang der Wasserstoffbrückenspender garantiert. Diese Anordnung erlaubt den schnellen Durchtritt von bis zu 3×10^9 Wassermolekülen pro Sekunde und MIP [Agre et al. 1998; Borgnia et al. 1999].

1.2.2 Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei besitzt insgesamt drei MIPs (AQP1, AQP2 und AQP3). Die Gene liegen auf Chromosom 6 (TbAQP1; 966 bp) und Chromosom 10 (TbAQP2; 939 bp und TbAQP3; 915 bp). Alle drei Kanäle sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich und weisen hohe *percent identity scores* auf. Berechnet mit der Software DNAMAN weisen TbAQP1 und TbAQP2 66,4 % *identity* auf, TbAQP1 und TbAQP3 haben eine *identity* von 68,3 % und TbAQP2 verglichen mit TbAQP3 hat einen *identity score* von 76,6 (Abbildung 11).

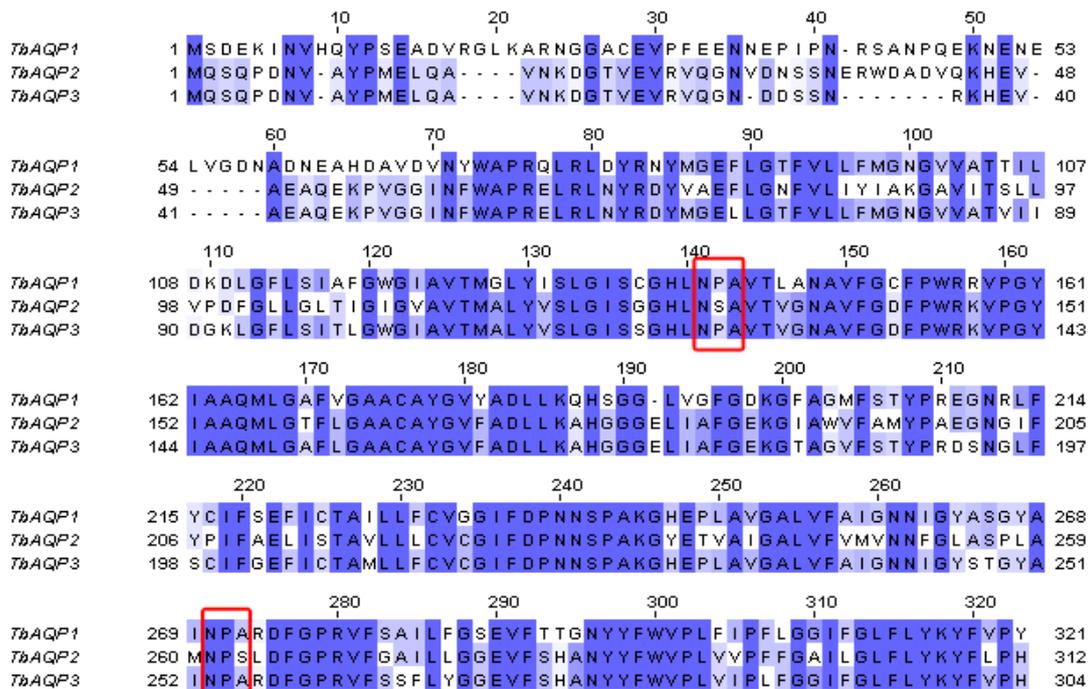


Abbildung 11 Proteinsequenzvergleich der drei TbAQPs mit Motivboxen

Ihren phylogenetischen Stammbäumen und Sequenzanalysen [Froger et al. 1998] nach sind sie eher Aquaglyceroporine als Aquaporine, was durch Transportmessungen in Oozyten bestätigt wurde [Uzcategui et al. 2005].

TbAQP1 und TbAQP3 haben in der porenbildenden Region die zwei hochkonservierten NPA-Motive, während TbAQP2 die nur selten vorkommenden NSA- und NPS-Motive enthält. Dabei besitzt TbAQP2 ein Leucine anstelle des hochkonservierten Arginins direkt nach der zweiten NPA-Box, beziehungsweise in diesem Fall dem NPS-Motiv.

Die Transmembranvorhersagen für alle drei TbAQPs zeigen kurze, zwei Aminosäure lange, C-terminale cytosolische Enden, aber charakteristisch verlängerte N-terminale cytosolische Enden. Die 73 und 65 Aminosäuren langen N-terminalen Enden von TbAQP2 und TbAQP3 sind fast identisch, wohingegen das 83 Aminosäuren lange N-terminale Ende von TbAQP1 gänzlich unterschiedlich ist.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Aquaglyceroporine der Trypanosomen weisen spezifische Funktionen auf, die für das Überleben der Parasiten von entscheidender Bedeutung sind. Dazu gehören die Osmoregulation bei der Besiedlung ihrer diversen Lebensräume oder die Entgiftung toxischer Metabolite wie Ammoniak aus dem Aminosäure-Stoffwechsel oder Glycerin bei anaerobem Stoffwechsel. Weiterhin zählt dazu die Aufnahme von Glycerin als Energiesubstrat und zur Bildung von Phospholipiden.

Gegenstand dieser Arbeit war die Charakterisierung der drei trypanosomalen Aquaglyceroporine, insbesondere ihre Lokalisation in der Zelle und ihre funktionelle Bedeutung zum Beispiel im Hinblick auf Glycerin-Transportvorgänge.

Zur Lokalisierung der drei Aquaglyceroporine sollten spezifische Antikörper zum Einsatz kommen. Neben dem direkten Nachweis der Aquaglyceroporine war es auch das Ziel, die RNA Interferenz-Arbeitstechnik im unserem Labor zu etablieren und einzusetzen. RNA Interferenz sollte eine indirekte Lokalisierung durch Rückschlüsse aus Defizit-Klonen ermöglichen und Aussagen zur Aufklärung ihrer physiologischen Funktionen, insbesondere zum Glycerintransport, zulassen. Hierzu wurde eine Reihe von Versuchen zum Aufspüren der phänotypischen Veränderungen geplant.

Die einzusetzende RNA Interferenz-Methode sollte die Herstellung vererbbarer, induzierbarer Knockdown-Trypanosomen erlauben, damit auch die Funktion potentiell essentieller Genprodukte untersucht werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchsorganismen

3.1.1.1 Trypanosomen

Für Stabilate und Experimente die viele Trypanosomen erforderten, wurden die Parasiten *in vivo* angezogen. Dafür wurden Ratten der Rasse Wistar verwendet, die im Tierstall des Interfakultären Institutes für Biochemie untergebracht waren. Es wurden nur nicht humanpathogene *Trypanosoma brucei brucei*-Erreger verwendet.

Als Blutform-Trypanosomen (BF 221) wurde die klonierte Linie MITat1.2 eingesetzt, die aus dem monomorphen *Trypanosoma brucei brucei*-Stamm Lister 427 herangezogen wurde und den variablen Antigentyp 221 exprimiert [Cross 2009].

Als procyclische Zellen wurde eine durch Transformation aus dem zuvor genannten MITat1.2-Stamm geschaffene Zelllinie (PC 221) eingesetzt [Overath et al. 1986].

Außerdem wurden schon vorhandene transgene Zelllinien im Laufe dieser Arbeit eingesetzt. Transgene Zelllinien wurden entsprechend den *Trypanosoma brucei*-Nomenklatur nach Clayton benannt [Clayton et al. 1998]. Im weiterführenden Text werden jedoch meistens abgeänderte Namen verwendet, um die Lesbarkeit zu verbessern. In den nachfolgenden Tabellen sind diese abgeänderten Namen in fetter Schrift in der Kopfzeile aufgeführt. In einigen Fällen existiert mehr als ein Name für dieselbe Zelllinie, welcher dann als alternativer Name angezeigt ist.

Verwendung für RNAi Experimente fand die von einer BF 221 klonalen Zelllinie abgeleitete *single marker bloodform* Linie (BF SMB) [Wirtz et al. 1999], die konstitutiv T7 RNA-Polymerase (Plasmid pHD328) und *Tn10 Tet* Repressor (Plasmid pLEW114hyg5') mittels NEO-Resistenz exprimiert.

BF SMB	
Originalpublikation:	[Wirtz et al. 1999]
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO</i>
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml]

Ebenfalls für RNAi Experimente wurde die von einer PC 221 klonalen Zelllinie abgeleiteten PC 1313-514 Zellen verwendet [Alibu et al. 2005], die konstitutiv Tetracyclin-Repressor (Plasmid pHD1313) und T7 RNA-Polymerase (Plasmid pHD514) durch BLE- und NEO-Selektion exprimiert.

PC 1313-514	
Originalpublikation:	[Alibu et al. 2005]
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO</i>
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml]

Des Weiteren wurden die von der klonalen Zelllinie PC 221 abgeleiteten PC 29-13 Zellen [Wirtz et al. 1999] für TbAQP Überexpressionsversuche eingesetzt. Diese Zellen exprimieren konstitutiv T7 RNA-Polymerase (pLEW13) und Tetracyclin-Repressor (pLEW29) unter G418- und HYG-Resistenz.

PC 29-13	
Originalpublikation:	[Wirtz et al. 1999]
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP NEO TETR HYG</i>
Selektionsmarker:	G418 [15 µg/ml]; Hygromycin [50 µg/ml]

Der Übersichtlichkeit halber sind alle für diese Arbeit erschaffenen transgenen Zelllinien hier, zusätzlich zur detaillierten Beschreibung im Ergebnissteil, mit aufgelistet:

PC 29-13 AQP2		1
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP NEO TETR HYG RDNA::PGPEET^{Ti} AQP2 T7RNAP BLE</i>	
Alternativer Name:	PC AQP2 Überexpression	
Klon- oder Pool-Nummer:	3@11	
Plasmidname:	pLEW100 AQP2_over	
Selektionsmarker:	G418 [15 µg/ml]; Hygromycin B [50 µg/ml]	

PC 1313-514 AQP1		2
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP1 HYG</i>	
Alternativer Name:	PC AQP1-Knockdown	
Klon- oder Pool-Nummer:	Cl1	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP1	
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]	

PC 1313-514 AQP2		3
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP2 HYG</i>	
Alternativer Name:	PC AQP2-Knockdown	
Klon- oder Pool-Nummer:	Ori	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP2	
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]	

PC 1313-514 AQP3		4
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP3 HYG</i>	
Alternativer Name:	PC AQP3-Knockdown	
Klon- oder Pool-Nummer:	Ori	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP3	
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]	

PC 1313-514 AQP1-3		5
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP1-3 HYG</i>	
Alternativer Name:	PC Gesamt-AQP-Knockdown	
Klon- oder Pool-Nummer:	Cl2	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP1-3	
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]	

PC 1313-514 ATUB		6
Hergestellt von:	B. Bassarak	

Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} ATUB HYG</i>
Alternativer Name:	PC Knockdown-Positivkontrolle
Klon- oder Pool-Nummer:	Ori
Plasmidname:	p2T7TAblue ATUB
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]

PC 1313-514 empty		7
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>TETR BLE T7RNAP NEO RDNA::T7PRO^{Ti} HYG</i>	
Alternativer Name:	PC Knockdown-Kontrolle	
Klon- oder Pool-Nummer:	Ori	
Plasmidname:	p2T7TAblue empty	
Selektionsmarker:	Phleomycin [5 µg/ml], G418 [50 µg/ml], Hygromycin B [15 µg/ml]	

BF SMB AQP1		8
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP1 HYG</i>	
Alternativer Name:	BF AQP1-Knockdown	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP1	
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml], Hygromycin B [2,5 µg/ml]	

BF SMB AQP2		9
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP2 HYG</i>	
Alternativer Name:	BF AQP2-Knockdown	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP2	
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml], Hygromycin B [2,5 µg/ml]	

BF SMB AQP3		10
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP3 HYG</i>	
Alternativer Name:	BF AQP3-Knockdown	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP3	
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml], Hygromycin B [2,5 µg/ml]	

BF SMB AQP1-3		11
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP1-3 HYG</i>	
Alternativer Name:	BF Gesamt-AQP-Knockdown	
Plasmidname:	p2T7TAblue AQP1-3	
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml], Hygromycin B [2,5 µg/ml]	

BF SMB ATUB		12
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Nomenklaturname:	MITat1.2 <i>T7RNAP TETR NEO RDNA::T7PRO^{Ti} AQP2 HYG</i>	
Alternativer Name:	BF Knockdown-Positivkontrolle	
Plasmidname:	p2T7TAblue ATUB	
Selektionsmarker:	G418 [2 µg/ml], Hygromycin B [2,5 µg/ml]	

3.1.1.2 Bakterien

Für die Klonierung von Plasmiden wurden *One Shot TOP10 Chemically Competent Escherichia coli* (F⁺ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* λ-) der Firma Invitrogen verwendet. Diese Zellen benötigen kein Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), um die Expression des *lac* Promoters zu induzieren. Für eine mögliche blau/weiß Selektion wurde darauf geachtet, dass die Selektionsplatten 50 µg/ml X-Gal enthalten.

3.1.2 Antikörper

Huhn-Anti-AQP1	Biogenes, Berlin
Huhn-Anti-AQP2	Biogenes, Berlin
Huhn-Anti-AQP3	Biogenes, Berlin
Maus-Anti-Huhn Leichte Ketten-FITC Konjugat, monoklonal	Sigma-Aldrich, München

3.1.3 Oligonukleotide

Alle Primer (Oligonukleotide) sind von der Firma Invitrogen und wurden als 100 µM Stammlösung bei -20°C gelagert und für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Die Position des resultierenden PCR-Fragments im Gen wurde wie folgt angegeben: Nukleotidnummer im Gen (#Zahl), Nukleotidnummer in 5'-UTR (#-Zahl) und Nukleotidnummer in 3'-UTR (#+Zahl).

Standard-Primer

Oligo(dT)18 Primer	5'-T(18)-3'
--------------------	-------------

Sequenzierungsprimer

p2T7TAbblue_se	5'-CCGCTCTAGAACTAGTGGA-3'
pLEW100_se	5'-CCTGAGTACTGAGTTTAACATGTTCTC-3'
pLEW100_as	5'-TGCTGTGCCATCAGATTACTC-3'

Einzel-AQP-Knockdowns

Aquaglyceroporin 1 [Tb927.6.1520/Genlänge 966 bp/PCR-Produkt 567 bp (#130 bis #696)]

AQP1_RNAi_1x_Taal_se	5'-GCCAATCCACAGGAAAAGAA-3'
AQP1_RNAi_1x_Taal_as	5'-ACCGACGCAAAGAGAAGAA-3'

Aquaglyceroporin 2 [Tb10.61.2640/Genlänge 939 bp/PCR-Produkt 360 bp (#+175 bis #+534)]

AQP2_RNAi_1x_Taal_se	5'-acat-ACTGT-GCGTTGAAGTTTTGCCTTC-3'
AQP2_RNAi_1x_Taal_as	5'-tata-ACTGT-TCGTTGCGTGGTAACGTAAA-3'

Aquaglyceroporin 3 [Tb10.61.2650/Genlänge 915 bp/PCR-Produkt 337 bp (#+175 bis #+511)]

AQP3_RNAi_1x_Taal_se	5'-aggt-ACTGT-TTTTTGAGTGCATGAGCTGC-3'
AQP3_RNAi_1x_Taal_as	5'-acgc-ACTGT-TGGTTCAGCGCTATTCACTG-3'

Gesamt-AQP-Knockdown

Aquaglyceroporin 1 [Tb927.6.1520/Genlänge 966 bp/PCR-Produkt 567 bp (#130 bis #696)]

AQP1_3x_link_Taal_se	5'-gcbt-ACTGT-GCCAATCCACAGGAAAAGAA-3'
----------------------	---------------------------------------

AQP1_3x_link_NdeI_as 5'-cgtttaaacttacggaccgt-catatg-ACCGACGCAAAAGAGAAGAA-3'

Aquaglyceroporin 2 [Tb10.61.2640/Genlänge 939 bp/PCR-Produkt 360 bp (#+175 bis #+534)]

AQP2_3x_link_NdeI_se 5'-acgt-catatg-GCGTTGAAGTTTTGCCTTC-3'

AQP2_3x_link_Sall_as 5'-tatg-gtcgac-TCGTTGCGTGGTAACGTAAA-3'

Aquaglyceroporin 3 [Tb10.61.2650/Genlänge 915 bp/PCR-Produkt 337 bp (#+175 bis #+511)]

AQP3_3x_link_Sall_se 5'-tgacgggccgtaagttaaac-gtcgac-TTTTTGAGTGCATGAGCTGC-3'

AQP3_3x_link_TaaI_as 5'-acgc-ACTGT-TGGTTCAGCGCTATTCAGTG-3'

Sonstige Knockdowns

α -Tubulin [Tb927.1.2400/Genlänge 1356 bp/PCR-Produkt 413 bp (#833 bis #1245)]

ATUB_RNAi_se 5'-CAGAGAAGGCCTACCACGAG-3'

ATUB_RNAi_as 5'-CTCTTCCATACCCTCACCGA-3'

Northern Sonden

β -Tubulin [Tb927.1.2330/Genlänge 1329 bp/PCR-Produkt 1320 bp (#1 bis #1320)]

BTUB_sonde_se 5'-ATGCGCGAAATCGTCTGCGTTCAG-3'

BTUB_sonde_as 5'-CTCCTCCTCGTCAACTCGCCCT-3'

α -Tubulin [Tb927.1.2400/Genlänge 1356 bp/PCR-Produkt 273 bp (#546 bis #818)]

ATUB_sonde_se 5'-GGAGCCCTACAACCTCTGTGC-3'

ATUB_sonde_as 5'-GCATAGCTTGTCAGCACGAA-3'

Aquaglyceroporin 1 [Tb927.6.1520/Genlänge 966 bp/PCR-Produkt 253 bp (#-129 bis #124)]

AQP1_sonde_se 5'-GGGTCCACCACAATCAAAAA-3'

AQP1_sonde_as 5'-GGTTGGGAATGGGTTTCATTA-3'

Aquaglyceroporin 2 [Tb10.61.2640/Genlänge 939 bp/PCR-Produkt 251 bp (#883 bis #+194)]

AQP2_sonde_se 5'-CCATTCTTTGGAGCTATCCTTG-3'

AQP2_sonde_as 5'-GAAGGCAAAACTTCAACGC-3'

Aquaglyceroporin 3 [Tb10.61.2650/Genlänge 915 bp/PCR-Produkt 251 bp (#544 bis #794)]

AQP3_sonde_se 5'-ACCGCAGGTGTGTTTCAGC-3'

AQP3_sonde_as 5'-GAAGAGAAGACCCTGGGACC-3'

AQP Überexpressionen

Aquaglyceroporin 2 [Tb10.61.2640/Genlänge 939 bp/PCR-Produkt 939 bp (#1 bis #939)]

AQP2_over_HindIII_se 5'-tcag-AAGCTT-ATGCAGAGCCAACCAGAC-3'

AQP2_over_BamHI_as 5'-attc-GGATCC-TTAGTGTGGAAGAAAATATTTGTACAG-3'

3.1.4 Plasmide

pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pUC19 Smal	Fermentas, St. Leon-Rot
p2T7TAblue	David Horn, London, UK
pLEW100	George Cross, New York, USA

Plasmidkonstrukte

Für eine bessere Übersicht werden alle für diese Arbeit selbst hergestellten oder verwendeten Plasmidkonstrukte hier, zusätzlich zum ausführlicheren Ergebnissteil, kurz aufgelistet.

p2T7TAblue AQP1		1
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	PCR-Amplikon von <i>TbAQP1</i> Teilstück (Nukleotide 130 bis 696) wurde in Eam1105I geöffneten RNAi-Vektor p2T7TAblue kloniert.	
Kurzbeschreibung:	Induzierbares RNAi-Knockdown-Plasmid gegen <i>TbAQP1</i> [p2T7TAblue::AQP1ΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

p2T7TAblue AQP2		2
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	PCR-Amplikon von <i>TbAQP2</i> 3'-UTR Teilstück (Nukleotide +175 bis +534) wurde in Eam1105I geöffneten RNAi-Vektor p2T7TAblue kloniert.	
Kurzbeschreibung:	Induzierbares RNAi-Knockdown-Plasmid gegen <i>TbAQP2</i> [p2T7TAblue::AQP2ΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

p2T7TAblue AQP3		3
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	PCR-Amplikon von <i>TbAQP3</i> 3'-UTR Teilstück (Nukleotide +175 bis +511) wurde in Eam1105I geöffneten RNAi-Vektor p2T7TAblue kloniert.	
Kurzbeschreibung:	Induzierbares RNAi-Knockdown-Plasmid gegen <i>TbAQP3</i> [p2T7TAblue::AQP3ΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

p2T7TAblue AQP1-3		4
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	Konstrukt aus den drei <i>TbAQP1</i> , <i>TbAQP2</i> und <i>TbAQP3</i> Singel-Knockdown-Fragmenten (Insgesamt 1281 nt) wurde in Eam1105I geöffneten RNAi-Vektor p2T7TAblue kloniert.	
Kurzbeschreibung:	Induzierbares RNAi-Knockdown-Plasmid gegen <i>TbAQP1-3</i> [p2T7TAblue::AQP1-3ΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

p2T7TAblue ATUB		5
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	PCR-Amplikon von <i>TbATUB</i> Teilstück (Nukleotide 833 bis 1245) wurde in Eam1105I geöffneten RNAi-Vektor p2T7TAblue kloniert.	
Kurzbeschreibung:	Induzierbare RNAi-Knockdown-Positivkontrolle [p2T7TAblue::ATUBΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

p2T7TAblue empty		6
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	Mit Eam1105I geöffneter RNAi-Vektor p2T7TAblue, Enden mittels T4 DNA Polymerase geglättet und mit T4 DANN Ligase rezirkularisiert	
Kurzbeschreibung:	RNAi-Elektroporations- und Selektionskontrolle [p2T7TAblue::ΔLacZ]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Hygromycin B	

pLEW100 AQP2		7
Hergestellt von:	B. Bassarak	
Herstellung:	PCR-Amplikon von <i>TbAQP2</i> (Nucleotide 1 bis 939) in mit HindIII und BamHI geöffneten Vektor pLEW100 ligiert	
Kurzbeschreibung:	Induzierbares <i>TbAQP2</i> Überexpressionsplasmid [pLEW100::AQP2ΔLuc]	
Verdau für Transfektion:	NotI	
Selektionsmarker:	Phleomycin	

3.1.5 Kits

AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit	Invitrogen, Karlsruhe
HexaLabel DNA labeling Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Megaprime DNA labeling systems Kit	Amersham, Freiburg
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
NEBlot DNA labeling Kit	New England BioLabs, Frankfurt
NucleoBond PC 100 Kit	Macherey-Nagel, Düren
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden sämtliche Aminosäuren von der Firma Sigma-Aldrich, alle Restriktionsenzyme von der Firma Fermentas und alle nicht aufgeführten anorganischen Salze von der Firma Carl Roth bezogen.

Zellkultur

Ampuwa Wasser, RNase frei	Fresenius Kabi, Bad Homburg
(D)-Glucose	Fluka, Buchs, CH
Adenosin	Sigma-Aldrich, München
Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized	Sigma-Aldrich, München
Canusal™	CP Pharmaceuticals, Wrexham, UK
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich, München
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämin	Sigma-Aldrich, München
Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Sigma-Aldrich, München
MEM Aminosäuren	Sigma-Aldrich, München
MEM Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, München
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich, München
Phenolrot	Sigma-Aldrich, München
Serum Plus™	SAFC Biosciences, Andover, UK

Radiochemikalien

[α - ³² P]dATP	Amersham, Little Chalfont, UK
[α - ³² P]dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig

Sonstige Chemikalien

1 kb DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Quality	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Arsentrioxid	Carl Roth, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich, München
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, München
Calf Intestinal Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt
CTP	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, München
DNA loading dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, München
G418	Carl Roth, Karlsruhe
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Giensa-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
GTP	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	PAA Laboratories, Pasching
Immu-Mount Einbettungsmedium	Shandon, Pittsburgh, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumantimontartrat	Carl Roth, Karlsruhe

Lachssperma	Sigma-Aldrich, München
L-Lactatdehydrogenase	Roche, Mannheim
NADH	Roche, Mannheim
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Pfu DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Phleomycin	Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, München
RNase A	Sigma-Aldrich, München
RNaseOUT	Gibco BRL, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas, St. Leon-Rot
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
UTP	Sigma-Aldrich, München
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Zellkultur

Cryo-Röhrchen (1,4 ml)	Greiner, Frickenhausen
Glocken-Sterilfilter MediKap-2 Hohlfaserfilter (0,2 µm)	Microgon, Laguna Hills, USA
Mikrotiterplatten (6-well, 24-well, 96-well)	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen (94 x 16 mm)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Schott Glasflaschen, autoklavierbar (50 ml bis 1 l)	Fischer Scientific, Steinheim
Spritzenvorsatz-Sterilfilter mit SFCA-Membran (0,22 µm)	Nalge, Hereford, UK
Sterile Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (T-12,5; T-25; T-75; T-175) mit Sterilfilter	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturröhrchen, runder Boden (14 ml)	Greiner, Frickenhausen

Sonstige Materialien

BioMax MR Film (13x18 cm)	Kodak, Stuttgart
Elektroporationsküvetten 2 mm	Bio-Rad, München
Filterpapierblättchen Sample Discs SS03	Wescor, Utah, USA
Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Hybond - ECL (Nitrocellulosemembran)	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybond - N+ (Nylon Transfermembran)	Amersham Biosciences, Freiburg
Immuno-Mount	Shandon, Pittsburg, USA
Kalibrierlösungen OPTI-Mole 100, 290 & 1000 mmol/kg	Wescor, Utah, USA
Objektträger für Immunfluoreszenz	Biomerieux, Nürtingen
Objektträger/Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm	American Can Co, Chicago, USA
Szintillationsgefäße	PerkinElmer, Waltham, USA
Ultima Gold Scintillation Cocktail	Packard, Frankfurt
UV-Küvette mikro	Brand, Wertheim
Whatman Papier (3 mm)	Whatman, Maidstone, USA

3.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben wurde zum Lösen Aqua dest. verwendet. Die angegebenen Molaritäten bezeichnen die Endkonzentrationen.

3.1.8.1 Medien

Alle Medien und Medienzusätze wurden im Autoklaven sterilisiert oder steril filtriert.

3.1.8.1.1 Trypanosomen

Grundmedium, pH 7,4

Das Grundmedium ist ein *minimal essential medium* (MEM) nach dem Standardprotokoll [Eagle 1959]; es beinhaltet Modifikationen nach Duszenko [Duszenko et al. 1985; Duszenko et al. 1992].

CaCl ₂	265 mg/l	1,8 mM
KCl	400 mg/l	5,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg/l	0,8 mM
NaCl	6800 mg/l	116 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140 mg/l	1 mM
HEPES	7140 mg/l	30 mM

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

L-Arginin/HCl	126 mg/l	0,6 mM
L-Histidin/HCl x H ₂ O	42 mg/l	0,2 mM
L-Isoleucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Leucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Lysin	73 mg/l	0,5 mM
L-Methionin	60 mg/l	0,4 mM
L-Phenylalanin	100 mg/l	0,6 mM
L-Threonin	48 mg/l	0,4 mM
L-Tryptophan	100 mg/l	0,5 mM
L-Tyrosin	100 mg/l	0,55 mM
L-Valin	46 mg/l	0,4 mM
L-Ornithin/HCl	10 mg/l	0,3 mM
L-Adenosin	12 mg/l	0,045 mM

MEM nicht essentielle Aminosäurelösung	10 mg/l	
MEM Vitamin-Lösung	10 mg/l	
Phenolrot	10 mg/l	0,03 mM

Die Aminosäuren und Adenosin wurden addiert und die nachfolgend genannten kommerziellen Lösungen inklusive Phenolrot zugegeben. Dieses Grundmedium wurde mittels Pumpe und netzmittelfreier Celluloseacetat-Filtermembran (SFCA-Membran) steril filtriert und bei 4°C bis zu sechs Monaten gelagert.

BF-Kulturmedium für Blutform-Trypanosomen, pH 7,4

Zur Herstellung des kompletten BF-Kulturmediums wurden Glucose und folgende Stammlösungen zum Grundmedium zugegeben. Die Konzentrationsangaben sind auf das finale Volumen bezogen.

Glucose x H ₂ O	4990 mg/l	25 mM	
NaHCO ₃ 33,3x	75 mg/ml	26,2 mM	30 ml/l
L-Glutamin 100x	29,2 mg/ml	2 mM	10 ml/l
L-Cystein 100x	3,03 mg/ml	0,25 mM	10 ml/l
Thymidin 100x	0,39 mg/ml	0,016 mM	10 ml/l
Hypoxanthin 100x*	1,36 mg/ml	0,1 mM	10 ml/l
Bathocuproindisulfonat; 1000x**	5,65 mg/ml	0,016 mM	1 ml/l
Myristinsäure, gekoppelt an BSA 50x***	24 mg/ml	0,1 mM	20 ml/l
Penicillin/Streptomycin Mix****			5 ml/l
Grundmedium			ad 850 ml/l

* Hypoxanthin 100x wurde in 0,1 M NaOH gelöst.

** Bathocuproindisulfonat 1000x wurde in Aqua bidest. suspendiert und durch Zugabe von wenigen Tropfen 0,5 M HCl gelöst.

*** Die Herstellung der Myristinsäurelösung erfolgte nach Ferguson und Cross [Cross et al. 1973; Ferguson et al. 1984], wobei zunächst 24 mg Myristinsäure in 100 µl Ethanol p.a. gelöst wurden. Die ethanolische Myristinsäurelösung wurde dann schrittweise zu einer BSA-Lösung zugegeben (1 g fettsäurefreies BSA pro 20 ml Aqua bidest.).

**** Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10 000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 µg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:200 fach eingesetzt.

Der pH-Wert des Mediums wurde kontrolliert (pH 7,4), es wurde steril filtriert und zu sterilem fötalem Kälberserum hinzugegeben.

Fötales Kälberserum (30 min @ 56°C hitzeinaktiviert)	150 ml/l
--	----------

Das finale BF-Kulturmedium war für circa 6 Wochen bei 4°C haltbar.

PC-Kulturmedium für procyclische Formen, pH 7,4

Zur Herstellung des kompletten PC-Kulturmediums wurden folgende Stammlösungen zu Grundmedium zugegeben. Die Konzentrationsangaben sind auf das finale Volumen bezogen.

L-Prolin 100x	60 mg/ml	5,2 mM	10 ml/l
L-Glutamin 100x	29,2 mg/ml	2 mM	10 ml/l
Na-Pyruvat 100x	22 mg/ml	2,0 mM	10 ml/l
Hämin 333x in 0,1 M NaOH	2,5 mg/ml	0,012 mM	3 ml/l
Penicillin/Streptomycin Mix*			5 ml/l
Grundmedium			ad 900 ml/l

* Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10 000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 µg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:200 fach eingesetzt.

Der pH-Wert des Mediums wurde kontrolliert (pH 7,4); es wurde steril filtriert und zu sterilem fötalem Kälberserum hinzugegeben.

Fötales Kälberserum (30 min @ 56°C hitzeinaktiviert)	100 ml/l
--	----------

Das finale PC-Kulturmedium war für circa 6 Wochen bei 4°C haltbar.

HMI-9 Kulturmedium für Blutformtrypanosomen, pH 7,4

Dieses spezielle BF-Wachstumsmedium begünstigt durch seinen Zusatz von Serum Plus TM die Anzucht klonaler Reihen von BF-Trypanosomen. Zuerst wurde der *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) Mix für 1,0 Liter der Firma Sigma Aldrich und Natriumhydrogencarbonat gelöst. Danach wurden verschiedene Stammlösungen zugegeben.

IMDM Mix	17,7 g/l	
NaHCO ₃	3,02 g/l	
Aqua dest.		ad 775 ml/l

Die Substanzen wurden gelöst, der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt und folgende Stammlösungen hinzugegeben. Die Konzentrationsangaben sind auf das finale Volumen bezogen.

Hypoxanthin 1000x*	13,6 mg/ml	1 mM	10 ml/l
L-Cystein 100x	18,2 mg/ml	1,5 mM	10 ml/l
Na-Pyruvat 1000x	110 mg/ml	1 mM	1 ml/l
Thymidin 1000x	39 mg/ml	0,16 mM	1 ml/l
Bathocuproindisulfonat 1000x**	28,2 mg/ml	0,087 mM	1 ml/l
β-Mercaptoethanol			14 µl/l
Penicillin/Streptomycin Mix***			10 ml/l

* Hypoxanthin 1000x wurde in 0,1 M NaOH gelöst.

** Bathocuproindisulfonat 1000x wurde in Aqua bidest. suspendiert und durch Zugabe von ein paar Tropfen 0,5 M HCl gelöst.

*** Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10 000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 µg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:100 fach eingesetzt.

Der pH-Wert des Mediums wurde kontrolliert (pH 7,4); es wurde steril filtriert und zu sterilem fötalem Kälberserum und sterilem Serum Plus™ hinzugegeben.

Fötales Kälberserum (30 min @ 56°C hitzeinaktiviert)	96 ml/l
Serum Plus™ (nicht erhitzt)	96 ml/l

Das finale BF-Kulturmedium war für circa 6 Wochen bei 4°C haltbar.

MEM-Pros Kulturmedium für procyclische Formen, pH 7,4

Dieses spezielle PC-Wachstumsmedium wurde für die Anzucht klonaler Reihen von PC-Trypanosomen verwendet.

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	265 mg/l	1,8 mM
KCl	400 mg/l	5,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg/l	0,8 mM
NaCl	6800 mg/l	116 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140 mg/l	1 mM
HEPES	7140 mg/l	30 mM

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

L-Arginin/HCl	126 mg/l	0,6 mM
L-Cystein	24 mg/l	0,2 mM
L-Glutamin	292 mg/l	2,0 mM
L-Histidin/HCl x H ₂ O	42 mg/l	0,2 mM
L-Isoleucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Leucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Lysin	73 mg/l	0,5 mM
L-Methionin	15 mg/l	0,1 mM
L-Phenylalanin	100 mg/l	0,6 mM
L-Threonin	48 mg/l	0,4 mM
L-Tryptophan	10 mg/l	0,05 mM
L-Tyrosin	100 mg/l	0,55 mM
L-Valin	46 mg/l	0,4 mM
L-Prolin	600 mg/l	5,2 mM
L-Ornithin/HCl	10 mg/l	0,3 mM
L-Adenosin	12 mg/l	0,045 mM
MEM nicht essentielle Aminosäurelösung	10 mg/l	
MEM Vitamin-Lösung	10 mg/l	
Phenolrot	10 mg/l	0,03 mM

Die Aminosäuren und Adenosin wurden addiert und die nachfolgend genannten kommerziellen Lösungen inklusive Phenolrot zugegeben. Dieses Mem-Pros Grundmedium wurde mittels Pumpe und Filter (netzmittelfreie Celluloseacetat-Filtermembran) steril filtriert und bei 4°C bis zu sechs Monate gelagert. Zur Herstellung des kompletten MEM-Pros Kulturmediums wurden folgende Lösungen zu MEM-Pros Grundmedium hinzugegeben.

Hämin-Stammlösung*	3 ml/l
Penicillin/Streptomycin Mix**	5 ml/l
Mem-Pros Grundmedium	ad 900 ml/l

* Hämin-Stammlösung enthält 250 mg Hämin in 100 ml 0,1 M NaOH. Sie wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

** Penicillin/Streptomycin Mix ist *Antibiotic Antimycotic Solution 100x, stabilized* (steril filtriert, mit 10 000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 µg Amphotericin B pro ml, Zellkultur getestet) der Firma Sigma-Aldrich und wurde 1:200 fach eingesetzt.

Der pH-Wert des Mediums wurde kontrolliert (pH 7,4); es wurde steril filtriert und zu sterilem fötalem Kälberserum hinzugegeben.

Fötales Kälberserum (30 min @ 56°C hitzeinaktiviert)	100 ml/l
--	----------

Das finale MEM-Pros Medium war für circa 6 Wochen bei 4°C haltbar.

Trypanosome Dilution Buffer (TDB), pH 7,7

Na ₂ HPO ₄	18 mM
NaH ₂ PO ₄	2 mM
KCl	5 mM

NaCl	80 mM
MgSO ₄	1 mM
Glucose	20 mM

Einfriermedium, steril filtriert

TDB	77 ml
Glycerin 87%	23 ml

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

Na-Citrat	100 mM
Glucose	40 mM

Separationspuffer, pH 8,0

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

Antibiotika-Stammlösungen

G418	50 mg/ml
Phleomycin	2,5 mg/ml
Hygromycin B	50 mg/ml
Tetracyclin in 70 % Ethanol	5 mg/ml

Aliquots wurden bei -20°C im Dunkeln gelagert.

3.1.8.1.2 *Escherichia coli*

Luria-Bertani (LB) Medium 2x, pH 7,5

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	20 g/l

LB-Amp Medium

LB Medium 2x	0,5 ml
Aqua dest.	0,5 ml
Ampicillin 50 mg/ml in 70 % Ethanol	1 µl/ml

Agar-Agar 2x

Agar-Agar	40 g/l
-----------	--------

LB-Amp Agar Platten

Agar-Agar 2x	0,5 ml/ml
LB-Medium 2x	0,5 ml/ml
X-Gal 25 mg/ml in Dimethylformamid	2 µl/ml
Ampicillin 50 mg/ml in 70 % Ethanol	1 µl/ml

SOB Medium

Bacto-Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	20 g/l
MgCl ₂ 1 M	10 ml/l
MgSO ₄ 1 M	10 ml/l

SOC Medium, pH 7,0

Glucose 2 M	0,01 ml/ml
SOB Medium	ad 1 ml/ml

3.1.8.2 Puffer und Lösungen

3.1.8.2.1 Molekularbiologie

TAE Puffer 50x, pH 8,0

Tris	242 g/l
Essigsäure	57,1 ml/l
EDTA	37,2 g/l

pH-Wert mit Essigsäure eingestellt.

1 % DNA-Agarosegel

Agarose	0,5 g
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	2,5 µl
TAE Puffer 1x	50 ml

Die Agarose in TAE Puffer 1x wurde in der Mikrowelle gelöst, auf 60°C abgekühlt und Ethidiumbromid hinzugegeben.

FA Gel Puffer 10x, pH 7,0

3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

1 % RNA-Agarosegel

Agarose	0,5 g
Formaldehyd (37 %)	0,9 ml
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	1 µl
FA Gel Puffer 1x	50 ml

Die Agarose in FA Gel Puffer 1x wurde in der Mikrowelle gelöst, auf 60°C abgekühlt und Formaldehyd sowie Ethidiumbromid hinzugegeben.

3.1.8.2.2 Immunfluoreszenz

Natriumphosphat-Glycin Puffer, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	100 mM
Glycin	100 mM

Phosphate buffered saline (PBS) 2x; pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	20 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
NaCl	274 mM
KCl	5,4 mM

BSA/PBS -Lösung

BSA	10 mg/ml
PBS	ad 1 ml/ml

0,2 % Triton X-100

Triton X-100	2 mg/ml
PBS	ad 1 ml/ml

Fixierlösung

Paraformaldehyd	40 mg/ml
Glutaraldehyd	1 mg/ml
PBS	ad 1 ml/ml

Das Lösen der Paraformaldehydlösung erfolgte unter ständiger Kontrolle in der Mikrowelle (nicht kochen). Nach Abkühlen wurde Glutaraldehyd (25 % Stammlösung) für eine finale Konzentration von 0,1 % zugegeben. Die Fixierlösung wurde immer frisch angesetzt.

3.1.8.2.3 Trypanosomen-Elektroporation

PC-Transfektionsmedium (Zimmerman Post-Fusion Medium), pH 7,0 steril filtriert

NaCl	132 mM
KCl	8 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
MgOAc	1,5 mM
CaOAc ₂	90 µM
Glucose	1 %

Der pH von 7,0 wurde mit Natronlauge oder Essigsäure eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

BF-Transfektionsmedium (modifizierter Cytomix), pH 7,6 steril filtriert

EGTA*	2 mM
KCl	120 mM
CaCl ₂	0,15 mM
K ₂ HPO ₄	86,6 mM
KH ₂ PO ₄	13,4 mM
HEPES	25 mM
MgCl ₂	5 mM

Glucose	0,5 %
BSA (fettsäurefrei)	1,5 μ M
Hypoxanthin**	0,1 mM

* Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)

** Hypoxanthin 100x Stammlösung (1,36 mg/ml) verwendet. Diese wurde mit 1 M KOH eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

3.1.8.2.4 Northern Blot

Für alle RNA-Applikationen wurde RNase freies Wasser eingesetzt.

SSC 20x, pH 7,0

NaCl	175,3 g/l
Natriumcitrat x 3 H ₂ O	88,2 g/l

Der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure eingestellt.

NaPi 500 mM, pH 7,2

Na ₂ HPO ₄	500 mM
----------------------------------	--------

EDTA, pH 7,5

Dinatriumethylendiamintetraacetat	500 mM
-----------------------------------	--------

Hybridmix NaPi, pH 7,2

Natriumdodecylsulfat	70 g
EDTA 500 mM	4 ml
NaPi 500 mM	ad 1000 ml

Stripping Puffer

Natriumdodecylsulfat	10 g/l
----------------------	--------

Pi-Waschpuffer

Natriumdodecylsulfat	10 g/l
NaPi 500mM	80 ml/l

3.1.8.2.5 Hypoosmolarer Schock

Earle's-Salz-Puffer ohne NaCl, pH 7,4

CaCl ₂	1,8 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	0,8 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM
HEPES	30 mM
Glucose	30 mM

Durch Zugabe von Cholinchlorid oder NaCl wurde die gewünschte finale Osmolarität eingestellt.

3.1.8.2.6 Enzymassays

Lysepuffer für Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstest

Na-Acetat, pH 5,5	1 M
p-Nitrophenylphosphat	76 mM
Triton X-100	0,01 %

Pyruvatbestimmungs-Assay-Puffer; pH 7,0

K ₂ HPO ₄	40 mM
NaH ₂ PO ₄	30 mM

Pyruvatbestimmungs-Reaktionsmix für 96-well-Platten

NADH	0,2 mM
Lactat-DH (5 mg/ml)	2,5 µg/ml
Pyruvatbestimmungs-Assay-Puffer	ad 34ml

3.1.9 Geräte

Zellkultur

Autoklav Dampfsterilisator LSS	Münchner Mechanik, Stadlern
Brutschrank, 27°C	Köttermann, Uetze-Hönigsen
Heracell Brutschrank, 37°C, 5 % CO ₂ , befeuchtete Luft	Heraeus, Osterode
Invertmikroskop Zeiss ID 02	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Sigma 302K	Sigma, St. Louis, USA
Microzentrifuge Amicon MC-13	Heraeus, Osterode
Mikroskop Axiostar Plus	Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)	Brand, Wertheim
Sterilbank LaminAir HLB 2448 GS	Brand, Wertheim

Sonstige Geräte

Bio-Dot Microfiltration Apparat	Bio-Rad, München
ELISA-Reader MRX-II Revelation	Dynex, Chantilly, USA
Entwickler SRX-101A	Konica, Langenhagen
Filmkassette X-Omatic	Kodak, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg
Gelkammer Blue Marine 100	Serva, Heidelberg
Gelkammer Blue Marine 200	Serva, Heidelberg
Gelphotoapparat CS1	Cybertech, Ingolstadt
GenePulser XCell	Bio-Rad, München
Heizblock neoBlock I	NeoLab, Heidelberg
Kamera Olympus U-PMTVC	Olympus, Hamburg
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb1600 TR	Packard, Frankfurt
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
MiniCycler PTC-150	MJ Research, Waltham, USA
PCR Cycler Techne	Progene, Jahnsdorf
pH Meter pH 535	WTW, Weilheim
Power Supply EPS 301	Amersham, Freiburg
Schüttler Certomat R	BBraun, Melsungen
Semi-dry Blotting Apparat	Biotec-Fischer, Reiskirchen

SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
GeneQuant 1300	GE Healthcare, München
UV Crosslinker CL-1000	UVP, Upland, USA
Osmometer VAPRO 5520	Wescor, Utah, USA
Vortex-Genie	Bender&Hobein, Zürich, CH
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Suprafuge 22	Heraeus, Osterode

3.1.10 Software und Datenbanken

ATCViewer 1.00	GATC, Konstanz
CellF 3.1	Olympus, Hamburg
DNAMAN 6.0.3.99	Lynnon Corporation, Quebec, Canada
Endnote X3	Thomson Reuters, New York, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Unterschleißheim
Origin 8.0773	OriginLab, Northampton, USA
Photoshop 6.0	Adobe Systems, München
Quantity One 4.6.3 Basic	Bio-Rad, München

GeneDB	http://www.genedb.org/genedb/trypan/index.jsp
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
RNAit	http://trypanofan.path.cam.ac.uk/software/RNAit.html
TIGR	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Organismen

Alle Chemikalien und Lösungen sowie die Arbeitsmaterialien wurden steril angesetzt oder durch Autoklavieren sterilisiert. Alle Arbeitsschritte wurden in einer sterilen Werkbank (*laminar flow hood*) durchgeführt.

3.2.1.1 Trypanosoma brucei

Die Zelldichte der Trypanosomenkulturen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde zwischen Zählkammer und Deckglas eingebracht und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden alle 4 Großquadrate, jedes unterteilt in 16 Kleinquadrate, ausgezählt. Die Zahl der Trypanosomen in den 64 Kleinquadraten, die in der Summe ein Volumen von 0,02 µl enthalten, wurde mit dem Kammerfaktor 50.000 multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

3.2.1.1.1 Kultivierung

Die hier verwendeten Blutform-Trypanosomen, gewonnen aus dem monomorphen *Trypanosoma brucei brucei*-Stamm Lister 427, konnten aus vereinzelt Zellen wieder heranwachsen. Sie wuchsen bis zu einer maximalen Zelldichte von 2,5e6 Zellen/ml. Falls die Zelldichte der Kultur 2e6 Zellen/ml überstieg, so differenzierten die Zellen zur *stumpy*-Form und gingen irreversibel in die stationäre Phase über. Idealerweise sollte die Zelldichte von 1e6 Zellen/ml nicht überschritten werden, damit die Trypanosomen in der logarithmischen Wachstumsphase verbleiben.

Procyclische Zellkulturen starben normalerweise ab, wenn sie unter 1e5 Zellen/ml verdünnt wurden. Dies konnte verhindert werden, indem die Anwesenheit größerer Zellmengen durch das Verwenden von konditioniertem Medium vortäuscht wurde. Als konditioniertes Medium wurde Medium ohne Zellen verwendet, in dem zuvor eine Kultur mit 2×10^5 Trypanosomen für 24h wuchs. Die Stoffkomponente im konditionierten Medium, die das Parasitenwachstum erlaubt, ist noch unbekannt. Die procyclischen Zellen wachsen bis zu einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml. Sie können bei dieser Zelldichte 24h verweilen ohne abzusterben; solche Kulturen weisen nach anschließender Verdünnung eine längere *lag*-Phase auf.

Blutform-Trypanosomen (BF 221)

Die Kultivierung der aeroben Blutform-Trypanosomen erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ in einem Brutschrank. Ein BF-Kulturstabilat wurde nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter unter fließend warmem Wasser sofort aufgetaut. Um das Glycerin auszuwaschen wurde die Stabilatzellsuspension in 9 ml kaltes Blutform-Kulturmedium überführt und bei 4°C mit 1.300 g für 5 min die Trypanosomen pelletiert. Der Überstand wurde bis auf circa 1 ml verworfen, die Zellen in 5 ml eiskaltem BF-Medium resuspendiert und eine 1:10 Verdünnung ausgezählt. Die Vorkultur wurde auf eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in einer belüfteten Kulturflasche mit vorgewärmtem Blutform-Kulturmedium angesetzt. Nach einer *lag*-Phase gehen die Zellen zu einer Phase des exponentiellen Wachstums über und nach circa 16 h, bei einer Zelldichte von 8×10^5 bis $1,0 \times 10^6$ ml⁻¹, wurde aus dieser Vorkultur durch Verdünnung die Hauptkultur für die jeweiligen Experimente mit $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml gestartet. Dauerkulturen wurden täglich verdünnt, so dass die Zelldichte stets zwischen 1e5 Zellen/ml und 1e6 Zellen/ml lag. Die Generationszeit betrug

etwa 8 h. Nach circa 36 h bei einer Zelldichte von circa $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml erreichte die Hauptkultur die stationäre Phase, um dann in die Absterbephase überzugehen. Zur Kultivierung der Zellen wurden Kulturflaschen verwendet, die über einen Sterilfilter den Gasaustausch mit der im Brutschrank herrschenden Atmosphäre gewährleisten. Um ein optimales Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu erreichen, wurden 5-10 ml (20-30 ml, 50-60 ml) Kulturen in T-25 (T-75, T-125)-Flaschen gefüllt.

Blutform-Trypanosomen (BF SMB)

Die Kultivierung erfolgte analog BF 221. Der alleinige Unterschied ist der Zusatz des Selektionsantibiotikums G418 während der Kultivierung, der die Aufrechterhaltung der Expression der T7 RNA-Polymerase und des Tetracyclin Repressors sicherstellte. Ausgehend von einer sterilen 50 mg/ml G418-Stammlösung wurde ein mit 0,4 $\mu\text{l}/10$ ml supplementiertes BF-Medium verwendet; das heißt die finale G418-Konzentration betrug 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die SMB-Kulturstabilate enthielten kein G418. Beim Ansetzen einer Kultur aus einem Stabilat wurde das Antibiotikum erst 6 h nach Ansetzen der Vorkultur hinzugegeben.

Procyclische Trypanosomen (PC 221)

Die Zellen wurden bei 27°C in Suspension in PC-Medium kultiviert. Das Ansetzen der Vor- und Hauptkultur aus Stabilaten erfolgte analog den Blutformstabilaten. Zu beachten galt es, dass die Zelldichte $1,0 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ nicht überschritten werden sollte. Beim Verdünnen musste darauf geachtet werden, dass die Zelldichte nicht unter $1,0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ lag. Auf diese Weise konnten so genannte Dauerkulturen von procyclischen Trypanosomen angelegt werden, die über mehrere Wochen verwendet wurden. Die Zellen durchliefen etwa alle 10,5 h eine komplette Zellteilung.

Procyclische Trypanosomen (PC 1313-514)

Die Kultivierung erfolgte analog PC 221. Der einzige Unterschied ist der Zusatz der Selektionsantibiotika G418 und Phleomycin während der Kultivierung, die die Aufrechterhaltung der Expression des Tetracyclin Repressors und der T7 RNA-Polymerase sicherstellte. Ausgehend von einer sterilen 50 mg/ml G418-Stammlösung und einer sterilen 2,5 mg/ml Phleomycin-Stammlösung wurde ein mit 10 $\mu\text{l}/10$ ml beziehungsweise 20 $\mu\text{l}/10$ ml supplementiertes PC-Medium verwendet; das heißt die finalen G418- und Phleomycin-Konzentration betragen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die PC 1313-514 Kulturstabilate enthielten kein G418 und Phleomycin. Beim Ansetzen einer Kultur aus einem Stabilat wurden die Antibiotika G418 und Phleomycin erst 6 h nach Ansetzen der Vorkultur zugegeben.

Procyclische Trypanosomen (PC 29-13)

Die Kultivierung erfolgte analog PC 221. Der alleinige Unterschied ist der Zusatz der Selektionsantibiotika G418 und HYG während der Kultivierung, die die Aufrechterhaltung der Expression der T7 RNA-Polymerase und des Tetracyclin-Repressors sicherstellte. Ausgehend von einer sterilen 50 mg/ml G418-Stammlösung und einer sterilen 50 mg/ml HYG-Stammlösung wurde ein mit 3 $\mu\text{l}/10$ ml beziehungsweise 10 $\mu\text{l}/10$ ml supplementiertes PC-Medium verwendet, das heißt, die finalen G418 und HYG Konzentration betragen 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die PC 29-13 Kulturstabilate enthielten kein G418 und HYG. Beim Ansetzen einer Kultur aus einem Stabilat wurden die Antibiotika G418 und HYG erst 6 h nach Ansetzen der Vorkultur zugegeben.

3.2.1.1.2 Stabilatherstellung

Blutform-Trypanosomen (BF 221)

Ein in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrtes Stabilat für die Infektion von Ratten und Mäusen (Rattenstabilat) wurde unter handwarmem Wasser innerhalb von zwei Minuten aufgetaut und mit eiskaltem Citrat-Glucose-Anticoagulans (CGA) auf eine Zelldichte von $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Eine mittels CO₂ betäubte Ratte wurde mit je 500 µl links- und rechtsseitig mittels intraperitonealer Injektion infiziert.

Zur Kontrolle der Parasitämie wurden 5 µl Blut aus der Schwanzvene mit 995 µl CGA verdünnt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Normalerweise erreichte die Parasitämie nach 2,5 Tagen 5×10^8 bis 1×10^9 Zellen pro ml Blut. Um die Ratte zu präparieren, wurde sie mittels CO₂ eingeschläfert, der Thorax mit einer Schere geöffnet und mit einigen ml eiskaltem CGA der Brustraum gespült. Nun wurde die Vena cava inferior durchtrennt und das in den Brustraum austretende Blut mit einer Pasteurpipette in ein 15 ml Falcon-Tube überführt. Das Gefäßsystem wurde durch Punktion des linken Ventrikels mit zusätzlichen 10 ml CGA gespült. Das gewonnene Blut mit Trypanosomen wurde stets bei 4°C weiter verarbeitet.

Zur Herstellung von Rattenstabilaten wurde die Zelldichte der Trypanosomen im gewonnenen Blut mittels 4°C eiskaltem CGA auf circa 5×10^8 Zellen/ml eingestellt, im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt, in 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert und diese zum schonenden Einfrieren zuerst für 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Stabilate zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Herstellung von Kulturstabilaten wurde das gewonnene Blut für 10-15 min bei 4°C und 1.300 g zentrifugiert, so dass das Blutplasma und die zellulären Blutbestandteile sichtbar voneinander getrennt erschienen. Der durchsichtige Blutplasmaüberstand wurde verworfen und der über den roten Blutkörperchen geschichtete weiße *buffy coat* wurde mittels Pasteurpipette abgenommen und in 4 ml eiskaltem CGA resuspendiert. Der *buffy coat* enthält unter anderem die Trypanosomen. Nach Zugabe von 6 ml eiskaltem BF-Medium und 2 ml eiskaltem Canusal (entsprechend 200 U Heparin) wurde die Zellsuspension ausgezählt, auf eine Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml eingestellt und analog den BF-Rattenstabilaten eingefroren.

Kultivierung von BF 221 direkt nach steriler Isolierung aus dem Blut: Falls das direkte Weiterarbeiten mit großen Mengen an Trypanosomen gewünscht war, wurde nach dem Zentrifugieren des Rattenblutes der *buffy coat* mittels Pasteurpipette abgenommen und in 3 ml Separationspuffer (pH 8) resuspendiert. Bei alkalischem pH erscheinen die im *buffy coat* enthaltenen Trypanosomen aufgrund des VSG-Mantels neutral, die Blutzellen aber negativ geladen. Somit konnten die Trypanosomen mittels einer Anionenaustausch-Chromatographie von den Blutzellen getrennt werden. Die Säule aus circa 70 ml Diethylaminoethyl-Sephacel (DEAE-Sephacel) wurde mit 200 ml eiskaltem Separationspuffer äquilibriert und der *buffy coat* aufgetragen. Nach Anlegen eines Wasserstrahlvakuum und gleichzeitigem Spülen der Säule mit eiskaltem Separationspuffer erschienen die Trypanosomen als milchig-trübe Suspension. Dieser Durchlauf wurde erneut bei 4°C zentrifugiert, in BF-Medium aufgenommen, ausgezählt und zur weiteren Verwendung überführt.

Blutform-Trypanosomen (BF SMB)

Eine *in vitro* SMB-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (1×10^6 Zellen/ml) wurde bei 4°C mit 1.300 g für 5 min pelletiert und mit eiskaltem BF-Medium ohne G418 auf eine Zelldichte von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt, in 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert und diese zum schonenden Einfrieren zuerst für 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Stabilate zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt; dass heißt die SMB-Kulturstabilate enthielten kein G418.

Procyclische Trypanosomen (PC 221)

Eine *in vitro* PC-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (2×10^6 Zellen/ml) wurde bei 4°C mit 1.300 g für 5 min pelletiert und mit eiskaltem PC-Medium auf eine Zelldichte von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Zellen wurden 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt, in 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert und diese zum schonenden Einfrieren zuerst für 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Stabilate zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Procyclische Trypanosomen (PC 1313-514)

Eine *in vitro* PC 1313-514 Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (1×10^7 Zellen/ml) wurde bei 4°C mit 1.300 g für 5 min pelletiert und mit eiskaltem PC-Medium ohne G418 und Phleomycin auf eine Zelldichte von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt, in 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert und diese zum schonenden Einfrieren zuerst für 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Stabilate zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Procyclische Trypanosomen (PC 29-13)

Eine *in vitro* PC 29-13 Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (1×10^7 Zellen/ml) wurde bei 4°C mit 1.300 g für 5 min pelletiert und mit eiskaltem PC-Medium ohne G418 und Hygromycin B auf eine Zelldichte von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt, in 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert und diese zum schonenden Einfrieren zuerst für 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Stabilate zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.1.1.3 Transformation

Siehe unter 3.2.4 Herstellung von Knockdown-Trypanosomen.

3.2.1.2 Escherichia coli

3.2.1.2.1 Kultivierung

Flüssigkultur

Es wurden 3 ml LB-Amp-Medium in einem 14 ml Kulturröhrchen mit wenigen Eiskristallen aus Stabilaten inokuliert oder es wurde ein Klon von einer LB-Amp-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in das Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden für 8h bei 37°C und

225 rpm geschüttelt. Für größere Volumina wurden 100 ml in einem 250 ml Schüttelkolben 1:1.000 aus der 3 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht angezogen.

Agarplatten

Für diese Form der wurde LB-Amp Agar steril in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden diese bei 4°C mit der Agarseite nach oben bis zur Benutzung gelagert. Das X-Gal im LB-Amp-Agar ermöglichte das Screening nach Rekombinanten per blau/weiß Selektion. Dazu wurden wenige Mikroliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und mit einer sterilen Pipettenspitze ein Verdünnungsausstrich vorgenommen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C mit der Agarseite nach oben inkubiert.

3.2.1.2.2 Stabilatherstellung

Es wurden 300 µl einer sterilen 50 %igen Glycerinlösung in 2 ml Kryoröhrchen vorgelegt und dann 700 µl einer *Escherichia coli*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase hinzu pipettiert, kurz gemischt und sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Stabilate wurden bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.1.2.3 Transformation

Ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit maximal 5 µl des 20 µl Ligationsansatzes unter Verzicht auf Auf- und Abpipettieren durchmischt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30 sek Hitzeschock im 42°C Wasserbad, 2 min abkühlen auf Eis, Zugabe von 250 µl 37°C warmem SOC Medium, 1 h Inkubation bei 37°C unter Schütteln (225 rpm) und schließlich das Ausplattieren (maximal 200 µl pro Platte) per Drygalski-Spatel auf vorgewärmte LB-Amp-Agarplatten. Nach circa 19 h wurden die Platten auf mögliche Kolonien inspiziert.

3.2.2 Umgang mit Nukleinsäuren

3.2.2.1 Isolierung

Plasmid-DNA

Eine 1,5 ml *Escherichia coli*-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (18 000 g, 1 min), in 150 µl Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert, nach Zugabe von 150 µl Lyse-Puffer S2 (200 mM NaOH, 1 % Natriumdodecylsulfat) behutsam mehrmals invertiert und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 150 µl 4°C kalter Neutralisations-Puffer S3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) zugegeben, vorsichtig 6-8 mal invertiert (Neutralisierung führt zum Fällen der genomischen DNA), das Präzipitat für 10 min bei 18.000 g abzentrifugiert und der Plasmid-DNA enthaltende Überstand in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Isopropanolfällung und das Lösen des Plasmid-Pellets in 50 µl Puffer EB (Tris/HCl 10mM, pH 8,5). Für größere Isolierungen (50-100 ml Übernachtskultur) wurde das NucleoBond PC 100 Plasmid-Midi-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben eingesetzt.

Gesamt-RNA

Nach Herstellerangaben wurde mittels RNeasy Mini Kit die Gesamt-RNA (*total RNA*) isoliert. Die RNA-Probe wurde in 35 µl RNase freiem Wasser gelöst, die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.2 Fällung

Isopropanol DNA-Fällung

Zu 1 Volumen DNA-Lösung wurde 0,7 Volumen Isopropanol hinzugegeben, 5 min bei Raumtemperatur wiederholt invertiert und zum Schluss abzentrifugiert (18.000 g, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (15.000 g, 10 min, RT), für circa 45 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 50 µl TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8) gelöst.

Ethanol DNA-Fällung

Zu 0,9 Volumen DNA-Lösung wurde 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) zugegeben, gevortext, mit 2 Volumen Ethanol (100%) vorsichtig gemischt und dann für 30 min bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde für 15 min bei 4°C mit 18.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde zwei Mal mit je 700 µl -20°C eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in 50 µl Aqua bidest. aufgenommen wurde.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung

Die wässrigen Nukleinsäuren-Verdünnungen wurden in 100 µl UV-Küvetten gegen Wasser als Leerwert bestimmt. Es wurde im linearen Absorptionsbereich zwischen 0,1 und 1,0 bei 260 nm gemessen und eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA beziehungsweise 40 µg/ml ssRNA. Zusätzlich wurden Proteinkontaminationen über den Quotienten Abs₂₆₀ nm/Abs₂₈₀ nm bestimmt, der für reine DNA theoretisch bei 1,8 beziehungsweise für reine RNA bei 2,0 liegt. Alle Messungen wurden automatisiert gegen die Trübung bei 320 nm bereinigt.

Bei wenig Probe mit geringer DNA-Konzentration wurde alternativ eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und die Bandenintensitäten gegen DNA-Größenmarkern bekannter Konzentration verglichen.

3.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente in einfach DNA-Ladepuffer wurden ihren Größen entsprechend in 0,7 bis 2,0 %igen Agarosegelen in einfach TAE Puffer als Laufpuffer elektrophoretisch bei 80 V (8 cm Gel) bis 120 V (16 cm Gel) in Horizontal-Elektrophoresekammern aufgetrennt. Die Gele wurden in einfach TAE Puffer und mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid angesetzt. Das Auftragsvolumen variierte zwischen 12 µl (analytisch) und 50 bis 200 µl (präparativ). Auf jedem Gel wurde auch ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Visualisierung der DNA-Banden mittels UV-Tisch. Analytische Gele wurden fotografiert und bei präparativen Gelen wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt.

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Siehe unter 3.2.5 Northern Blot.

3.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktionen

Reverse Transkription

Aus einer logarithmischen Trypanosomenkultur wurde mittels RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen Gesamt-RNA (rRNAs und mRNAs länger als 200 Basen) gewonnen und dann im Omniscript Reverse Transkriptase Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Reverse Transkriptase ist ein multifunktionales Enzym, das zuerst mit seiner RNA-abhängigen DNA-Polymerase von einem RNA-Matrize cDNA transkribiert und dann mit seiner hybrid-abhängigen Exoribonuklease (RNase H) gezielt nur die RNA in RNA:DNA Hybridsträngen degradiert.

Für die Reverse Transkription wurden einfach Reverse Transkriptase Puffer, 0,5 mM dNTP-Mix (5 mM jedes dNTP/ μ l), 1 μ M Oligo-d(T)18-Primer, 10 U RNaseOUT (40 U/ μ l), 2 μ g RNA und 1 μ l Reverse Transkriptase (4 U/ μ l) in 20 μ l RNase freiem Wasser für 1 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die gewonnene cDNA 1:100 auf \sim 20 ng/ μ l verdünnt.

Primerdesign

Die PCR-Primer wurden unter Mithilfe des Oligo Perfekt Designer [Invitrogen 2009] konzipiert beziehungsweise mit dem *RNAi target selection script* (RNAit) [Redmond et al. 2003], welches die Eignung unterschiedlicher Sequenzen für RNA Interferenz untersucht, ausgewählt. Das TrypanoFAN RNAit Interface kombiniert das Erstellen der Primer mittels Primer3 [Rozen et al. 2000] und die *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Suche [NCBI 2009a] für den Ausschluss von *off-target*-Zielen.

Standard PCR

Für die Klonierung von Genen wurde die AccuPrime Taq High Fidelity DNA Polymerase der Firma Invitrogen verwendet. Für einen 50 μ l Ansatz wurde typischerweise einfach PCR-Puffer (inkl. 2 mM MgCl₂ und 200 μ M dNTP Mix), 200 nM Sense-Primer, 200 nM Antisense-Primer, 100 ng cDNA und 1 U AccuPrime Taq High Fidelity in Aqua bidest. verwendet.

Die AccuPrime Taq High Fidelity DNA-Polymerase war durch den Platinum Taq-Antikörper bei Raumtemperatur inhibiert und erlaubte somit einen automatischen *hot start*.

Initiale Aktivierung	94°C	2 min
3-Schritt Zyklus		
Denaturierung	94°C	30 sec
Anlagerung	T _m -5°C	30 sec
Elongation	68°C	1 min per kb
Anzahl an Zyklen	25-35	
Finale Elongation	68°C	10 min
Ende	4°C	∞

Für alle übrigen PCR-Amplifikationen wurde der HotStarTaq Master Mix der Firma Qiagen verwendet. Ein 50 μ l Ansatz enthielt 25 μ l HotStarTaq Master Mix (2,5 U HotStarTaq, einfach PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M je dNTP), 500 nM Sense-Primer, 500 nM Antisense-Primer, 100 ng cDNA und bidestilliertes Wasser. HotStarTaq DNA Polymerase zeigt keine Polymerase-Aktivität bei Raumtemperatur und erlaubt einen automatischen *hot start*.

Initiale Aktivierung	95°C	15 min
3-Schritt Zyklus		
Denaturierung	94°C	30 sec
Anlagerung	Tm -5°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min per kb
Anzahl an Zyklen	25-35	
Finale Elongation		
Finale Elongation	72°C	10 min
Ende	4°C	∞

Die Amplifikate wurden mittels DNA-Agarose Gelelektrophorese überprüft und gegebenenfalls sequenziert.

Touchdown PCR

Um die Spezifität der PCR-Reaktion beziehungsweise der Primerhybridisierung zu erhöhen wurde die Anlagerungstemperatur ausgehend von einer sehr hohen Temperatur pro Zyklus um einen definierten Wert verringert. Somit vermehrte sich aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung vor allem das gewünschte primerspezifische Amplikon.

Nested PCR

Wenn bei einer PCR die Primer mehr als eine Hybridisierungsstelle fanden, bildete sich ein Gemisch an Amplifikaten. Manchmal wurde, anstatt die PCR durch Anpassung verschiedener Parameter (Anlagerungstemperatur, Mg²⁺-Konzentration, Primerkonzentration, Matrizenkonzentration) zu optimieren, ein zweiter, das heißt verschachtelter, PCR-Lauf mit einem zweiten Paar an Primern durchgeführt. Dieses zweite Paar an Primern amplifizierte ein sekundäres Fragment innerhalb des erwünschten ersten Amplifikats.

3.2.2.6 DNA-Modifikationen

DNA-Restriktionsverdau

Die DNA wurde nach Herstellerangaben mit Restriktionsendonukleasen in 20 µl geeignetem Puffer (analytisch) verdaut, Das heißt 1 µg DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym pro Schnittstelle für 1 h inkubiert. Für größere Verdau in 100 µl geeignetem Puffer (präparativ) wurde die vom Hersteller angegeben spezifische Übernachtverdau-Enzymkonzentration eingesetzt. Die Restriktionsverdau wurden entweder nach Herstellerangabe hitzeinaktiviert oder per Agarosegelelextraktion aufgereinigt.

Klenow-Reaktion

Überhänge von Restriktionsendonukleasen oder von Taq-Polymerasen (3' A-Überhang) wurden mit dem Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I ohne 5' → 3' Exonuklease) geglättet. 2 µg DNA in einfach Klenow Puffer mit 0,05 mM dNTP Mix und 5 U Klenow Enzym wurden in 20 µl für 10 min bei 37°C inkubiert, anschließend für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert und dann mittels Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt.

Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um die Rezirkularisierung des Plasmids bei Klonierungen zu vermeiden, wurde linearisierter Vektor für 1 h bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase aus dem Rind (CIP) dephosphoryliert. 1 µg DNA wurde in einfach CIP-Puffer mit 0,5 U CIP für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 60°C hitzeinaktiviert und per Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt.

Phosphorylierung von 5'-Enden

Gekaufte Oligonukleotide (Primer) haben herstellungsbedingt am 5'-Ende keine frei Phosphatgruppe mehr. Deshalb wurden zu klonierende PCR-Produkte, die nicht einem Restriktionsverdau unterzogen wurden, mit T4 Polynukleotidkinase behandelt. In einem 20 µl Ansatz wurde eine entsprechende Menge Amplikon (20 pmol 5'-Enden) in einfach T4 Polynukleotidkinase Reaktionspuffer A mit 1 mM ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert und die DNA mittels Gelextraktion aufgereinigt.

Ligation

Für das Verhältnis von Vektor zu Insert mussten die pmol Enden/µg DNA berechnet werden. Dazu bedurfte es der molaren Stoffmengen der eingesetzten DNA, welche sich aus der Masse der Basenpaare berechnen ließ. Die Molmasse eines Desoxynukleosidmonophosphats (dNMP) beträgt durchschnittlich 326 g/mol, das heißt $3,3 \times 10^{-4}$ µg/pmol, oder reziprok 3030 pmol/µg. Für die pmol Enden/µg linearisierter DNA musste demnach 3030 durch die Anzahl der Nukleotide des DNA-Fragments geteilt werden.

Kohäsive Enden Ligation

Es wurde 50 ng linearisierter Vektor im Molverhältnis 1:3 mit DNA-Insert in einfach T4 Ligase-Puffer inklusive 0,5 mM ATP mit 2 U T4 DNA-Ligase (10 U/µl) in 20 µl gemischt und 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C ligiert. 50 µl chemisch kompetente *Escherichia coli* wurden mit 5µl des Ligationsansatzes transformiert.

Glatte Enden Ligation

Es wurde 50 ng linearisierter Vektor im Molverhältnis 1:5 mit DNA-Insert mit 10 U T4 DNA-Ligase (30 U/µl) und 2µl 50% Polyethylenglycol 4000 -Lösung in 20 µl einfach T4 Ligase-Puffer gemischt und 1 h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C ligiert. Mit der rekombinanten DNA wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* transformiert.

PCR-Ligation

Die Ligation von zwei PCR-Produkten ließ sich unter PCR-Bedingungen durchführen, wenn der Antisense-Primer des ersten Produktes und der Sense-Primer des zweiten Produktes zueinander komplementäre Ankersequenzen beinhalteten. Beide PCR-Produkte wurden getrennt voneinander amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend wurden sie im Molverhältnis 1:1 gemischt und in einer HotStarTaq MasterMix-PCR ohne zusätzliche DNA-Matrize oder Primer miteinander ligiert. Das neu entstandene Produkt wurde anschließend in ein Plasmid inkloniert.

3.2.2.7 Klonierung

Klonierungen allgemein

Falls nicht anders erwähnt, wurden mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Stücke immer per Gelextraktion aufgereinigt. Bei Klonierungen mit glatten Enden (*blunt ends*) wurde der Amplikoneinbau immer auf die richtige Orientierung hin überprüft.

TA-Klonierungen

Bei einer TA-Klonierung weißt der linearisierte Vektor am jeweiligen 3'-Ende ein überhängendes Thymidin (T) auf. Das einzuklonierende PCR-Produkt wurde mittels Taq DNA-Polymerase amplifiziert; sie verfügt über eine terminale Transferase Aktivität, die ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an beide 3' Ende des PCR-Produktes anhängt. Die kohäsiven Enden (*sticky ends*) von Vektor und Insert passen somit zueinander und können mittels T4 DNA-Ligase miteinander verschmolzen werden.

3.2.2.8 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR-Produkt wurden bei der Firma GATC Biotech in Auftrag gegeben. Plasmid-DNA wurde mittels QIAprep Miniprep Plasmidisolierung der Firma Qiagen und PCR-Produkte per QIAquick Spin Gelextraktion der Firma Qiagen aufgereinigt und je 30 µl mit einer Konzentration von 30-100 ng/µl beziehungsweise 10-50 ng/µl zur Firma GATC Biotech eingeschickt. Die Sequenzierungs-Chromatogramme wurden alle nochmals von Hand überprüft und die FASTA-Daten mittels *BLAST 2 Sequences* [NCBI 2009b] mit den in der Trypanosomen-Genomdatenbank [GeneDB 2009] hinterlegten Sequenzen abgeglichen.

Sequenzanalysen wie Restriktionsvorhersagen *in silico*, Nukleotid-Sequenzvergleiche, phylogenetische Stammbäume, Translationen und Protein-Sequenzvergleiche wurde in der Software DNAMAN der Firma Lynnon durchgeführt.

3.2.3 Immunfluoreszenz

Je Probe wurden 1×10^6 Zellen entnommen und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl PBS und 300 µl Fixierungslösung aufgenommen, durch behutsames Invertieren gemischt und 2 h bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden 20 sek bei 13.000 rpm abzentrifugiert und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde zuerst in 500 µl Natriumphosphat-Glycin-Puffer aufgenommen und 15 min inkubiert. Zur Permeabilisierung erfolgte eine Inkubation für weitere 5 min nach Zugabe von 500 µl 0,2 %iger Triton X100 in PBS - Lösung. Nach 5 min wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS mit 1% BSA gewaschen und in 100 µl Erstantikörperlösung, verdünnt in PBS mit 1% BSA, resuspendiert. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 µl der entsprechenden Zweitantikörperlösung resuspendiert und wiederum 1 h bei 4°C inkubiert.

Um Kern und Kinetoplast anzufärben, wurde 1 µl einer frischen Bisbenzimid-Stammlösung (1mg/ml) zugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS und zweimal mit Aqua dest. gewaschen, das Pellet in 50 µl aufgenommen und je 10 µl auf einen Immunoslide (beschichteter Objektträger mit Vertiefungen) aufgegeben.

Die Proben wurden getrocknet, in Immu-Mount eingebettet und unter dem Mikroskop (Olympus BH2 RFCA) betrachtet. Photos wurden mit der Kamera Olympus U-PMTVC dokumentiert und die Bilder mittels Adobe Photoshop 6.0 bearbeitet.

3.2.4 Herstellung von Knockdown-Trypanosomen

Transfektion und Selektion

Procyclische Zellen

2,5e7 PC 1313-514 Zellen in PC-Medium mit 50 µg/ml G418 und 5 µg/ml Phleomycin wurden 10 min bei 1.300 g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml eisgekühltem PC-Transfektionsmedium gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 440 µl PC-Transfektionsmedium resuspendiert und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Sodann wurden circa 10 µl (10 bis 20 µg) durch Restriktionsendonuklease NotI linearisierter RNAi-Vektor steril zugegeben, durch auf- und abpipettieren durchmischt und im Abstand von 10 sek mit einem Bio-Rad GenePulser XCell zwei Mal ein *square wave*-Puls von 1,4 kV mit 25 µF und $\infty \Omega$ gesetzt. Die 450 µl elektroporierten Zellen wurden in 36 ml vorgewärmtes PC-Medium (50 % frisches PC-Medium, 50 % konditioniertes PC-Medium) überführt, die Zellzahl ausgezählt (~2,5e5 Zellen/ml) und dann 6 h bei 27°C inkubiert.

Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden 50 µg/ml G418 und 5 µg/ml Phleomycin und 15 µg/ml Hygromycin B zugegeben. Die Kultur wurde auf 24-well-Platten verteilt (1 ml/well) und für mehrere Tage ungestört inkubiert. Nach 9 bis 12 Tagen wurden *wells* mit klonalen Zelllinien ausgezählt und bevor die Zellzahl 1e6 Zellen/ml erreichte, wurden sie durch schrittweise Verdünnung mit PC-Medium in größere Volumina überführt.

Blutformzellen

2,5e7 SMB-Zellen in HMI-9 Medium mit 2 µg/ml G418 wurden 10 min bei 1.300 g und 4°C abzentrifugiert und in 25 ml eisgekühltem BF-Transfektionsmedium gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 440 µl BF-Transfektionsmedium resuspendiert. Die Zelldichte wurde aus einer 1:100 Verdünnung ermittelt. Etwa 10 µl (10 bis 12 µg) NotI linearisierter Vektor wurde zugegeben und die Zellsuspension in eine kalte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Ein Puls von 1,4 kV, 25 µF und $\infty \Omega$ wurde gesetzt und die 450 µl elektroporierten Zellen in 36 ml vorgewärmtes HMI-9 überführt, die Zellzahl ausgezählt (~2,5e5 Zellen/ml) und dann 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden 2 µg/ml G418 und 2.5 µg/ml Hygromycin B zugegeben. Die Kultur wurde auf 24-well-Platten verteilt (1 ml/well) und für 5 Tage ungestört inkubiert. Nach 5 bis 6 Tagen wurden Vertiefungen mit klonalen Zelllinien ausgezählt und bevor die Zellzahl 1e6 Zellen/ml erreichte wurden sie durch schrittweise Verdünnung in größere Volumina überführt. Ab einem Volumen von 10 ml wurde von HMI-9-Medium auf normales Blutform-Medium gewechselt.

Induzierung

Die Kulturen wurden mit 500-1.000 ng/ml Tetracyclin [Djikeng et al. 2004] für 3 Tage induziert und dann für Untersuchungen eingesetzt. Da die Halbwertszeit von Tetracyclin im Medium nur 24 h beträgt, wurden die Kulturen alle 24 h, das heißt zeitgleich mit dem Verdünnen der Kulturen auf 1e5 Zellen/ml, erneut mit 500-1.000 ng/ml Tetracyclin versetzt.

Knockdown-Verifizierung

Von drei Tage lang induzierten 50 ml Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (0,8 bis $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 17,5 ml zur Membranprotein Isolierung und 32,5 ml zur Gesamt-RNA-Isolierung eingesetzt.

3.2.5 Northern Blot

Alle für Arbeiten mit RNA verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit RNase freiem Wasser angesetzt. Die eingesetzten Geräte und Materialien wurden vor Gebrauch mit 0,1 M NaOH gewaschen und dann mit RNase freiem Wasser gespült.

Probenvorbereitung

32,5 ml einer Trypanosomenkultur in der logarithmischen Wachstumsphase (0,8 bis $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden für 5 min bei 4°C mit 1.300 g abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und dann wurde nach Herstellerangaben mittels RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in 35 µl RNase freiem Wasser gelöst, die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und bei -20°C aufbewahrt.

RNA-Gelelektrophorese

Es wurde ein 16 x 16 cm 1,2 %iges 250 ml RNA-Agarosegel in einfach FA Gel Puffer angesetzt, wobei die 3.600 µl Formaldehyd (37 %) und der 5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) unter dem Abzug zur gelösten Agarose zugegeben wurden. 12 µg RNA (1 µg/µl) wurden mit 3 µl fünffach denaturierendem RNA-Ladepuffer gemischt, 5 min bei 65°C erhitzt, anschließend auf Eis schnell heruntergekühlt und dann für 3 h bei 120 V einer Elektrophorese in einfach FA Gel Laufpuffer (100 ml/l FA Gel Puffer 10x, 20 ml/l Formaldehyd 37%) unterzogen. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert und die Laufstrecke der drei prominenten rRNA-Banden (2250 b, 1850 b und 1350 b) wurde gemessen. Es waren drei Banden, anstelle der üblichen zwei, da in Trypanosomen die große ribosomale RNA in zwei kleineren Bruchstücken vorlag. Diese drei machten rund 90% der Gesamt-RNA aus und dienten nebenbei als Ladekontrolle.

Blotting

Sandwich-Diffusions-Kapillarblot

Zum Blotten wurde die Gelkammer Blue Marine 200 mit SSC 20x gefüllt und die Gelschale invertiert eingesetzt. Ein passender Streifen und 6 Blatt Whatman-Papier (3 mm) sowie eine Hybond-N+ Nylonmembran der Firma Amersham wurden in SSC 20x angefeuchtet beziehungsweise für 1 h äquilibriert. Der Streifen Whatman-Papier wurde über die Gelschale gelegt, so dass beide Ende des Streifens in die gefüllte Gelkammer eintauchen. Mittig auf die Gelschale wurden nacheinander folgende Materialien aufeinander geschichtet: 3 Blatt angefeuchtetes Whatman-Papier, das Gel mit der Oberseiten nach unten zeigend, die äquilibrierte Membran, 3 Blatt angefeuchtetes Whatman-Papier, und ein dicker Stapel trockenes Papier. Dieses Sandwich wurde mit Gewichten beschwert und über Nacht stehen gelassen. Der RNA-Kapillartransfer erfolgte über Nacht. Nach 18 bis 24 h wurde der Blot entnommen, zweimal kurz in SSC 2x gewaschen und unter Lichtausschluss getrocknet. Das Cross-Linking zur Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte mit einem UV Crosslinker CL-1000.

RNA-Dot-Blot

Zum Blotten wurde ein an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossener Bio-Dot Microfiltration Apparat verwendet. Es wurden 2 µg Gesamt-RNA in 10 µl RNase freiem Wasser pro Dot [Djikeng et al. 2004] mit 20 µl Formamid, 7 µl Formaldehyd und 2 µl SSC 20x zum Denaturieren versetzt und 15 min bei 68°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit 78 µl SSC 20x komplettiert. Eine Nylonmembran (Hybond-N+) wurde zugeschnitten, 1 h in SSC 20x gewässert und in die Bio-Rad Bio-Dot Apparatur für Dot-Blots eingespannt. Alle Kammern der Apparatur wurden gefüllt und mittels des Wasserstrahl-Vakuums durch die Membran entleert. Alle Kammern wurden zweimal mit 1 ml SSC 10x gewaschen, danach die Proben aufgetragen, abgesaugt und wieder zweimal mit 1 ml SSC 10x gewaschen. Die Dots wurden 5 min im Wasserstrahl-Vakuum vorgetrocknet, die Nitrocellulosemembran entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss getrocknet. Die Fixierung der RNA erfolgte beidseitig für je 150 Sekunden unter UV-Licht (230 nm).

Sondenherstellung und Markierung mit ³²P

Die Herstellung der unmarkierten Sonden erfolgte mittels Reverser Transkriptase PCR. Die reverse Transkription der Matrizen-RNA erfolgte mit dem Omniscript Reverse Transkriptase Kit der Firma Qiagen und die PCR mit dem HotStarTaq Master Mix Kit der Firma Qiagen jeweils nach Herstellerangaben. Die PCR-Produkte wurden zur Größenbestimmung einer DNA-Elektrophorese unterzogen und mittels QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die PCR-Fragmente wurden bis zur Sondenherstellung, die unmittelbar vor der Northern Blot Hybridisierung stattfand, bei -20°C gelagert. Die Synthese der α-³²P-dATP markierten Sonden mittels des HexaLabel DNA Labeling Kits der Firma Fermentas, des Megaprime DNA labeling system Kits der Firma Amersham oder des NEBlot DNA labeling Kits der Firma New England BioLabs.

Alle drei Kits basierten auf dem Einsatz randomisierter Oligodesoxynukleotidprimer, die denaturierte Matrizen-DNA an multiplen Stellen binden. Die Kits wurden mit jeweils 40 ng Matrizen-DNA nach Herstellerangabe eingesetzt. Für das NEBlot Kit bedeutete das beispielsweise, dass 40 ng Matrizen-DNA auf 33 µl verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert wurden. Sofortige 5-minütige Eiskühlung verhinderte eine Wiederanlagerung komplementärer DNA-Stränge. Nacheinander 5 µl zehnfach Labeling Puffer mit Octadesoxyribonukleotiden (7,5 o.u./ml), jeweils 2 µl dTTP (0,5 mM), dGTP (0,5 mM), dCTP (0,5 mM), 5 µl α-³²P-dATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml entsprechend 370 MBq), sowie 1 µl (5 U/µl) DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment - 3' → 5' exo⁻) zugegeben. Die Kettenverlängerung erfolgte für 60 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA (pH 8.0) gestoppt. Der Ansatz wurde erneut 5 min auf 95°C erhitzt und bis zur Hybridisierung auf Eis gelagert.

Hybridisierung, Exposition und Entwicklung

Für die Hybridisierung wurde zunächst 1 % BSA in 50 ml Hybridmix NaPi gelöst und mit 100 µg/ml Lachssperma, das für 5 min bei 95°C denaturiert wurden, versetzt. Darin wurde der Blot mit der quervernetzten RNA circa 10 min geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurde der 50 µl Ansatz der *random-primed* ³²P-markierten Sonde hinzupipettiert und der Blot darin über Nacht unter Schütteln hybridisiert. Alle Schritte erfolgten bei 68°C im Schüttel-Wasserbad. Am nächsten Tag wurde der Blot für je 20 min einmal mit 0,5% BSA in 50 ml Pi-Wash und zweimal mit 50 ml Pi-Wash gewaschen, die gebundene Aktivität und die örtliche Hintergrundstrahlung mit einem Geiger-Müller-Zähler gemessen.

Der Blot wurde in eine Frischhaltefolie eingepackt, unter Rotlicht zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Entwicklerkassette gelegt und für mehrere Stunden bei -70°C exponiert. Die erforderliche Belichtungszeit wurde anhand der gemessenen *impacts per second* (IPS) berechnet (110 IPS entsprechen 5 h). Die Entwicklung erfolgte mit einem Röntgenentwickler SRX-101A der Firma Konica.

Stripping

Für den Fall, dass der Blot mit weiteren Sonden hybridisiert werden sollte, wurde die Membran gestrippt. Dafür wurde der Blot dreimal für 20 min bei 68°C in je 50 ml Stripping Puffer gewaschen.

Auswertung

Die entwickelten Filme wurden mit der Software Quantity One Basic der Firma Bio-Rad eingescannt und die Bandenintensitäten quantifiziert. Die betreffenden Banden wurden mit dem rechteckigen *region of interest*-Werkzeug markiert, gegen einen durchschnittlichen Hintergrundbereich bereinigt und die Intensitäten über den markierten Flächeninhalt integriert. Verglichen wurden schließlich die ausgegebenen Volumenintensitäten ($\text{Adj.Vol.INT} \cdot \text{mm}^2$).

3.2.6 Hypoosmolarer Schock

Die Osmolaritäten wurden mit dem Osmometer VAPRO 5520 bestimmt. Zur Kalibrierung und für die Messung des Osmometers wurden ein passendes Filterpapier-Probenscheibchen in den Einzugschacht des Osmometers eingelegt und im Anschluss daran 10 μl Kalibrierlösung beziehungsweise Probe auf das Filterpapier pipettiert. Dann wurde der Einzugschacht in das Gerät geschoben und die Messung startete automatisch. Nach 75 sek konnte die gemessene Osmolarität abgelesen werden.

Etwa $3,5 \times 10^7$ Trypanosomenzellen wurden abzentrifugiert (3.000 rpm, 5 min, 4°C), das Zellpellet einmal in isotonem Earle's Salz Puffer gewaschen und sodann in 650 μl isotonem Earle's-Salz Puffer mit NaCl (300 mosm) aufgenommen und der Phänotyp beschrieben beziehungsweise durch Messung bei 550 nm beschrieben. 100 μl der Tet induzierte Knockdown-Zellen oder der nicht elektroporierte Kontrollzellen in isoosmolarem Puffer (300 mosm) wurden mit einem Volumen Earle's Salz-Puffer (300 mosm) versetzt, was isoosmolaren Bedingungen garantierte. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop für 10 min beschrieben oder der gleichbleibende Normal-Absorptionswert bei 550 nm wurde über einen Zeitraum von einer Minute dokumentiert. Dieser Wert kann beim hypoosmolaren Schock nicht mit dokumentiert werden, da das Anschwellen der Zellen zu schnell geschieht. 500 μl der Tet induzierte Knockdown-Zellen oder der nicht elektroporierte Kontrollzellen in isoosmolarem Puffer (300 mosm) wurden mit einem Volumen Aqua dest. versetzt, was zum hypoosmolaren Schock (150 mosm) zum Zeitpunkt Null führte. Die Absorptionsänderungen wurden unter dem Mikroskop beschrieben oder bei 550 nm alle zwei Sekunden für 15 Minuten mit einem GeneQuant 1300 Spektrophotometer aufgezeichnet.

3.2.7 Enzymassays

Zytotoxizitäts-Test

Das Prinzip dieser Messung beruht auf der photometrischen Bestimmung der Aktivität freigesetzter Saurer Phosphatase [Bodley et al. 1995]. Dabei wurde die Enzymaktivität noch lebender Zellen gemessen, weshalb die betreffenden Kulturen vor der Zugabe des Substrates lysiert wurden.

Für den Versuch wurden Trypanosomen aus Kulturstabilaten in Blutformmedium ohne Phenolrot angezogen und eine Hauptkultur in der späten logarithmischen Phase bei einer Zelldichte von etwa $8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in frischem Medium auf eine Zelldichte von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Aliquots von je $200 \mu\text{l}$ wurden in eine 96-well-Platte pipettiert und die Wirkstoffkonzentrationen mit Hilfe geeigneter Stammlösungen durch Zugabe des jeweils gleichen Volumens auf die angegebenen Werte eingestellt. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass bei der niedrigsten fast alle Zellen überlebten, bei der höchsten jedoch alle abgetötet wurden. Die Standard-Reihe und die Wirkstoffsuspensionen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt. Als Kontrollen dienten die Absorptionen des Mediums ohne Zellen und der Zellsuspension ohne Zusatz. Die Platte wurde für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die *wells* mit je $20 \mu\text{l}$ des p-Nitrophenylphosphat enthaltenden Lysepuffers versetzt und nach 4 weiteren Stunden im Brutschrank die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im MRX II ELISA Reader der Firma Dynex Technologies bestimmt. Die Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol ist direkt proportional zur Zelldichte.

Pyruvatbestimmung

Eine BF-Trypanosomenkultur im logarithmischen Wachstum mit etwa 2×10^7 Zellen wurde abzentrifugiert und zweimal mit kaltem TDB ohne Glucose gewaschen (je 4 min bei 4°C und 1.300 g) und dann auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in TDB ohne Glucose versetzt mit 10 mM Glucose, 10 mM Glycerin oder 5 mM NaCl angesetzt. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in einer Vertiefung einer 12-well-Platte bei 37°C mit 150 rpm geschüttelt. Zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min wurden jeweils $100 \mu\text{l}$ Zellkultur entnommen. Diese wurden mit $10 \mu\text{l}$ 70 %iger Perchlorsäure über Nacht bei 4°C gefällt, abzentrifugiert (1 min , 13.000 rpm) und der Überstand zur Messung eingesetzt. Zusätzlich wurde zu jedem Zeitpunkt die Zellzahl durch Auszählen mit der Zählkammer protokolliert.

Die Pyruvatkonzentration wurde enzymatisch mittels der Lactatdehydrogenase-Methode [Hesse 1996] ermittelt. In einer 96 well-Platte wurde als Vierfachbestimmung immer $7,5 \mu\text{l}$ Probe zu $340 \mu\text{l}$ Pyruvatbestimmungs-Reaktionsmix hinzupipettiert, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorptionsabnahme bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ im ELISA Reader MRX II der Firma Dynex Technologies ausgewertet. Die Extinktionsabnahme durch Bildung von NAD^+ war proportional der Pyruvat-Konzentration. Für jede Probe wurde der korrespondierende Leerwert (als Vierfachbestimmung) gemessen, wobei nur die Lactatdehydrogenase aus dem Pyruvatbestimmungs-Reaktionsmix weggelassen wurde. Für die Pyruvat-Standard Reihe, ebenfalls als Vierfachbestimmung, wurden folgende Pyruvat-Konzentrationen in 70 %iger Perchlorsäure gefällt und bestimmt: 0 mM , $0,25 \text{ mM}$, $0,5 \text{ mM}$, 1 mM , $1,5 \text{ mM}$, $2,0 \text{ mM}$, $2,5 \text{ mM}$, $3,0 \text{ mM}$, $3,5 \text{ mM}$, $4,0 \text{ mM}$, $4,5 \text{ mM}$ und 5 mM .

4 Ergebnisse

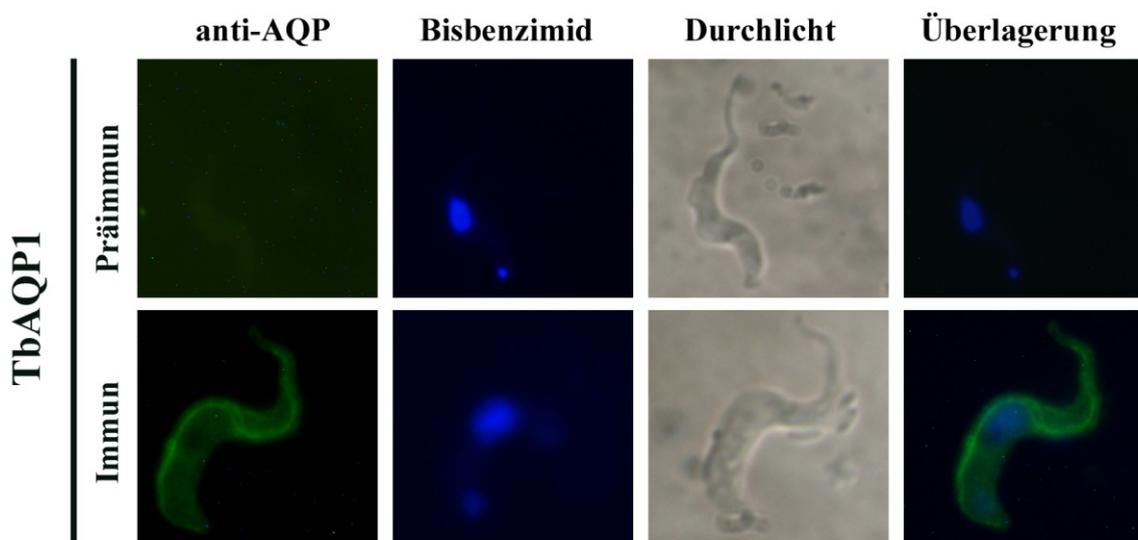
4.1 Lokalisierung der Aquaglyceroporine

4.1.1 Immunfluoreszenz-Aufnahmen

Um Antikörper gegen die trypanosomalen Aquaglyceroporine zu erhalten, wurden kurze Aminosäuresequenzen der TbAQPs für die Peptidsynthese ausgewählt. Die Auswahl war sehr beschränkt, vor allem, da die drei Aquaglyceroporine sich so sehr ähneln. Die Sequenzen waren lang genug, um immunogen zu sein, sie lagen nicht in Transmembrandomänen, sie wiesen keine bekannten posttranslationalen Modifikationsmotive, zum Beispiel für Glycosylierung oder Phosphorylierung, auf und sie waren, verglichen mit den restlichen Trypanosomenproteinen, einzigartig. Die synthetisierten Peptide KINVHQYPSEADVRLKARC (AQP1), CDVQKHEVAEAQEKPV (AQP2) und CEKGTAGVFSTYPRDSN (AQP3) entsprachen Teilstücken aus dem NH₂-Ende von TbAQP1 und TbAQP2 sowie aus der Schleife C von TbAQP3. Sie wurden von der Firma Biogenes zur Immunisierung in Hühnern eingesetzt.

Die erhaltenen TbAQP-Antikörper wurden weiter von Herrn Dr. Kalbacher (Universität Tübingen) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurden die ursprünglich zur Immunisierung verwendeten AQP-Peptide verwendet. Das TbAQP2-Peptid wurde an eine erste Säule gekoppelt und AQP3-Antikörper-Serum über die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde als aufgereinigte TbAQP3-Antikörper verwahrt und das entsprechende Eluat wurde über eine zweite Säule mit gebundenem TbAQP3-Peptid geschickt. Der direkte Durchfluss dieser zweiten Säule wurde als aufgereinigte AQP2-Antikörper aufgehoben. Schließlich wurde AQP1-Antikörper-Serum über die erste Säule, mit gebundenem AQP2-Peptid, geleitet und der Durchfluss sogleich auf die zweite Säule, mit gebundenem AQP3-Peptid, aufgetragen. Der Säulendurchfluss wurde nun als aufgereinigte TbAQP1-Antikörper aufgefangen.

Die aufgereinigten AQP-Antikörper wurden für Immunfluoreszenz-Aufnahmen in BF 221 Trypanosomen eingesetzt, um die genau Verortung der Kanäle zu erhalten. Als Gegenfärbung wurde Bisbenzimid gewählt, das die nukleare und mitochondriale DNA anfärbt.



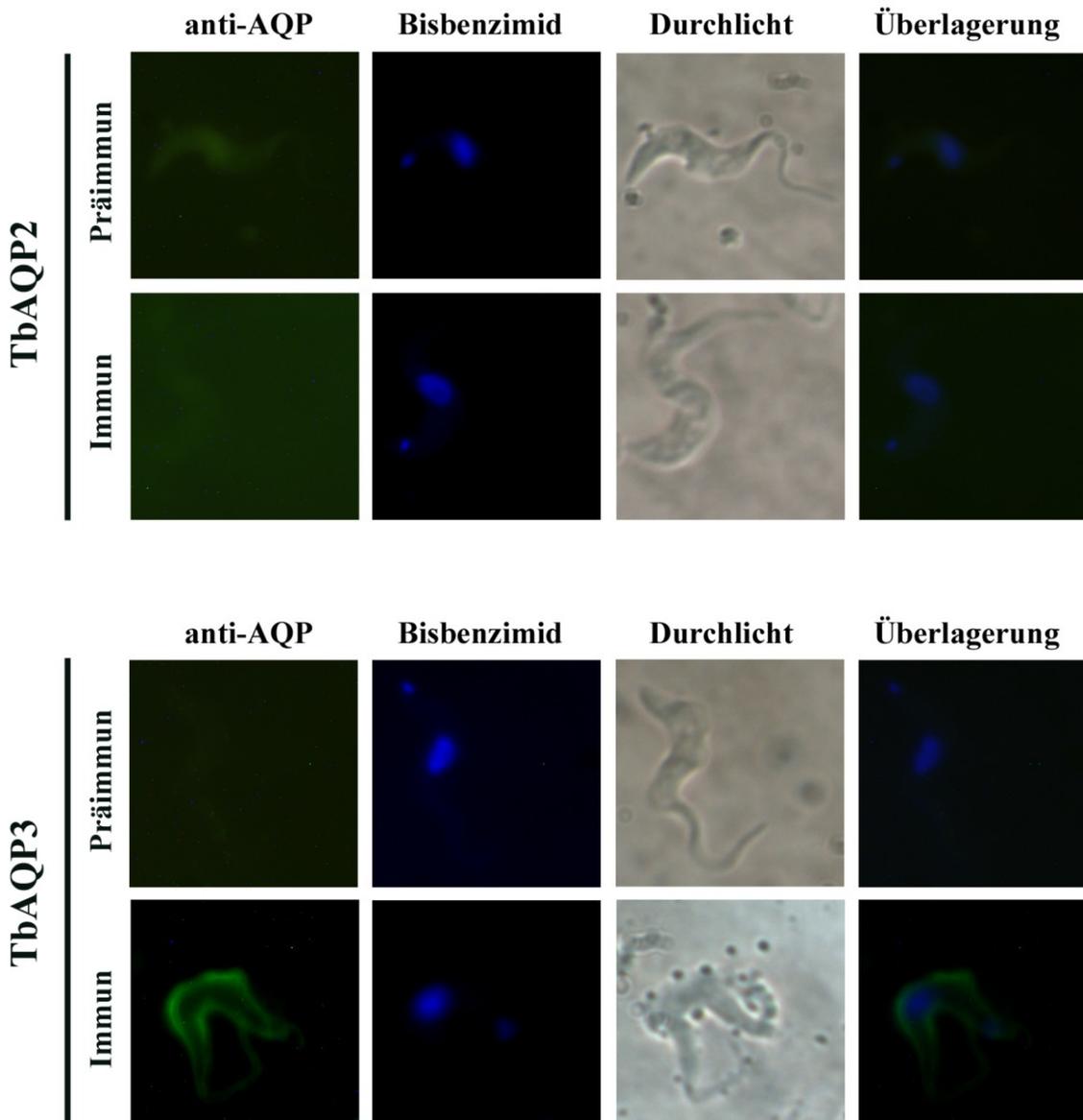


Abbildung 12 BF 221 Immunfluoreszenz-Aufnahmen für AQP1, AQP2 und AQP3. Die Trypanosomen wurden nach Protokoll fixiert, permeabilisiert und mit aufgereinigten Anti-AQP-Antikörpern inkubiert. Dabei wurden die Präimmunsereen 1:200 und die durch die Aufreinigung verdünnten AQP-Primärantikörpern direkt eingesetzt. Es wurde ein FITC-gekoppelter Zweitantikörper verwendet und als Kontrastfärbung wurde mit Bisbenzimid die nukleare und mitochondriale DNA visualisiert.

Die AQP1-Präimmun-Serum Präparation zeigte keine Fluoreszenz, wohingegen die Behandlung mit dem aufgereinigten spezifischen AQP1-Antikörper eine eindeutige Lokalisierung von TbAQP1 in der Flagellummembran zeigte.

Die Kontrollaufnahmen mit AQP2-Präimmun-Serum in BF 221 Zellen zeigten nur eine normale, sehr schwache Hintergrund-Fluoreszenz. Der aufgereinigte Antikörper TbAQP2 führte zu keinerlei Fluoreszenz-Anfärbung, so dass keine Auswertung möglich war. Dies war höchst wahrscheinlich auf die starke Verdünnung des Antikörpers bei der Affinitäts-Aufreinigung zurückzuführen. Die begrenzte Menge an aufgereinigtem TbAQP2-Antikörper ließ eine Einengung aber nicht zu. Das Problem wäre wahrscheinlich durch eine zweite, mengenmäßig größere Aufreinigung zu beheben gewesen.

Stattdessen wurden die fehlenden Immunfluoreszenz-Ergebnisse für TbAQP2 jedoch durch Aufnahmen mit AQP2-Überexpressionszellen komplettiert (siehe Kapitel 4.1.2).

Für TbAQP3, beim Einsatz des Präimmun-Serums, war keine spezifische Anfärbung zu erkennen. Anders sah es aus für den aufgereinigten spezifischen TbAQP3-Antikörper, der eine klare und eindeutige Fluoreszenz-Färbung in der Plasmamembran zeigte.

Beim Einsatz der Antikörper im Western Blot waren die Resultate enttäuschend (Ergebnisse nicht gezeigt). Alle drei trypanosomalen AQP-Antikörper färbten Banden entsprechend dem jeweiligen Aquaglyceroporin-Molekulargewicht, wobei dies aber keine spezifische Bandendetektion darstellte. Es wurde, nach langen Inkubationszeiten, jeweils eine Vielzahl von Banden detektiert, was auf eine unspezifische Bandenfärbung hindeutete. Die trypanosomalen Aquaglyceropore unterscheiden sich nur wenig voneinander (siehe Kapitel 1.2.2), so dass spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes AQP nur über synthetische Peptide gewonnen werden konnten. Diese Antikörper waren in der Lage Aquaglyceropore ausreichend spezifisch zu binden, um aussagekräftige Immunfluoreszenz-Bilder zu ermöglichen, wohingegen die geringe Affinität der Antikörper im Western Blot nicht ausreichte, um bestimmte Aquaglyceropore in Trypanosomenmembran-Fractionen als alleinige Bande zu detektieren.

4.1.2 AQP2-Überexpression

Zum Einschleusen in die Trypanosomen wurde der Überexpressionsvektor pLEW100 ausgewählt, der sich per homologer Rekombination in eine der *rRNA spacer*-Sequenzen des Trypanosomen-Genoms integrierte. Dessen Phleomycin-Resistenz stand unter einem unregulierten T7 Promoter und das einklonierte Genprodukt hatte einen mittels Tet-Operator regulierten Procyclin GPEET Promoter.

Als Trypanosomen wurden PC 29-13 Zellen verwendet, die konstitutiv T7 RNA-Polymerase und Tetracyclin-Repressor unter G418- und HYG-Resistenz exprimieren. Procyclische Trypanosomen sind metabolisch stabiler und insgesamt robuster, so dass sie eine bessere Erfolgsaussicht für das Gelingen einer stabilen Transfektion haben als BF-Trypanosomen. Aus diesem Grund wurden zuerst procyclische Trypanosomen zur Transformation eingesetzt.

4.1.2.1 Klonierung

Die AQP2-Gensequenzen wurden mittels der High Fidelity Pfu DNA-Polymerase, unter Einsatz der Primer AQP2_over_HindIII_se und AQP2_over_BamHI_as, amplifiziert. Die 5'-Enden der PCR-Produkte wurden mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in einen mit SmaI geschnittenen und dephosphorylierten pUC19 Subklonierungsvektor einkloniert. Der gekaufte Vektor pUC19 ist ein *high copy*-Plasmid mit Ampicillin-Resistenz und ist über das Reportergen *lacZ* blau/weiß selektionierbar. Aus dem Subklonierungsvektor wurde das AQP2-Fragment dann mit einem HindIII/BamHI Doppelverdau wieder herausgeschnitten und sogleich in den mit HindIII und BamHI geöffneten und per Gelextraktion aufgereinigten pLEW100 Überexpressionsvektor einligiert, was zu dem Plasmid pLEW100 AQP2_over führte. Der fehlerfreie Einbau wurde durch EcoRV Verdau und mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech bestätigt.

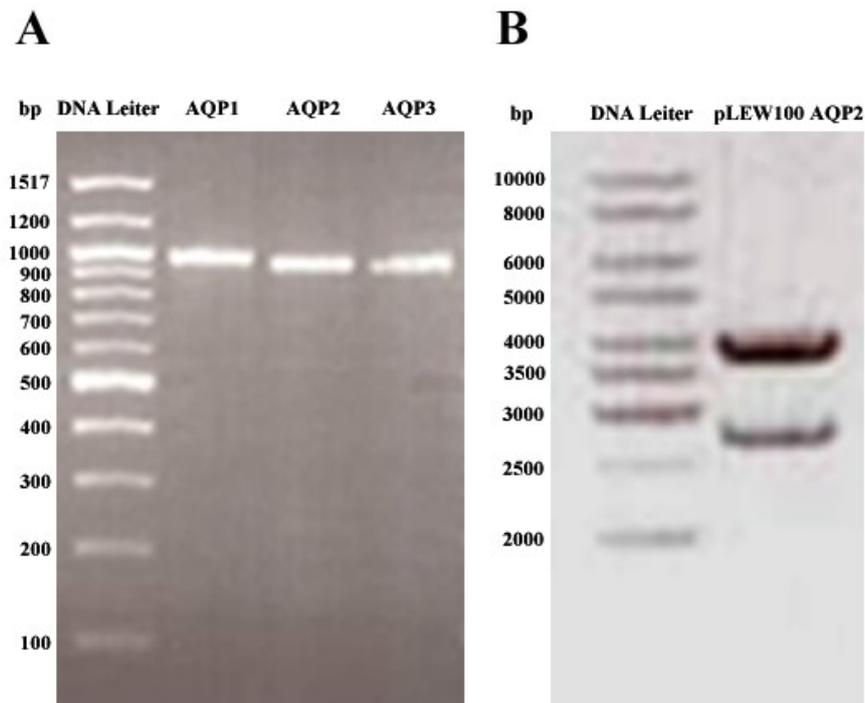


Abbildung 13 A) PCR-Amplikons AQP1, AQP2 und AQP3 B) EcoRV Verdau des Plasmids pLEW100 AQP2_over (6485 bp) ergab folgende Fragmente: 2709 bp & 3776 bp

4.1.2.2 Herstellung der Überexpressions-Trypanosomen

Das NotI linearisierte Plasmid pLEW100 AQP2_over wurde zur Elektroporation in PC 29-13 Zellen eingesetzt.

Diese so hergestellten Zellen ($2,5 \times 10^7$ in PC-Medium mit 15 $\mu\text{g/ml}$ G418 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B) wurden 10 min bei 1.300 g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit je 10 ml eisgekühltem PC-Transfektionsmedium gewaschen, in 440 μl PC-Transfektionsmedium resuspendiert und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Sodann wurden 10 μl (10 μg) NotI linearisierter RNAi-Vektor steril zugegeben, durch auf- und abpipettieren durchmischt und im Abstand von 10 sek mit einem Bio-Rad GenePulser XCell zwei Mal ein *square wave*-Puls von 1,4 kV mit 25 μF und $\infty \Omega$ gesetzt. Die 450 μl elektroporierten Zellen wurden in 36 ml vorgewärmtes PC-Medium (50 % frisches PC-Medium, 50 % konditioniertes PC-Medium) überführt, die Zellzahl ausgezählt (2,5e5 Zellen/ml) und dann 6 h bei 27°C inkubiert. Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden 15 $\mu\text{g/ml}$ G418 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B plus 15 $\mu\text{g/ml}$ Selektionantibiotika Phleomycin zugegeben. Die Kultur wurde auf 24-well-Platten verteilt (1 ml/well) und für mehrere Tage ungestört inkubiert.

Nach neun Tagen wurde ein *well*, in dem eine klonale Zelllinie hochwuchs, ausgewählt, ausgezählt und bevor sie die Zelldichte von 1e6 Zellen/ml erreichte wurden sie durch schrittweise Verdünnung mit PC-Medium inklusive Selektionantibiotika in größere Volumina überführt.

Die Generationszeit der Zellen wurde über drei Tage hinweg bestimmt. Sie betrug $12,3 \pm 2,1$ Stunden. Es wurden Stablate angelegt und Immunfluoreszenz-Aufnahmen angefertigt.

4.1.2.3 Immunfluoreszenz-Aufnahmen

Die AQP2-Überexpression wurde durch Zugabe von 500 ng/ml Tetracyclin zu PC 29-13 AQP2_over Zellen 48 h lang induziert und dann für Immunfluoreszenz-Aufnahmen eingesetzt.

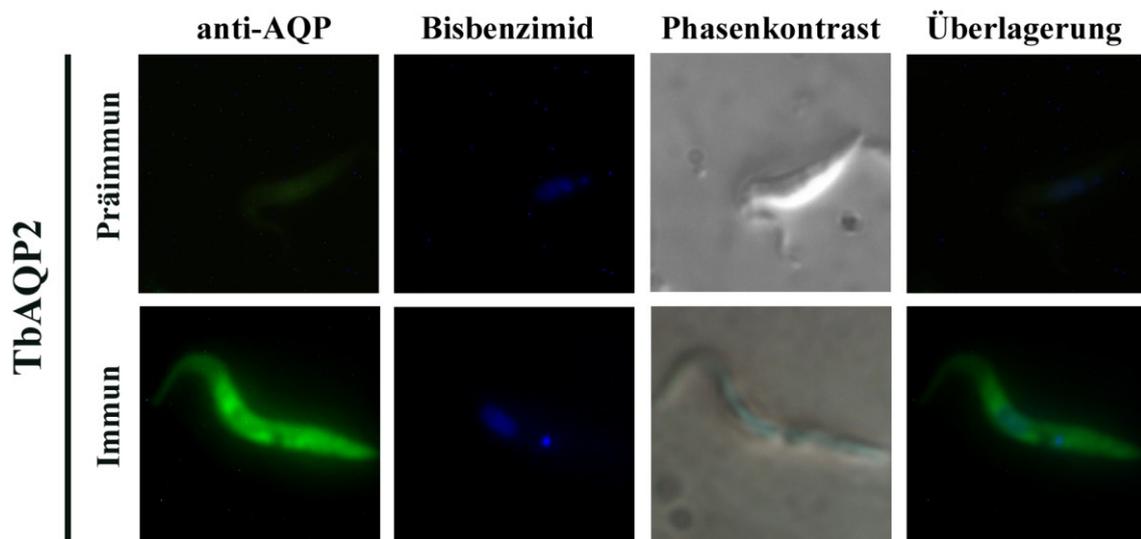


Abbildung 14 Immunfluoreszenz-Aufnahmen für PC 29-13 AQP2 Überexpressions-Trypanosomen. 48 h mit 500 ng/ml induzierte PC 29-13 AQP2_over Zellen wurden nach Protokoll fixiert und permeabilisiert. Sie wurden mit Präimmun-Antiserum und Anti-AQP2 Antikörper, jeweils 1:150 verdünnt, inkubiert. Als Zweitantikörper wurde der monoklonale Anti-Huhn-FITC-Konjugat Antikörper 1:400 eingesetzt und mit Bisbenzimid die DNA angefärbt.

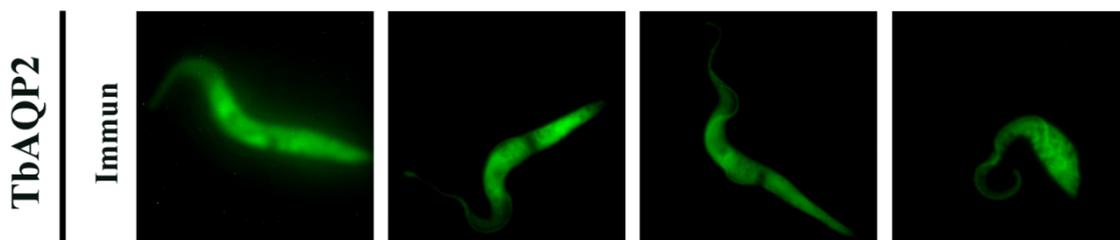


Abbildung 15 Immunfluoreszenz-Aufnahmen für PC 29-13 AQP2 Überexpressions-Trypanosomen..

Die AQP2-Präimmun-Serum-Präparation der induzierten PC 29-13 AQP2-Überexpressions-Trypanosomen zeigte nur eine sehr schwache Hintergrund-Fluoreszenz (Abbildung 14), wohingegen die Behandlung mit dem AQP2-Antikörper eine intrazelluläre Lokalisierung aufzeigt. Eine genauere Festlegung auf bestimmte Organellmembranen gestatteten die Aufnahmen leider nicht (Abbildung 14 und 15). Der AQP2-Antikörper war leider nicht spezifisch genug, um erfolgreich Doppelfärbungen gegen Marker-Proteine für Acidocalcisomen, Glycosomen oder das Endoplasmatische Retikulum durchzuführen (Daten nicht gezeigt). Wie zuvor schon beschrieben (Kapitel 4.1.1) gelangte aufgrund der schlechten AQP2-Antikörper auch mit einer Membran-Fraktion dieser AQP2-Überexpressionszellen keine Detektion im Western Blot.

4.1.2.4 Verifizierung der Überexpression

Die AQP2-Überexpression in PC 29-13 Zellen wurde via Northern Blot dokumentiert.

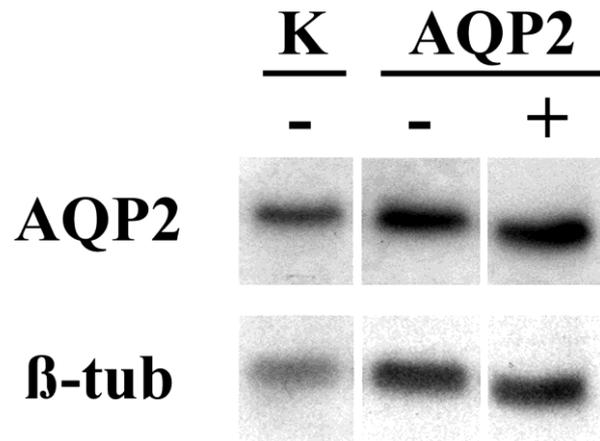


Abbildung 16 Northern Blot für procyclische AQP2-Überexpressions-Trypanosomen. Es wurden je 12 µg isolierte Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Als Negativkontrolle (K) wurden nicht elektroporierte PC 1313-514 Zellen ohne Tetracyclin (-) im Medium verwendet. Der untersuchte PC 29-13 AQP2-Überexpressions-Klon wurde einmal ohne Tetracyclinzugabe (-) und einmal nach zweitägiger Inkubation mit 500 ng Tetracyclin pro Milliliter Medium (+) untersucht.

Die AQP2-mRNA-Bandenintensitäten wurden β-Tubulin-normalisiert und der Wert für die Negativkontrolle K wurde auf 100 % gesetzt. Das Radiogramm zeigte einen AQP2-mRNA-Anstieg auf 217 % für den nicht induzierten Überexpressions-Klon und einen Anstieg auf 229 % für die entsprechende induzierte Kultur. Die nicht induzierten Zellen sind extrem *leaky* und zeigen wie die induzierten Zellen eine etwa dreifache Überexpression von AQP2.

4.1.2.5 Hypoosmotischer Schock

Wurden PC 29-13 Kontrollzellen und induzierte PC 29-13 AQP2-Überexpressionszellen nach Protokoll einem hypoosmolaren Schock (150 mosm) ausgesetzt, so war folgendes zu beobachten:

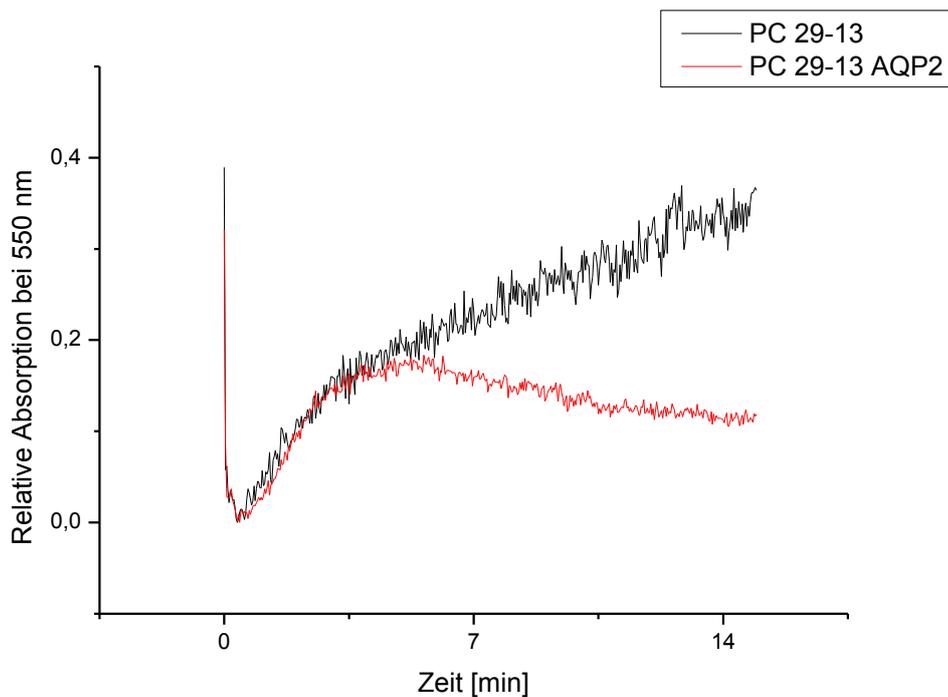


Abbildung 17 Hypoosmolarer Schock (150 mosm). PC 29-13 Kontrollzellen versus PC 29-13 AQP2-Überexpression

Zelllinie	Schwellzeit [sek]	Max. Verschlankung [sek]
PC 29-13	22,0	698
PC 29-13 AQP2	26,0 ± 4,3	274 ± 49

Die induzierten AQP2-Überexpressionszellen unterschieden sich mit ihrer Schwellzeit von $26,0 \pm 4,3$ Sekunden nicht signifikant von den Kontrollzellen. Die Schwellzeit wurde als Zeit definiert, die verstrich, bis die Zellen durch Wassereinstrom maximal geschwollen waren. Einen signifikanten Unterschied gab es aber beim Abschwollen der Zellen. Das Abschwollen der AQP2-Überexpressionszellen blieb circa 3,5 Minuten nach Versuchsstart hinter den Kontrollzellen zurück. Die Zellen erreichten zum Zeitpunkt $t = 274 \pm 49$ Sekunden ihre größte Verschlankung. Unter dem Mikroskop konnte man beobachten, dass weit mehr als die Hälfte der Zellen bewegungslos war und auch später nicht wieder aktiv wurde.

Phänotypische Veränderungen ermöglichen Rückschlüsse über die Lokalisierung und Funktion. Im Folgenden wurden daher weitere Trypanosomen transformiert. Anstatt auf PC- und potentielle BF-Überexpressions-Klone zu setzen, wurde allerdings mit RNA Interferenz-Klonen weiterexperimentiert. Die Funktionsdefizite dieser Klone sollten neue Schlussfolgerungen zulassen.

4.2 AQP-RNAi-Trypanosomen

Im Folgenden wurden RNA Interferenz-Experimente in Trypanosomen durchgeführt. Die Defizit-Phänotypen sollten Rückschlüsse auf die Lokalisation und Funktionen der Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei* zulassen. Es sollte Knockdown-Transformanten für jedes der drei Aquaglyceroporine sowie für den Gesamt-Knockdown alle drei AQPs gleichzeitig generiert werden.

Für die RNA Interferenz-Untersuchungen musste dsRNA in die Trypanosomen eingeschleust werden. Für eine ausführliche Untersuchung des jeweiligen Phänotyps wurden stabile anstatt transienter RNAi-Knockdown-Klone angestrebt. Solche klonalen Zelllinien wurden durch die dauerhafte Integration eines Knockdown-Vektors ins Trypanosomengenom erzielt. Der eingesetzte RNAi-Vektor erlaubte es weiterhin, die Knockdown-Information nicht konstitutiv, sondern Tetracyclin-induzierbar zu transkribieren. Dies ermöglichte die Generation von Knockdown-Zelllinien auch für den Fall, dass der Verlust aller drei (AQP1-3) oder einzelner Aquaglyceroporine letale Folgen hat. Zum Einsatz kam der Trypanosomen-RNAi-Vektor p2T7TAblue [Clayton et al. 2005].

4.2.1 Auswahl der Knockdown-Sequenzen

Die Aussicht auf einen möglichst vollständigen Knockdown erhöht sich mit der Anzahl an verschiedenartigen siRNAs, welche mit der Ziel-mRNA hybridieren können, weshalb die gewählten dsRNA-Knockdown-Sequenzen mehrere hundert Basenpaare lang waren. Für die Einzel-AQP-Knockdowns konnte, aufgrund der hohen Sequenzhomologien der drei TbAQPs miteinander, nur für TbAQP1 eine Knockdown-Sequenz (Nukleotide 130 bis 696) im eigentlichen Aquaglyceroporin-Gen gefunden werden. Die offenen Leserahmen von TbAQP2 und TbAQP3 ähnelten sich so stark (82,8 % identity), dass jede gewählte Nukleotid-Knockdown-Sequenz auch *off-target*-Knockdown-Effekte im jeweils anderen Aquaglyceroporin gehabt hätte. Ein Blick in die Genomdatenbank GeneDB zeigte aber sich stark voneinander unterscheidende Nukleotid-Sequenzen *downstream* der zwei AQP-Gene. Für TbAQP2 und TbAQP3 wurden in der 3'-UTR Nukleotid-Sequenzen für den jeweiligen Knockdown ausgewählt (Nukleotide +175 bis +534 und Nukleotide +175 bis +511); beide Sequenzen konnten aus cDNA amplifiziert werden.

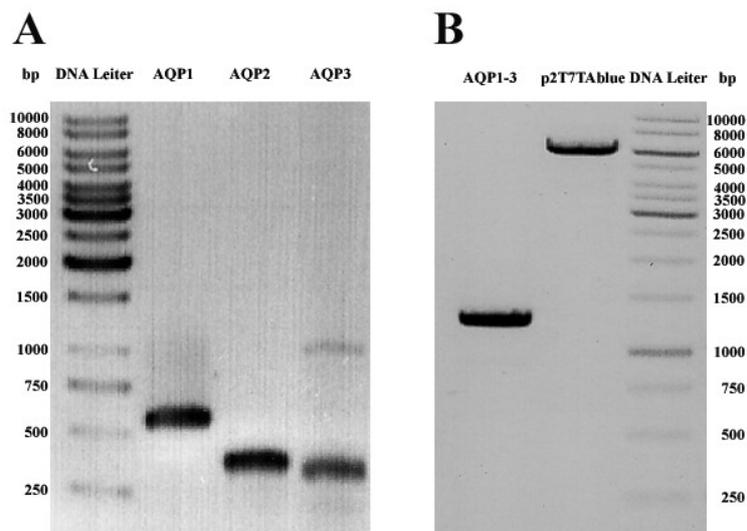


Abbildung 18 A) PCR Knockdown-Fragmente AQP1 (567 bp), AQP2 (360 bp) und AQP3 (337 bp) B) Gesamt-AQP-Knockdown-Fragment (1281 bp) und Vektor p2T7TAblue, Eam11051 geöffnet und aufgereinigt (5921 bp)

Für den gleichzeitigen Knockdown aller drei TbAQPs (Gesamt-AQP-Knockdown) wurden die Sequenzen für die Einzel-AQP-Knockdowns zum Gesamt-AQP-Knockdown-Fragment (1281 bp) aneinander ligiert. Als Knockdown-Positivkontrolle wurde ein Teilstück des α -Tubulin-Gens (Nukleotide 833 bis 1245) in den trypanosomalen RNAi-Vektor inkloniert.

4.2.2 Klonierung der Knockdown-Vektoren

Für die folgenden Klonierungen wurde aus dem RNAi-Vektor p2T7TAbblue (6740 bp) jeweils ein Teilstück des *lacZ* Gens (819 bp) durch Eam1105I Verdau herausgeschnitten, was zu Vektorenden mit einem 3' überhängenden Thymidin passend für TA-Klonierungen führte. Die einzuklonierende Knockdown-Fragmente mit einem überhängenden Adenin am jeweiligen 3'-Ende wurden mittels Taq-DNA-Polymerase in einer PCR amplifiziert. Der fehlerfreie Einbau wurde jeweils mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech bestätigt.

Für den AQP1-Knockdown wurde ein 567 bp langes DNA-Fragment, das den Nukleotiden 130 bis 696 von TbAQP1 entsprach, mit Hilfe der Primer AQP1_RNAi_1x_se und AQP1_RNAi_1x_as amplifiziert. Das PCR-Amplikon wurde in den geöffneten Vektor einligiert.

Für den AQP2-Knockdown wurde ein 360 bp langes DNA-Fragment, das den Nukleotiden +175 bis +534 der 3'-UTR von TbAQP2 entsprach, mit Hilfe der Primer AQP2_RNAi_1x_Taal_se und AQP2_RNAi_1x_Taal_as amplifiziert und in den Subklonierungsvektor pCR2.1-TOPO inkloniert. Das DNA-Fragment wurde über Taal Verdau wieder freigesetzt, was zu einem überhängenden Adenin am jeweiligen 3'-Ende führt. Anschließend wurde das Fragment in den geöffneten RNAi-Vektor einligiert.

Für den AQP3-Knockdown wurde ein 337 bp langes DNA-Fragment, das den Nukleotiden 175 bis 511 der 3'-UTR von TbAQP3 entsprach, mit Hilfe der Primer AQP3_RNAi_1x_Taal_se und AQP3_RNAi_1x_Taal_as amplifiziert und in den Subklonierungsvektor pCR2.1-TOPO eingebracht. Das DNA-Fragment wurde über Taal Verdau wieder freigesetzt, was zu einem überhängenden Adenin am jeweiligen 3'-Ende führte. Anschließend wurde das Fragment in den geöffneten RNAi-Vektor einligiert.

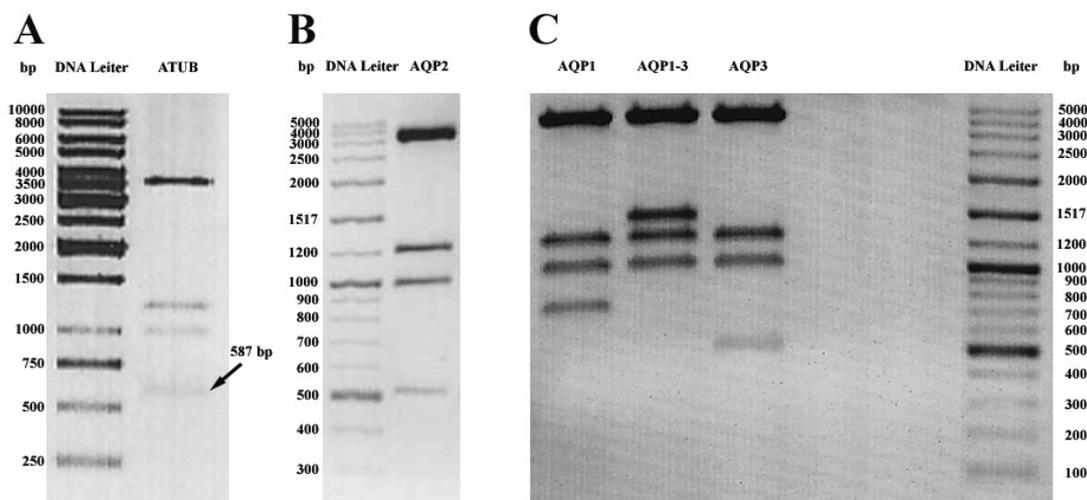


Abbildung 19 Erfolgreiche Verifizierung der Plasmidkonstrukte A) ATUB-Knockdown-Fragment; *Asel* Verdau des Plasmids p2T7TAbblue ATUB (6335 bp) ergab folgende Fragmente: 3506 bp, 1235 bp, 1007 bp, 587 bp B) AQP2-Knockdown-Fragment; *Asel* Verdau des Plasmids p2T7TAbblue AQP2 (6302 bp) ergab folgende Fragmente: 3506 bp, 1235 bp, 1007 bp, 554 bp C) Knockdown-Fragmente für AQP1, AQP1-3 und AQP3; *Asel* Verdaue der Plasmide p2T7TAbblue AQP1 (6489 bp), p2T7TAbblue AQP1-3 (7202 bp) und p2T7TAbblue AQP3 (6288 bp) ergaben folgende Fragmente: 3506 bp, 1235 bp, 1007 bp, 741 bp beziehungsweise 3506 bp, 1454, 1235 bp, 1007 bp sowie 3506 bp, 1235 bp, 1007 bp, 530 bp

Für den gleichzeitigen Knockdown aller drei Aquaglyceropore wurde ein 1281 bp langes DNA-Fragment, das Gesamt-AQP-Knockdown-Fragment, mit einem überhängenden Adenin am jeweiligen 3'-Ende in den geöffneten Vektor einligiert und der fehlerfreie Einbau mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech bestätigt.

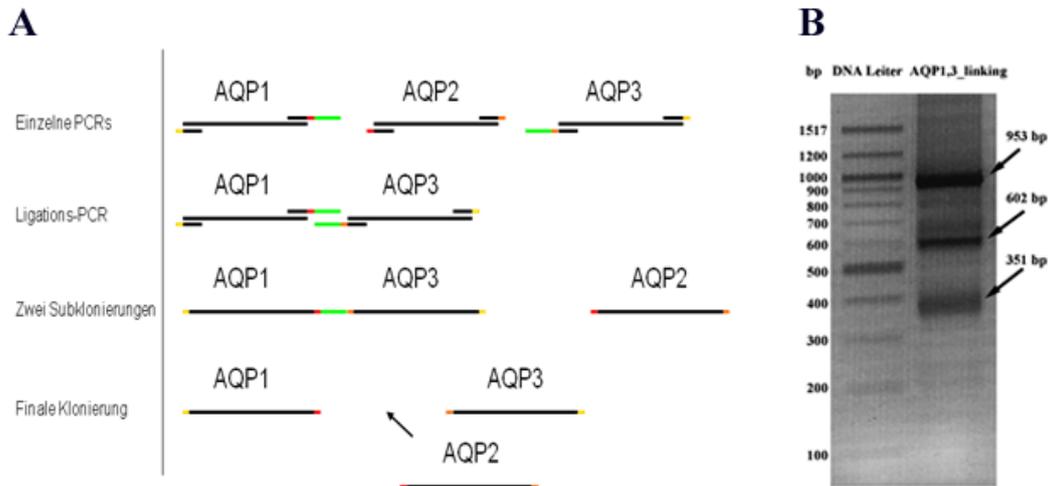


Abbildung 20 Klonierung des Gesamt-AQP-Knockdown-Fragments A) Schematische Abfolge Klonierung B) PCR-Ligation des AQP1,3_linking-Fragments (953 bp) aus den zwei Ankersequenz-tragenden AQP1- und AQP3-Amplikons (602 bp und 351 bp).

Das Gesamt-AQP-Knockdown-Fragment wurde auf nachfolgende Weise erzeugt: Mit Hilfe der Primer AQP1_3x_link_Taal_se und AQP1_3x_link_NdeI_as beziehungsweise AQP3_3x_link_Sall_se und AQP3_3x_link_Taal_as wurden zwei PCR-Amplikons erhalten; diese wurden dann über die komplementären Ankersequenzen, welche in den vorher erwähnten Primern AQP1_3x_link_NdeI_as und AQP3_3x_link_Sall_se enthalten waren, mittels PCR-Ligation zum AQP1,3_linking-Fragment verlängert. Das AQP1,3_linking-Fragment wurde mittels TA-Klonierung in den Subklonierungsvektor pCR2.1-TOPO eingebracht. Die Ankersequenz konnte dann über NdeI und Sall Doppelverdau herausgeschnitten werden und das mit den Primern AQP2_3x_link_NdeI_se und AQP2_3x_link_Sall_as amplifizierte PCR-Produkt wurde mit NdeI und Sall doppelverdaut und anschließend in den geöffneten Subklonierungsvektor einligiert. Aus diesem Plasmid wurde das Gesamt-AQP-Knockdown-Fragment (1281 bp) durch Taal Verdau herausgeschnitten, welches nun ein überhängendes Adenin am jeweiligen 3'-Ende aufwies und zur TA-Klonierung in den RNAi-Vektor eingesetzt wurde.

Für den α -Tubulin-Knockdown wurde ein 413 bp langes DNA-Fragment, das den Nukleotiden 833 bis 1245 von TbATUB entsprach, mit Hilfe der Primer a-tub_RNAi_se und a-tub_RNAi_as amplifiziert. Das PCR-Amplikon wurde in den geöffneten p2T7TAbblue-Vektor einligiert und der fehlerfreie Einbau mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech bestätigt.

Für den Vektor p2T7TAbblue empty, eingesetzt als Kontrolle während der Elektroporations- und Selektionsphase, wurden die kohäsiven Enden des geöffneten p2T7TAbblue-Vektors mittels T4 DNA-Polymerase geglättet und der Vektor durch Ligation rezirkularisiert.

4.2.3 Herstellung der RNAi-Transformanten

Der linearisierte, elektroporierte Vektor integrierte sich per homologer Rekombination in eine der *rDNA spacer*-Regionen im Trypanosomengenom. Das klonierte PCR-Produkt lag zwischen zwei einander gegenüberliegende T7 Promotern (T7PRO^{Ti}) mit doppelten Tetracyclin-Operatoren und je einem T7 Terminator auf beiden Seite. Mit Hygromycin B selektionierte rekombinante Trypanosomen konnten nach Zugabe von Tetracyclin von beiden DNA-Strängen ssRNA synthetisieren, die selbständig zu doppelsträngiger RNA hybridisierte.

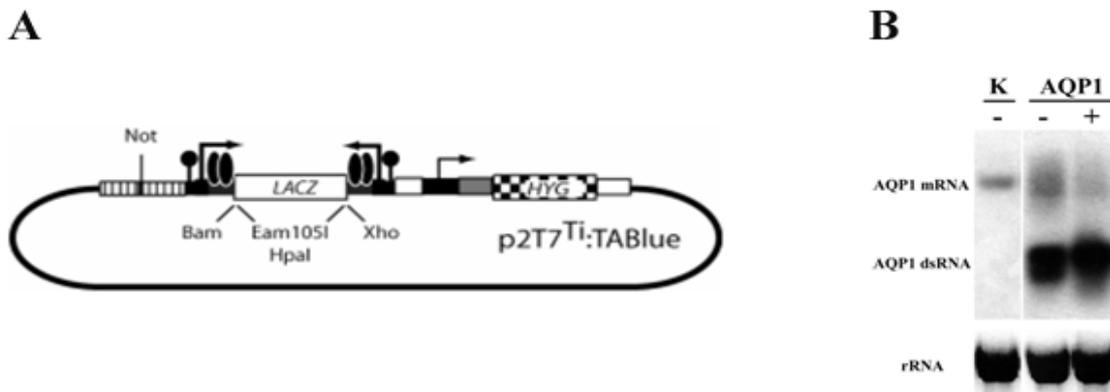


Abbildung 21 RNA Interferenz A) RNAi-Vektor p2T7TABlue [Clayton et al. 2005] B) RNAi-Testverifizierung via Northern Blot mit PC 1313-514 AQP1 Trypanosomen [nicht induziert (-) und Tetracyclin induziert (+)] und PC 1313-514 Kontrollzellen; je 10 µg Gesamt-RNA pro Bahn und AQP1-Knockdown-Fragment als ³²P-markierte Sonde; rRNA Banden des Ethidiumbromid-haltigen RNA-Agarose-Gels als Ladekontrolle.

Elektroporation und Selektion

Um Knockdown-Trypanosomen zu erhalten, wurden die verschiedenen hergestellten RNAi-Knockdown-Vektoren durch einen NotI Verdau linearisiert und mit $2,5 \times 10^7$ Trypanosomenzellen nach Protokoll elektroporiert. Die procyclischen Elektroporationen für p2T7TABlue AQP2, p2T7TABlue AQP3, p2T7TABlue ATUB und p2T7TABlue empty waren mit 10 µg Plasmid und die für p2T7TABlue TbAQP1 und p2T7TABlue TbAQP1-3 waren mit 20 µg Plasmid erfolgreich. Die Blutform-Elektroporationen waren alle mit Plasmidmengen zwischen 10 und 12 µg erfolgreich.

Die Zeitkonstanten ergaben bei einem *square wave*-Puls von 1,4 kV, 25 µF und $\infty \Omega$ stets $\sim 0,3$ Millisekunden. Die Gewinnung klonaler Reihen geschah durch die Verteilung/Vereinzelnung der Elektroporationsansätze auf 36 einzelne *wells*. Die Selektion der Transformanten dauerte für procyclische Zellen circa elf Tage, wohin gegen die Blutform-Transformanten etwa sieben Tage benötigten, um auf 1×10^6 Zellen pro ml hochzuwachsen.

Die Transformationseffizienz der procyclischen PC 1313-514 Zellen für die TbAQPs konnte durch Verbesserungen des Protokolls gesteigert werden, so dass in etwa 50 % der 36 *wells* Klone hochwuchsen. Von den procyclischen TbAQP1, TbAQP2 und TbAQP3 Elektroporationen wurden je drei und vom Gesamt-AQP-Knockdown zwei Klone ausgewählt, per Northern Blot Analyse miteinander verglichen und mit dem besten Knockdown-Klon weiter gearbeitet. Die Kontroll-Elektroporation ohne Vektor erbrachte nie lebende Klone und die Kontroll-Elektroporation mit leerem Vektor produzierte immer selektierte Trypanosomen. Ein procyclischer α -Tubulin-Knockdown-Klon fand sich in nur einem der 36 *wells*.

Die Transformationseffizienz für BF SMB-Zellen konnte auf circa 10 % positive *wells* optimiert werden. Es wurde je ein Klon der TbAQP1-, TbAQP2-, TbAQP3- und TbAQP1-3-Elektroporation ausgewählt und mit diesem weiter gearbeitet. Die α -Tubulin-Elektroporation lieferte ein positives *well*, das heißt einen lebensfähigen Klon.

Nach dem Anlegen von Langzeitstabilaten für alle PC- und BF-Knockdown-Zelllinien wurde der Phänotyp jeder Knockdown-Variante ausgewertet, indem immer die entsprechende, nicht elektroporierte Zelllinie und eine induzierte Knockdown-Zellkultur miteinander verglichen wurden. Normalerweise wurde die Trypanosomen mit einer Tetracyclin-Konzentration von 250 bis 1.000 ng/ml Kultur induziert. Da die Halbwertszeit von Tetracyclin in Kultur etwa 24 h beträgt, wurde bei jedem Verdünnungsschritt entsprechend Tetracyclin nachgelegt.

Der α -Tubulin-Knockdown zeigte sowohl in procyclischen Formen wie auch in Blutformen den in der Literatur beschriebenen und mikroskopisch einfach auszuwertenden FAT-Phänotyp [Shi et al. 2000].

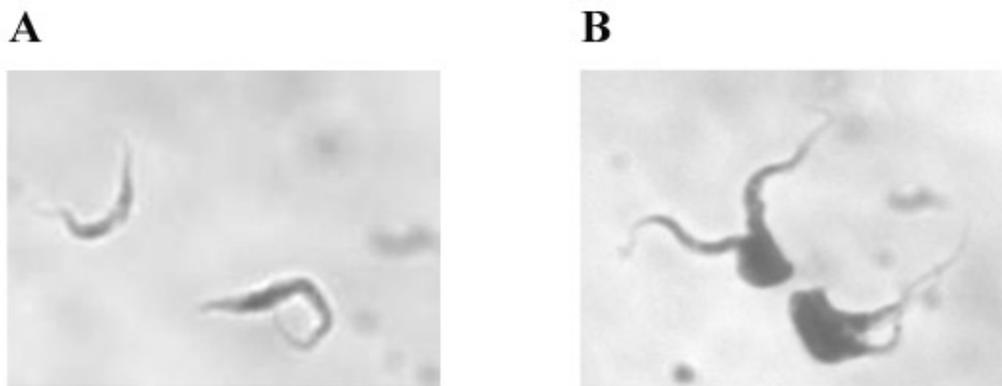


Abbildung 22 A-Tubulin Knockdown-Zellen A) PC1313-514 ATUB, uninduziert B) PC1313-514 ATUB nach 24 h mit 100 ng/ml Tet; circa 50 % der Zellen wiesen den FAT-Phänotyp auf.

Das Blockieren der Tubulin-Synthese führte zu einem Arrest der Zytokinese und wenn aufgrund sinkender Tetracyclin-Konzentrationen die Tubulin-Synthese wieder startete, durchliefen die Trypanosomen den Zellzyklus noch genau ein Mal; sie verdoppelten den Basalkörper und das Flagellum und führten die Kern- und Kinetoplastenteilung durch. Zu diesem Zeitpunkt wurden aus den *slender*-Trypanosomen große, fast kreisrunde FAT-Zellen. Dies ist ein finaler Phänotyp; die Zellen sind nicht mehr in der Lage sich weiter zu teilen.

4.2.4 Dokumentation der Knockdown-Rate

Zum Nachweis der mRNA-Reduktion und um die Vollständigkeit des Knockdowns prozentual zu bestimmen, wurden Northern Blots jedes Knockdown-Klons durchgeführt. Dazu wurden die Gesamt-RNA einer nicht elektroporierten, einer nicht induzierten und einer drei Tage Tetracyclin-induzierten Knockdown-Kultur miteinander verglichen.

Die Knockdown-Klone wurden parallel zueinander einmal mit 1.000 ng/ml Tetracyclin und einmal ohne Tetracyclin für drei Tage kultiviert, wie auch eine entsprechende, nicht elektroporierte Trypanosomenkultur. Es wurden jeweils Gesamt-RNA isoliert, in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer ^{32}P -haltigen Sonde hybridisiert. Dies geschah streng nach dem Northern Blot Protokoll.

Die Northern Blots wurden nach der Hybridisierung mit der ersten spezifischen Sonde gestriipt und gegebenenfalls mit weiteren Sonden rehybridisiert. Mit der Software QuantityOne wurden die Bandenintensitäten bestimmt und die AQP-Werte gegen die Ladekontrolle β -Tubulin normalisiert.

Die folgenden verwendeten Northern-Sonden hybridisierten spezifisch mit der jeweilige AQP-mRNA und nicht mit der RNA des Knockdown-Fragments.

Die AQP1-Northern Sonde war 253 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer AQP1_sonde_se und AQP1_sonde_as amplifiziert und hybridisierte ein Stück der AQP1 mRNA, welches vom Nukleotid -129 im 5'-UTR bis zum Nukleotid 124 im AQP1-Gen reicht. Die AQP2-Northern Sonde war 251 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer AQP2_sonde_se und AQP2_sonde_as amplifiziert und hybridisierte ein Stück der AQP2 mRNA, welches vom Nukleotid 883 des AQP2-Gens bis zum Nukleotid +194 im 3'-UTR reichte. Die AQP3-Northern Sonde war ebenfalls 251 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer AQP3_sonde_se und AQP3_sonde_as amplifiziert und hybridisierte ein Stück der AQP3 mRNA, welches vom Nukleotid 544 bis zum Nukleotid 794 im AQP2-Gen reicht. Die BTUB-Northern Sonde war 1320 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer BTUB_sonde_se und BTUB_sonde_as amplifiziert und hybridisierte ein Stück der β -Tubulin mRNA, welches vom Nukleotid -1 bis zum Nukleotid 1320 im BTUB-Gen reicht.

4.2.4.1 Beispiel eines Knockdown-Verlaufs

Um herauszufinden, nach welcher Zeit der Knockdown vollständig war, beziehungsweise nach wie vielen Tagen Tetracyclin-Induzierung die Gesamt-RNA isoliert werden sollte, wurde am Beispiel des PC 1313-514 AQP1-Knockdowns die zeitliche Progression dokumentiert.

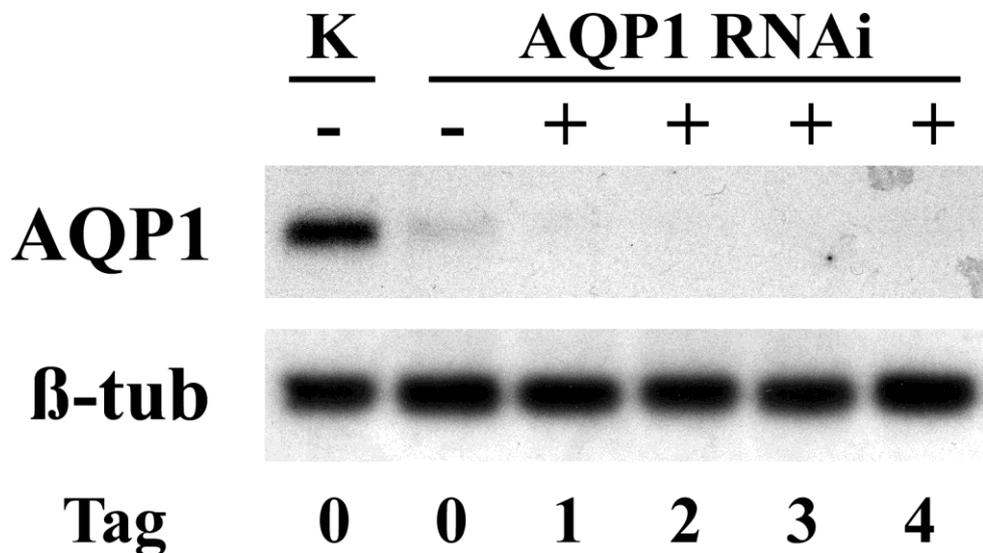


Abbildung 23 PC 1313-514 AQP1-Knockdown-Verlauf. AQP1-mRNA-Mengen von nicht elektroporierten PC 1313-514 Kontrollzellen (K) und PC 1313-514 AQP1-Knockdown-Zellen (AQP1 RNAi). Tetracyclin-Induzierung (Bahn +) und keine Tetracyclin-Induzierung (Bahn -) sind gekennzeichnet. Die Gesamt-RNA wurden vor der Tetracyclin-Zugabe (Tag 0) beziehungsweise 1, 2, 3 und 4 Tage nach Tetracyclin Zugabe isoliert. Je 7,5 μ g Gesamt-RNA pro Bahn. Als Ladekontrolle wurden β -Tubulin-mRNA-Mengen detektiert.

Dazu wurde die Gesamt-RNA der nicht induzierten Kultur, der mit 250 ng/ml Tetracyclin induzierten Kultur nach 24, 48, 72, 96 Stunden sowie einer nicht elektroporierten PC 1313-514 Kultur isoliert. Jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA wurden über ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine

Nylonmembran geblottet. Als ^{32}P -haltige Hybridisierungssonden wurden die AQP1-Northern Sonde verwendet. Sie ist 253 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer AQP1_sonde_se und AQP1_sonde_as amplifiziert und hybridisierte mit einem Stück der AQP1-mRNA, welches vom Nukleotid -129 im 5'-UTR bis zum Nukleotid 124 im TbAQP1-Gen reicht. Der Blot wurde gestriipt und zur quantitativen Beurteilung der geblotteten Gesamt-RNA-Mengen wurde er mit einer Sonde für das *housekeeping*-Gen β -Tubulin rehybridisiert. Die β -Tubulin Northern-Sonde ist 1320 bp lang, wurde mit Hilfe der Primer BTUB_sonde_se und BTUB_sonde_as amplifiziert und hybridisierte mit einem Teilbereich der β -Tubulin-mRNA, welches vom Nukleotid 1 bis zum Nukleotid 1320 im BTUB-Gen reicht.

Die AQP1-mRNA-Bandenintensitäten wurden β -Tubulin-normalisiert und der Wert für die AQP1-mRNA-Bandenintensitäten der Negativkontrolle K (PC 1313-514) wurde auf 100 % gesetzt. Das Radiogramm in Abbildung 23 zeigt eine AQP1-mRNA-Reduktion auf 13 % für den nicht induzierten Knockdown-Klon und eine Reduktion auf 0 % am Tag 1, auf 1 % am Tag 2, auf 7 % am Tag 3 und auf 7 % am Tag 4 für die induzierten Zellen.

Der TbAQP1-Knockdown-Verlauf zeigte auf, dass der nicht induzierte AQP1-Knockdown-Klon *leaky* ist. Auch ohne Tetracyclin-Zugabe ist die AQP1 mRNA-Menge bereits um 87 % verringert. Nach 24 h Tetracyclin-Gabe ist der Knockdown komplett; die nach 24 bis 96 h verbleibende mRNA-Menge macht 7 % oder weniger der typischerweise vorhanden Transkripte an AQP1 messenger RNA aus.

Bei einem erfolgreichen Knockdown werden keine oder nur sehr geringe Mengen an neuem AQP-Protein synthetisiert. Für die phänotypischen Eigenschaften der Zellen ausschlaggebend sind aber die tatsächlich in der Zelle vorhanden AQP-Proteine. Die natürliche *protein turnover*-Rate für TbAQPs ist nicht bekannt und kann deshalb auch nicht berücksichtigt werden. Trypanosomen führen alle 8 h (BF) beziehungsweise 10-12 h (PC) eine Zellverdoppelung durch, wobei sich die bereits vorhandenen AQP-Proteine auf die zwei Tochterzellen verteilen. Dies bedeutet, dass ohne Neusynthese und ohne Degradierung nach 72 h in jeder Trypanosomen-Zelle nur noch 0,2 % (BF) beziehungsweise 1 % (PC) der ursprünglichen AQP-Proteinmenge vorhanden sein sollte.

Aus den zuvor aufgeführten Gründen wurden deshalb immer drei Tage Tetracyclin induzierte Knockdown-Zellen untersucht.

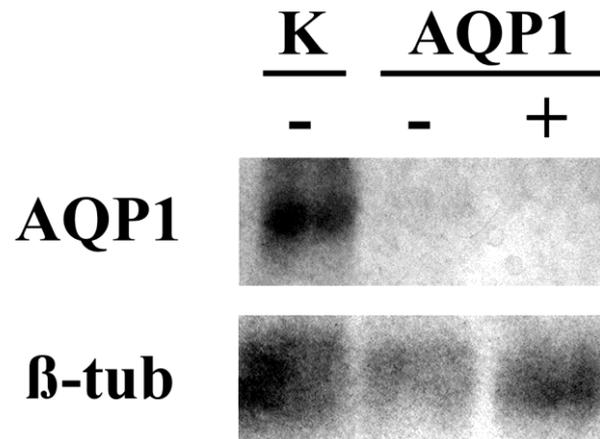
4.2.4.2 Verifizierung der verschiedenen PC-AQP-Knockdowns

Als Negativkontrolle (K) wurden immer nicht elektroporierte PC 1313-514 Zellen ohne Tetracyclin (-) im Medium verwendet. Der jeweils untersuchte AQP-Knockdown-Klon (AQP1, AQP2, AQP3 oder AQP1-3) wurde einmal ohne Tetracyclinzugabe (-) und einmal nach dreitägiger Tetracyclin-Induzierung (+) überprüft. Die jeweiligen AQP-mRNA-Bandenintensitäten für AQP1, AQP2 oder AQP3 wurden stets β -Tubulin-normalisiert und der Wert für die Negativkontrolle K (PC 1313-514) im Radiogramm wurde immer auf 100 % gesetzt.

Eine Zusammenfassung und Vergleich der Knockdown-Raten ist im Kapitel 4.2.4.4 aufgeführt.

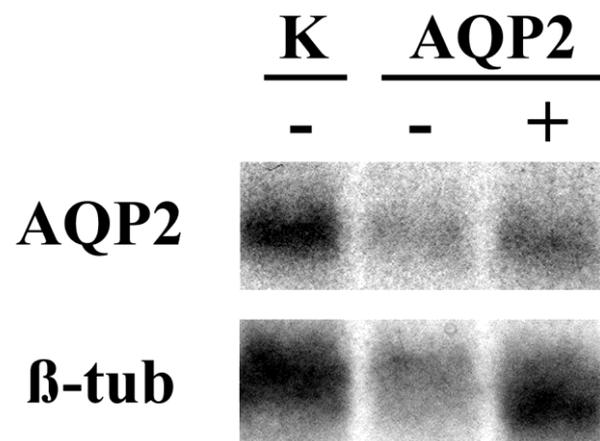
4.2.4.2.1 PC 1313-514 AQP1-Knockdown

Es wurden jeweils 20 μg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt.



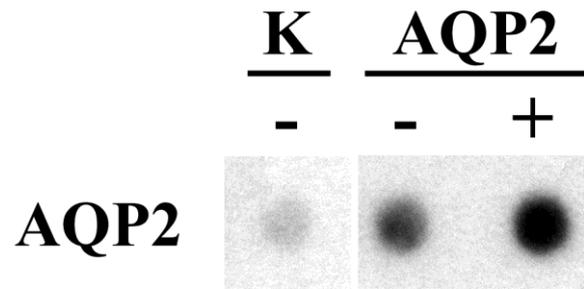
Das Radiogramm zeigte eine AQP1-mRNA-Reduktion auf 35 % für den nicht induzierten Knockdown und eine sehr erfolgreiche Reduktion auf 1 % für den induzierten Knockdown.

4.2.4.2.2 PC 1313-514 AQP2-Knockdown



Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Das Radiogramm zeigte eine AQP2-mRNA-Reduktion auf 53 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 61 % für den induzierten Knockdown.

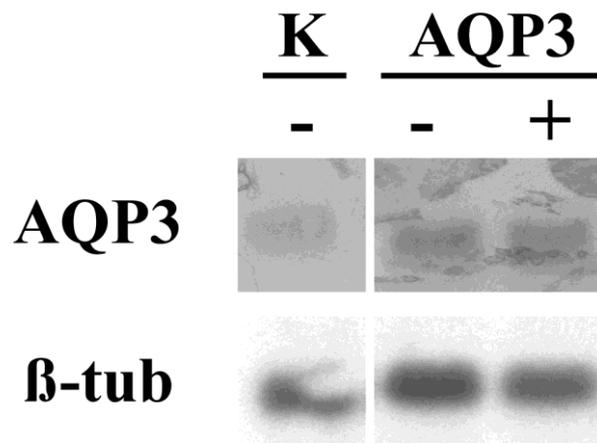
Um zu klären was zu diesem schwachen mRNA-Knockdown führte wurde mit einer 360 bp langen ³²P haltigen DNA-Sonde, die sowohl die AQP2-mRNA als auch doppelsträngige AQP2-Knockdown-RNA detektieren konnte, hybridisiert. Dies sollte Aufschluss geben in welchem Ausmaß die Knockdown-Zelllinie dsRNA transkribierten. Verwendet wurde die von den Primern AQP2_RNAi_1x_Taal_se und AQP2_RNAi_1x_Taal_as amplifizierte Sequenz des TbAQP2-mRNA-Transkripts. In einer Bio-Rad Bio-Dot Apparatur wurden je 3 µg Gesamt-RNA pro dot des Dot-Blots aufgetragen.



Der AQP2-mRNA-Dot-Blot-Intensitätswert der Negativkontrolle K (PC 1313-514) wurde als 100 % gesetzt. Das Radiogramm zeigte einen erhöhten Level an Hybridisierungspartnern für die AQP2 Sonde an, 265 % für den nicht induzierten Knockdown und 390 % für den induzierten Knockdown-Klon.

Die zuvor aufgezeigte AQP2-mRNA-Reduktion induzierter Zellen um 39 % liegt also im AQP2-Knockdownfragment begründet.

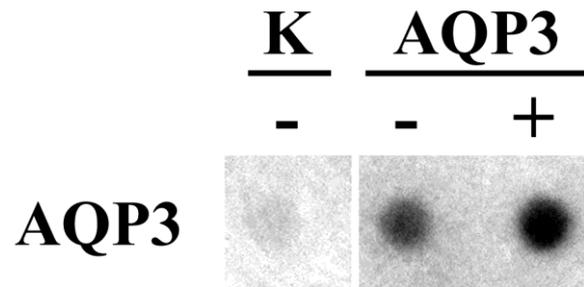
4.2.4.2.3 PC 1313-514 AQP3-Knockdown



Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Das Radiogramm zeigte eine AQP3-mRNA-Reduktion auf 90 % für den nicht induzierten Knockdown und einen Wert von 101 % für den induzierten Knockdown.

Dieses Ergebnis zeigte eine komplett fehlende Reduktion der AQP3 mRNA-Menge der PC 1313-514 AQP3 Knockdown-Zelllinie auf.

Um zu klären, ob die Knockdown-Zelllinie überhaupt dsRNA transkribierte, wurde mit einer 337 bp langen ³²P haltigen DNA-Sonde hybridisiert, die sowohl die AQP3-mRNA als auch doppelsträngige AQP3-Knockdown-RNA detektieren konnte. Verwendet wurde die von den Primern AQP3_RNAi_1x_Taal_se und AQP3_RNAi_1x_Taal_as amplifizierte Sequenz des TbAQP3-mRNA-Transkripts. In einer Bio-Rad Bio-Dot Apparatur wurden je 3 µg Gesamt-RNA pro Auftragspunkt des Dot-Blots eingesetzt.

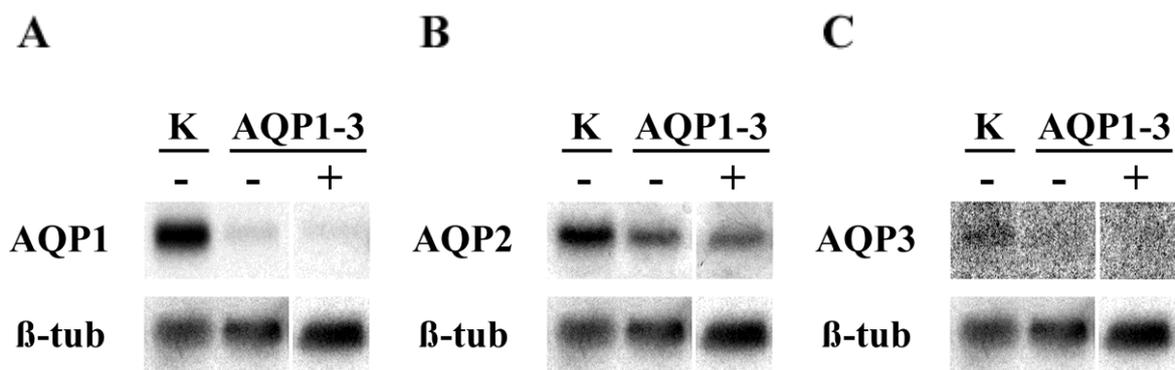


Der AQP3-mRNA-Dot-Blot-Intensitätswert der Negativkontrolle K (PC 1313-514) wurde als 100 % gesetzt. Das Radiogramm zeigte einen erhöhten Level an Hybridisierungspartnern für die AQP3 Sonde; 325 % für den nicht induzierten Knockdown und 406 % für den induzierten Knockdown-Klon an. Die Zellen stellen also AQP3-Knockdown-Fragment her.

Die zuvor aufgezeigte scheinbar fehlende mRNA-Reduktion der induzierten Zellen liegt also nicht an einem zu schwachen Knockdown, sondern liegt wahrscheinlich in der sehr niedrigen Ausgangskonzentration von AQP3-mRNA begründet. Die RNAi-Maschinerie ist nicht effektiv genug, um auch die letzten AQP3-mRNA in der Zelle aufzuspüren und zu zerschneiden.

4.2.4.2.4 PC 1313-514 Gesamt-AQP-Knockdown

Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt.



Das Radiogramm (A) zeigte eine AQP1-mRNA-Reduktion auf 11 % für den nicht induzierten procyclischen Gesamt-AQP-Knockdown und eine Reduktion auf 7 % für die Tetracyclin-induzierten Zellen.

Weiter zeigte das Radiogramm (B) zeigte eine AQP2-mRNA-Reduktion auf 43 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 39 % für die entsprechenden induzierten Trypanosomen.

Für die AQP3-mRNA Menge ergab sich laut Radiogramm (C) eine Reduktion auf 45 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 36 % für den induzierten Knockdown.

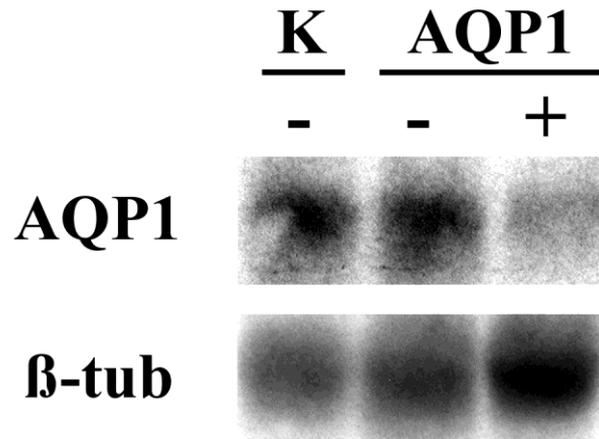
Der PC 1313-514 Gesamt-AQP-Knockdown hat gleiche oder höhere Knockdown-Raten als die Einzel-AQP-Knockdowns.

4.2.4.3 Verifizierung der verschiedenen BF-AQP-Knockdowns

Als Negativkontrolle (K) wurden stets nicht elektroporierte BF SMB-Zellen ohne Tetracyclin (-) im Medium verwendet. Der jeweils untersuchte AQP-Knockdown-Klon wurde einmal ohne Tetracyclinzugabe (-) und einmal nach dreitägiger Tetracyclin-Induzierung (+) untersucht.

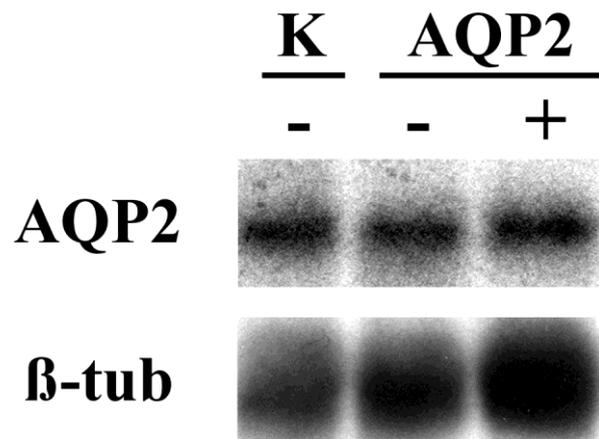
Die jeweiligen AQP-mRNA-Bandenintensitäten wurden immer mittels der β -Tubulin-Bande normalisiert und der Wert für die Negativkontrolle K (BF SMB) wurde dann auf 100 % gesetzt.

4.2.4.3.1 BF SMB AQP1-Knockdown



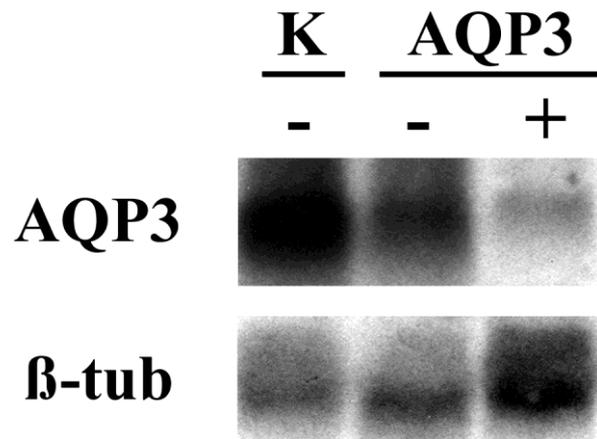
Es wurden jeweils 20 μ g Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Das Radiogramm zeigte eine AQP1-mRNA-Reduktion auf 74 % für den nicht induzierten Knockdown und eine erfolgreiche Reduktion auf nur noch 17 % für den induzierten Knockdown.

4.2.4.3.2 BF SMB AQP2-Knockdown



Es wurden jeweils 20 μ g Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Das Radiogramm zeigte eine AQP2-mRNA-Reduktion auf 74 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 64 % für den induzierten Knockdown. Dies sind vergleichbare Werte wie beim procyclischen AQP2-Knockdown.

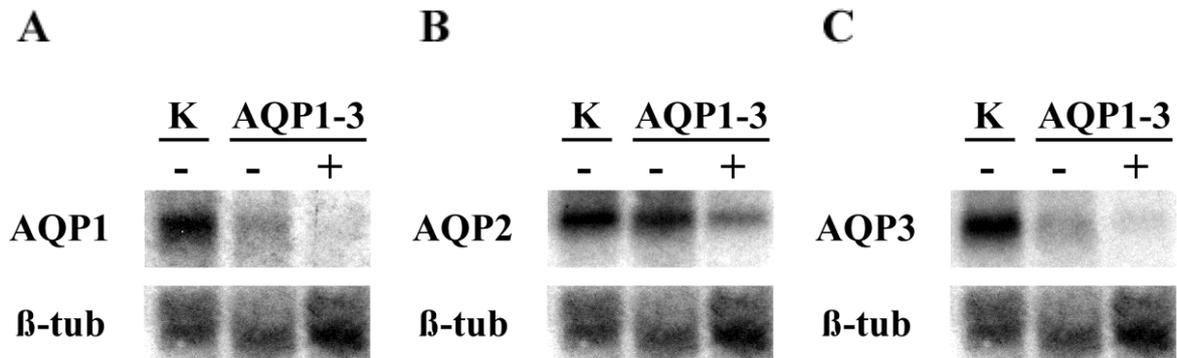
4.2.4.3.3 BF SMB AQP3-Knockdown



Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt. Das Radiogramm zeigte eine AQP3-mRNA-Reduktion auf 68 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 16 % für den induzierten Knockdown.

4.2.4.3.4 BF SMB-Gesamt-AQP-Knockdown

Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Gelbahn aufgetrennt.



Das Radiogramm (A) zeigte eine AQP1-mRNA-Reduktion auf 35 % für den nicht induzierten BF-Gesamt-AQP-Knockdown und eine Reduktion auf 1 % für die Tetracyclin-induzierten Zellen.

Weiter zeigte das Radiogramm (B) zeigte eine AQP2-mRNA-Reduktion auf 83 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 27 % für die entsprechenden induzierten Trypanosomen.

Für die AQP3-mRNA Menge ergab sich laut Radiogramm (C) eine Reduktion auf 37 % für den nicht induzierten Knockdown und eine Reduktion auf 6 % für den induzierten Knockdown.

Der BF SMB-Gesamt-AQP-Knockdown hat durchweg höhere Knockdown-Raten als die Einzel-AQP-Knockdowns.

4.2.4.4 Zusammenfassung

	PC 1313-514 AQP1		PC 1313-514 AQP2		PC 1313-514 AQP3		PC 1313-514 AQP1-3	
Tet	-	+	-	+	-	+	-	+
AQP1	35 %	1 %					6 %	3 %
AQP2			53 %	61 %			43 %	39 %
AQP3					90 %	101 %	45 %	36 %

	BF SMB AQP1		BF SMB AQP2		BF SMB AQP3		BF SMB AQP1-3	
Tet	-	+	-	+	-	+	-	+
AQP1	74 %	17 %					35 %	1 %
AQP2			74 %	64 %			83 %	27 %
AQP3					68 %	16 %	37 %	6 %

4.2.5 Wachstumskurve

Es wurde der Wachstumsphänotyp der verschiedenen AQP-Knockdown-Trypanosomen mit und ohne Tetracyclin-Zugabe überprüft. Als Kontrolle wurden die jeweiligen nicht elektroporierten Zelllinien eingesetzt. Die Generationszeiten wurden wiederholt (n = 3-10) an mehreren aufeinander folgenden Tagen mit Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bestimmt. Für BF-Trypanosomen bedeutete dies 1e5 bis 1e6 Zellen/ml und für PC-Zellen war dies 2,5e5 bis 2,5e6 Zellen/ml.

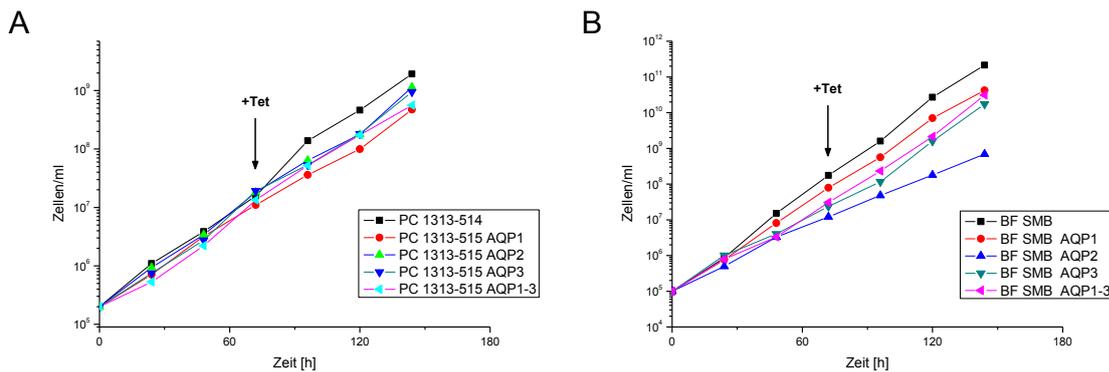


Abbildung 24 Wachstumskurven (repräsentative Beispielkurven). Ab dem vierten Tag jeweils mit 1.000 ng/ml Tetracyclin induziert. Tägliche Verdünnungen wurden berücksichtigt. A) PC 1313-514- Kontroll-, AQP1-, AQP2-, AQP3- und AQP1-3-Knockdown-Zellen. B) BF SMB- Kontroll-, AQP1-, AQP2-, AQP3- und AQP1-3-Knockdown-Zellen.

Einzig bei den BF SMB AQP2-Knockdown-Zellen trat eine Wachstumsinhibition auf.

Zusammenfassung

Zelllinie \ Generationszeit [h]	- Tet	+ Tet
PC 1313-514	11,2 ± 3,9	11,0 ± 3,1
PC 1313-514 AQP1	13,0 ± 2,3	12,4 ± 2,9
PC 1313-514 AQP2	11,6 ± 3,4	12,8 ± 3,7
PC 1313-514 AQP3	12,5 ± 3,9	13,3 ± 3,1
PC 1313-514 AQP1-3	13,1 ± 3,7	13,4 ± 1,0

Zelllinie \ Generationszeit [h]	- Tet	+ Tet
BF SMB	7,6 ± 1,7	7,8 ± 1,3
BF SMB AQP1	8,6 ± 1,7	8,0 ± 1,0
BF SMB AQP2	10,3 ± 1,8	13,2 ± 1,7
BF SMB AQP3	8,4 ± 1,7	7,9 ± 1,5
BF SMB AQP1-3	7,7 ± 1,8	7,9 ± 1,3

4.2.6 Hypoosmotischer Schock

PC 1313-514- und BF SMB-Kontrollzellen, zeigten im hypoosmolaren Stress bei visueller Kontrolle unter dem Mikroskop folgendes Verhalten: Die Trypanosomen schwollen sehr schnell dramatisch an, um anschließend über mehrere Minuten wieder zu schrumpfen. Dieser Prozess war nach mehreren Minuten für die meisten Zellen soweit abgeschlossen, dass sie sich mit dem bloßen Auge in Bezug auf Morphologie und Beweglichkeit nicht mehr von Zellen unter isoosmolaren Bedingungen unterscheiden ließen.

Beim Verfolgen des hypoosmolaren Schocks am Mikroskop ergaben sich Auffälligkeiten für AQP2-Knockdowns. Etwa die Hälfte der induzierten PC 1313-514 AQP2-Zellen war nach 10 Minuten noch leicht geschwollen. Noch ausgeprägter waren die Ergebnisse für die induzierten BF SMB AQP2-Trypanosomen, wo etwa die Hälfte der Zellen nach 10 Minuten noch sichtbar geschwollen war und die andere Hälfte leblos war. Die restlichen induzierten Knockdown-Klone unterschieden sich am Mikroskop nicht stark von den entsprechenden Kontrollzellen.

Die Mikroskopbeobachtungen wurden um das Nachverfolgen der Volumenregulation durch Lichtstreuungsexperimente [Fang et al. 2007] ergänzt. Dazu wurden nach Protokoll jeweils etwa $3,5 \times 10^7$ Zellen in 650 μ l isotonem Earle's Salz Puffer (300 mosm) aufgenommen; 100 μ l Zellsuspension wurden mit 100 μ l isotonem Earle's Salz Puffer und weitere 500 μ l Zellsuspension wurden mit Aqua dest. versetzt und die jeweilige Änderung der Absorption bei 550 nm protokolliert. Änderungen in der Absorption der Zellsuspension korrelierten negativ mit Änderungen im Zellvolumen der Zellen [Maroulis et al. 2000].

Procyclische Knockdowns

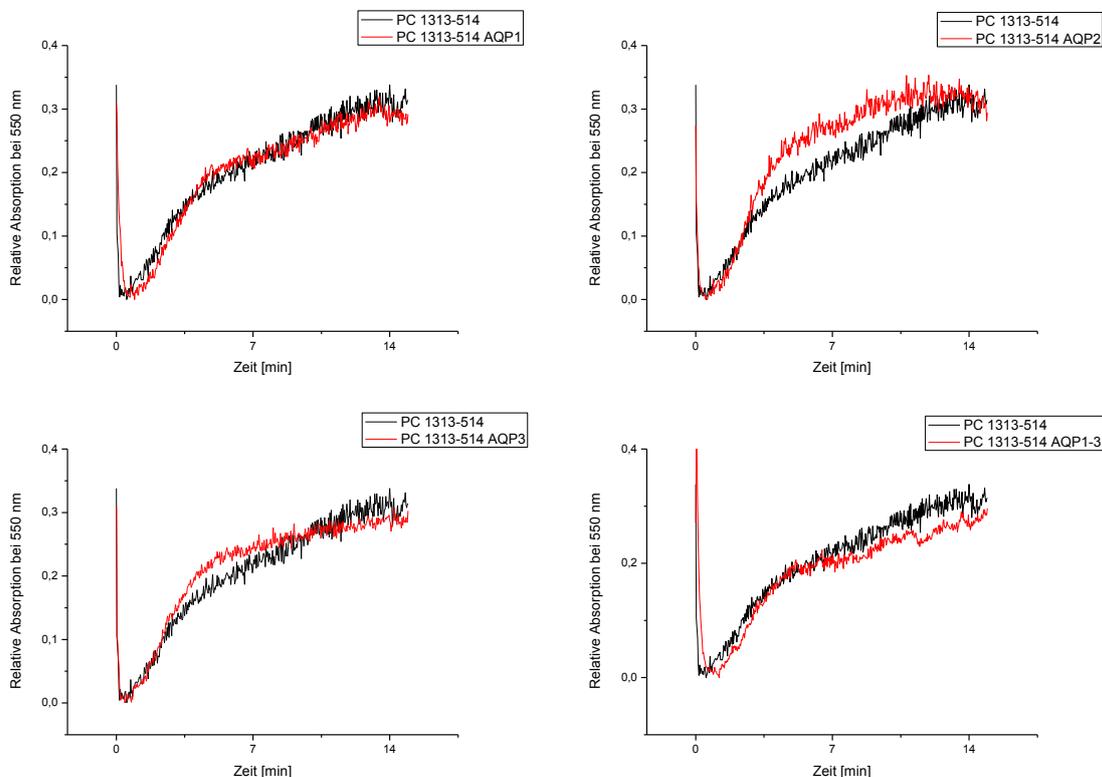


Abbildung 25 Versuche zum hypoosmolaren Schock (150 mosm) mit PC-Knockdowns. Verwendet wurden PC 1313-514-Kontroll- und PC 1313-514 AQP-Knockdown-Zellen (AQP1, AQP2, AQP3 und AQP1-3). Es wurden jeweils mehrere

voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n \geq 3$). Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für die erhaltenen Volumenregulationsdaten. Die gewählten Absorptionseinheiten sind relativ zum Schwellmaximum normiert.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Schwellzeiten der untersuchten Trypanosomen-Klone aufgelistet. Die Schwellzeit wurde als die Zeit definiert, die verstrich, bis die Zellen durch Wassereinstrom maximal geschwollen waren.

Zelllinie	Schwellzeit [sek]
PC 1313-514	$30,4 \pm 5,0$
PC 1313-514 AQP1	$61,3 \pm 5,0$
PC 1313-514 AQP2	$36,0 \pm 2,0$
PC 1313-514 AQP3	$30,7 \pm 4,2$
PC 1313-514 AQP1-3	$72,7 \pm 7,0$

Die in Abbildung 25 gezeigten induzierten PC 1313-514 AQP3- und PC 1313-514 AQP2-Zellen unterschieden sich in ihrer Schwellzeit mit $30,7 \pm 4,2$ sek und $36,0 \pm 2,0$ sek nicht oder nur unbedeutend von den Kontrollzellen ($30,4 \pm 5,0$ sek). Signifikant unterschiedlich waren die Ergebnisse für den PC-AQP1 Einzel- und den PC-AQP1-3 Gesamt-Knockdown ($61,3 \pm 5,0$ und $72,7 \pm 7,0$ sek). In beiden Fällen konnte mehr als eine Verdoppelung der Schwellzeit dokumentiert werden.

Blutform-Knockdowns

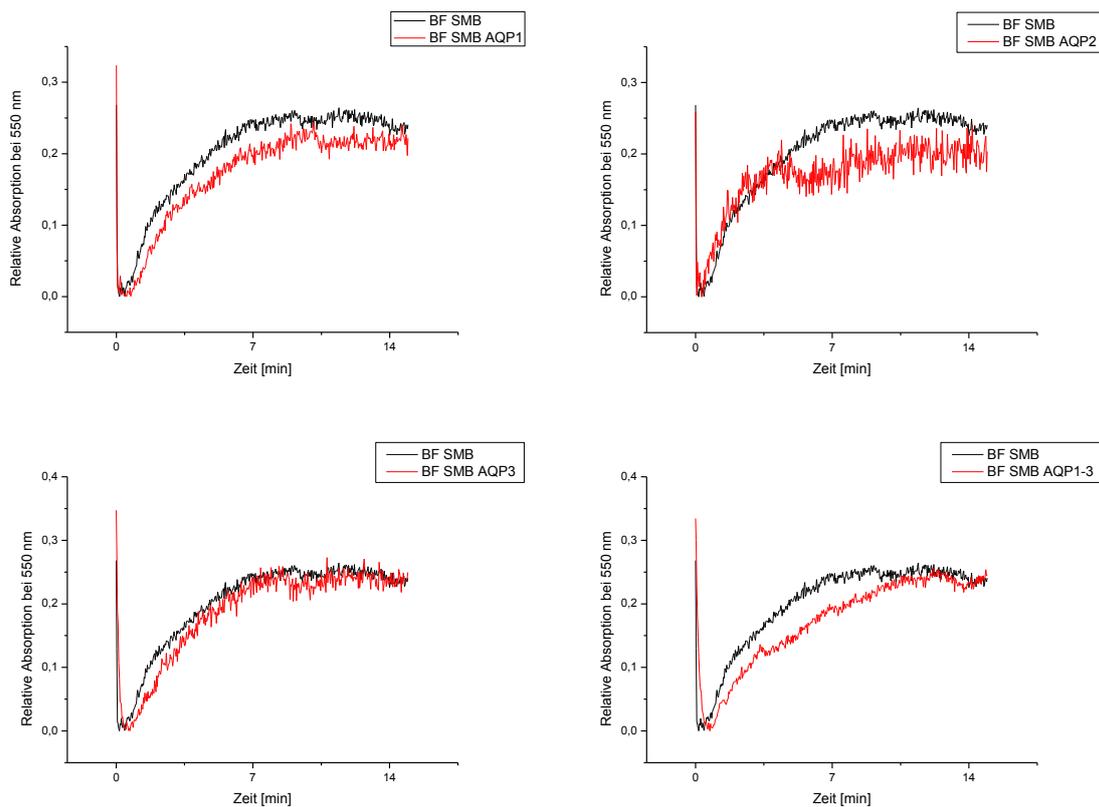


Abbildung 26 Versuche zum hypoosmolaren Schock (150 mosm) in BF-Trypanosomen. Verwendet wurden BF SMB-Kontroll- und BF SMB AQP-Knockdown-Zellen (AQP1, AQP2, AQP3 und AQP1-3). Es wurden jeweils mehrere voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n \geq 3$); die Ausnahme ist BF SMB AQP2 ($n = 1$). Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für die erhaltenen Volumenregulationsdaten. Die gewählten Absorptionseinheiten sind relativ zum Schwellmaximum normiert.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Schwellzeiten der untersuchten Trypanosomen-Klone aufgelistet.

Zelllinie	Schwellzeit [sek]
BF SMB	18,4 ± 5,2
BF SMB AQP1	26,0 ± 2,0
BF SMB AQP2	18,0
BF SMB AQP3	34,0 ± 2,0
BF SMB AQP1-3	36,7 ± 2,3

Die Schwellzeit der in Abbildung 26 gezeigten induzierten BF-AQP2-Zellen war mit 18 Sekunden gleich der der BF-SMB-Kontrollzellen (18,4 ± 5,2 sek). Auffällig war aber, dass nach etwa vier Minuten die Absorption stagnierte. Dieses Ergebnis lässt sich durch die zuvor erwähnten Mikroskop-Beobachtungen von BF-AQP2 erklären, wo etwa die Hälfte der Zellen nach 10 Minuten noch sichtbar geschwollen war und die andere Hälfte tot erschien.

Die induzierten BF-AQP1-, AQP3 und vor allem die induzierten BF-AQP1-3-Zellen erreichten ihr Schwellmaximum mit 26,0 ± 2,0 sek, 34,0 ± 2,0 sek und 36,7 ± 2,3 sek erst deutlich später als die BF-Kontrollzellen (18,4 ± 5,2 sek).

Zusammenfassung

Zelllinie	Schwellzeit [sek]
PC 1313-514	30,4 ± 5,0
PC 1313-514 AQP1	61,3 ± 5,0
PC 1313-514 AQP2	36,0 ± 2,0
PC 1313-514 AQP3	30,7 ± 4,2
PC 1313-514 AQP1-3	72,7 ± 7,0

Zelllinie	Schwellzeit [sek]
BF SMB	18,4 ± 5,2
BF SMB AQP1	26,0 ± 2,0
BF SMB AQP2	18,0
BF SMB AQP3	34,0 ± 2,0
BF SMB AQP1-3	36,7 ± 2,3

4.2.7 Glycerin-Überlebens-Test

Es sollte getestet werden, in wie weit die induzierten AQP-Knockdown-Trypanosomen noch in der Lage sind, allein durch die Aufnahme von Glycerin zu überleben. Die Positiv-Kontrolle dokumentiert, wie die Zellen allein durch die Aufnahme von Glucose überleben. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit den entsprechenden Resultaten für passende nicht elektroporierte Kontrollzellen.

Jeweils 1e7 Zellen/ml Knockdown-Zellen und Kontrollzellen wurden für zwei Stunden in einem Minimalmedium bei 37°C am Leben erhalten. Die Zellen wurden mit 150 rpm geschüttelt um die Aggregation der Trypanosomen zu verhindern. Das verwendete Medium war TDB ohne Glucose (pH 7,4) dem entweder 5 mM NaCl als Negativkontrolle, 10 mM Glucose als Positivkontrolle oder 10 mM Glycerin als Testreihe zugesetzt wurden. Die Trypanosomen in der Negativkontrolle verfügten über kein Energie-Substrat und starben innerhalb weniger Minuten. Als Knockdown-Zellen wurden für drei Tage mit 1.000 ng/ml Tetracyclin induzierte BF SMB AQP1-3-Knockdown-Zellen und als Kontrollzellen eine entsprechende Kultur von nicht elektroporierten BF SMB-Zellen verwendet. Für zwei Stunden

wurden alle 30 Minuten ein Aliquot an Zellsuspension entnommen, mittels Perchlorsäure gefällt und das gebildete Pyruvat enzymatisch bestimmt.

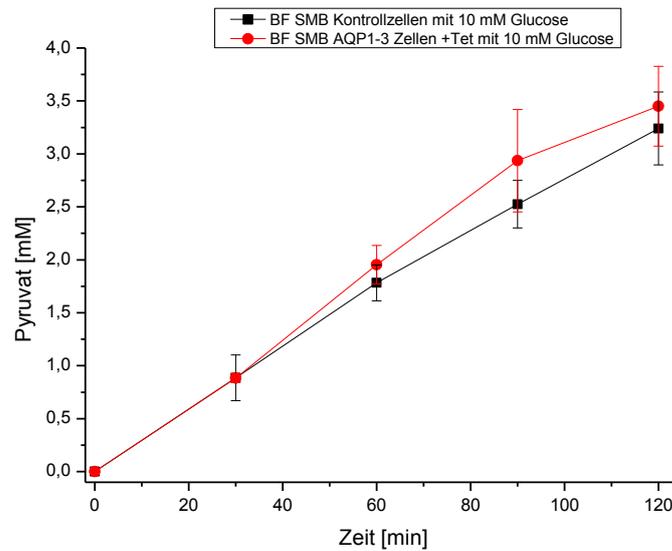


Abbildung 27 Pyruvat-Produktion in Minimal-Medium mit Glucose

Unter dem Mikroskop betrachtet sind sowohl die induzierten Knockdown-Zellen als auch die Kontrollzellen im ‚TDB ohne Glucose‘-Minimalmedium mit 10 mM Glucose als alleinigem Energie-Substrat normal aktiv und in ihrer Beweglichkeit/Aktivität nicht oder nur sehr schwer von Zellen in konventionellem BF-Kulturmedium zu unterscheiden. Die Knockdown- und Kontrollzellen zeigen eine konstante Verstoffwechslung der Glucose zu Pyruvat über die gesamten 120 Minuten ($3,24 \pm 0,35$ mM Pyruvat versus $3,45 \pm 0,38$ mM Pyruvat).

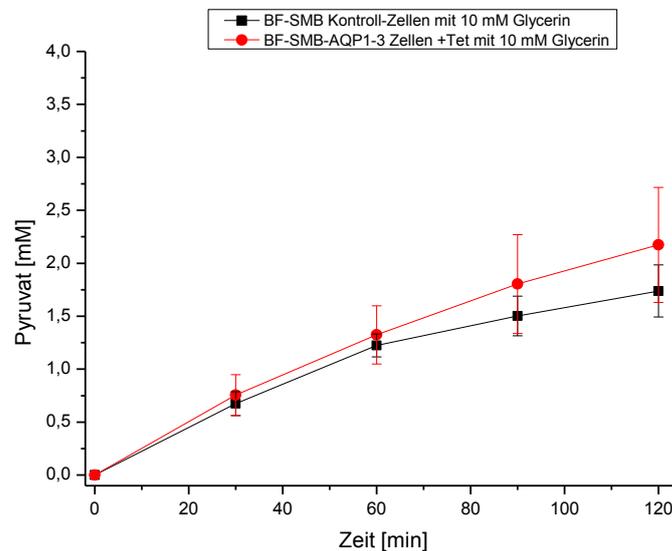


Abbildung 28 Pyruvat-Produktion in Minimal-Medium mit Glycerin

Zellen die nur Glycerin (10 mM) als Energieträger im ‚TDB ohne Glucose‘-Minimalmedium zum Verstoffwechslern zugeführt bekamen, zeigten schon unter dem Mikroskop deutliche Einschränkungen. Innerhalb der ersten halben Stunde begannen die mit Glycerin gefütterten Knockdown- und Kontroll-Trypanosomen deutlich inaktiver zu werden. Dieser Level an Aktivität beziehungsweise Beweglichkeit verringerte sich dann für die Restzeit des zweistündigen Versuchs nur

noch geringfügig. Die Menge an gebildetem Pyruvat in beiden Zelllinien unterschied sich fast nicht ($1,74 \pm 0,25$ mM Pyruvat versus $2,17 \pm 0,54$ mM Pyruvat), wohingegen es signifikante Unterschiede zur gebildeten Pyruvatmenge mit Glucose als Energie-Substrat gab. Hier noch einmal der direkte Vergleich:

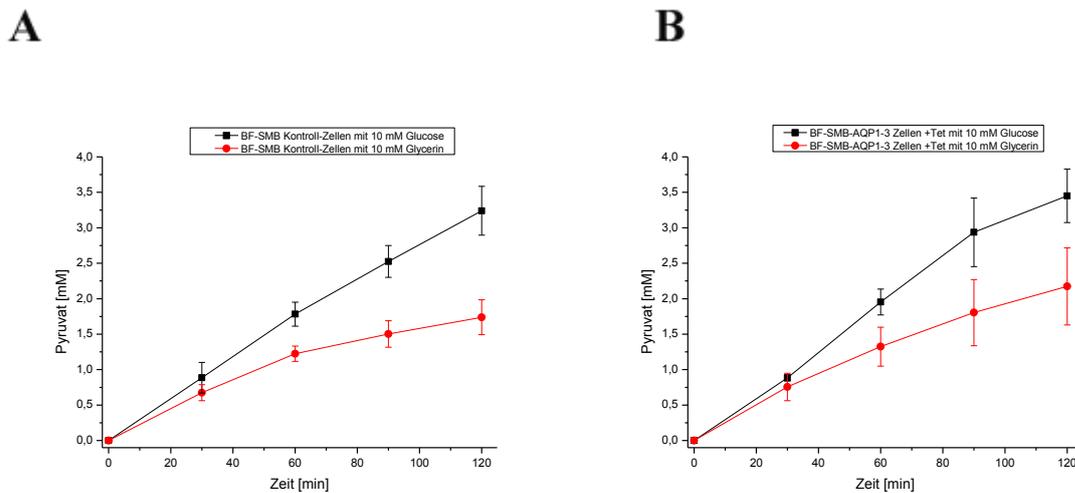


Abbildung 29 Pyruvat-Produktion in Minimal-Medium. A) BF SMB-Zellen B) BF SMB AQP1-3-Zellen

Die BF SMB-Kontrollzellen generierten $3,24 \pm 0,35$ mM Pyruvat aus Glucose, aber nur $1,74 \pm 0,25$ mM Pyruvat aus Glycerin. Ganz ähnlich verhielten sich die BF SMB-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen die $3,45 \pm 0,38$ mM Pyruvat im Glucose-Medium ausschieden, aber nur $2,17 \pm 0,54$ mM Pyruvat wenn einzig Glycerin verstoffwechselt wurden.

4.2.8 Arsen- und Antimon-Transport

Die trypanosomalen Aquaglyceroporine transportieren $\text{As}(\text{OH})_3$ und $\text{Sb}(\text{OH})_3$ [Uzcatogui 2006]. Die Erwartung ist, dass der Verlust beziehungsweise die sehr starke Reduzierung an Aquaglyceroporinen zu einer erhöhten Arsen- und Antimon-Toleranz führen. Der größte Effekt ist mit Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen zu erwarten. Verwendet wurden die BF-AQP-Gesamt-Knockdown-Trypanosomen, die im Northern Blot den jeweils höchsten Knockdown für alle drei AQP-mRNAs zeigten.

Für induzierte BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen und die entsprechenden nicht elektroporierten Kontrollzellen wurden sogenannte *inhibitory concentration 50%* (IC_{50})-Untersuchungen durchgeführt. Die IC_{50} ist ein Maß für die Toxizität eines Stoffes im gegebenen Organismus. Es handelt sich dabei um die Konzentration eines Stoffes, die eine Reduktion der Trypanosomen-Population um 50 % bewirkt.

Die Abbildungen 30 und 31 zeigten die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von dreiwertigem Arsen und dreiwertigem Antimon in BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen. Die Cytotoxizitätstests wurden unter den für BF-Trypanosomen typischen Kulturbedingungen durchgeführt. Jeweils 2×10^5 Zellen/ml wurden für 24 h mit verschiedenen Arsen- und Antimon-Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 und 100.000 mM) inkubiert. Die Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen waren jeweils für drei Tag mit 1.000 ng/ml Tetracyclin induziert. Die Saure Phosphatase-Cytotoxizitätstests ergaben folgende IC_{50} -Graphen:

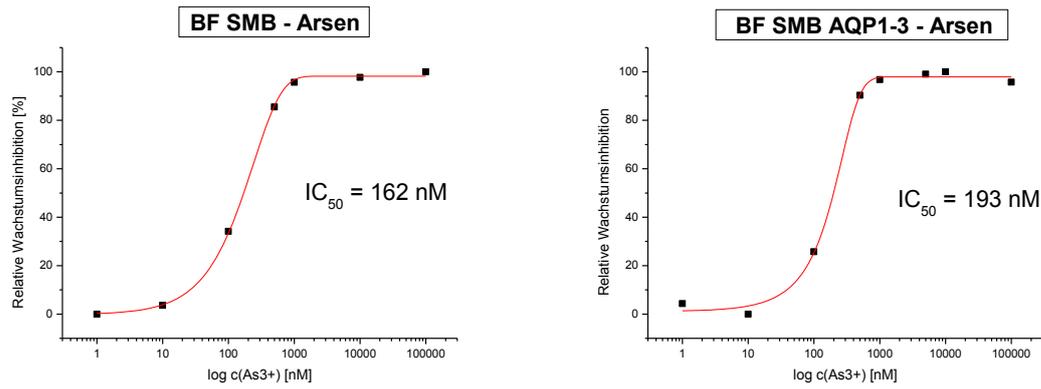


Abbildung 30 Die halbinhibitorische Konzentration der BF SMB und BF SMB AQP1-3-Trypanosomen für As³⁺ lagen bei 162 nM beziehungsweise 193 nM.

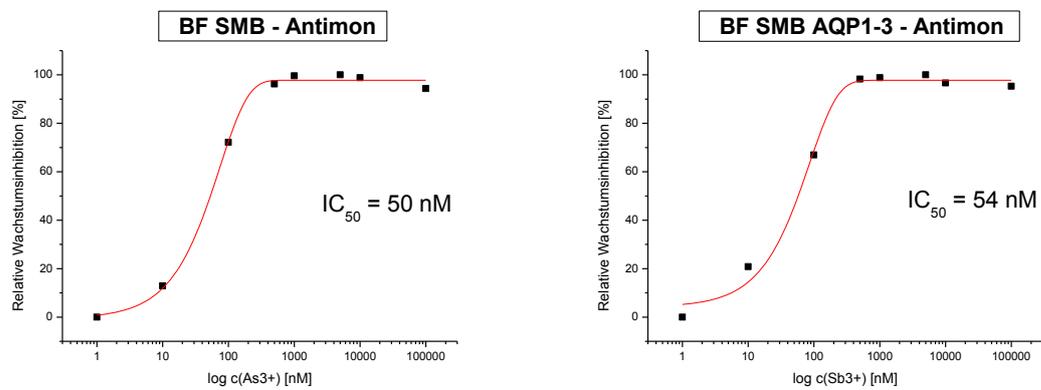


Abbildung 31 Die halbinhibitorische Konzentration der BF SMB und BF SMB AQP1-3-Trypanosomen für Sb³⁺ lagen bei 50 nM beziehungsweise 54 nM.

Die Arsen- IC_{50} -Werte für BF SMB-Kontrollzellen (162 nM) und BF SMB AQP1-3-Zellen (193 nM) wie auch die Antimon- IC_{50} -Werte für BF SMB-Kontrollzellen (50 nM) und BF SMB AQP1-3-Zellen (54 nM) unterschieden sich nur minimal.

Zusammenfassung

Zelllinie	$IC_{50}(\text{As}^{3+})$ [nM]	$IC_{50}(\text{Sb}^{3+})$ [nM]
BF SMB	162	50
BF SMB AQP1-3	193	54

5 Diskussion

Um die physiologischen Funktionen der trypanosomalen Aquaglyceroporine einschätzen zu können, benötigt man Informationen zu ihrem Expressionsmuster und ihrer Lokalisierung innerhalb der Zelle.

Eigene Northern Blot-Analysen zeigten, dass die drei Aquaglyceroporin-Transkripte in allen Lebensphasen der Trypanosomen transkribiert werden, dabei aber sehr unterschiedlich reguliert sind. Trypanosomen betreiben nur in wenigen Ausnahmefällen Gen-Regulation auf dem Level der Transkriptions-Initiation und zeigen stattdessen eine starke posttranskriptionelle Regulation [Kabani et al. 2009]. Zwei umfangreiche Studien in *Trypanosoma brucei brucei* und *Trypanosoma brucei gambiense* nutzten Microarray-Analysen (Hybridisierung) beziehungsweise Digital Gene Expression Profiling (Sequenzierung), um die mRNA-Level in BF- und PC-Trypanosomen genauer zu bestimmen [Jensen et al. 2009; Veitch et al. 2010].

Die Expressions-Muster für die drei TbAQPs nach Jensen et al. basierten auf Microarray-Daten, die relative und nicht direkt quantitative Expressions-Daten lieferten. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die eingesetzten Sonden gegen die trypanosomalen Aquaglyceroporine unterschiedlich gut ihre komplementären Sequenzen erkennen (Fehlerquellen sind nicht spezifische Hybridisierung, Cross-Hybridisierung und nicht lineare und sättigbare Hybridisierungs-Kinetiken), konnten die Expressions-Levels der drei TbAQPs nicht miteinander verglichen werden. Allerdings konnten die mRNA-Daten der procyclischen und Blutform-Trypanosomen für die einzelnen Aquaglyceroporine einander gegenübergestellt werden.

Dabei stellte sich heraus, dass die AQP1-Transkriptmenge in Blutformzellen nur etwa die Hälfte der Menge in procyclischen Trypanosomen ausmachte. Die AQP2-mRNA-Menge in BF- und PC-Zellen war gleich groß und die AQP3-Transkriptmenge in Blutformen war mehr als viermal so groß wie in procyclischen Zellen.

Diese Ergebnisse zur Genexpressions-Regulation für die Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei brucei* wurden von Veitch et al. in *Trypanosoma brucei gambiense* bestätigt. Dazu wurde die SuperSAGE-Methode, eine weiter entwickelte Version der Seriellen Analyse der Genexpression (SAGE), zur qualitativen und quantitativen Analyse von exprimierten Genen eingesetzt [Matsumura et al. 2003]. Bei dieser Methode wird mRNA in cDNA umgeschrieben, wobei wie bei der Seriellen Analyse der Genexpression von jedem Transkript enzymatisch ein Sequenzabschnitt, auch Tag genannt, herausgeschnitten und sequenziert wird. Diese Tag-basierte Analyse der Genexpression mittels neuer Hochdurchsatz-Sequenziermethoden wird auch als Digital Gene Expression Profiling (DGE) bezeichnet. Digital Gene Expression Profiling weist nicht die Beschränkungen der Microarrays auf und ermöglicht es auch extrem seltene Transkripte genau zu quantifizieren.

Digital Gene Expression Profiling erlaubte es, die Transkript-Mengen der verschiedenen Aquaglyceroporine auch direkt miteinander zu vergleichen. Normiert auf 100.000 Transkripte insgesamt, war TbAQP1 mit 21 Tags in Blutformzellen und 47 Tags in procyclischen Zellen die prädominante Aquaglyceroporin-mRNA. In Blutform-Trypanosomen machten AQP2-Transkripte nur 0,19 % und AQP3-Transkripte nur 1,34 % der AQP1-mRNA-Menge aus. Procyclische Zellen wiesen AQP2- und AQP3-Transkriptmengen auf, die 0,22 % und 0,30 % der entsprechenden AQP1-Transkriptmenge entsprachen.

5.1 Lokalisierung der Aquaglyceroporine

Die drei Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei* sind sich in ihrer Aminosäuresequenz einander so ähnlich, dass zur Immunisierung nicht ganze Proteine, sondern kurze synthetische Peptide eingesetzt werden mussten. Die gewonnenen Antikörper waren spezifisch für kurze Sequenzabschnitte, die jeweils nur in einem Aquaglyceroporphin vorkam. Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit diesen AQP-Antikörpern waren aussagekräftig. Die spezifische Detektion der drei Aquaglyceroporine in unterschiedlichen trypanosomalen Membran-Fractionen im Western Blot war, auch mit den mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörpern, nicht erfolgreich.

Frühere Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit den nicht aufgereinigten AQP-Antikörpern zeigten folgende, in BF- und PC-Trypanosomen identische, Lokalisierungen für die drei Aquaglyceroporine [Uzcategui 2006]: TbAQP1 war nur in der Flagellummembran zu finden, wohingegen TbAQP2 in der Plasmamembran und in intrazellulären Organellen und TbAQP3 in der Plasmamembran verortet wurden.

AQP1

Die aktuellen Immunfluoreszenz-Bilder in BF 221-Trypanosomen bestätigen die klare und eindeutige Lokalisierung von TbAQP1 in der Flagellummembran. *Leishmania major* besitzt fünf MIPs, wobei das Aquaglyceroporphin LmAQP1 in Promastigot-Formen im Flagellum lokalisiert ist [Figarella et al. 2007]. Noch ist kein Signalpeptid für die Lokalisation in der Flagellummembran bekannt, aber in *Leishmania mexicana* und *Leishmania enriettii*, Kinetoplastiden mit drei beziehungsweise zwei Glucose-Transportern, hat jeweils nur das in der Flagellummembran lokalisierte Protein einen relativ langen N-Terminus [Burchmore et al. 2003; Nasser et al. 2004]. Auch TbAQP1 weist diesen relativ langen charakteristischen Amino-Terminus auf. Daten zu den LeISO1 und LeISO2 Glucose-Transportern deuten nicht auf die Existenz einer einfachen linearen Zielsequenz hin. Wahrscheinlich ist die Raumstruktur des Amino-Endes für die Lokalisierung ausschlaggebend [Nasser et al. 2004]. Es stellt sich die Frage, welche Funktion ein in der Flagellummembran lokalisierter Glucosetransporter oder Glycerinkanal erfüllt. Die Aufnahme von Glucose und Glycerin zur Verstoffwechslung ist über die Plasmamembran sicher effektiver. Möglicherweise dienen diese Proteine als Sensoren [McCarter 2001; Burchmore et al. 2003; Thar et al. 2003]. Es gibt Überlegungen, dass Aquaporine als Osmosensoren wirken können [Hill et al. 2004].

AQP2

Nachdem der aufgereinigte Antikörper gegen TbAQP2 bei Immunfluoreszenz-Aufnahmen in BF 221-Zellen keine verwertbaren Bilder lieferte, wurde die Verortung anhand von AQP2-Überexpressions-Trypanosomen durchgeführt. Die Erfolgsrate für das stabile Einbringen neuer DNA-Abschnitte ins Trypanosomen-Genom von BF- und PC-Zellen unterscheidet sich stark, wobei PC-Formen leichter zu transformieren sind [Clayton et al. 2005]. Procyclische Trypanosomen sind aufgrund der Tatsache, dass sie sowohl per Glycolyse als auch durch oxidative Phosphorylierung Energie gewinnen können, metabolisch stabiler und insgesamt robuster. Sie können daher typischerweise ein größeres Spektrum an phänotypischer Veränderung überleben. Aus diesem Grund wurden PC 29-13-Zellen mit einem zuvor hergestellten induzierbaren Überexpressions-Plasmidkonstrukt transformiert. Die AQP2-Überexpressionszellen waren *leaky*, was den Trypanosomen aber nicht zum offensichtlich Nachteil gereichte. Unter Induzierungsbedingungen verdoppelten sich die Überexpressionszellen alle $12,3 \pm 2,1$ Stunden, was einem normalen Wert für procyclische Trypanosomen entspricht.

Die induzierten Überexpressionszellen zeigten auf Immunfluoreszenz-Aufnahmen eine Membranlokalisierung innerhalb der Zelle. Die zuvor berichtete TbAQP2-Lokalisierung in der Plasmamembran [Uzcategui 2006] konnte auf den neuen Aufnahmen und bei einer Kontroll-Auswertung auf den alten Aufnahmen nicht bestätigt werden.

In *Trypanosoma cruzi* ist eines von vier Aquaporinen in Acidocalcisomen lokalisiert und spielt bei der Osmoregulation eine wichtige Rolle [Rohloff et al. 2008]. Es ist denkbar, dass Glycerin über Aquaglyceroporin (TbAQP2) an den Ort der Lipidsynthese, das glatte endoplasmatische Retikulum, gebracht wird, um die Phospholipide-Synthese zu gestatten. Eine weitere theoretische Überlegung ist, dass ein Aquaglyceroporin (TbAQP2) in der Glycosomenmembran lokalisiert sein könnte. Die Zelle muss die Möglichkeit besitzen, Glycerin je nach Stoffwechsellage, aus den Glycosomen heraus- oder in die Glycosomen hineinzuschleusen.

Eine erfolgreiche intrazelluläre Lokalisierung durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen TbAQP2 und Pyrophosphatase TbVP1, einem Marker der Acidocalcisomen in *Trypanosoma brucei* [Lemercier et al. 2002], gegen TbAQP2 und Rab-Protein TbRAB2, einem Marker des Endoplasmatischen Retikulums in *Trypanosoma brucei* [Field et al. 1999] oder gegen TbAQP2 und Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase TbALD, einem Marker der Glycosomen in *Trypanosoma brucei*, steht noch aus. Hauptgrund ist der vorhandene AQP2-Antikörper, der die Bestimmung des exakten intrazellulären Membranlocus bisher nicht zuließ.

AQP3

Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen in BF 221 für TbAQP3 mit dem affinitätsgereinigten AQP3-Antikörper zeigten eine klare Lokalisierung in der Plasmamembran. TbAQP3 ermöglicht den Austausch zwischen dem Cytosol und der Außenwelt. Die Anwesenheit von TbAQP3 in der Plasmamembran wurde auch von Bridges et al. bei ihrer Analyse des Plasmamembran-Subproteoms von Blutform-Trypanosomen gefunden [Bridges et al. 2008]. Im Widerspruch zu den hier präsentierten Daten wurde in der Studie aber auch TbAQP2 in der Plasmamembran-Fraktion gefunden. Sowohl im Fall von TbAQP2 als auch im Fall von TbAQP3 basierte die Identifikation der Aquaglyceroporine nach Bridges et al. auf der massenspektroskopischen Detektion von jeweils nur einem Peptid. Dies und der hohe Anteil an Nicht-Plasmamembran-Proteinen in der untersuchten isolierten Plasmamembran-Fraktion begründet die Möglichkeit, dass auch TbAQP2 eine Kontamination in der untersuchten Plasmamembran-Fraktion war. Dazu ist anzumerken, dass in der Studie 133 von 837 identifizierten Proteinen durch eine Kombination von Schlüsselwort-Suchen und dem Finden von GeneDB-Zitatstellen als nicht Membran-lokalisierte Proteine identifiziert und daher als Kontamination aus dem Datensatz entfernt wurden.

5.2 AQP-RNAi-Trypanosomen

Nach Auswahl der α -Tubulin-Knockdown-Sequenz, der drei AQP-Knockdown-Sequenzen und der AQP-Gesamt-Knockdown-Sequenz wurden diese in Knockdown-Vektoren kloniert, linearisiert und in procyclische und Blutform-Trypanosomen transfiziert. Zur Bestimmung der Knockdown-Rate in den gewonnenen Transformanden wurden jeweils Northern Blot-Analysen durchgeführt. Die Effektivität der RNA Interferenz variierte auch zwischen einzelnen Klonen eines Knockdowns, wahrscheinlich da es mehrere mögliche Integrationsstellen gibt. Es existieren verschiedene *rRNA spacer*-Regionen auf mehreren unterschiedlichen Chromosomen. Aus jeweils mehreren Klonen eines AQP-Knockdown-

Typs wurde derjenige mit der höchsten Reduktion an AQP-Transkript ausgewählt und zur Phänotypisierung eingesetzt.

Beim Anfertigen der Northern Blots zeigte sich, dass bei allen Knockdown-Ziellinien die Transkriptions-Regulation des RNA-Interferenz-Fragments trotz Tetracyclin-Repressors *leaky* war. Die AQP-mRNA-Level der verschiedenen uninduzierten Knockdown-Klone waren im Extremfall um 94 %, ansonsten zwischen 17 % und 65 % gegenüber den nicht elektroporierten Kontrollzellen reduziert. Da sich aber keiner der Knockdowns als tödlich erwies, stellte dies für die weiteren Untersuchungen kein Problem dar.

Die zu Beginn des Tetracyclin-induzierten Knockdowns in den Trypanosomen vorhandene Aquaglyceroporin-Protein-Menge reduziert sich ohne Neusynthese und ohne Degradierung durch subsequente Zellteilungen innerhalb von drei Tagen Induktion rechnerisch auf nur noch 0,2 % (BF) beziehungsweise 1 % (PC) der ursprünglichen AQP-Proteinmenge. Die Erkennung und Degradation der mRNA ist ein *knock-down* und kein *knock-out* Verfahren. Es verbleibt also immer ein Rest mRNA. Bei einem guten Knockdown ist die entsprechende mRNA-Menge soweit reduziert, dass nur geringe Mengen an neuem AQP-Protein in der Zelle hergestellt werden. Die Erfahrungen zeigen, dass viele Trypanosomen-Proteine, im Vergleich mit dem Level, der benötigt wird, um den Wildtyp-Phänotyp aufrecht zu erhalten, in 5- bis 10-fachem Überschuss vorliegen [Krieger et al. 2000; Helfert et al. 2001]. Es wird also häufig eine mindestens 80 %ige Reduktion an Protein für eine Änderung des Phänotyps benötigt.

Um herauszufinden welche Defizite ein Aquaglyceroporin-Knockdown aufweist, wurden die RNAi-Klone unter anderem einem hypoosmolaren Schock unterzogen. Anstatt den normalen 280 bis 300 mosm waren die Trypanosomen nun einer extrazellulären Osmolarität von 150 mosm ausgesetzt. Dieser Osmolaritätsunterschied führte zu einem schnellen und massiven Wassereinstrom über die Aquaglyceroporine. Die Trypanosomen reagierten auf diesen Wassereinstrom mit dem Prozess der regulatorischen Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*). Sie scheiden Osmolyte aus, woraufhin es, entsprechend dem osmotischen Gefälle, zum Wassertransport aus der Zelle kommt.

Wenn Leishmanien einem hypoosmolaren Stress ausgesetzt wurden, stieg das Zellvolumen in der ersten Minute um vierzig Prozent an und sie leiten einen *regulatory volume decrease* mit der schnellen Freisetzung von Ninhydrin-positiven Substanzen ein [Darling et al. 1990]. Außerdem kommt es zu einer schnellen Freisetzung von Natrium, Kalium und Chlorid aus dem Cytosol der Zellen [LeFurgey et al. 2001]. In *Trypanosoma cruzi* kam es beim hypoosmolaren Schock zur Freisetzung von Aminosäuren und Kalium. Hier war die Freisetzung der Aminosäuren nach zwei Minuten beendet [Rohloff et al. 2003]. Diese Freisetzung ist zuständig für 57 % des *regulatory volume decrease*. Es kommt außerdem zu einem Anschwellen der Acidocalcisomen und zur Freisetzung von Wasser mittels Aquaporin aus dem kontraktiven Vakuolenkomplex. Dieser Wasserausstoß ist für die restlichen 43 % des *regulatory volume decrease* zuständig [Rohloff et al. 2004].

In *Trypanosoma brucei* kam es beim hypoosmolaren Schock innerhalb der ersten drei Minuten zum aktiven Austransport von Aminosäuren, vor allem Alanin, nicht aber Natrium oder Kalium [Lehnert 2007].

Wie zuvor erwähnt, waren die vorhandenen AQP-Antikörper nicht in der Lage, TbAQPs im Western Blot zu detektieren. Somit konnte der Knockdown-Verlauf nicht im Immunblot protokolliert werden.

5.2.1 AQP1

Der Knockdown von TbAQP1 war sowohl in Blutformen als auch in procyclischen Trypanosomen sehr hoch. Bei der Dokumentation des mRNA-Knockdown-Verlaufs der PC 1313-514 AQP1 Zellen konnten mRNA-Reduktionen zwischen 99 % und 93 % gemessen werden und die BF AQP1-Knockdown-Trypanosomen zeigten eine Reduktion der AQP1-mRNA um 83 %. Die Generationszeiten von $12,4 \pm 2,98$ h und $8,0 \pm 1,0$ h unterschieden sich nicht signifikant von denen der entsprechenden Kontrollzellen mit $11,0 \pm 3,1$ h und $7,8 \pm 1,3$ h.

Beim hypoosmolaren Schock-Experiment korrespondierte ein Abnehmen der Absorption mit einer Zunahme des Zellvolumens. Der AQP1-mRNA-Knockdown wirkte sich in den PC- und BF-Zellen sehr unterschiedlich aus.

In PC 1313-514 AQP1-Trypanosomen war die Schwellzeit, die Zeit bis zur maximalen Schwellung der Trypanosomen, mit $61,3 \pm 5,0$ Sekunden, im Vergleich zu den Kontrollzellen, mehr als doppelt so lang. Diese Kontrollzellen hatten eine Schwellzeit von $30,4 \pm 5,0$ Sekunden. Dieser Wert erklärt sich durch die Tatsache, dass AQP1 in der Flagellummembran lokalisiert und mengenmäßig das dominierende Aquaglyceroporin mit 99,5 % der gesamten Aquaglyceroporin-mRNA ist [Veitch et al. 2010].

In BF SMB AQP1-Zellen kam es nur zu einer Verlängerung der Schwellzeit von $18,4 \pm 5,2$ sek auf $26,0 \pm 2,0$ sek. Blutform-Trypanosomen besitzen nur etwa die Hälfte der AQP1-mRNAs, verglichen mit PC-Zellen. Dies müsste den Wassereinstrom eigentlich hinauszögern, aber von größerem Effekt sind hier höchstwahrscheinlich die in der Plasmamembran sitzenden AQP3-Kanäle, für die in Blutformen eine mehr als vierfache größere Transkriptmenge als in procyclischen Trypanosomen gefunden wurde [Veitch et al. 2010]. Die Wasserleitfähigkeit von AQP1 und AQP3 ist fast identisch [Uzcategui 2006], aber Wasser kann über die Plasmamembran viel effektiver in die Zelle transportiert werden als über die Flagellummembran.

5.2.2 AQP2

Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass sowohl der procyclische als auch der Blutform-mRNA-Knockdown von TbAQP2 nur eine Reduzierung auf 61 % beziehungsweise 64 % erreichte. Da gezeigt werden konnte, dass AQP2-Knockdownfragment in den induzierten Zellen hergestellt wurde, stellte sich die Frage warum keine größere mRNA-Reduktion erreicht wurde.

Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass dieser spezielle Klon eine schwache Knockdown-Rate aufwies, potentiell aber auch Klone erzeugbar sind, die höhere Knockdown-Raten besitzen. Eine andere, bessere Erklärung liegt in der niedrigen Expressionsrate von TbAQP2 begründet. Nur circa eines von je 300.000 Transkripten in BF- und PC-Trypanosomen ist eine TbAQP2-mRNA [Veitch et al. 2010].

Es gibt Hinweise, dass das Argonaut-Protein, die RNase H Endonukleaseaktivität des *RNA inducing silencing complex*, Polyribosom-assoziiert ist. Das trypanosomale AGO1 sedimentiert mit Polyribosomen, was an einer Arginin/Glycin-reichen Domäne am Amino-Terminus des Proteins liegt. Wird die Arginin/Glycin-reiche Domäne verkleinert, so reduziert dies die Assoziation von TbAGO1 mit Polyribosomen und die RNAi-induzierte Zerstörung von mRNA dramatisch [Shi et al. 2009]. Boten-RNAs, die nicht aktiv translatiert werden, sind somit wahrscheinlich weniger zugänglich für die RNAi-Maschinerie. Ein gewisser niedriger Basislevel an Transkript ist diesem RNAi-Mechanismus somit

nicht zugänglich. Ein Beispiel sind die AQP2-mRNAs im Kern. Die Gene für AQP2 und AQP3 liegen direkt nebeneinander auf Chromosom 10 und befinden sich höchstwahrscheinlich auf derselben polycistronischen Transkriptionseinheit. Da die AQP3-mRNA-Menge in BF-Zellen mehr als vierfach so groß ist wie in PC-Zellen zeigt dies, dass die AQP2-Transkript-Menge posttranskriptional herunter reguliert wird. Somit kann das nur schwach exprimierte AQP2-Transkript im Knockdown-Klon prozentual nicht so stark reduziert werden.

Die induzierten PC 1313-514 AQP2-Zellen verdoppelten sich mit $12,8 \pm 3,7$ h nicht signifikant langsamer als die procyclischen Kontrollzellen mit $11,0 \pm 3,1$ h. Wenn diese Knockdown-Zellen einem hypoosmolaren Schock ausgesetzt wurden, so gab es mit $36,0 \pm 2,0$ sek versus $30,4 \pm 5,0$ sek für die PC-Kontrollzellen keine signifikante Änderung der Schwellzeit, das heißt AQP2 ist nicht beteiligt am Wassereintransport ins Cytosol. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der gefundenen intrazellulären Membran-Lokalisation des Proteins.

Die PC-AQP2-Knockdown-Zellen zeigten also keinen auffälligen Phänotyp, wohingegen der bereits zuvor erwähnte PC-AQP2-Überexpressions-Klon, der sich induziert unter Nicht-Stress-Bedingungen normal alle $12,3 \pm 2,1$ Stunden verdoppelt, beim hypoosmolaren Schock einen interessanten Phänotyp zeigt. Die Überexpressionszellen sehr ähnlich wie die Kontrollzellen an und nach etwas mehr als 20 Sekunden begann die Volumenreduktion. Die Kontrollzellen erreichten nach etwa fünfzehn Minuten wieder ihre ursprüngliche Größe, wohingegen bei den AQP2-Überexpressionszellen die Volumenreduktion nach etwa 3,5 Minuten abbrach. Zu diesem Zeitpunkt waren weit mehr als die Hälfte aller Zellen bewegungslos und sie erholten sich auch nicht mehr.

Die induzierten BF-AQP2-Knockdown-Zellen waren, anders als die robusteren procyclischen Formen, signifikant wachstumsinhibiert. Ihre Generationszeit betrug $13,2 \pm 1,7$ h im Gegensatz zu $7,8 \pm 1,3$ h für die BF-Kontrollzellen. Die Zeit der BF-AQP2-Knockdown-Trypanosomen bis zur maximalen Schwellung in 150 mosm Medium war 18,0 Sekunden versus $18,4 \pm 5,2$ Sekunden für die BF-Kontrollzellen. Der nicht existente Einfluss von AQP2 auf dem anfänglichen Wassereinstrom, war aufgrund der nur intrazellulären AQP2-Membran-Lokalisierung zu erwarten. Das Abschwollen der Trypanosomen funktionierte nicht normal. Nach etwa vier Minuten stagnierte die Absorption im Hypoosmolaren-Schock-Experiment, ein Ergebnis, dass durch Mikroskop-Beobachtungen gedeckt wurde, wo etwa die Hälfte der induzierten BF-AQP2-Knockdown-Zellen nach zehn Minuten noch sichtbar geschwollen war und die andere Hälfte leblos erschien.

AQP2 scheint eine wichtige Funktion beim Prozess der Osmoregulation zu spielen, da ein Zuwenig (BF-AQ2-Knockdown) oder Zuviel (PC-AQP2-Überexpression) an AQP2 unter hypoosmolaren Stressbedingungen zum Tode der Trypanosomen führt. Möglich ist eine Lokalisierung von TbAQP2 in Acidocalcisomen, wo es, wie für *Trypanosoma cruzi* beschrieben [Rohloff et al. 2008], eine wichtige Rolle in der Osmoregulation spielen kann.

In *Trypanosoma cruzi* ist eines von vier Aquaporinen in den Acidocalcisomen lokalisiert. Kommt es durch Wassereinstrom zur Zellschwellung, zum Beispiel im Falle eines hypoosmolaren Schocks, so kommt es durch diesen Stimulus zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg durch eine bislang noch nicht identifizierte Adenylatcyclase. Der cAMP-Anstieg führt zur Fusion von Acidocalcisomen mit der Kontraktilen Vakuole und damit einer Translokation der Aquaporine. Ein simultaner Anstieg an Ammoniak und seine Abscheidung in Acidocalcisomen als Ammonium-Ionen aktiviert die dortige Polyphosphat-Spaltung zu anorganischen Phosphatresten. Der resultierende osmotische Gradient

sequestriert durch das Aquaporin Wasser, welches anschließend in die Flagellumtasche abgegeben wird.

5.2.3 AQP3

Wenn man die Transkript-Menge für induzierte AQP3-RNAi-Trypanosomen betrachtet, so sieht man, dass der procyclische Knockdown keine mRNA-Reduktion erzeugte. Es wurde aber auch nachgewiesen, dass das AQP3-Knockdown-Fragment in den induzierten Zellen transkribiert wurde. Erklären lässt sich dies, wie weiter oben schon für die PC- und BF-AQP2-Knockdown-Klone beschrieben, mit der außerordentlich kleinen AQP3-mRNA Menge in procyclischen Trypanosomen [Veitch et al. 2010]. Blutform-Trypanosomen haben eine mehr als vierfach höhere Menge an AQP3-mRNA und der entsprechende induzierte BF-AQP3-RNAi-Klon zeigte dann auch eine Reduktion der mRNA-Menge auf nur noch 16 %.

Es stellt sich die Frage, warum das Plasmamembran-Protein TbAQP3 in Blutform-Trypanosomen, im Vergleich zu der procyclischen Form, so stark hochreguliert ist. Eine Erklärung ist, dass die Blutform-Trypanosomen häufiger als Fliegenformen einer osmolytisch stark schwankenden Umgebung ausgesetzt sind. Nur im Säuger gibt es die regelmäßige Nierenpassage, so dass TbAQP3 in der Plasmamembran bei der Osmoregulation helfen kann.

Eine wachstumsinhibierende Wirkung konnte unter den verwendeten Nicht-Stress-Bedingungen in den induzierten PC-AQP3-Knockdown-Trypanosomen nicht festgestellt werden. Die Generationszeiten von $13,3 \pm 3,1$ h unterschied sich nicht signifikant von der entsprechender Kontrollzellen mit $11,0 \pm 3,1$ h. Wenn diese Knockdown-Zellen einem hypoosmolaren Schock ausgesetzt wurden, so gab es in den PC-Knockdown-Trypanosomen mit $30,7 \pm 4,2$ sek versus $30,4 \pm 5,0$ sek für die PC-Kontrollzellen keine signifikante Änderung der Schwellzeit. Da es keine AQP3-mRNA-Reduktion gab, waren die Schwellzeit und auch die Generationszeit gleich mit der der PC-Kontrollzellen.

Induzierte BF-AQP3-Knockdown-Trypanosomen zeigten ebenfalls keine wachstumsinhibierende Wirkung. Die Generationszeit $7,9 \pm 1,5$ h unterschied sich nicht signifikant von der entsprechender Kontrollzellen mit $7,8 \pm 1,3$ h. Anders sah es aber bei Stress-Bedingungen aus. Beim hypoosmolaren Schock nahm die Schwellzeit der BF-Knockdown-Zellen, mit $34,0 \pm 2,0$ sek versus $18,4 \pm 5,2$ sek für die BF-Kontrollzellen, zu. Die höhere Expressionsrate von AQP3 in Blutformen führte zu einer 86 %igen Erniedrigung des mRNA-Levels und somit einer deutlich verminderten Wasseraufnahme über die Plasmamembran, was sich in der Schwellzeit widerspiegelt.

5.2.4 AQP1-3

Die mRNA-Knockdown-Analysen zeigten sowohl für die PC- als auch die BF-Zellen sehr erfolgreiche Simultan-Knockdowns aller drei AQP-mRNAs. In den PC 1313-514-Gesamt-Knockdown-Trypanosomen konnte eine Reduktion der AQP1-, AQP2- und AQP3-mRNA auf 3 %, 39 % und 36 % erreicht werden. Eine ähnliche Reduktion der AQP1-, AQP2- und AQP3-mRNA konnte in den BF SMB-Gesamt-Knockdown-Zellen mit Restwerten von 1 %, 27 % und 6 % dokumentiert werden.

AQP1-mRNA ist durch die PC- und BF-Knockdown-Klone zu über 97 % herunter reguliert und AQP2-mRNA ist in beiden Formen aufgrund seiner geringen Ausgangsmenge nur zu etwa 60 bis 70 % reduziert. AQP3-mRNA ist in der procyclischen Form, wie TbAQP2-mRNA, aufgrund der geringen

Ausgangsmenge nur zu 64 % reduziert. In den entsprechenden Blutformzellen konnte eine 94 %ige Reduktion der AQP3-mRNA-Menge, die unter normalen Umständen in BF-Zellen mehr als vierfach stärker exprimiert ist als in PC-Zellen, verzeichnet werden.

Eine wachstumsinhibierende Wirkung konnte in den induzierten PC- und BF-Gesamt-Knockdown-Zellen nicht festgestellt werden. Die Generationszeiten von $13,4 \pm 1,0$ h und $7,9 \pm 1,3$ h unterschieden sich nicht signifikant von denen der entsprechenden Kontrollzellen mit $11,0 \pm 3,1$ h und $7,8 \pm 1,3$ h.

Beim hypoosmolaren Schock zeigten PC- und BF-Knockdownzellen eine verlängerte Schwellzeiten, aber eine normale Volumenreduktion. Die 2,4 fache Schwellzeit im Vergleich zu den Kontrollzellen ($30,4 \pm 5,0$ sek) konnte in den induzierten PC 1313-514 AQP1 Trypanosomen ($72,7 \pm 7,0$ sek) gemessen werden. Die Schwellzeit-Zunahme für den Gesamt-AQP-Knockdown unterscheidet sich nicht signifikant von den aufsummierten Schwellzeit-Zunahmen der Einzel-AQP-Knockdowns. Ebenso kam es zu einer Verdoppelung der Schwellzeit in den induzierten BF SMB AQP1-Knockdown-Zellen. Diese wiesen eine Schwellzeit von $36,7 \pm 2,3$ sek im Vergleich zu den $18,4 \pm 5,2$ sek der BF-Kontrollzellen auf. Auch hier setzt sich die Schwellzeit-Zunahme für den Gesamt-AQP-Knockdown aus den aufsummierten Schwellzeit-Zunahmen der Einzel-AQP-Knockdowns zusammen.

Es existiert allerdings ein Widerspruch zu den BF-AQP2-Einzel-Knockdown-Ergebnissen. Induzierte BF-AQP1-3-Zellen, im Gegensatz zu BF-AQP2-Einzel-Knockdown-Zellen, wiesen eine normale Generationszeit auf und überlebten den Abschwelligvorgang beim hypoosmolaren Schock. Jedoch könnte gerade im gleichzeitigen Knockdown von AQP1 und AQP3, das heißt dem Ausbleiben des initialen Stimulus für den osmoregulatorischen Effekt von AQP2, der Grund für den Unterschied liegen. Das schnelle Anschwellen der Trypanosomen ist der Initialstimulus [Rohloff et al. 2008] und TbAQP1 und TbAQP3 sind hierfür alleinverantwortlich. Hypotone Bedingungen können einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg induzieren, der wiederum zur Aktivierung des *regulatory volume decrease* führt [Galizia et al. 2008]. Der Anstieg der cytosolischen Calcium-Konzentration geschieht zum Beispiel mittels eines mechanosensitiven Ionenkanals [Martinac 2004; Hua et al. 2010].

Da beide Gesamt-AQP-Knockdown-Zelllinien in allen Belangen höhere Knockdown-Raten aufwiesen als die Einzel-Knockdowns und die Dreifach-Knockdowns potentiell mehr Defizite als die Einzel-Knockdowns aufweisen sollten, wurde die weitere Phänotypisierung fokussiert mit der für den Menschen wichtigen BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zelllinien durchgeführt. Dieser Klon zeigte den insgesamt stärksten RNA Interferenz-Effekt.

Glycerin-Überlebenstest

Aquaglyceroporine transportieren neben Wasser auch Glycerin. Blutform-Trypanosomen können nur mit Glycerin als einzigem Energiesubstrat überleben [Haanstra et al. 2008]. Wenn sie sich von Glucose ernähren, so verstoffwechseln sie alle drei bis vier Stunden eine Glucose-Menge, die ihrem eigenen Körpergewicht entspricht [Duszenko 1998]. Wenn sie nun nur Glycerin zum Überleben haben, müssen sie molar betrachtet doppelt so viel Glycerin wie Glucose aufnehmen, um auf die gleiche Menge an ATP zu gelangen.

Die Versuche zeigten, dass induzierte BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen, verglichen mit BF-Kontrollzellen, mit Glycerin als einzigem Energiesubstrat im Medium ohne Einschränkungen überleben können. Die Pyruvat-Produktion, für die induzierten Knockdown-Zellen und die

Kontrollzellen, war beim Überleben nur mit Glycerin, aber signifikant geringer als nur mit Glucose, was auf eine Ineffizienz der BF SMB-Zellen bei der Glycerin-Verstoffwechslung deutet.

Die induzierten BF-Gesamt-Knockdown-Zellen konnten trotz der sehr guten AQP-Knockdowns Glycerin ins Cytosol und von dort in die Glycosomen transportieren. Die AQP-Transkripte waren für AQP1 um 99 %, für AQP2 um 73 % beziehungsweise für AQP3 um 94 %% reduziert, was einem vollständigen Knockdown gleichkommt. Aus diesem Grunde musste es einen weiteren Transportmechanismus für Glycerin in *Trypanosoma brucei* geben, welcher die fehlende Transportkapazität der Aquaglyceroporine komplett ausgleichen konnte.

Der in den induzierten BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen fehlende Glycerintransport durch AQP1 in der Flagellummembran und AQP3 in der Plasmamembran wurde von dem von Wille et al. beschriebenen spezifischen Glycerintransporter ausgeglichen. Kinetische Betrachtungen von Glycerin-Transport in Blutform-Trypanosomen zeigten zwei Transportmechanismen auf, einen spezifischen Glycerin-Transporter, der nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion arbeitete und der bei niedrigen Glycerin-Konzentrationen vorherrscht und einen Glycerinkanal, der auf einfacher Diffusion beruht und bei hohen Glycerin-Konzentrationen vorherrscht. Die Glycerinaufnahme mittels einfacher Diffusion geschieht über die Aquaglyceroporine. Vom spezifischen Glycerin-Transporter ist bekannt, dass er eine Michaelis-Konstante von 0,17 mM aufweist. [Wille et al. 1998].

Der lange Zeit in der Literatur „verdächtigste“ Kandidat, das *glycerol uptake protein* [Bleve et al. 2005] ist wirklich eine Membran-gebundene *glycosylphosphatidylinositol remodelase* [Jaquenoud et al. 2008] und fällt somit als Glycerintransporter aus.

Die Funktion des Glycerin-Transporters liegt, unter normalen Bedingungen, das heißt mit Glucose im Medium und unter Berücksichtigung der Stoffwechselsituation in *Trypanosoma brucei*, auf Seiten des Glycerin-Austransports und nicht auf Seiten der Glycerin-Aufnahme. Durch Expression des spezifischen Transporters wird selbst bei kleinen Substratkonzentrationen eine effektive Glycerin-Ausscheidung gewährleistet. Da auch unter normalen Bedingungen fortlaufend geringe Mengen an Glycerin gebildet werden [Eisenthal et al. 1985], ist der Transporter für die Trypanosomen von physiologischer Bedeutung.

Die Tatsache des funktionierenden massiven Glycerin-Transports ins Glycosom der induzierten BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen ist ein sehr starkes Indiz, dass der spezifische Glycerintransporter auch in der Glycosomenmembran vorhanden ist.

Arsen- und Antimon-Transport

Die drei trypanosomalen Aquaglyceroporine transportieren auch dreiwertiges Arsen und Antimon. $\text{As}(\text{OH})_3$ und $\text{Sb}(\text{OH})_3$ werden in die Zellen aufgenommen und töten Blutform-Trypanosomen im nanomolaren Konzentrationsbereich [Uzategui 2006]. Die akut schädigende Wirkung in Trypanosomen besteht in der Bindung der Thiolgruppen physiologisch wichtiger Substanzen.

Die IC_{50} -Werte für dreiwertiges Arsen in induzierten BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen und in BF SMB-Kontrollzellen waren mit 193 und 162 nM nicht signifikant unterschiedlich. Dieselbe Aussage trifft zu für dreiwertiges Antimon in induzierten BF-Gesamt-AQP-Knockdown-Zellen und in BF SMB-Kontrollzellen, wo die IC_{50} -Werte mit 54 und 50 nM noch näher zusammen lagen. Die reduzierte Arsen- und Antimon-Aufnahmemöglichkeit über die Aquaglyceroporine führte zu nicht signifikant

höheren IC_{50} -Werten. Wahrscheinlich ist, dass die wenigen verbliebenen AQP1- und AQP3-Proteine ausreichen, um über den 24-stündigen Zeitraum des Versuchs dreiwertiges Arsen und Antimon in ausreichender, letaler Menge aufzunehmen.

5.3 Resümee und Ausblick

Im Hinblick auf ein zentrales Ziel dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass es gelungen ist, eine sowohl stabil vererbare als auch induzierbare RNA Interferenz-Methode für procyclische Trypanosomen und Blutform-Trypanosomen in unserem Labor zu etablieren.

Die RNAi-Methode wurde erfolgreich eingesetzt, um in beiden Trypanosomen-Formen sowohl jedes Aquaglyceroporin individuell als auch alle drei Aquaglyceroporine gleichzeitig auszuschalten. Die Aquaglyceroporine sind Membrankanäle, deren Funktion in der Osmoregulation und im Ein- und Aus-Transport von Glycerin liegt. Da sie zusätzlich die Fähigkeit haben toxische Verbindungen wie Arsen, Antimon oder Dihydroxyaceton in die Zelle zu schleusen, besteht die Möglichkeit sie als Ziele für die Bekämpfung der Schlafkrankheit weiter zu entwickeln.

Die erzielten AQP-Knockdown-Raten waren für nahezu alle RNAi-Transformanten dazu geeignet, Rückschlüsse aus den resultierenden Phänotypen ziehen zu können. Die Knockdown-Rate für die von Beginn an nur sehr schwach exprimierten Aquaglyceroporine TbAQP2 (in BF und PC) und TbAQP3 (in PC) in den entsprechenden RNAi-Klonen lag unter 75 %. In jedem Einzelfall ist für die so gewonnenen Ergebnisse zu prüfen, ob die resultierende Abnahme an korrespondierendem Protein ausreichte, valide Ergebnisse erhalten zu können. Generell gilt, dass die RNA Interferenz-Methode einfacher und schneller ist als das Erzeugen von genetischen Null-Mutanten, auch Knockout-Trypanosomen genannt. Absolute Gewissheit der vollständigen Abwesenheit der Genfunktion kann nur die komplette Entfernung der diploiden Kopien des ausgesuchten offenen Leserahmens garantieren.

Das Ziel der Lokalisierung aller Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei* wurde größtenteils erfüllt. TbAQP1 wurde in der Falgellummembran verortet und TbAQP3 konnte in der Plasmamembran lokalisiert werden. Lediglich für TbAQP2 konnte seine intrazelluläre Lokalisierung nicht auf bestimmte Organellmembranen eingegrenzt werden, wobei es valide Hinweise auf ein Vorkommen in Acidocalcisomen gibt. Die Resultate der Knockdown-Phänotypisierung, soweit Unterschiede zum Wildtyp festzustellen waren, bestätigten alle Lokalisierungen.

Die Fähigkeit der Blutform-Trypanosomen, bei sehr erfolgreichem Simultan-Knockdown der drei Aquaglyceroporin, nur von Glycerin als Energiesubstrat überleben zu können, validierte den von Wille et al. 1998 beschriebenen spezifischen Glycerintransporter. Die Fähigkeit aller untersuchten AQP-Knockdown-Klone ohne einzelne oder ohne alle Aquaglyceroporine in vitro überleben zu können zeigte die Robustheit der Trypanosomen auf und damit die großen Schwierigkeiten beim Auffinden geeigneter *drug targets*.

Der nächste wichtige Schritt ist die präzise intrazelluläre Verortung von TbAQP2 mit Hilfe eines neuen Antikörpers und mit geeigneten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen. Dann muss abschließend bewertet werden, ob die Aquaglyceroporine in *Trypanosoma brucei* noch ein lohnendes *drug target* darstellen.

6 Abstract

The protozoan parasite *Trypanosoma brucei* causes human sleeping sickness, Nagana in domestic animals and depends on the tsetse fly for dissemination. In its complex life cycle two dividing stages can be differentiated, the slender form in blood, lymphatic fluid, and brain of the mammalian host and the procyclic form in the midgut of the fly vector.

For energy production bloodstream parasites rely on glucose, but alternatively they can also metabolize glycerol. Glycolysis in trypanosomes differs markedly from other eukaryotic cells, because the first seven reactions of the pathway are compartmentalized to a special organelle, called glycosome. Bloodstream form trypanosomes, because of the absence of a lactate dehydrogenase, use oxygen to maintain the NAD/NADH balance in the glycosome and throw out pyruvate. Under low oxygen conditions, the parasite can utilize a glycosomal glycerol kinase to maintain NAD/NADH homeostasis and produce glycerol as waste. The procyclic forms can feed on glucose too, but mainly use proline as an energy source; they have a functional tricarboxylic acid cycle and oxidative phosphorylation capabilities.

In its life cycle the trypanosome is also subjected to considerable variations of osmolarity. To cope with water and glycerol transport across membranes, they have three aquaglyceroporins, which are furthermore permeable for small uncharged solutes such as ammonia, arsenic or antimony.

Peptide-derived antibodies directed against each individual aquaglyceroporin were purified by affinity chromatography utilizing the synthesized peptides. Immunofluorescence staining showed AQP1 only in the flagellar membrane, whereas AQP3 was exclusively localized to the plasma membrane. For determining the AQP2 localization an AQP2 overexpressing trypanosome cell line was created to counter the low affinity of the Anti-AQP2 antibody. From the respective immunofluorescence micrographs, only a non-specific intracellular membrane localization could be concluded.

Besides that aquaglyceroporin-deficient RNA interference cell lines were used to backup and complement these results. A heritable and inducible RNAi vector was cloned for each individual aquaglyceroporin knockdown and one for a simultaneous triple knockdown. The plasmids were used to create corresponding procyclic and in bloodstream form knockdown cell lines. After verifying the success of the knockdown clones via Northern blot, the cell lines were tested phenotype changes like growth inhibition or their response to a hypo-osmotic shock.

The procyclic and bloodstream form AQP1 knockdown-rates were 99 % and 83 %, respectively. These cells showed no growth inhibition. They were capable to recover from a hypo-osmotic shock of 150 mosm and displayed, in accordance with AQP1 expression levels and the AQP1 flagellar membrane localization, a prolonged time to swell to the maximum size.

The procyclic form AQP3 knockdown transcribed AQP3 knockdown RNA but was not able to reduce the already low AQP3 transcript level, so accordingly no phenotype changes could be found. Bloodstream form trypanosomes have more than fourfold more AQP3 transcript than procyclic forms; when the bloodstream form AQP3 knockdown was induced the AQP3 mRNA amount was reduced to a sixth. The lack of AQP3 in the plasma membrane led to no growth inhibition and normal recovery from hypo-osmotic stress conditions. It also led to a profoundly prolonged time for cell swelling, as would be anticipated.

Both the procyclic and bloodstream form AQP2 knockdowns exhibited only a mild reduction of AQP2 transcripts to about sixty percent of normal levels. The knockdown fly form grew normal and showed no significant change in the hypo-osmotic stress test. The bloodstream form AQP2 knockdown trypanosomes were more sensitive to intracellular organelles missing AQP2. They had a growth defect and had severe problems in the hypo-osmotic stress test. These knockdown cells showed a normal swelling time but during the volume recovery phase one half of the cells died and the others took longer to recover fully. One possible explanation is the localization of AQP2 in acidocalcisomes where they would be involved in the osmoregulation as shown for *Trypanosoma cruzi* by Rohloff et al. 2004. Additionally, when AQP2 was overexpressed in procyclic form trypanosomes and exposed to hypo-osmotic conditions, three quarters of the cells did not survive the volume recovery phase.

The procyclic and bloodstream form AQP1-3 knockdown cells exhibited mRNA reductions for AQP1, AQP2 and AQP3 of 97, 61 and 67 percent and 99, 73 and 94 percent, respectively. These triple knockdown cell lines, when exposed to hypo-osmotic conditions, showed a maximum swelling time equal to the additive single knockdown maximum swelling times. The AQP1-3 knockdown phenotypes were all consistent with the results obtained for the single knockdowns.

The bloodstream form AQP1-3 knockdown trypanosomes were also subjected to a glycerol survival test. The induced knockdown cells were able, despite their lack of aquaglyceroporins 1 to 3, to survive on a minimal medium only containing glycerol as an energy source. This finding confirmed the existence of a specific glycerol transporter in the plasma membrane proposed by Wille et al. 1998 and it stands to reason that the same glycerol facilitator was present in the glycosomal membrane.

7 Literaturverzeichnis

- Agre, P., M. Bonhivers, et al. (1998). "The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems." J Biol Chem **273**(24): 14659-14662.
- Agre, P., L. S. King, et al. (2002). "Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine." J Physiol. **542**: 3-16.
- Aitchison, N., S. Talbot, et al. (2005). "VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection." Mol Microbiol **57**(6): 1608-1622.
- Alibu, V. P., L. Storm, et al. (2005). "A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **139**(1): 75-82.
- Archer, S. K., V. D. Luu, et al. (2009). "*Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle." PLoS Pathog **5**(8): e1000565.
- Bakker, B. M., H. V. Westerhoff, et al. (2000). "Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs." Molecular & Biochemical Parasitology **106**(1): 1-10.
- Balana-Fouce, R. and R. M. Reguera (2007). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids?" Trends Parasitol **23**(8): 348-351.
- Bastin, P., K. Ellis, et al. (2000). "Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system." J Cell Sci **113** (Pt **18**): 3321-3328.
- Beitz, E., D. Becker, et al. (2009). "In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity." Handb Exp Pharmacol(190): 77-92.
- Berriman, M., E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-422.
- Best, A., L. Handoko, et al. (2005). "In vitro synthesized small interfering RNAs elicit RNA interference in african trypanosomes: an in vitro and in vivo analysis." J Biol Chem **280**(21): 20573-20579.
- Besteiro, S., M. Biran, et al. (2002). "Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase." J Biol Chem. **277**(41): 38001-38012.
- BioLib. (2010). "Genus *Trypanosoma*." Retrieved 21.01.2010, from <http://www.biolib.cz/en/taxonsubtaxa/id132281/>.
- Blattner, J. and C. E. Clayton (1995). "The 3'-untranslated regions from the *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase-encoding genes mediate developmental regulation." Gene **162**(1): 153-156.
- Bleve, G., G. Zacheo, et al. (2005). "Subcellular localization and functional expression of the glycerol uptake protein 1 (GUP1) of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with green fluorescent protein." Biochem J **390**(Pt 1): 145-155.
- Bodley, A. L., M. W. McGarry, et al. (1995). "Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species." J Infect Dis **172**(4): 1157-1159.
- Borgnia, M. J., D. Kozono, et al. (1999). "Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein." J Mol Biol **291**(5): 1169-1179.
- Borst, P. (2002). "Antigenic variation and allelic exclusion." Cell **109**(1): 5-8.
- Bridges, D. J., A. R. Pitt, et al. (2008). "Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*." Proteomics **8**(1): 83-99.
- Bringaud, F. and T. Baltz (1993). "Differential regulation of two distinct families of glucose transporter genes in *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol. **13**(2): 1146-1154.
- Brohn, F. J. and A. B. Clarkson (1978). "Quantitative effects of salicylhydroxamic acid and glycerol on *trypanosoma brucei* glycolysis *in vitro* and *in vivo*." Acta tropica **35**: 23-33.
- Bruce, D. (1895). Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zululand. Ubombo, Zululand.
- Bruce, D., D. N. Nabarro, et al. (1903). Further Report on Sleeping Sickness in Uganda. Reports of the Sleeping Sickness commission of the Royal Society. **4**: 1-87.

- Burchmore, R. J., D. Rodriguez-Contreras, et al. (2003). "Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3901-3906.
- Burykin, A. and A. Warshel (2004). "On the origin of the electrostatic barrier for proton transport in aquaporin." *FEBS Lett* **570**(1-3): 41-46.
- CDC. (2010). "African Trypanosomiasis." Retrieved 20.01.2010, 2010, from <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>.
- Cerutti, L., N. Mian, et al. (2000). "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain." *Trends Biochem Sci* **25**(10): 481-482.
- Clarkson, A. J., E. Bienen, et al. (1989). "Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase." *J Biol Chem* **264**(30): 17770-17776.
- Clayton, C., M. Adams, et al. (1998). "Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol* **97**(1-2): 221-224.
- Clayton, C., C. Hartmann, et al. (2005). EMBO/TDR practical course RNA interference and genetic manipulation in *Trypanosoma brucei*. *Protocol book*. Heidelberg, Clayton, C.
- Clayton, C. E. and P. Michels (1996). "Metabolic Compartmentation in African Trypanosomes." *Parasitology Today* **12**: 465-471.
- Clayton, J. (2004). "RNA interference: the silent treatment." *Nature* **431**(7008): 599-605.
- Cornish-Bowden, A. and M. L. Cardenas (2003). "Metabolic analysis in drug design." *C R Biol* **326**(5): 509-515.
- Cross, G. A. (1975). "Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*." *Parasitology* **71**: 393-417.
- Cross, G. A. (2009). "Lister 427." Retrieved 01.09.2009, from http://tryps.rockefeller.edu/DocumentsGlobal/lineage_Lister427.pdf.
- Cross, G. A. and J. C. Manning (1973). "Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media." *Parasitology* **67**(3): 315-331.
- Cross, G. A., L. E. Wirtz, et al. (1998). "Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 77-91.
- Darling, T. N., C. M. Burrows, et al. (1990). "Rapid shape change and release of ninhydrin-positive substances by *Leishmania* major promastigotes in response to hypo-osmotic stress." *J Protozool* **37**(6): 493-499.
- de Groot, B. L. and H. Grubmuller (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." *Science* **294**(5550): 2353-2357.
- de Groot, B. L. and H. Grubmuller (2005). "The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins." *Curr Opin Struct Biol* **15**(2): 176-183.
- de Groot, B. L., J. B. Heymann, et al. (2000). "The fold of human aquaporin 1." *J Mol Biol* **300**(4): 987-994.
- Despommier, D. D., R. W. Gwadz, et al. (2000). *Parasitic diseases*. New York, Apple Tree Productions.
- Djikeng, A., S. Shen, et al. (2004). "Analysis of gene function in *Trypanosoma brucei* using RNA interference." *Methods Mol Biol* **270**: 287-298.
- Djikeng, A., H. Shi, et al. (2001). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs." *Rna* **7**(11): 1522-1530.
- Docampo, R., W. de Souza, et al. (2005). "Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man." *Nat Rev Microbiol* **3**(3): 251-261.
- Durand-Dubief, M. and P. Bastin (2003). "TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*." *BMC Biol* **1**(1): 2.
- Duszenko, M. (1998). "Aspekte der Infektionsbiologie: Afrikanische Trypanosomen und Schlafkrankheit." *Biol. in unserer Zeit* **28**: 72-81.

- Duszenko, M., M. Ferguson, et al. (1985). "Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro." J Exp Med. **162**(4): 1256-1263.
- Duszenko, M., K. Figarella, et al. (2006). "Death of a trypanosome: a selfish altruism." Trends Parasitol **22**(11): 536-542.
- Duszenko, M., K. Muhlstadt, et al. (1992). "Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms." Mol Biochem Parasitol. **50**(2): 269-273.
- Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures." Science **130**(3373): 432-437.
- Echevarria, M., E. Gonzalez, et al. (1994a). "Water and urea diffusive permeabilities in isolated proximal tubule cells." Am J Physiol **267**(5 Pt 2): F709-715.
- Echevarria, M., E. E. Windhager, et al. (1994b). "Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10997-11001.
- Eisenberg, B. (2003). "Why can't protons move through water channels?" Biophys J **85**(6): 3427-3428.
- Eisenthal, R. and A. Panes (1985). "The aerobic/anaerobic transition of glucose metabolism in *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **181**(1): 23-27.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**(5733): 404-409.
- Fang, J., P. Rohloff, et al. (2007). "Ablation of a small transmembrane protein of *Trypanosoma brucei* (TbVTC1) involved in the synthesis of polyphosphate alters acidocalcisome biogenesis and function, and leads to a cytokinesis defect." Biochem J **407**(2): 161-170.
- Ferguson, M. A. and G. A. Cross (1984). "Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein." J Biol Chem **259**(5): 3011-3015.
- Field, H., B. R. Ali, et al. (1999). "TbRab2p, a marker for the endoplasmic reticulum of *Trypanosoma brucei*, localises to the ERGIC in mammalian cells." J Cell Sci **112** (Pt 2): 147-156.
- Figarella, K., N. L. Uzcategui, et al. (2006). "Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress." Cell Death Differ **13**(10): 1802-1814.
- Figarella, K., N. L. Uzcategui, et al. (2007). "Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis." Mol Microbiol **65**(4): 1006-1017.
- Fischer, G., U. Kosinska-Eriksson, et al. (2009). "Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism." PLoS Biol **7**(6): e1000130.
- Frey, H.-H. and W. Löscher (2001). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart, Enke-Verlag.
- Froger, A., B. Tallur, et al. (1998). "Prediction of functional residues in water channels and related proteins." Protein Sci **7**(6): 1458-1468.
- Fu, D., A. Libson, et al. (2000). "Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity." Science **290**(5491): 481-486.
- Galizia, L., M. P. Flamenco, et al. (2008). "Role of AQP2 in activation of calcium entry by hypotonicity: implications in cell volume regulation." Am J Physiol Renal Physiol **294**(3): F582-590.
- GeneDB. (2009). "*Trypanosoma brucei* Gene Database." Retrieved 07.09.2009, from <http://www.genedb.org/genedb/tryp/index.jsp>.
- Haanstra, J. R., A. van Tuijl, et al. (2008). "Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17718-17723.
- Harries, W. E., D. Akhavan, et al. (2004). "The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14045-14050.
- Helfert, S., A. M. Estevez, et al. (2001). "Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*." Biochem J **357**(Pt 1): 117-125.
- Hesse, F. (1996). Axenische Kultivierung und in vitro - Differenzierung der Blutformen von *Trypanosoma brucei*. Fakultät für Chemie und Pharmazie. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Heymann, J. B. and A. Engel (2000). "Structural clues in the sequences of the aquaporins." J Mol Biol **295**(4): 1039-1053.
- Hill, A. E., B. Shachar-Hill, et al. (2004). "What are aquaporins for?" J Membr Biol **197**(1): 1-32.
- Hiroaki, Y., K. Tani, et al. (2006). "Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion." J Mol Biol **355**(4): 628-639.
- Horsefield, R., V. Yankovskaya, et al. (2006). "Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction." J Biol Chem **281**(11): 7309-7316.
- Hua, S. Z., P. A. Gottlieb, et al. (2010). "A mechanosensitive ion channel regulating cell volume." Am J Physiol Cell Physiol **298**(6): C1424-1430.
- Hub, J. S. (2008). Selectivity, Regulation, and Inhibition of Aquaporin Channels. A Molecular Dynamics Study. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Göttingen, Georg-August-Universität. **PhD**.
- ILRAD (1989). ILRAD REPORTS January 1989. Schiphol, Holland. **7**.
- Invitrogen. (2009). "Oligo Perfect Designer." Retrieved 09.09.2009, from <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Designers/OligoPerfect-Designer.html>.
- Ishibashi, K. (2009). "New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12." Handb Exp Pharmacol(190): 251-262.
- Ishibashi, K., S. Hara, et al. (2009). "Aquaporin water channels in mammals." Clin Exp Nephrol **13**(2): 107-117.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6269-6273.
- Ishikawa, F., S. Suga, et al. (2005). "Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana." FEBS Lett **579**(25): 5814-5820.
- Jahn, T. P., A. L. Moller, et al. (2004). "Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia." FEBS Lett **574**(1-3): 31-36.
- Jaquenoud, M., M. Pagac, et al. (2008). "The Gup1 homologue of Trypanosoma brucei is a GPI glycosylphosphatidylinositol remodelase." Mol Microbiol **67**(1): 202-212.
- Jensen, B. C., D. Sivam, et al. (2009). "Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of Trypanosoma brucei." BMC Genomics **10**: 482.
- Kabani, S., K. Fenn, et al. (2009). "Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in Trypanosoma brucei." BMC Genomics **10**: 427.
- Kato, M., A. V. Pisljakov, et al. (2006). "The barrier for proton transport in aquaporins as a challenge for electrostatic models: the role of protein relaxation in mutational calculations." Proteins **64**(4): 829-844.
- Kennedy, P. G. (2004). "Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges." J Clin Invest **113**(4): 496-504.
- Kramer, S. (2004). Characterization of a PKA-like kinase from Trypanosoma brucei. Department Biologie I, Bereich Genetik. München, Ludwig-Maximilians-Universität. **PhD**.
- Krieger, S., W. Schwarz, et al. (2000). "Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress." Mol Microbiol **35**(3): 542-552.
- Landfear, S. M. and M. Ignatushchenko (2001). "The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids." Mol Biochem Parasitol **115**(1): 1-17.
- Lecordier, L., B. Vanhollebeke, et al. (2009). "C-terminal mutants of apolipoprotein L-I efficiently kill both Trypanosoma brucei brucei and Trypanosoma brucei rhodesiense." PLoS Pathog **5**(12): e1000685.

- Lee, J. K., D. Kozono, et al. (2005). "Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(52): 18932-18937.
- LeFurgey, A., P. Ingram, et al. (2001). "Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania major* result in rapid loss of Na⁺ and Cl⁻." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **128**(2): 385-394.
- Lehnert, S. (2007). Untersuchungen zur Osmoregulation bei *Trypanosoma brucei*. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. **Biochemie**: 75.
- Lemercier, G., S. Dutoya, et al. (2002). "A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **277**(40): 37369-37376.
- Levine, N. D. (1980). "A newly revised classification of the protozoa." *J Protozool.* **27**(1): 37-58.
- Ma, T., A. Frigeri, et al. (1994). "Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene-sensitive glycerol transporter." *Journal of Biological Chemistry* **269**(34): 21845-21849.
- Maeda, N., T. Funahashi, et al. (2008). "Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**(11): 627-634.
- Mallick, B., Z. Ghosh, et al. (2008). "MicroRNA switches in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Biophys Res Commun* **372**(3): 459-463.
- Maroulis, S. L., P. J. Schofield, et al. (2000). "The role of potassium in the response of *Giardia intestinalis* to hypo-osmotic stress." *Mol Biochem Parasitol* **108**(1): 141-145.
- Martinac, B. (2004). "Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction." *J Cell Sci* **117**(Pt 12): 2449-2460.
- Matsumura, H., S. Reich, et al. (2003). "Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15718-15723.
- Matthews, K. R. and K. Gull (1994). "Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*." *Parasitol Today* **10**(12): 473-476.
- Maurel, C. (2007). "Plant aquaporins: novel functions and regulation properties." *FEBS Lett* **581**(12): 2227-2236.
- McCarter, L. L. (2001). "Polar flagellar motility of the Vibrionaceae." *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(3): 445-462, table of contents.
- Mehlhorn, H. and G. Piekarski (1998). *Grundriss der Parasitenkunde*. Stuttgart, Gustav Fischer.
- Meng, Y. L., Z. Liu, et al. (2004). "As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **279**(18): 18334-18341.
- Mitsuoka, K., K. Murata, et al. (1999). "The structure of aquaporin-1 at 4.5-Å resolution reveals short alpha-helices in the center of the monomer." *J Struct Biol* **128**(1): 34-43.
- Morishita, Y., Y. Sakube, et al. (2004). "Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms." *J Pharmacol Sci* **96**(3): 276-279.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." *Nature* **407**(6804): 599-605.
- Nasser, M. I. and S. M. Landfear (2004). "Sequences required for the flagellar targeting of an integral membrane protein." *Mol Biochem Parasitol* **135**(1): 89-100.
- NCBI. (2009a). "Basic Local Alignment Search Tool." Retrieved 08.09.2009, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- NCBI. (2009b). "BLAST 2 Sequences." Retrieved 07.09.2009, from http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq.
- Ngo, H., C. Tschudi, et al. (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14687-14692.
- Nollert, P., W. E. Harries, et al. (2001). "Atomic structure of a glycerol channel and implications for substrate permeation in aqua(glycero)porins." *FEBS Lett* **504**(3): 112-117.

- Opperdoes, F. R. (1987). "Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes." Annu Rev Microbiol **41**: 127-151.
- Overath, P., J. Czichos, et al. (1986). "The effect of citrate/cis-aconitate on oxidative metabolism during transformation of *Trypanosoma brucei*." European Journal of Biochemistry **160**: 175-182.
- Patrick, K. L., H. Shi, et al. (2009). "Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17933-17938.
- Pays, E., S. Lips, et al. (2001). "The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts." Mol Biochem Parasitol **114**(1): 1-16.
- Pays, E. and B. Vanhollebeke (2008). "Mutual self-defence: the trypanolytic factor story." Microbes Infect **10**(9): 985-989.
- Pepin, J. and F. Milord (1994). "The treatment of human African trypanosomiasis." Adv Parasitol **33**: 1-47.
- Perez-Morga, D., B. Vanhollebeke, et al. (2005). "Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes." Science **309**(5733): 469-472.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science **256**(5055): 385-387.
- Preston, G. M., J. S. Jung, et al. (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." J Biol Chem **268**(1): 17-20.
- Redmond, S., J. Vadivelu, et al. (2003). "RNAi: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 115-118.
- Riviere, L., S. W. van Weelden, et al. (2004). "Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism." J Biol Chem **279**(44): 45337-45346.
- Robles, A. and C. Clayton (2008). "Regulation of an amino acid transporter mRNA in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **157**(1): 102-106.
- Roditi, I. and C. Clayton (1999). "An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **103**(1): 99-100.
- Rohloff, P. and R. Docampo (2008). "A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **118**(1): 17-24.
- Rohloff, P., A. Montalvetti, et al. (2004). "Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **279**(50): 52270-52281.
- Rohloff, P., C. O. Rodrigues, et al. (2003). "Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium." Mol Biochem Parasitol **126**(2): 219-230.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-386.
- Sakurai, J., F. Ishikawa, et al. (2005). "Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function." Plant Cell Physiol **46**(9): 1568-1577.
- Savage, D. F., P. F. Egea, et al. (2003). "Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 a X-ray structure of aquaporin Z." PLoS Biol **1**(3): E72.
- Sept, J. (1999). "Tsetse fly modern distribution." Retrieved 21.01.2010, from <http://www.indiana.edu/~origins/images/tsetsemap.jpg>.
- Shi, H., N. Chamond, et al. (2009). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: role of the n-terminal RGG domain and the polyribosome association of argonaute." J Biol Chem **284**(52): 36511-36520.
- Shi, H., A. Djikeng, et al. (2000). "Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA." Rna **6**(7): 1069-1076.
- Shi, H., C. Tschudi, et al. (2006). "An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*." RNA **12**(12): 2063-2072.

- Shi, H., E. Ullu, et al. (2004). "Function of the Trypanosome Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain." J Biol Chem **279**(48): 49889-49893.
- Stahlberg, H., T. Braun, et al. (2000). "The 6.9-A structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from Escherichia coli." J Struct Biol **132**(2): 133-141.
- Steverding, D. (2010). "The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review." Parasit Vectors **3**(1): 15.
- Storm, L. M. E. (2008). Ein doppelt induzierbares System für die RNA-Interferenz in Trypanosoma brucei. Medizinische Fakultät. Heidelberg, Universität Heidelberg. **PhD**.
- Sui, H., B. G. Han, et al. (2001). "Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel." Nature **414**(6866): 872-878.
- Thar, R. and M. Kuhl (2003). "Bacteria are not too small for spatial sensing of chemical gradients: an experimental evidence." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5748-5753.
- Tyerman, S. D., C. M. Niemietz, et al. (2002). "Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles." Plant Cell Environ **25**(2): 173-194.
- Ullu, E. and C. Tschudi (1995). "Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system." J Biol Chem. **270**(35): 20365-20369.
- Ullu, E., C. Tschudi, et al. (2004). "RNA interference in protozoan parasites." Cell Microbiol **6**(6): 509-519.
- Unger, V. M. (2000). "Fraternal twins: AQP1 and GlpF." Nat Struct Biol **7**(12): 1082-1084.
- Uzcategui, N. L. (2006). Aquaglyceroporins of Trypanosoma brucei a potential target for chemotherapy: Cloning, heterologous expression, biochemical characterization and localization. Interfakultäres Institut für Biochemie. Tübingen, Universität Tübingen. **PhD**.
- Uzcategui, N. L., D. Carmona-Gutierrez, et al. (2007). "Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on Trypanosoma brucei bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death." Antimicrob Agents Chemother **51**(11): 3960-3968.
- Uzcategui, N. L., K. Figarella, et al. (2005). "Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant Leishmania parasites." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **140**(3-4): 395-402.
- van Weelden, S. W., B. Fast, et al. (2003). "Procyclic Trypanosoma brucei do not use Krebs cycle activity for energy generation." J Biol Chem **278**(15): 12854-12863.
- Veitch, N. J., P. C. Johnson, et al. (2010). "Digital gene expression analysis of two life cycle stages of the human-infective parasite, Trypanosoma brucei gambiense reveals differentially expressed clusters of co-regulated genes." BMC Genomics **11**: 124.
- Wallace, I. S. and D. M. Roberts (2004). "Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter." Plant Physiol **135**(2): 1059-1068.
- Walz, T., Y. Fujiyoshi, et al. (2009). "The AQP structure and functional implications." Handb Exp Pharmacol(190): 31-56.
- Walz, T., T. Hirai, et al. (1997). "The three-dimensional structure of aquaporin-1." Nature **387**(6633): 624-627.
- WHO. (2006). "Fact sheet N°259." Fact sheets Retrieved 13.01.2010, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
- Wiemer, E. A., P. A. Michels, et al. (1995). "The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of Trypanosoma brucei and its metabolic implications." Biochemical Journal **312**(Pt 2): 479-484.
- Wille, U., B. Schade, et al. (1998). Characterization of glycerol uptake in bloodstream and procyclic forms of Trypanosoma Brucei. Eur J Biochem. **256**: 245-250.
- Wirtz, E., S. Leal, et al. (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **99**(1): 89-101.

- Yasui, M. (2004). "Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: structure and function of aquaporins." J Pharmacol Sci **96**(3): 260-263.
- Zardoya, R. (2005). "Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family." Biol Cell **97**(6): 397-414.
- Zardoya, R., X. Ding, et al. (2002). "Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14893-14896.
- Zardoya, R. and S. Villalba (2001). "A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes." J Mol Evol **52**(5): 391-404.

8 Akademische Lehrer

Biochemie:	Prof. Bisswanger, Prof. Bohley, Prof. Duszenko, Prof. Eisele, Prof. Hamprecht, Prof. Mecke, Prof. Probst, Prof. Voelter, Prof. Weser, Dr. Fröhlich, Dr. Madeo
Chemie:	Prof. Strähle, Prof. Hagenmaier, Prof. Oberhammer, Prof. Gauglitz, Prof. Lindner, Prof. Maier, Prof. Jung, Prof. Hanack
Anatomie:	Prof. Reutter
Pharmakologie/Toxikologie:	Prof. Schwarz, Prof. Bock, Prof. Krug, Dr. Jäger
Mikrobiologie:	Prof. Wohlleben, Prof. Götz
Botanik:	Prof. Ninnemann
Zoologie:	Prof. Pfeifer, Dr. Günzel
Physik:	Prof. Gönnenwein, Prof. Brendle
Isotopenlabor:	Dr. Reinecke, Dr. Haug
Mathematik:	Dr. Pommer