

**Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Trypanosomen</b>	<b>2</b>
1.1	Systematik	2
1.2	<i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.2.1	Morphologie und Physiologie	3
1.2.2	Entwicklung	5
1.2.3	Epidemiologie	6
1.2.4	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	7
1.2.5	Genomorganisation	7
1.2.6	Antigene Variation	10
1.2.7	Diagnose und Therapie	12
<b>2</b>	<b>Glykoproteine</b>	<b>13</b>
2.1	Oligosaccharide	13
2.2	N-Glykane	14
2.2.1	Struktur und Biosynthese von N-Glykanen	14
2.2.2	Funktion und Bedeutung von N-Glykanen	18
2.3	GPI-Anker	20
2.3.1	GPI-Struktur	21
2.3.2	GPI-Biosynthese	22
2.3.3	Besondere Aspekte der GPI-Anker Biosynthese bei <i>Trypanosoma brucei</i>	24
2.3.4	Lokalisation der GPI-Biosynthese	24
2.3.5	Spezifische GPI-Protein Erkennung	25
2.3.6	GPI und PNH	25
2.4	Glykosyltransferasen	26
<b>3</b>	<b>Prokaryotischen und Eukaryotische Klonierstämme und -Vektoren</b>	<b>28</b>
3.1	<i>Escherichia coli</i>	28
3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.3	Klonierungsvektoren	29
3.3.1	Plasmide	29
3.3.2	Shuttlevektoren	30
3.4	Klonierungsstrategie	30
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>31</b>

<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Materialien</b>	<b>33</b>
5.1	Geräte	33
5.2	Feinchemikalien	34
5.3	Radioaktive Substanzen	34
5.4	Bakterien, Hefen, Parasiten und Vektoren	34
5.4.1	Bakterien: <i>E. coli</i> Stämme	34
5.4.2	Hefen: <i>S. cerevisiae</i> Stämme	35
5.4.3	Parasiten: <i>T. brucei brucei</i>	35
5.4.4	Vektoren	35
5.5	Puffer, Lösungen, Nährmedien und Stammlösungen	36
5.5.1	Puffer	36
5.5.2	Lösungen	39
5.5.3	Nährmedien	41
5.5.4	Stammlösungen	42
5.5.5	DNA Größen-Marker	44
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
6.1	Vermehrung von Trypanosomen	45
6.1.1	Vorbereiten der Trypanosomen	45
6.1.2	Infizierung von Mäusen mit Trypanosomen	45
6.1.3	Infizierung von Ratten mit Trypanosomen	46
6.1.4	Isolierung von Trypanosomen aus den infizierten Ratten	46
6.1.5	Herstellung von Trypanosomenstabilaten	47
6.2	Züchtung und Transformation von <i>E. coli</i> Wirtszellen	48
6.2.1	<i>E. coli</i> : Dauerkulturen, Stammkulturen und Übernachtkulturen	48
6.2.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	48
6.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	49
6.2.2.2	Transformation und Ausplattieren kompetenter Zellen	49
6.2.2.3	Transformation durch Elektroporation	49
6.3	Züchtung und Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	50
6.3.1	Anzucht und Stammkonservierung von <i>S. cerevisiae</i>	50
6.3.2	Transformation von Hefezellen	50
6.3.2.1	Waschen und Konzentrierung von Hefezellen	50
6.3.2.2	Transformation in kleinem Maßstab	51
6.3.2.3	Transformation in großem Maßstab	51

6.3.3.	Elektroporation von Hefezellen	52
6.3.4	Selektionsbedingungen	52
6.4	Plasmidisolierung	53
6.4.1	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> (Alkalische Zelllyse)	54
6.4.1.1	Mini-Präparation (in kleinem Maßstab)	54
6.4.1.2	Maxi-Präparation (in großem Maßstab)	54
6.4.2	Plasmidpräparation mit Hilfe von Qiagen-Säulen	55
6.4.2.1	Präparation in kleinem Maßstab	55
6.4.2.2	Präparation in großem Maßstab	56
6.4.3	DNA/Plasmidpräparation aus Hefe	56
6.4.3.1	Plasmidisolierung aus <i>S.cerevisiae</i>	57
6.4.3.2	Modifizierte Plasmidpräparation aus <i>S.cerevisiae</i>	57
6.5	Replikaplattierung	58
6.6	Aufarbeitung, Reinigung und Analyse von DNA	58
6.6.1	Fällen und Waschen von DNA	58
6.6.2	DNA-Reinigung durch Phenolextraktion	59
6.6.3	Agarosegelektrophorese von DNA	59
6.6.4	Southern/Northern Blot Analysen und DNA Hybridisierung	60
6.6.4.1	Southern/Northern Blot Analyse	60
6.6.4.2	DNA Hybridisierung	60
6.6.4.3	Methylenblaufärbung nach RNA-Transfer auf eine Nitrocellulose Membran (Northern blot)	61
6.6.5	Elution von DNA aus einem Agarosegel	61
6.6.6	Restriktionsverdau von DNA	62
6.6.7	Computergestützte Sequenz-Analyse mit HUSAR	62
6.7	Komplementationsklonierung	63
6.8	DNA/RNA Isolierung aus <i>T.b.brucei</i>	63
6.8.1	DNA Isolierung aus <i>T.b.brucei</i>	63
6.8.2	RNA Isolierung aus <i>T.b.brucei</i>	64
6.8.2.1	Aufarbeitung der Parasiten	64
6.8.2.2	RNA-Gewinnung durch CsCl-Zentrifugation	65
6.8.2.3	RNA-Gewinnung nach der sauren Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode	66
6.8.2.4	Kalibrierung von DNA und RNA	67
6.8.2.5	Elektrophoretische Kontrolle der RNA	67
6.9	Herstellung einer cDNA-Bank	68
6.9.1	mRNA Isolierung	68

6.9.2	Erststrangsynthese	69
6.9.3	Zweitstrangsynthese	70
6.9.4	Ligierung des Eco RI-Adapters	71
6.9.5	Phosphorylierung der Eco RI-Enden	71
6.9.6	Xho I-Verdau	72
6.9.7	Fraktionierung der cDNA Probe	72
6.9.8	Ligierung der cDNA mit dem Vektor	72
6.9.9	Transformation der cDNA Bank in <i>E.coli</i> Zellen durch Elektroporation	73
6.10	Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach Sanger	74
6.10.1	Silicongsierung von Glasgeräten	74
6.10.2	Hochspannungspolyacrylamid-Gelelektrophorese	75
6.10.3	Sequenzierungsreaktion	76
6.10.4	Automatische DNA Sequenzierung	77
6.10.5	Sequenzierprimer	77
6.11	Gewinnung von DNA Fragmenten durch Polymerase-Ketten-Reaktion PCR	78
6.11.1	Primeraufarbeitung	78
6.11.1.1	Qualitätskontrolle über Harnstoff-Polyacrylamid-Gele	78
6.11.2	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	79
6.11.3	Reinigung von PCR Produkten	79
6.12	Expression der Dol-P-Man Synthase in einem <i>E.coli</i> Expressionssystem	80
6.12.1	Kontrolle der Expression durch SDS-PAGE	80
6.13	Biochemische Arbeitsmethoden	82
6.13.1	Aktivitätstest der Dol-P-Man Synthase im Hefelysat	82
6.13.1.1	Herstellung des Hefelysates	82
6.13.1.2	GDP-[ <sup>3</sup> H]-Man Markierung	83
6.13.1.3	Extraktion von Glykolipiden mit Chloroform/Methanol	83
6.13.1.4	Folch-Waschung der Chloroform/Methanol-Extrakte	84
6.13.1.5	Messung der eingebauten Radioaktivität im Flüssigkeits-Scintillations Zähler	84
6.13.2	Darstellung von Dol-P-Man aus sekundären Hühnerembryofibroblasten	85
6.13.2.1	Herstellung von Mikrosomen	85
6.13.2.2	Darstellung von Dol-P-Man aus CEF	86
6.13.3	Dünnschichtchromatographie	87
6.13.3.1	Vorbereitung von Dünnschichtplatten	87

6.13.3.2	Analysen mittels Dünnschichtchromatographie	87
6.13.4	Analysen von Dolichol-Phosphat-Monosacchariden mittels Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose	88
6.13.5	Saure Hydrolyse von Dol-P-Man	88
6.13.6	Kohlenhydratanalyse durch alkalische Anionenaustauschchromatographie	90
<b>III. Ergebnisse</b>		<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Komplementationsklonierung der Dol-P-Man Synthase aus <i>T.b. brucei</i></b>	<b>91</b>
7.1	RNA Isolierung aus <i>T.b. brucei</i>	91
7.2	mRNA Isolierung	92
7.3	cDNA Synthese	94
7.4	Transformation des ts-Hefestamms dpm1-6 mit der <i>T.b. brucei</i> cDNA Bank (Klonierung der Dol-P-Man Synthase)	98
7.4.1	Rücktransformation von dpm1-6	100
7.4.2	Subklonierung des cDNA Inserts von Plasmid p28	100
7.4.3	Sequenzierung der Subklone	103
7.4.4	Southern Blot Analyse	109
7.4.5	Biochemische Charakterisierung der Dol-P-Man Synthase aus <i>T.b. brucei</i> (p28)	111
7.4.5.1	Enzymtest im Hefelysat	111
7.4.5.2	Enzymtest im <i>E. coli</i> -Lysat	114
7.4.5.3	Reinigung von Dol-P-Man an DEAE-Cellulose und Bestimmung der chemischen Natur der radioaktiv markierten Komponente	117
7.5	Expression der Dol-P-Man Synthase in einem <i>E. coli</i> Expressionssystem	118
7.5.1	Umklonierung der Dol-P-Man Synthase in pTRX-FUS	119
7.5.2	Expression der Dol-P-Man Synthase	120

<b>8</b>	<b>Herstellung von Gal1-Promotor Mutanten durch homologe Rekombination</b>	121
8.1	Konstruktion der His3-Gal1 Promotermutante	122
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	130
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	135
	Literatur	138
	Liste der verwendeten Abkürzungen	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Erklärung	