

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Schlafkrankheit und ihr Erreger <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2 Thiolstoffwechsel und Redox-Systeme	3
1.2.1 Glutaredoxine.....	8
1.3 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien.....	14
2.1.1 Chemikalien.....	14
2.1.2 Geräte.....	14
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.4 Säulenmaterial	16
2.1.5 Enzyme und Proteine	16
2.1.6 Puffer und Lösungen	18
2.1.7 Flüssigmedien zur Bakterienkultivierung	20
2.1.8 Bakterienstämme und Vektoren.....	20
2.1.9 Oligonukleotide	21
2.1.10 Platten und Gele	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1 Datenbanksuche und Sequenzanalyse	22
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	24
2.2.5 Reinigung von DNA.....	24
2.2.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	25
2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	25
2.2.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	26
2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.11 Selektion positiv transformierter Zellen.....	27
2.2.12 Lagerung der Bakterienstämme	27
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Expression und Aufreinigung des rekombinanten <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxin-1	28
2.3.2 Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm.....	30

2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA	30
2.3.4	Quantitative Messung von Thiolgruppen im Ellman-Test	30
2.3.5	Konzentrationsbestimmung der in den Enzymkinetiken verwendeten Proteine und Substrate (Übersicht).....	31
2.3.6	Dialyse von Proteinlösungen	32
2.3.7	Reduktion des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1 durch verschiedene Thiolssysteme....	32
2.3.8	Enzymassays.....	33
2.3.9	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.10	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie.....	38
2.3.11	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxin-1	38
2.3.12	Western Blot.....	39
2.3.13	Intrazelluläre Lokalisation des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1 und <i>T. brucei</i> Tryparedoxins in Blutstromparasiten	40
3	Ergebnisse	42
3.1	In silico Analyse von 1-Cys-Glutaredoxinen in Trypanosomatiden	42
3.1.1	Sequenzen möglicher 1-Cys-Glutaredoxine	42
3.1.2	Intrazelluläre Lokalisation	47
3.1.3	Schlussfolgerung	48
3.2	In silico Analyse von 2-Cys-Glutaredoxinen in Trypanosomatiden	48
3.2.1	Sequenzen möglicher 2-Cys-Glutaredoxine	48
3.2.2	Schlussfolgerung.....	51
3.3	Klonierung und Expression des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	51
3.3.1	Alignment des <i>T. brucei</i> Proteins mit anderen 1-Cys-Glutaredoxinen.....	52
3.3.2	mRNA-Sequenz des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	54
3.3.3	Expression und Lagerung	56
3.3.4	Proteinfaktor des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1 bei 280 nm.....	59
3.4	Reduktion des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	60
3.5	Enzymassays.....	62
3.5.1	2-Hydroxyethyl-disulfid (HEDS) Assay.....	62
3.5.2	Reduktion von Insulin durch <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxin-1.....	63
3.5.3	Ribonukleotid-Reduktase Assay	64
3.5.4	Peroxidase Assay	66
3.5.5	Inaktivierung der GAPDH mit H ₂ O ₂ und Reaktivierung durch niedermolekulare Thiole und Thiolproteine	67

3.6	Immunologischer Nachweis des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1 in Blutstrom- und prozyklischen Parasiten.....	70
3.7	Intrazelluläre Konzentration des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	71
3.8	Lokalisation des 1-Cys-Glutaredoxins-1 und Tryparedoxins in Blutstrom- <i>T. brucei</i>	72
3.9	Lokalisation des 1-Cys-Glutaredoxins-1 in prozyklischen <i>T. brucei</i>	73
3.10	Massenspektrometrie des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	74
4	Diskussion	76
4.1	In silico Analyse von Glutaredoxinen in Trypanosomatiden.....	76
4.2	Reduktion des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	78
4.3	Enzymatische Untersuchungen	80
4.4	Intraparasitäre Konzentration des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1	82
4.5	Intrazelluläre Lokalisation des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1 und Tryparedoxins	83
4.6	Einordnung der 1-Cys-Glutaredoxine in die Gruppe der Glutaredoxine	84
4.7	Diskussion der Funktion des <i>T. brucei</i> 1-Cys-Glutaredoxins-1.....	86
5	Zusammenfassung.....	89
6	Literaturverzeichnis	91
7	Lebenslauf.....	105
8	Danksagung.....	106