

Die laterale Diffusion des variablen Oberflächenglykoproteins in Trypanosomen und in artifiziellen Membranen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andreas J. W. Hartel

geboren in Darmstadt

Würzburg, 2013



Eingereicht am: 23.10.2013

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Engstler

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Engstler

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Der Modellorganismus <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	4
1.1.1 Das <i>Variant Surface Glycoprotein</i> und die Antigene Variation . . .	6
1.1.2 Hydrodynamisches Sortieren von VSG-Antikörperkomplexen . . .	9
1.2 Zelluläre Membranen und Membranproteine	10
1.2.1 Brownsche Molekularbewegung in Membranen	15
1.2.2 Diffusion von Transmembran- und GPI-verankerten Proteinen . .	17
1.3 Zielsetzung, methodischer Ansatz und Fragestellung.	20
2 Ergebnisse	23
2.1 Charakterisierung der Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen	24
2.1.1 Gelatine eignet sich als Medium für die Immobilisierung von Trypanosomen	24
2.1.2 Die Diffusion verschiedener VSG auf der Zelloberfläche von Trypa- nosomen ist sehr ähnlich	26
2.1.3 VSG diffundieren in artifiziellen Membranen typisch für GPI- verankerte Proteine	33
2.2 Einfluss der lateralen Dichte auf die Diffusion des VSG	35
2.2.1 Die Mobilität des VSG auf der Zelloberfläche ist in der Nähe eines Diffusionsschwellenwertes	35
2.2.2 Zusätzliche membranverankerte Proteine üben einen starken Ef- fekt auf den Diffusionskoeffizienten des VSG aus	38

2.3	Einfluss der N-Glykosylierung auf die Diffusion des VSG	41
2.3.1	N-Glykane erhalten die Mobilität des VSG in lebenden Trypanosomen	41
2.3.2	N-Glykosylierung beeinflusst den Diffusionsschwellenwert des VSG in artifiziellen Membranen	45
2.4	Die Größe von GPI-verankerten Proteinen hat einen Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten	49
2.4.1	Die Verkleinerung der Proteindomäne führt zu einer Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten	49
2.4.2	Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten	52
3	Diskussion	55
3.1	Diffusion des VSG <i>in vivo</i> und in artifiziellen Membranen	56
3.2	Einfluss der lateralen Dichte auf die Diffusion des VSG	60
3.3	Einfluss der N-Glykosylierung des VSG auf die Diffusion	63
3.4	Einfluss der Proteingröße auf die Diffusion GPI-verankerter Proteine . . .	65
3.5	Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf Blutstromform-Trypanosomen .	75
3.6	Einordnung der Ergebnisse in das allgemeine Bild biologischer Membranen	79
4	Material und Methoden	81
4.1	Material	82
4.1.1	Chemikalien	82
4.1.2	Medien und Puffer zur Kultivierung von BSF-Trypanosomen . . .	84
4.1.3	Verwendete <i>T. brucei brucei</i> Blutstromform-Zelllinien	85
4.2	Methoden	87
4.2.1	Proteinbiochemische Methoden	87
4.2.2	Zellkultur und Handhabung von Blutstromform-Trypanosomen . .	90
4.2.3	Reinigung von membranform-VSG	94
4.2.4	Rekonstitution von membranform VSG in Lipid-Vesikel	97
4.2.5	Herstellung von artifiziellen Membranen	101
4.2.6	Bestimmung der Diffusion durch Fluoreszenz Wiederkehr nach irreversiblen Photobleichen	104

Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Literaturverzeichnis	V
A Anhang	XVIII
A.1 Erklärung gemäß §4 (3) der Promotionsordnung	XIX
A.2 Publikationsliste	XX
A.3 Lebenslauf	XXI
A.4 Danksagung	XXII

Zusammenfassung

Die Diffusion von Membranproteinen spielt bei einer Vielzahl von zellbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. So hat die Beweglichkeit von Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) verankerten Proteinen zum Beispiel eine tragende Funktion bei der Alzheimer Krankheit, der Creutzfeldt-Jacob Krankheit und der Afrikanischen Schlafkrankheit. Der Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei spec.*, präsentiert auf seiner Zelloberfläche einen dichten Mantel aus identischen GPI-verankerten Proteinen. Diese sogenannten *Variant Surface Glycoproteins* (VSGs) stellen den zentralen Pathogenitätsfaktor der Trypanosomen im Blutstrom des Wirtes dar und ermöglichen dem Parasiten die Antigenen Variation. Während der Antigenen Variation wird der VSG-Mantel durch einen immunologisch distinkten Mantel ersetzt. Hierfür ist die Diffusion der VSG essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wird die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen systematisch untersucht. Auf diese Weise werden der Einfluss der lateralen Proteindichte, der N-Glykosylierung und der Proteingröße auf die Diffusion der GPI-verankerten Proteine charakterisiert. Die Mobilität des VSG auf lebenden Trypanosomen ist an der Grenze zu einem Diffusionsschwellenwert, dieser wird allerdings nicht überschritten. Die Mobilität des VSG in der Nähe des Diffusionsschwellenwertes wird durch die N-Glykosylierung der VSG ermöglicht. Außerdem kann gezeigt werden, dass die Größe der Proteine einen entscheidenden Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten der GPI-verankerten Proteine ausübt. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, dass der VSG-Mantel der Trypanosomen ein, an seine Anforderungen, hoch-adaptiertes System darstellt. Würde entweder die laterale Dichte, die N-Glykosylierung oder die Größe der Proteine beeinträchtigt werden, so wäre die Funktion der Antigenen Variation gestört und die Pathogenität des Parasiten gefährdet. Da die lokale Verteilung von GPI-verankerten Proteinen in biologischen Membranen ein wichtiges funktionelles Konzept darstellt, ist der Einfluss der untersuchten Faktoren nicht nur für den VSG-Mantel relevant, sondern kann auch für das generelle Verständnis der Dynamik von Proteinen in zellulären Membranen dienen.

Summary

The lateral diffusion of membrane anchored proteins plays a crucial role in many cell biological processes. The mobility of glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) anchored proteins holds a pivotal function in many diseases such as, Creutzfeld-Jacob, Alzheimer and the African sleeping sickness. The cell surface of the pathogen causing African sleeping sickness, *Trypanosoma brucei sp.*, is covered by a dense layer of identical GPI-anchored proteins. These variant surface glycoproteins (VSGs) are the major pathogenicity factor of the parasites in the circulation of the host and permit antigenic variation. During antigenic variation the VSG-coat has to be replaced by an immunologically distinct coat. For this purpose, the diffusion of VSG is essential.

In the present study, the diffusion of VSG is analysed in living trypanosomes and in artificial membranes. By this, the impact of the lateral protein density, the N-glycosylation and the protein size on the lateral diffusion are studied systematically. The diffusion of VSG in the surface coat of the trypanosome is at the edge of a molecular crowding threshold. Importantly, this crowding threshold is not exceeded. N-glycosylation enables the diffusion of the VSG at the edge of the crowding threshold. Further, the diffusion coefficient of GPI-anchored proteins is strongly affected by the size of the proteins. In conclusion, the present study shows, that the VSG-coat of the trypanosomes is a system, which is highly adapted to its requirements. Any interference with either, the lateral density, the N-glycosylation or the VSG-size would hamper the pathogenicity of the parasite. The local distribution of GPI-anchored proteins is an essential component of biological membranes, thus the results of the present work will have an impact not only on the VSG-coat, but also give further understanding on the dynamics of proteins in crowded spaces.

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Trypanosoma brucei* *brucei*

Trypanosomen sind eine Gattung einzelliger, eukaryotischer Organismen des Taxon der Euglenozoa. Die geißeltragenden Parasiten sind in der afrikanischen Sub-Sahara Region Auslöser verschiedener Krankheiten bei Mensch und Tier. So wird die Afrikanische Schlafkrankheit, bei Tieren auch Nagana genannt, durch die Unterarten *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei brucei* ausgelöst. Die Humane Afrikanische Schlafkrankheit (HAT) wird durch die beiden Unterarten *T. brucei gambiense* und *T. brucei rhodesiense* vermittelt [1]. Die Erstbeschreibung von Nagana führt bis in das zweite Jahrtausend vor Christus in das antike Ägypten zurück. In dem veterinärmedizinischen Papyrus von Kahun wird eine Viehkrankheit beschrieben, deren Symptome der Nagana Krankheit gleichen [2]. Eine der ersten Überlieferungen der HAT ist in den Aufzeichnungen des arabischen Geographen Abu Abdallah Yaqut (1179 - 1229) zu finden. Dieser beschrieb während einer Expedition in Afrika, dass die Einwohner eines gesamten Dorfes, und sogar deren Hunde, nur noch schliefen und aus Haut und Knochen bestanden [1, 3]. Die Beschreibungen der HAT in der Moderne gehen mit dem Beginn des Sklavenhandels während des 18. Jahrhunderts einher. 1734 publiziert der britische Schiffsarzt John Aktivs (1685 - 1757) die erste genaue Beschreibung der späten neurologischen Symptome der HAT (Störung des Schlafzyklus bis hin zum Koma). Erst rund 70 Jahre später, 1803, werden die frühen Krankheitssymptome, geschwollene Lymphknoten entlang des Nackens, durch den britischen Physiker Thomas Winterbottom (1766 - 1859) beschrieben [1]. 1852 berichtet der schottische Missionar und Entdecker David Livingston (1813 - 1875) von der möglichen Übertragung der Trypanosomiasis durch den Biss der Tsetse Fliege (*Glossina spec.*). Ungefähr 50 Jahre später, 1895, gelang es dem schottischen Pathologen und Mikrobiologen Sir David Bruce, Trypanosomen in dem Blut der an Nagana erkrankten Rinder nachzuweisen und somit den Erreger der Trypanosomiasis zu identifizieren [4]. Daher gebührt Sir David Bruce die Ehre Namensgeber der Art *Trypanosoma brucei spec.* zu sein. Kurze Zeit später, 1901, gelang es dem britischen Kolonialarzt Robert Michael Forde (1861–1948) Trypanosomen in menschlichem Blut nachzuweisen. 1909 ist es dem deutschen Militärarzt Friedrich Karl Kleine (1869–1951) möglich zu zeigen, dass Trypanosomen eine zyklische Übertragung über die Tsetse-Fliege vollführen. Kurz darauf

publiziert Sir David Bruce den Lebenszyklus der Trypanosomen in ihrem Insekten-Wirt [5]. Bis in das Jahr 1910 werden die tierpathogenen Trypanosomen Arten *T. vivax*, *T. congolense* und die humanpathogenen Arten *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei gambiense* beschrieben [1].

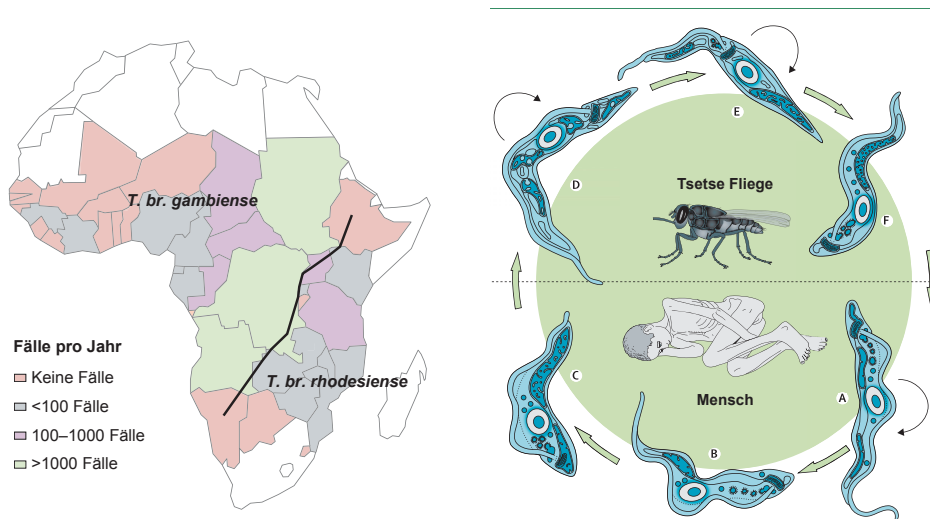


Abbildung 1.1: Verbreitung und Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* sp.. Links: Verbreitung der humanpathogenen Arten *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*. Rechts: Lebenszyklus humanpathogener Trypanosomen in Mensch und Tsetse-Fliege. Abbildungen abgeändert aus Brun *et al.* 2010, [6].

In den folgenden 100 Jahren wurden verschiedene Aspekte der Parasiten, wie die Verbreitung, deren Lebenszyklus und die generelle Zellbiologie intensiv erforscht. An Trypanosomen wurden elementare zellbiologische Aspekte, wie die polycistronische Transkription [7], das Transsplicing [8], das RNA-Editieren [9–11], die GPI-verankerten Proteine [12–14] und die Antigenvariation [15–17] (siehe folgendes Kapitel) entdeckt und beschrieben. Trotz intensiver Erforschung existiert keine wirksame Prophylaxe gegen die Trypanosomiasis. Alle vier zur Zeit zugelassenen Präparate weisen eine hohe Zytotoxizität auf. Daher gilt die frühzeitige Diagnose der Infektion als eine der zentralen Strategien der Bekämpfung der Krankheit. Die serologische Diagnose galt bislang als besonders schwierig, da kein wirksamer Nachweis der Unterarten zur Verfügung steht. Ende 2012 konnte die Forschergruppe um Professor Göringer an der Technischen Universität Darmstadt einen vielversprechenden Biosensor präsentieren. Mit Hilfe dieses Sensors soll es möglich sein Infektionen frühzeitig und effizient zu erkennen [18].

1.1.1 Das *Variant Surface Glycoprotein* und die Antigene Variation

1910 beschrieben Ross und Thompson eine akkurate Methode für die Bestimmung der Anzahl von Trypanosomen in dem Blut infizierter Patienten. Sie konnten hiermit den periodischen Verlauf der Parasitämie eines mit *T. b. gambiense* infizierten Patienten nachweisen [19]. Ohne es zu wissen, haben die Autoren hiermit die Auswirkungen des zentralen Pathogenitätsfaktor der Trypanosomen beschrieben.

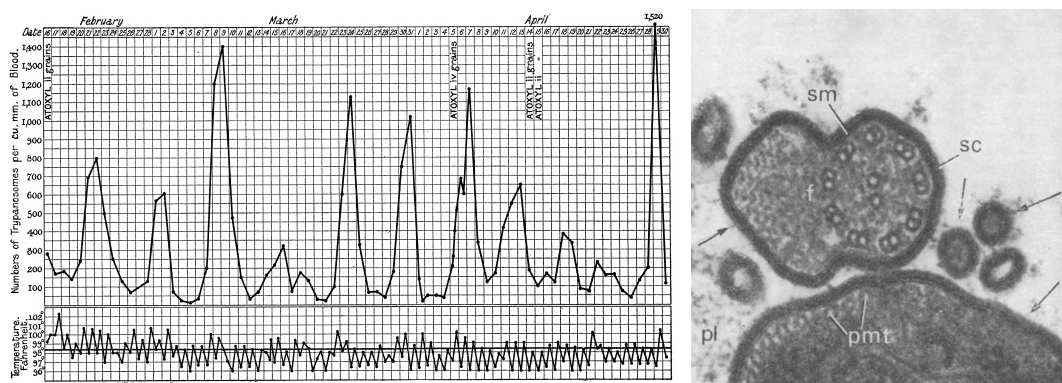


Abbildung 1.2: Grundlagen der Pathogenität von Trypanosomen. Links: Periodischer Verlauf der Infektion durch *T. b. gambiense*, aus Ross und Thomson 1910 [19]. Rechts: Erster bildgebender Nachweis des VSG-Mantels von Vickerman *et al.* 1969 [16].

60 Jahre später konnten Vickerman *et al.* mit Hilfe von Antikörperseren aus infizierten Kaninchen eine Antigenschicht auf der Zelloberfläche der Blutstrom-Trypanosomen (BSF-Trypanosomen) nachweisen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass diese Antigenschicht durch eine immunologisch distinkte Antigenschicht ausgetauscht werden kann [12]. Die Autoren postulierten, dass der Hauptbestandteil der Kaninchen-Antikörper an jene spezifischen Antigene gebunden werden. Es war den Autoren außerdem möglich nachzuweisen, dass diese Antigene an der äußeren Seite der Zellmembran lokalisiert sind (siehe Abbildung 1.2) [16, 20]. In den folgenden Dekaden wurde das *variant specific surface antigen*, wie es zu Beginn genannt wurde, intensiv erforscht. Neben anderen, war es aber vor allem George Cross, der in detaillierten Arbeiten das *Variant Surface Glycoprotein* (VSG) charakterisierte [12, 21–24]. Auffret *et al.* zeigten, dass VSG-Monomere ein Molekulargewicht zwischen 50 und 60 kDa besitzen und Homo-Dimere ausbilden [25]. Ferguson *et al.* konnten 1985 nachweisen, dass jedes VSG-Monomer

durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) an der Plasmamembran angeheftet wird [14]. Trypanosomen sind in der Lage auf ein reichhaltiges Repertoire VSG-kodierender Gene zurückzugreifen. Das Genom enthält ungefähr 1000 verschiedene VSG-Gene. Der größte Teil dieser Gene kodiert allerdings nicht für vollständige VSG-Proteine und dient wahrscheinlich der Generierung sogenannter Mosaik-VSG [17]. Der aktive Ort der VSG-Expression (engl.: *expression site*, ES) liegt in den Telomer-Regionen der Chromosomen. Zu jedem Zeitpunkt ist hier immer nur eine ES und das damit assoziierte VSG-Gen aktiv. Die verschiedenen Typen der VSG können unter anderem anhand der Verteilung der Cysteinbrücken in den Carboxyl- und Aminoterminalen Domänen (C- bzw N-terminal) klassifiziert werden [26].

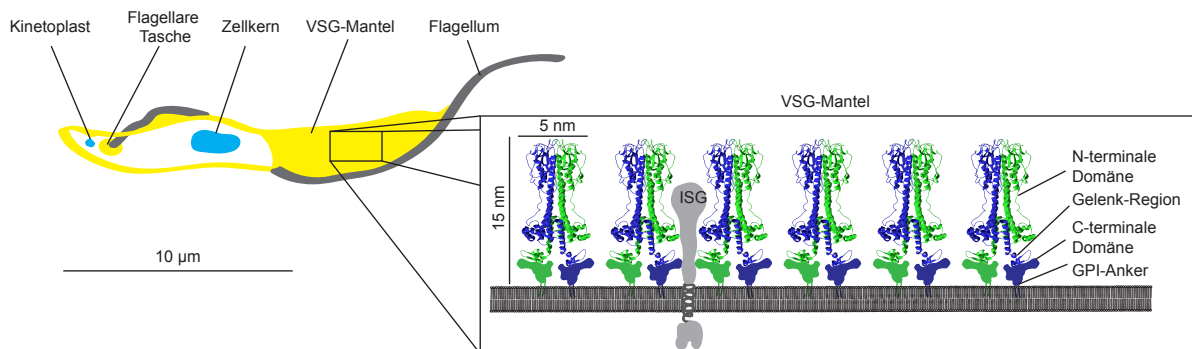


Abbildung 1.3: Vereinfachter Aufbau eines Blutstromform-Trypanosoms und des VSG-Mantels.

Die C- und die N-terminale Domäne der VSG sind durch eine flexible Region verbunden. In dieser sogenannten Gelenk-Region (von engl.: *hinge region*) können bestimmte VSG durch die Protease Trypsin gespalten werden [27–29]. Alle VSG der BSF-Trypanosomen sind durch die kovalente Bindung verschiedener Zuckermoleküle modifiziert [30]. Diese N-Glykosylierung stellt die häufigste posttranslationale Modifikation in eukaryotischen Zellen dar [31]. Ungefähr $5 \cdot 10^6$ identische VSG-Dimere bilden auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen eine homogene und zugleich erstaunlich dicht gepackte Proteinschicht mit einer Höhe von 12-15 nm [12, 16]. Der VSG-Mantel bedeckt ca 90% der gesamten Zelloberfläche der Parasiten, maskiert alle weiteren Bestandteile der Zelloberfläche und verhindert somit das Durchdringen von Proteinen in der Größe von Antikörpern oder den lytischen Komponenten des Wirtsimmunsystems [32, 33]. Somit sind die BSF-Trypanosomen in der Lage die invarianten Komponenten der Zelloberfläche

vor dem Immunsystem des Wirtes abzuschirmen. Daher kann das Immunsystem nahezu ausschliesslich Antikörper gegen die auf der Zelloberfläche präsentierten VSG generieren. Hingegen sind die Parasiten sind in der Lage die Expression des aktiven VSG zu inaktivieren und stattdessen ein immunologisch distinktes VSG herzustellen. Dieser Vorgang ermöglicht es den Parasiten das Immunsystem wie folgt zu überlisten [17,34,35]. Während das Immunsystem in der akuten Phase der Parasitämie durch die Produktion von Antikörpern und der damit verbundenen Lyse der Parasiten beschäftigt ist, tauscht ein kleiner Anteil der gesamten Population der Parasiten durch einen stochastischen Prozess das aktive VSG gegen ein immunologisch distinktes aus [36].

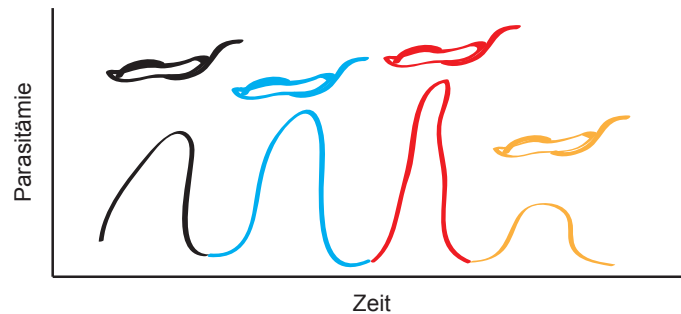


Abbildung 1.4: Illustration der Antigenen Variation. Zu jeder neuen Welle der Parasitämie wird ein immunologisch distinktes VSG präsentiert.

Zu diesem Zeitpunkt wird die Anzahl der Parasiten in der Blutbahn deutlich reduziert, dies führt zu einem Rückgang der Parasitämie. Alle Parasiten, welche das alte VSG präsentieren, werden zu diesem Zeitpunkt durch das Immunsystem abgetötet. Zurück bleiben jene Parasiten die das neue VSG auf der Zelloberfläche präsentieren. Dieses kann zunächst von dem Immunsystem des Wirtes nicht mehr erkannt werden. Auf diese Weise beginnt nach einer mehrtägigen augenscheinlichen Ruhephase der Parasitämie ein neuer Schub. Dieser Vorgang wird als Antigenen Variation bezeichnet und erklärt so den, von Ross und Thomson 1910 beschriebenen, periodischen Verlauf der Trypanosomiasis.

1.1.2 Hydrodynamisches Sortieren von VSG-Antikörperkomplexen

Neben der bemerkenswerten Fähigkeit der Antigenen Variation besitzen die BSF-Trypanosomen einen weiteren erstaunlichen Mechanismus um der Erkennung durch das Wirtsimmunsystem zu entfliehen. Webster *et al.* konnten 1990 zeigen, dass VSG-Antikörperkomplexe nach ihrer Entstehung auf der Zelloberfläche innerhalb von wenigen Minuten entfernt und in endozytotischen Kompartimenten angereichert werden [37]. Das Entfernen der VSG-Antikörperkomplexe (oder auch engl.: *antibody clearance*) ermöglicht es dem Parasiten, bei geringem Antikörpertiter im Blut, der Erkennung und nachfolgenden Lyse durch das Komplementsystem des Wirtes auszuweichen. Der genaue Mechanismus der *antibody clearance* konnte 2007 von Engstler *et al.* aufgeklärt werden [38]. Nach der Bindung der Antikörper an die VSG auf der Zelloberfläche werden diese Komplexe durch die hydrodynamische Kraft, welche entgegengesetzt der Schwimmrichtung auf die Komplexe wirkt, an den posterioren Pol der Zelle transportiert. An dem posterioren Ende der Zelle befindet sich die sogenannte flagellare Tasche. Die flagellare Tasche ist ein hochspezialisierter Bereich der Trypanosomenzelle. Ausschließlich an diesem Ort findet die Endo- und Exozytose des Organismus statt. Die VSG-Antikörperkomplexe werden an der flagellaren Tasche endozytiert und stehen somit nicht länger als Ziel für das Immunsystem zu Verfügung.

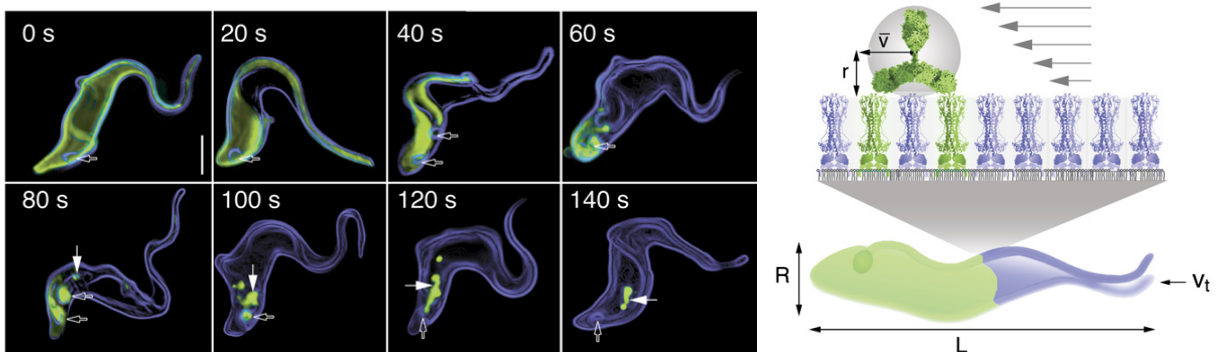


Abbildung 1.5: Illustration der *antibody clearance*. Die VSG-Antikörperkomplexe werden durch den hydrodynamischen Widerstand an den posterioren Pol der Zelle gezogen, werden dort endozytiert und somit von der Zelloberfläche entfernt. Abbildung aus Engstler *et al.* 2007, [38].

1.2 Zelluläre Membranen und Membranproteine

Die Entstehung des heutigen Verständnisses von zellulären Membranen führt bis in das zweite Jahrtausend vor Christus zurück. Es wird berichtet, dass babylonische Weissager Ölspreitungen verwendet haben, um Aussagen über zukünftige Geschehen zu treffen [39]. Diese Spreitungen beinhalten einen der fundamentalen Vorgänge, die für die Entstehung von Membranen und somit aller Lebewesen notwendig ist. Lipide sind polare Verbindungen, welche aus einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen an welche eine stark hydrophobe Schwanzregion aus langkettigen Kohlenwasserstoffen verknüpft ist. Diese Verbindung einer stark hydrophilen und einer stark hydrophoben Region führt dazu, dass Lipide in wässrigen Lösungsmitteln stark bis gänzlich unlöslich sind. Bereits bei niedrigen Lipid-Konzentrationen bilden sich sogenannte Mizellen aus. Hier orientieren sich die hydrophilen Regionen zu den angrenzenden Wassermolekülen aus und bilden eine einschichtige Kugel. Die hydrophoben Lipid-Regionen werden so der Interaktion mit dem wässrigen Milieu entzogen. Hierdurch ist die Ausbildung von Mizellen energetisch besonders günstig.

Benjamin Franklin beschäftigte sich bereits 1770 mit den Eigenschaften von Lipiden in Verbindung mit Wasser. Er fand heraus, dass die Wellenausbreitung in einem englischen Gartenteich, welcher mit einer Ölschicht bedeckt war, deutlich reduziert wurde. Im späten 19. Jahrhundert arbeitete, neben anderen, Lord Rayleigh an der Ausbildung von Lipid-Einzelschichten auf Oberflächen wässriger Lösungen. Lord Rayleigh bekam von Agnes Pockels per Brief die Mitteilung, sie habe einen Apparat entwickelt mit deren Hilfe es möglich sei Lipidschichten auf Wasseroberflächen zu untersuchen. 1917 publizierte Irving Langmuir eine verbesserte Version von Agnes Pockels Apparat, welcher seitdem als Langmuir-Waage bezeichnet wird [39]. Die Langmuir-Waage besteht aus einem mit Wasser gefüllten Becken. Direkt oberhalb der Wasseroberfläche befinden sich entweder eine oder zwei bewegliche Barrieren. Die Barrieren sind in direktem Kontakt mit der Wasseroberfläche. Mit Hilfe eines Tensiometers kann die Oberflächenspannung des Wassers bestimmt werden. Mit diesem System ist es möglich, Lipide aus organischen Lösungsmitteln auf die Wasseroberfläche aufzubringen und bei verschiedenen, durch die Barrieren eingestellten, Flächen die resultierende Oberflächenspannung zu bestimmen. Somit war es Irving Langmuir möglich die Orientierung und Dicke einer Lipid-Einzelschicht auf der Wasseroberfläche erstmals zu bestimmen [40]. 1925 gelang es

Gorter und Grendel mit der Entwicklung einer Methode zur Extraktion von Lipiden aus Erythrozyten und der Bestimmung der Oberfläche der Erythrozyten die folgende Schlussfolgerung zu treffen.

“... It is clear that all our results fit in well with the supposition that the chromocytes are covered by a layer of fatty substances that is two molecules thick. ...“

Mit dieser einfachen Aussage haben die Autoren eine der grundlegenden Entdeckungen der Membranbiologie getroffen [41]. Die Ausbildung von Lipid-Doppelschichten ist eine weitere energetisch begünstigte Anordnung von Lipiden. Hierbei steht die hydrophobe Region eines Lipides der eines Zweiten gegenüber. Nach diesem Prinzip sind alle zellulären Membranen aufgebaut. Membranen können somit eine innere von einer äußeren wässrigen Phase abtrennen. Dieses fundamentale Konzept ermöglicht eine Vielzahl für das Leben essentieller Prozesse. So können zum Beispiel, durch in die Membran eingelagerte Proteine Ionengradienten aufgebaut werden, welche unter anderem an Prozessen wie der Erregung von Aktionspotentialen und der Energiegewinnung beteiligt sind.

Zehn Jahre nach der Entdeckung von Gorter und Grendel postulierten Danielli und Davson ein Membranmodell, in welchem ein Lipidfilm zu beiden Seiten von einer Proteinschicht bedeckt wird. Danielli und Davson gingen davon aus, dass die Proteine auf beiden Seiten des Lipidfilmes absorbiert werden [42]. Frey und Edidin konnten 1970 die freie Beweglichkeit von Antigenen in Zellmembranen nachweisen. Hierzu wurden humane und murine Kulturzellen mit Hilfe des Sendai-Virus fusioniert. Die Autoren konnten somit die Verteilung der humanen und murinen Antigene auf der Zelloberfläche über einen Zeitraum von 40 Minuten verfolgen. Direkt nach der Fusion war eine klare heterogene Verteilung der verschiedenen Antigene auf der Fusionszelle sichtbar. Diese heterogene Verteilung löste sich dann mit zunehmender Zeit auf. Nach 40 Minuten konnten Frey und Edidin bis zu 90 % Vermischung der verschiedenen Antigene feststellen [43].

“... Our observations and calculations, and the scattered examples from the literature all call attention to the possibility that elements of many biological membranes are not rigidly held in place, but are free to re-orient relative to one another. ...“

Kurz darauf publizierten Singer und Nicholson das berühmte Fluid-Mosaik Modell. Sie postulieren ein Modell, in dem Proteine in die Membran eingelagert oder angeheftet sind. Die Proteine sind in diesem Modell in lokalen Anhäufungen organisiert, welche an ein Mosaik erinnern [44]. Die heutige Sicht der Organisation von Proteinen in zellulären Membranen weist deutliche Unterschiede zu dem Fluid-Mosaik Modell auf. So wird mittlerweile davon ausgegangen, dass der größte Teil der Membranen mit Proteinen bedeckt ist und die Proteine keine große laterale Bewegungsfreiheit aufweisen. So sind zum Beispiel bis zu 75 % der Membran von Chloroplasten oder Mitochondrien mit Proteinen bedeckt [45].

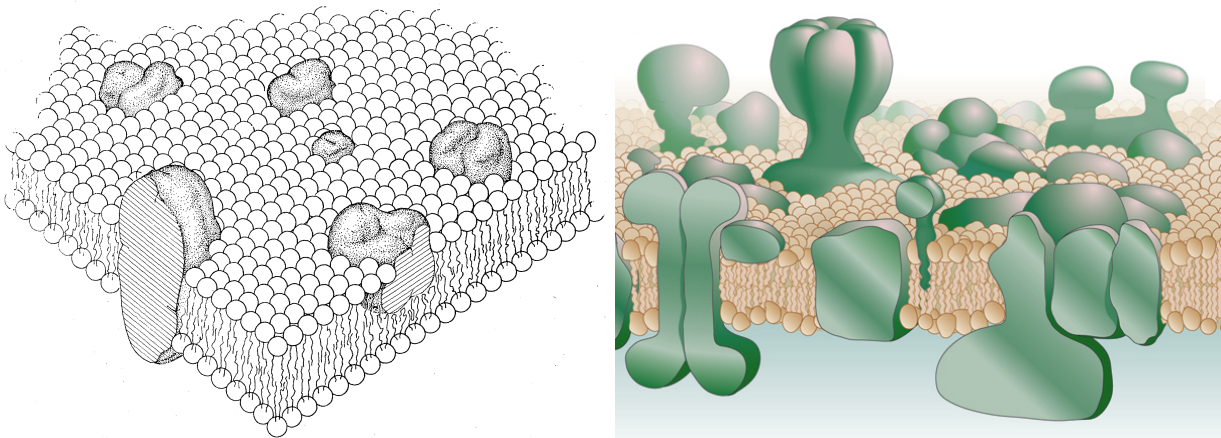


Abbildung 1.6: Zelluläre Membranen. Links: Fluid-Mosaik Modell, Singer und Nicholson 1972, [44]. Rechts: Aktuelles Modell zellulärer Membranen, aus Engelman 2005 [46].

Zelluläre Membranen werden heute nicht mehr als symmetrische Strukturen angesehen. Unter anderem werden die Auswirkungen von asymmetrischen Lipidverteilungen zwischen den Lipidschichten diskutiert [47, 48]. Die asymmetrische Verteilung von Proteinen ist vor allem bei der Frage der Interaktionsmöglichkeiten von intra- und extrazellulären Proteinen von Interesse. So können zum Beispiel extrazelluläre Proteine oder kleine Moleküle über andere, die Membran durchspannende (Transmembran) Proteine, mit intrazellulären Bestandteilen kommunizieren. Zum Beispiel beruht die Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf diesem Prinzip [49].

Membranproteine können über verschiedene Mechanismen an oder in der Membran verankert sein. Als Transmembranproteine (TM-Proteine) werden solche bezeichnet, die mit einer oder mehreren hydrophoben Domänen in die Membran eingelagert sind und die komplette Membran durchspannen. Diese Proteine können sowohl intra- als auch extrazelluläre Domänen besitzen, welche mit benachbarten Proteinen interagieren können. Die zweite Art stellen die peripheren Membranproteine dar. Diese besitzen eine partiell hydrophobe Region, die mit einer einzelnen Lipidschicht der Membran interagiert diese aber nicht vollständig durchdringt. Somit sind die Proteine in der Peripherie der Membran gebunden. Periphere Membranproteine können allerdings auch als lipidverankerte Proteine vorliegen. Diese sind mit einer oder mehreren Fettsäuren modifiziert, die in die Membran eingelagert werden und somit das Protein an die Membran binden. Zu dieser Gruppe gehören auch die GPI-verankerten Proteine. Diese Proteine sind an ihrem Carboxyl-Ende mit einem Phosphoethanolamin modifiziert, an welches eine Kette von verschiedenen Zuckermolekülen (Glykosylierungen) folgt. An diese werden über das Phosphatidylinositol die Phospholipide gekoppelt. Die Phospholipide der VSG werden über zwei Myristinsäuren in die Membran eingelagert. Die Verknüpfung zwischen dem GPI-Anker und dem Protein kann durch die GPI-spezifische Phospholipase-C (GPI-PLC) enzymatisch gespalten werden. Die GPI-PLC spaltet spezifisch zwischen dem Phosphatidylinositol und den Phospholipiden und kann somit die GPI-verankerten Proteine aus der Membran entfernen (siehe Abbildung 1.7).

GPI-verankerte Proteine kommen in allen eukaryotischen Zellen vor. Defekte an GPI-verankerten Proteinen sind mit schwerwiegenden Erkrankungen verbunden. Das wohl berühmteste Beispiel sind die GPI-verankerten Prionen-Proteine. Diese können unter bestimmten Voraussetzungen in eine proteaseresistente Form übergehen und bei Rindern die *Bovine spongiforme enzephalopathie* oder bei Menschen höchstwahrscheinlich die Creutzfeldt-Jakob Krankheit auslösen [50, 51]. Der Übergang in die proteaseresistente Form der Prionen führt vor allem im Gehirn zu starker Aggregation der Prionen und löst so die schwerwiegenden Symptome aus. Ein weiteres Beispiel, welches die Aggregation von Membranproteinen mit zellulären Defekten assoziiert, ist die Alzheimer-Krankheit. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Aggregation bestimmter Amyloid-Spaltprodukte an GM1 Ganglioside zu deren reduzierten Beweglichkeit führt [52]. GM1 und GM2 Ganglioside stehen in engem Zusammenhang mit neuroprotektiven Eigenschaften von Nervenzellen.

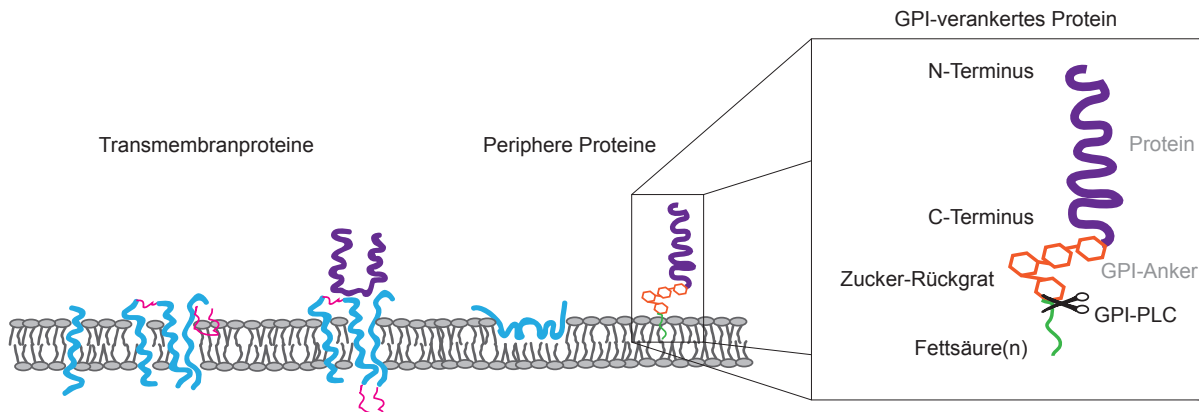


Abbildung 1.7: Typen der Membranverankerung. Links: Transmembranproteine mit einer oder mehreren Transmembrandomänen. Mitte: Lösliches Protein, assoziiert an Transmembranprotein. Rechts: Periphere Proteine. Entweder partiell in die Membran eingelagert, oder über GPI-Anker an die Membran gebunden.

Diese Beispiele zeigen deutlich, dass die freie Beweglichkeit von Proteinen in zellulären Membranen eine essentielle Eigenschaft darstellt. Daher wird in dem folgenden Kapitel, der Bewegung zugrundeliegende physikalische Prozess, die Diffusion behandelt.

1.2.1 Brownsche Molekularbewegung in Membranen

Diffusion beruht auf der Brownschen Molekularbewegung und ist die ungerichtete, temperaturabhängige Bewegung von Teilchen in Flüssigkeiten oder Gasen. Jedes Teilchen besitzt einen, der Zusammensetzung und der Umgebung entsprechenden, Diffusionskoeffizienten. Die erste Beschreibung von Diffusion ist auf den niederländischen Arzt und Botaniker Jan Ingenhousz im Jahr 1785 zurückzuführen. Ingenhousz beschrieb die stochastische Bewegung von Kohlenstaub auf Alkohol, welche er durch ein Mikroskop beobachten konnte. 1827 studiert der schottische Botaniker Robert Brown die Bewegung von Pollen in Wassertropfen. Ursprünglich war Brown auf der Suche nach der im 19. Jahrhundert intensiv gesuchten *Lebenskraft*. In empirischen Experimenten konnte aber die Molekularbewegung von eindeutig unbelebten Staubpartikeln nachgewiesen werden. Grundlegende Arbeiten von Thomas Graham und später von Adolf Fick führten zu dem basalen Verständnis, dass die Diffusion von Teilchen temperatur- und konzentrationsabhängig ist und den gleichen Regeln folgt, wie die Ausbreitung von Wärme. 1905 veröffentlichte Albert Einstein seine Arbeit in der er den theoretischen Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten eines Partikels, dessen Radius, der Temperatur des Systems und der Viskosität der Flüssigkeit, in welcher die Bewegung des Partikels stattfindet, beschreiben konnte [53]. Die Viskosität ist ein Maß für die Zähigkeit einer Flüssigkeit. Mit Hilfe der Viskosität kann die Reibung bestimmt werden, welche von der Flüssigkeit auf ein Objekt eines bestimmten Volumens übertragen werden kann (siehe Gleichung 1.1).

Für die theoretische Beschreibung der Diffusion eines Partikels in einem dreidimensionalen System werden unter anderem die Navier-Stokes Gleichungen verwendet. Die Navier-Stokes Gleichungen sind ein Gleichungssystem aus nichtlinearen partiellen Differentialgleichungen. Da es für diese Gleichungen keine direkte Lösung gibt, müssen für die Anwendung der Gleichungen bestimmte Randbedingungen definiert werden. Werden diese Randbedingungen für die Diffusion in einem zweidimensionalen System festgelegt, so führt dies zu dem sogenannten Stokes-Paradox und zu einer Nichtanwendbarkeit des Gleichungssystems [54]. 1975 konnten Philip Saffman und Max Delbrück dieses Problem unter Verwendung des folgenden Modells umgehen. Die Autoren betrachten eine Membran der Dicke h und der Viskosität μ , welche zu beiden Seiten von einem unendlichen Fluid der Viskosität μ' umgeben wird. In dieser Membran diffundiert ein

zylindrisches Objekt der Höhe h mit dem Radius α . Dieses Modell findet Anwendung wenn $\mu \gg \mu'$ ist.

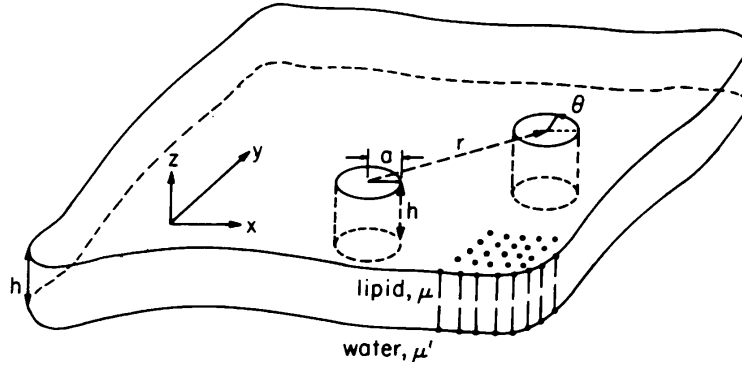


Abbildung 1.8: Das Saffman-Delbrück Modell, 1975. Ein zylindrisches Objekt ist in einer Lipidschicht hoher Viskosität eingebettet, diese wird zu beiden Seiten von Wasser umgeben [55].

Somit konnten Saffman und Delbrück erstmals ein Modell (SD-Modell) beschreiben, mit welchem der Zusammenhang zwischen dem Radius und der Höhe der Membraneinlagerung und der umgebenden Membran, sowie dem die Membran umgebenden Fluid beschreiben werden konnte [55].

Basierend auf der Einstein-Relation,

$$D = \frac{k_B * T}{\lambda} \quad (1.1)$$

mit der Boltzmann Konstante k_B , der absoluten Temperatur T und dem Strömungswiderstand λ , postulieren Saffman und Delbrück den folgenden Zusammenhang. γ steht hier für die Eulersche Zahl.

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} * \left(\log \frac{\mu h}{\mu' \alpha} - \gamma \right) \quad (1.2)$$

Ein System in dem eine Membraneinlagerung diffundiert kann mit dem dimensionslosen Parameter ϵ beschrieben werden. Für diesen gilt,

$$\epsilon = \frac{\alpha}{h} * \left(\frac{2\mu'}{\mu} \right). \quad (1.3)$$

Das SD-Modell ist nur für $\epsilon \leq 0,1$ gültig. Das bedeutet, dass das SD-Modell nur für kleine Membraneinlagerungen oder vergleichsweise hohe Membranviskositäten korrekte Ergebnisse produziert. Hughes *et al.* beschreiben 1981 ein erweitertes Modell, welches für $\epsilon \leq 1$ gültig ist [56]. Diese beiden Modelle basieren auf der Annahme, dass sich die Membranen frei in einem Fluid geringer Viskosität befinden. Merkel *et al.* beschreiben 1989 ein Modell in welchem die Koppelung der Membran mit einem darunterliegenden Substrat berücksichtigt wird [57]. Dieses Modell stellt den Fall einer zellulären Membran am besten dar, da die Plasmamembran in den meisten Fällen intrazellulär an das Zytoskelett assoziiert vorliegt.

1.2.2 Diffusion von Transmembran- und GPI-verankerten Proteinen

In den letzten drei Dekaden wurde eine Vielzahl von Fragestellungen zu der Diffusion von Transmembranproteinen (TM-Proteinen) bearbeitet. So wurde unter anderem der Einfluss des Durchmessers von TM-Proteinen auf ihre Diffusion untersucht [58]. An dem *band III* Protein der Erythrozyten wurden verschiedene Fragestellungen bearbeitet, zum Beispiel wurden der Einfluss von verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts [59], der Effekt der Lipidzusammensetzung der Membran [60, 61] oder die Auswirkungen von Proteinaggregation [62] auf die Diffusion untersucht. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Klärung der Frage, warum die Diffusionskoeffizienten von Proteinen, welche in zellulären Systemen bestimmt wurden, von denen aus artifiziellen Membranen meist um mehr als zwei Größenordnungen abweichen. Eine Erklärung hierfür, ist das Vorhandensein von mobilen und immobilen Hindernissen in der Plasmamembran von lebenden Zellen. So können immobile Hindernisse entstehen, wenn TM-Proteine mit dem Zytoskelett interagieren [63], diese können dann einen Einfluss auf die Diffusion anderer Proteine ausüben. Aber auch mobile Strukturen können die Diffusion von Membranproteinen beeinflussen [64].

Barbour *et al.* haben den Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Diffusion des *major histocompatibility complex* (MHC) Glykoproteins untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass die Entfernung der Glykosylierung der MHC-Proteine in murinen Fibroblasten zu einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten führt. Allerdings konnte

dieser Effekt in *chinese hamster ovary* (CHO) Zellen nicht reproduziert werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass sich die Zusammensetzung des Zytoskeletts in dem beiden Zelllinien stark unterscheidet und somit die Effekte der fehlenden Glykosylierung nur in den murinen Fibroblasten messbar war [65]. Interessanterweise konnten Høiberg-Nielsen *et al.* für das stark glykosylierte, zytosolische Enzym *Peniophora lycii* Phytase folgendes postulieren. Das Entfernen der Glykosylierungen führe zu einer Reduzierung repulsiver elektrostatischer Interaktionen. Diese repulsiven Interaktionen sollen als Aggregationsschutz dienen und ermöglichen so die freie Beweglichkeit der Proteine bei hohen Konzentrationen [66]. Ob dieser Effekt ebenso bei membranverankerten Proteinen auftritt ist bislang nicht beschrieben. Ein auffälliger Unterschied zwischen den Untersuchungen von Barbour *et al.* und Høiberg-Nielsen *et al.* ist die Konzentration, bzw. der laterale Abstand der Proteine. Barbour *et al.* beschrieben die Erhöhung des Diffusionskoeffizienten nach der Entfernung der Glykosylierung bei einer Anzahl von circa 4000 Proteinen, welche auf der Zelloberfläche eines Fibroblasten verteilt waren. Dies entspricht ungefähr einem Molekül pro Quadratmikrometer Zelloberfläche [67]. Der von Høiberg-Nielsen beschriebene Effekt hingegen, zeigte sich bei sehr hohen Proteinkonzentrationen von ungefähr 100 mg / mL. Dies entspricht einem Proteinabstand von nur wenigen Nanometern.

Die Diffusion von GPI-verankerten Proteinen wurde in den 90er Jahren neben anderem von Forschern um Ken Jacobson untersucht. Für die Diffusion des GPI-verankerten Thy-1 Proteins war es den Forschern möglich Diffusionskoeffizienten zu bestimmen, welche in der Größenordnung der Koeffizienten freier Lipide in zellulären Membranen lagen [68]. Diese und ähnliche Beobachtungen prägten die weitläufige Meinung, dass die Diffusion GPI-verankerter Proteine ausschliesslich durch die in die Membran eingelagerten Lipide bestimmt wird [69]. Allerdings konnten Zhang *et al.* nachweisen, dass extrazelluläre Proteindomänen einen signifikanten Effekt auf die Diffusion GPI-verankerter Proteine ausüben. Mit Hilfe von chimären Proteinen aus TM-Domänen und den extrazellulären Domänen GPI-verankerter Proteine schlussfolgerten die Autoren, dass die Struktur der extrazellulären Domänen teilweise einen größeren Einfluss habe, als die Art der Membranverankerung [70]. Letztendlich war es den Autoren allerdings nicht möglich, die beobachteten Effekte frei von möglichen Interaktionen der Proteine mit der extrazellulären Matrix des Expressionssystems zu beschreiben.

Umemura *et al.* untersuchten den Einfluss des Zytoskeletts auf die Diffusion von TM- und GPI-verankerten Proteinen mit zeitlich hochaufgelöster Einzelmolekül-Mikroskopie. Die Autoren konnten nachweisen, dass sowohl die TM- als auch die GPI-verankerte Variante des MHC-Proteins sogenannte *hop diffusion* vollziehen. Der Theorie der *hop diffusion* unterliegt die Annahme, dass das Zytoskelett als gitterartige Struktur mit der Plasmamembran interagiert. In den freien Bereichen diffundieren die Proteine mit einer hohen Ausbreitungsrate. Gelangen die Proteine aber an eine Kontaktstelle der Gitterstruktur, wird ihre freie Beweglichkeit behindert. Der Diffusionskoeffizient bleibt solange beeinflusst bis die Proteine die Gitterstruktur überwunden haben und wieder in der Lage sind frei zu diffundieren. Dieser Wechsel des Diffusionskoeffizienten führt zu der augenscheinlichen sprunghaften Bewegung der Proteine [71].

Ungefähr 90 % der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen sind mit GPI-verankerten VSG bedeckt. Bülow *et al.* gelang es nachzuweisen, dass trotz der hohen Proteindichte circa 80 % der VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen mobil sind. Die von den Autoren ermittelten Diffusionskoeffizienten für die VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen lagen in der Größenordnung der Koeffizienten von TM-Proteinen ($\approx 0,01 \mu\text{m}^2 / \text{s}$). VSG, welche in CHO Zellen integriert wurden, wiesen einen vergleichbar geringen Diffusionskoeffizienten auf. Bülow *et al.* schlussfolgerten, dass die vergleichsweise geringen Diffusionskoeffizienten der VSG nicht durch spezifische Interaktionen mit dem Zytoskelett der Trypanosomen oder der extrazellulären Matrix (bei Trypanosomen nicht vorhanden) ausgelöst werden [72]. Die direkte Interaktion der VSG mit dem Zytoskelett schlossen die Autoren aus, da die Lipide des GPI-Ankers nur in eine Schicht der Membran eingelagert werden.

Somit kann die Diffusion der GPI-verankerten VSG in lebendigen Zellen frei von potentiellen Interaktionen mit der extrazellulären Matrix in einer nahezu homogenen Proteinschicht untersucht werden. Der methodische Ansatz und die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

1.3 Zielsetzung, methodischer Ansatz und Fragestellung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es verschiedene Eigenschaften, welche einen Effekt auf die Diffusion GPI-verankerter Proteine ausüben, systematisch zu untersuchen. Hierzu sollte eine vergleichende Studie der Diffusion des VSG in zwei Modellsystemen erfolgen. Im folgenden werden die Vor- und Nachteile der beiden gewählten Modellsysteme, der methodische Ansatz und die Fragestellungen erläutert.

(I) *Der VSG-Mantel als biologisches Modellsystem:* Durch die hohe Anzahl und die Tatsache, dass in dem VSG-Mantel nahezu ausschliesslich identische Proteine präsentiert werden, stellt die Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen ein hervorragendes biologischen Modellsystem dar um die Diffusion von GPI-verankerten Proteinen zu studieren. Zusätzlich steht eine große Anzahl verschiedener natürlich vorkommender VSG zu Verfügung. Biologische Modellsysteme haben den Vorteil, dass viele Faktoren durch den Organismus selbstständig kontrolliert werden. So wird zum Beispiel die Qualitätskontrolle der Proteine oder die Menge der auf der Zelloberfläche präsentierten Moleküle intrinsisch gesteuert. Im Fall der Trypanosomen geschieht dies sogar auf Einzelzellebene. Ein weiterer Vorteil des biologischen Modellsystems ist die Möglichkeit der genetischen Manipulation der Organismen. So können zum Beispiel verschiedene Eigenschaften, wie die N-Glykosylierung oder die VSG-Menge verändert und der Einfluss auf die Diffusion analysiert werden. Gleichzeitig stellt die Tatsache der Selbstregulation einen Nachteil von biologischen Systemen dar. So können einige Faktoren, wie zum Beispiel die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran nicht beeinflusst werden. Da BSF-Trypanosomen in ihrer natürlichen Umgebung, dem Blutgefäßsystem, in ständiger Bewegung sein müssen, sind sie zu hervorragenden Schwimmern adaptiert [73]. Dieser Umstand erschwert die Analyse der Diffusion auf der Zelloberfläche. Die bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit publizierten Methoden zur Immobilisierung von BSF-Trypanosomen basieren auf der gezielten Vergiftung der Parasiten. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit eine Methode zu entwickeln, mit welcher die BSF-Trypanosomen auf physiologische Weise immobilisiert werden können. Im Anschluss hieran sollte die Diffusion der VSG auf der Zelloberfläche näher charakterisiert werden, um im folgenden gezielt Faktoren zu variieren und deren Auswirkung auf die Diffusion zu analysieren.

Da diese Faktoren in beiden Modellsystemen parallel bearbeitet werden sollten, wird im folgenden das zweite Modellsystem beschrieben und im Anschluss die Fragestellung erläutert.

(II) *Das artifizielle Modellsystem; festkörperunterstützte artifizielle Membranen:*

Um die Diffusion frei von zellulären Beeinflussungen mit den Analysen des biologischen Modellsystems zu vergleichen, sollte parallel hierzu ein artifizielles Modellsystem verwendet werden. Mit diesem System sollte es möglich sein die Diffusion der VSG unter vorgegebenen Randbedingungen zu untersuchen. Artifizielle Membransysteme wurden seit ihrer Entwicklung in den 1980er Jahren zu der Analyse verschiedener zellbiologischer Fragestellungen verwendet [74–77]. Der Vorteil von flachen artifiziellen Membranen im Vergleich zu anderen artifiziellen Membransystemen, wie zum Beispiel den großen unilamellaren Vesikeln oder freischwimmenden Membranen, ist die hervorragende mechanische Stabilität und die flache Architektur. Ein weiterer Vorteil des artifiziellen Modellsystems ist die Tatsache, dass hier beinahe alle Faktoren extern bestimmt werden können. So können zum Beispiel die Lipid-Zusammensetzung der Membran, die Temperatur des Systems, die Proteinkonzentration oder die Pufferbedingungen frei gewählt werden. Eine zentrale Anforderung an das artifizielle Modellsystem war die Quantifizierung der VSG-Konzentrationen auf den Lipidschichten. Die Quantifizierung der VSG-Mengen sollte auf zwei Weisen realisiert werden. Neben der absoluten Quantifizierung der lateralen Dichten sollte die Menge des VSG in den artifiziellen Membranen in Relation zu der Menge des VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen eingestellt und bestimmt werden.

Die Diffusion der Proteine wird in beiden Modellsystemen mit Hilfe der Fluoreszenz-Wiederkehr nach irreversiblen Photobleichen (engl.: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) Methode bestimmt. Hierbei wird in einem bestimmten Bereich der Zelle, oder der artifiziellen Membran, die Fluoreszenz der markierten Proteine durch einen intensiven Laserimpuls irreversibel zerstört. Durch die Diffusion gelangen die Proteine mit intakten Fluorophoren in den gebleichten Bereich zurück. Somit kann anhand der Kinetik der Fluoreszenz-Wiederkehr die Diffusion der Proteine in Detail charakterisiert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Methode erfolgt in Kapitel 4.2.6.

Die folgenden Fragen sollten mit Hilfe der Modellsysteme vergleichend studiert werden:

- Zeigen verschiedene VSG, trotz struktureller und biochemischer Unterschiede, ähnliche Eigenschaften der Diffusion?
- Ist die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen durch dessen laterale Dichte beeinflusst?
- Haben N-Glykane einen Effekt auf die Diffusion des VSG?
- Kann die Größe der Proteindomäne von GPI-verankerten Proteinen die Diffusion ohne Interaktionen mit extrazellulären Strukturen beeinflussen?

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung der Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen

2.1.1 Gelatine eignet sich als Medium für die Immobilisierung von Trypanosomen

Wie bereits erwähnt sind Trypanosomen hoch motil. Dieser Umstand erschwert die Analyse der Diffusion von Proteinen auf deren Zelloberfläche. Die bisher publizierten Methoden zu der Immobilisierung der Parasiten beruhen entweder auf der Inhibierung der Energiegewinnung oder auf der Verwendung von Substraten, welche die Blutstromform-Trypanosomen (BSF-Trypanosomen) in kurzer Zeit (ca 30-60 min) abtöten [72, 78]. Daher sollte eine Methode etabliert werden, um die Parasiten unter physiologischen Bedingungen über längere Zeiträume (1-2 h) zu immobilisieren. Die BSF-Trypanosomen wurden hierzu in einer 8%igen (Gew.%) Gelatine-Lösung aufgenommen und auf eine Temperatur von 20°C gekühlt. Nachdem die Gelatine in den gelartigen Zustand übergegangen war, konnte hiermit eine starke Immobilisierung der Parasiten erreicht werden.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Gelatine-Lösung potentiell negative Auswirkungen auf die Vitalität der BSF-Trypanosomen ausübt. Hierzu wurden eine definierte Anzahl an BSF-Trypanosomen für einen Zeitraum zwischen 0 und 7 h in der Gelatine-Lösung immobilisiert und nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) rekultiviert. Das Wachstum der BSF-Trypanosomen wurde nach der Rekultivierung für eine Dauer von 72 h beobachtet. In Abbildung 2.1 sind die Wachstumskurven der Kulturen nach verschiedener Immobilisierungsdauer abgebildet. BSF-Trypanosomen, welche für 1 bis 3 h immobilisiert wurden, zeigten in ihrem Wachstum nach der Rekultivierung keinen Unterschied zu den Zellen, die direkt nach der Immobilisierung wieder rekultiviert wurden (0 h). Die Populationsverdopplungszeit der Kulturen bei einer Immobilisierungsdauer zwischen 0 und 3 h betrug 6,3 bis 6,8 h und war somit gut vergleichbar mit der Zeit die BSF-Trypanosomen unter normalen Kultivierungsbedingungen (6-7 h) benötigen. Nach einer Immobilisierung von 4 bzw 7 h konnte eine Reduzierung der Wachstumsrate für die folgenden 18-20 h festgestellt werden. Ungefähr 24 h nach

der Reaktivierung zeigten diese Kulturen wieder einen nahezu parallelen Verlauf im Vergleich zu den Wachstumskurven der übrigen Kulturen. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass die Immobilisierung der BSF-Trypanosomen mit Hilfe der Gelatine-Lösung für einen Zeitraum von einer bis zu drei Stunden ohne schwerwiegende Beeinträchtigung der Vitalität der Parasiten möglich ist.

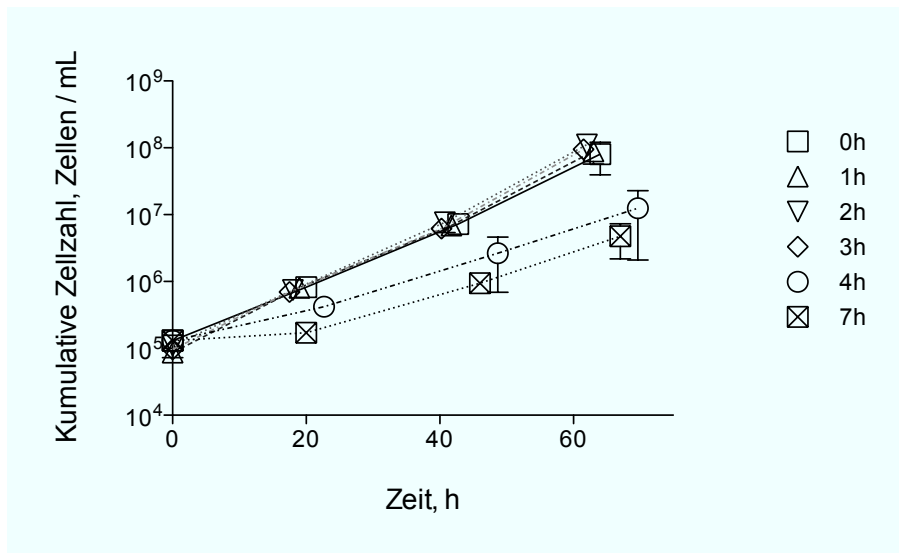


Abbildung 2.1: Wachstumskurven von BSF-Trypanosomen nach Immobilisierung in Gelatine. $5 \cdot 10^6$ BSF-Trypanosomen wurden in $500 \mu\text{L}$ einer 8%igen Gelatine-Lösung für 0 (□), 1 (△), 2 (▽), 3 (◇), 4 (○) oder 7 h (⊠) immobilisiert und im Anschluss reaktiviert. Die Zelldichte wurde nach der Reaktivierung auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt. Das Wachstum der Zellen wurde für die folgenden 72 h beobachtet. BSF-Trypanosomen, die zwischen 1 und 3 h immobilisiert wurden, zeigten nach der Reaktivierung keine Beeinträchtigung der Wachstumsrate. Nach einer Immobilisierung für vier oder sieben Stunden war eine Reduzierung der Wachstumsrate für einen Zeitraum von 24 h zu erkennen. Nach ca 24 h erholte sich das Wachstum der Zellen. Die Inkubation der Zellen nach der Reaktivierung erfolgte unter Standardbedingungen. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Triplikaten.

2.1.2 Die Diffusion verschiedener VSG auf der Zelloberfläche von Trypanosomen ist sehr ähnlich

Nach der erfolgreichen Etablierung der Immobilisierungsmethode sollte die Diffusion des VSG auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen näher charakterisiert werden. Bislang wurde die Diffusion eines einzelnen VSG, des MITat1.2, auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen untersucht [72]. Daher sollte die Diffusion verschiedener VSG der 3 Carboxyl-terminaler Domäne Typen (C-term Typen) charakterisiert werden.

Die Diffusion der folgenden VSG wurde untersucht:

- C-term Typ 1: MITat1.4 und MITat1.6; eine N-Glykosylierung
- C-term Typ 2: MITat1.1 und MITat1.2; zwei N-Glykosylierungen
- C-term Typ 3: MITat1.5; drei N-Glykosylierungen

Hierzu wurden die primären Amine der VSG auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen durch die Bindung von Succinimidyl-Ester gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen (Sulfo-NHS Atto 488, ATTO-TEC) markiert. Im Anschluss wurden die BSF-Trypanosomen in der Gelatine-Lösung immobilisiert und die Diffusion der VSG mit Hilfe von FRAP-Messungen (engl.: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) analysiert. Eine genaue Beschreibung der Durchführung der Experimente erfolgt in dem Abschnitt Methoden, in den Kapiteln 4.2.2.5 (Markierung der VSG), 4.2.2.7 (Immobilisierung) und 4.2.6.1 (FRAP-Messungen). Die Immobilisierung der BSF-Trypanosomen und die anschließende Analyse der Diffusion des VSG wurde in einer eigens für diesen Zweck angefertigten Probenkammer durchgeführt. Die Temperatur der Probenkammer wurde während der FRAP-Messungen auf 20 °C eingestellt. In Abbildung 2.2 ist eine typische FRAP-Messung und die Bearbeitung der Daten dargestellt. Der Diffusionskoeffizient (D) und die mobile Fraktion (MF) wurden nach Phair *et al.* bestimmt [79]. Der Diffusionskoeffizient beschreibt die zeitabhängige Flächenausbreitung der Moleküle und die mobile Fraktion den prozentualen Anteil der beweglichen Proteine in dem Beobachtungsraum.

Auf diese Weise wurde die Diffusion des VSG der oben aufgeführten Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse der FRAP-Messungen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Diffusionskoeffizienten und die mobilen Fraktionen aller analysierten VSG liegen zwischen $0,02$ und $0,03 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ bzw 75 und 80% . Dies verdeutlicht, dass die VSG der verschiedenen C-term Typen trotz struktureller und biochemischer Unterschiede grundsätzlich ähnliche Diffusionseigenschaften aufweisen.

Tabelle 2.1: Die Diffusion verschiedener VSG ist in lebenden Trypanosomen sehr ähnlich. Analyse der FRAP-Messungen: Diffusionskoeffizienten (D), mobile Fraktionen (MF) und Anzahl der analysierten BSF-Trypanosomen. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

	D , $\mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
Typ-1 VSG			
MITat1.4	$0,028 \pm 0,009$	80 ± 6	43
MITat1.6	$0,024 \pm 0,010$	79 ± 9	110
Typ-2 VSG			
MITat1.1	$0,021 \pm 0,013$	74 ± 7	40
MITat1.2	$0,021 \pm 0,008$	76 ± 6	28
Typ-3 VSG			
MITat1.5	$0,027 \pm 0,008$	78 ± 8	25

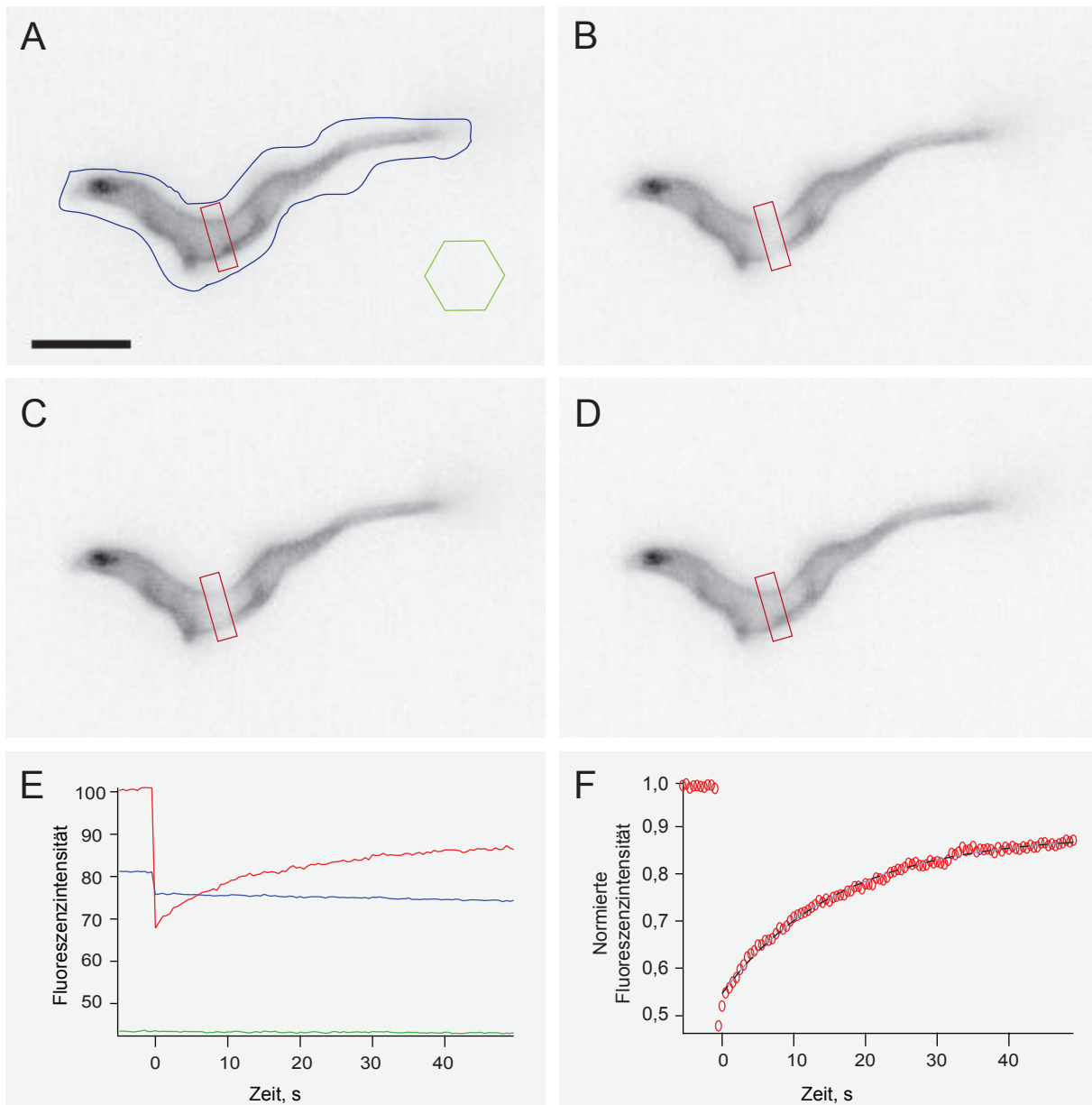


Abbildung 2.2: FRAP-Experiment an einem immobilisierten BSF-Trypanosom. A - D: Verschiedene Zeitpunkte einer FRAP-Messung. (A) Vor dem Bleichen; rotes Viereck markiert die FRAP-ROI (engl.: *Region Of Interest*, ROI), die blaue Einfassung die Ganzzell-ROI und das grüne Sechseck die Hintergrund-ROI. Der Größenbalken entspricht 10 μm . (B) Direkt nach dem Bleichen, (C) während der Fluoreszenz-Wiederkehr und (D) zur vollständigen Fluoreszenz-Wiederkehr. E und F: Daten und Auswertung. (E) Aufgezeichnete Rohdaten. (F) Normierte und korrigierte Daten (rote Kreise), Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion an die Daten (schwarz-graue Kurve).

2.1.2.1 Die Diffusion verschiedener VSG in einem Mosaik-Mantel ist kompatibel

Mit den vorstehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Diffusion verschiedener VSG in einem homogenen VSG-Mantel sehr ähnlich ist. Während der Antigenen Variation kommt es zu einer vorübergehenden Vermischung von zwei VSG-Typen auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen. In diesem Fall wird von einem Mosaik-Mantel gesprochen. Um die Kompatibilität einer Mischung verschiedener VSG auf Ebene der Diffusion zu untersuchen, wurde eine genetisch manipulierte Zelllinie analysiert, welche zwei unterschiedliche VSG aus identischem genomischen Kontext produziert. In diesen sogenannten Doppelexpressoren (DEX) wird in den aktiven Ort der VSG-Expression ein zusätzlicher VSG-Leserahmen integriert. Dies führt zu einer zeitgleichen Herstellung und Präsentation zwei verschiedener VSG zu ähnlichen Anteilen in einem Mosaik-Mantel [80]. Auf diese Weise wurde die Diffusion der VSG in einem Mosaik-Mantel, welcher aus den Proteinen MITat1.2 und MITat1.6 bestand, untersucht. In Tabelle 2.2 sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen der DEX BSF-Trypanosomen aufgeführt. Die statistische Auswertung verdeutlicht, dass die Diffusion der VSG in einem Mosaik-Mantel keine Abweichung zu der Diffusion des VSG in einem homogenen Mantel aufweist. Dies bedeutet, dass die VSG der beiden untersuchten Typen auf der Ebene der Diffusion kompatibel sind.

Tabelle 2.2: Die Diffusion verschiedener VSG in einem Mosaik-Mantel ist kompatibel. Diffusionskoeffizienten (D), mobile Fraktionen (MF) und die Anzahl der analysierten MITat1.2, MITat1.6 bzw MITat1.2/1.6DEX BSF-Zellen. p-Werte des t-Test für unverbundene Stichproben. Der t-Test wurde für alle Kombinationen der Experimente für D und MF durchgeführt. p-Werte $> 0,1$ bedeuten, dass die Messreihen keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
MITat1.2	$0,021 \pm 0,008$	$74,3 \pm 6$	45
MITat1.6	$0,024 \pm 0,010$	$78,6 \pm 9$	110
MITat1.2/1.6DEX	$0,018 \pm 0,007$	$78,4 \pm 16$	67
p-Werte, D	MITat1.2	MITat1.6	MITat1.2/1.6DEX
MITat1.2	-	0,219	0,678
MITat1.6	0,219	-	0,411
MITat1.2/1.6DEX	0,678	0,411	-
p-Werte, MF	MITat1.2	MITat1.6	MITat1.2/1.6DEX
MITat1.2	-	0,308	0,187
MITat1.6	0,308	-	0,756
MITat1.2/1.6DEX	0,187	0,756	-

2.1.2.2 Intrazelluläre Strukturen üben potentiell einen Einfluss auf die Diffusion des VSG aus

Um mögliche Interaktionen zwischen intrazellulären Strukturen, wie den subpellikulären Mikrotubuli-Filamenten, und der Plasmamembran zu analysieren, wurden die BSF-Trypanosomen während der Immobilisierung osmotisch-geschwollen. Hierzu wurde für die Immobilisierung der Zellen Gelatine verwendet, welche in Wasser aus einer Reinstwasser Anlage (mp-H₂O) gelöst wurde. Die Zellen verloren dadurch ihre charakteristische Form und schwollen kugelförmig an (siehe Abbildung 2.3). In Tabelle 2.3 sind die Ergebnisse der Diffusionsmessungen von normal immobilisierten und osmotisch-geschwollener BSF-Trypanosomen aufgeführt. Der Diffusionskoeffizient der geschwollenen BSF-Trypanosomen wurde im Vergleich zu den normal immobilisierten Zellen nicht (p-Wert $\geq 0,4$) beeinflusst. Hingegen wurde die mobile Fraktion der VSG durch das osmotische Schwellen hoch signifikant (p-Wert = 0,0008) auf rund 85 % angehoben. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass auch bei Trypanosomen intrazelluläre Komponenten mit der Plasmamembran assoziiert vorliegen und somit einen Einfluss auf die Diffusion der Proteine auf der Zelloberfläche ausüben. Um eine Aktivierung der GPI-spezifische Phospholipase-C (GPI-PLC) und das damit verbundene Ausdünnen des VSG-Mantels während dem osmotischen Schwellen auszuschließen, wurde die Diffusion des VSG in osmotisch-geschwollenen Trypanosomen untersucht, in welchen das Gen der GPI-PLC entfernt wurde [81]. Auch in dieser GPI-PLC^{-/-}-Zelllinie konnte kein signifikanter Unterschied der Diffusionskoeffizienten, aber eine signifikante Erhöhung der mobilen Fraktion (p-Wert = 0,0005), im Vergleich zu den ungeschwollenen wildtyp Trypanosomen festgestellt werden.

Tabelle 2.3: Intrazelluläre Strukturen üben potentiell einen Einfluss auf die Diffusion des VSG aus. Diffusionskoeffizienten (D), mobile Fraktionen (MF) und die Anzahl der analysierten BSF-Trypanosomen. Es wurden die Zelllinien MITat1.5-wt und MITat1.5-GPI-PLC^{-/-} untersucht. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

	D , $\mu\text{m}^2/\text{s}$	MF, %	Anzahl
wt, normal immobilisiert	$0,027 \pm 0,008$	78 ± 8	25
wt, osmotisch-geschwollen	$0,024 \pm 0,008$	84 ± 6	31
GPI-PLC ^{-/-} , osmotisch-geschwollen	$0,024 \pm 0,006$	86 ± 6	20

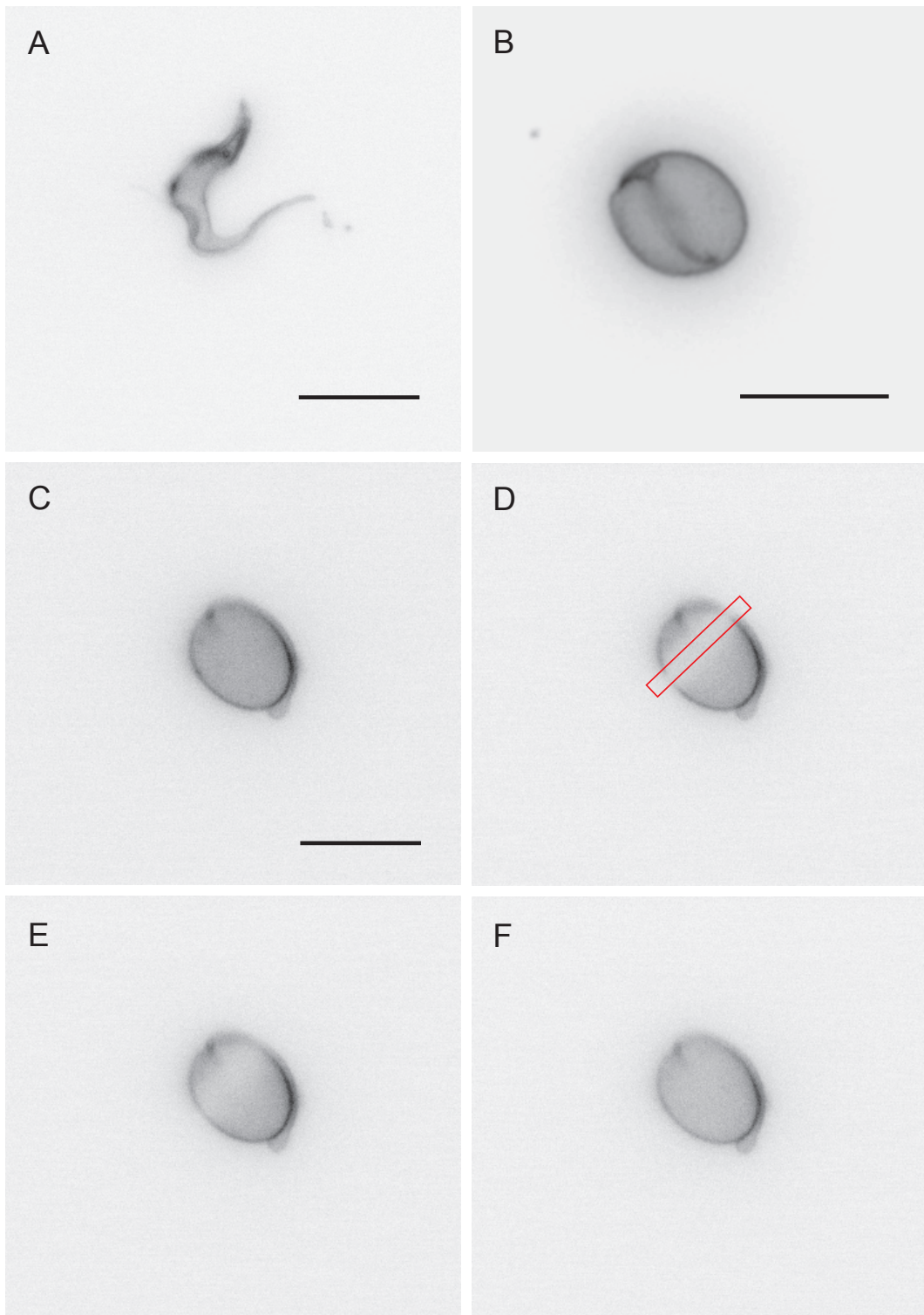


Abbildung 2.3: FRAP-Messung an einem osmotisch-geschwellenen BSF-Trypanosom. Die Größenbalken entsprechen 10 μm . (A) BSF-Trypanosom immobilisiert mittels Standardbedingungen. (B) Maximalprojektion eines z-Stapels (150 Bilder mit 100 nm Abstand in z-Ebene) eines osmotisch-geschwellenen BSF-Trypanosoms. C bis F: FRAP-Messung einer osmotisch-geschwellenen BSF Zelle. (C) vor dem Bleichen, (D) direkt nach dem Bleichen, (E) während der Fluoreszenz-Wiederkehr und (F) zum Zeitpunkt der vollständigen Fluoreszenz-Wiederkehr.

2.1.3 VSG diffundieren in artifiziellen Membranen typisch für GPI-verankerte Proteine

Nachdem die grundlegenden Eigenschaften der Diffusion des VSG in lebenden BSF-Trypanosomen charakterisiert wurden, sollte dies ebenso für die Diffusion des VSG in artifiziellen Membranen erfolgen. Hierzu wurde das VSG in der sogenannten membranform (mfVSG) aus den BSF-Trypanosomen extrahiert. Die Reinigung des mfVSG wurde per Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (*engl.: High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) durchgeführt. Das gereinigte mfVSG wurde im Anschluss mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und in Lipid-Doppelschichten integriert, welche zuvor per Vesikelfusion auf hydrophilen Objektträgern hergestellt wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Methoden ist den Kapiteln 4.2.3 (mfVSG Reinigung), 4.2.3.1 (Markierung der mfVSG), 4.2.5.1 (Vorbereitung der Objektträger) und 4.2.5.3 (Herstellung der Lipid-Doppelschichten) zu entnehmen. Die Diffusion der mfVSG wurde per FRAP-Messungen in kreisförmigen Regionen mit einem Radius von 5 μm bestimmt. Die Auswertung der FRAP-Experimente erfolgte nach Soumpasis *et al.* [82] (siehe Kapitel 4.2.6.2).

Auf diese Weise wurde die Diffusion von insgesamt 4 verschiedenen mfVSG der 3 C-term Typen untersucht (siehe Tabelle 2.4). Die Analyse der FRAP-Messungen zeigt, dass die mfVSG in artifiziellen Membranen hoch mobil sind ($\text{MF} \geq 94\%$). Dies deutet auf fluide und defekt-freie Lipid-Doppelschichten hin. Außerdem spiegelt eine hohe mobile Fraktion die freie Beweglichkeit der Proteine in der Membran wider und schließt somit eine Aggregation der Proteine oder Interaktionen der mfVSG mit dem Glassubstrat aus. Interessanterweise zeigen die mfVSG in artifiziellen Membranen, neben den hohen mobilen Fraktionen, Diffusionskoeffizienten zwischen 0,7 und 1,0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit Diffusionskoeffizienten von GPI-verankerten Proteinen in artifiziellen Membranen [83].

Im Vergleich zu der Situation in lebenden BSF-Trypanosomen ist der Diffusionskoeffizient der mfVSG in artifiziellen Membranen um ungefähr einen Faktor 50 größer. Um diese Abweichung genauer zu charakterisieren, sollte im folgenden der Einfluss der lateralen Dichte des VSG auf dessen Diffusion untersucht werden.

Tabelle 2.4: Membranform-VSG ist in artifizierten Membranen hoch mobil. FRAP-Messungen verschiedener VSG in artifizierten Membranen: Diffusionskoeffizienten (D), mobile Fraktionen (MF) und die Anzahl der FRAP-Messungen. Untersucht wurden mfVSG der drei verschiedenen C-term Typen. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
Typ-1 VSG			
MITat1.6	$1,0 \pm 0,3$	$94 \pm 6,2$	61
Typ-2 VSG			
MITat1.1	$0,9 \pm 0,2$	$94 \pm 5,0$	41
MITat1.2	$0,7 \pm 0,2$	$94 \pm 8,0$	58
Typ-3 VSG			
MITat1.5	$0,7 \pm 0,2$	$97 \pm 2,6$	41

2.2 Einfluss der lateralen Dichte auf die Diffusion des VSG

2.2.1 Die Mobilität des VSG auf der Zelloberfläche ist in der Nähe eines Diffusionsschwellenwertes

Eine sehr nahliegende Vermutung für die unterschiedlich großen Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen wäre, dass die laterale Dichte der VSG auf der Zelloberfläche deren Diffusion selbst beeinträchtigt. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde die laterale Dichte der mfVSG in den artifiziellen Proben in Relation zu der Konzentration der VSG auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen eingestellt. Somit sollte es möglich sein herauszufinden, ob die VSG-Dichte auf der Zelloberfläche die Diffusion der Proteine beeinflusst. Die Herstellung von artifiziellen Membranen mit hohen mfVSG Konzentrationen konnte mit der zuvor verwendeten Methode nicht realisiert werden. Die Inkorporation der mfVSG aus dem Pufferüberstand der Membranen wird ab einer gewissen Dichte durch sterische Wechselwirkungen der Proteine verhindert. Daher wurden zunächst hohe Konzentrationen der mfVSG mit Hilfe der Detergenz-Extraktionsmethode (Details, siehe Kapitel 4.2.4.2) in kleine unilamellare Lipidvesikel (*engl.: small unilamellar vesicles, SUV*) rekonstituiert. Um die laterale Dichte in den artifiziellen Proben zu variieren, wurde die Rekonstitution des mfVSG in Anwesenheit verschiedener Lipid-Konzentrationen durchgeführt. Würden die so entstandenen mfVSG-Proteoliposomen direkt auf einen Objektträger appliziert werden, so käme ein Teil der Proteine direkt mit dem Glas in Berührung. Um dies zu verhindern, wurden die Objektträger mit einer Lipid-Einzelschicht mittels Langmuir-Blodgett Transfer von der Luft/Wassergrenzschicht einer Film-Waage beschichtet. Die resultierende mfVSG-Menge in den artifiziellen Membranen wurde in Form von BSF-Zelläquivalenten per immunhistochemischen Nachweis bestimmt. Auf diese Weise war es möglich die laterale Dichte des mfVSG in den artifiziellen Membranen so einzustellen, dass diese der lateralen Dichte des VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen entspricht. Hierzu wurde die zell-spezifische mfVSG-Menge vor und nach der Fusion der Vesikel in dem Pufferüberstand der Membranen bestimmt. Aus der Differenz der beiden Proben (vor und nach der Fusion) konnte dann, mit Hilfe einer Eichgerade von Gesamt-Proteinextrakten der BSF-Trypanosomen die Anzahl der entsprechenden

Zell-Äquivalente in den artifiziellen Membranen bestimmt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung und der Quantifizierung dieser Proben ist in Kapitel 4.2.4.2 zu finden.

In Abbildung 2.4 sind die Diffusionskoeffizienten und die mobilen Fraktionen des mfVSG in Abhängigkeit der lateralen Dichte in Form von BSF-Oberflächenäquivalenten (BSFO) dargestellt. Ein BSFO von 1 bedeutet, dass die Konzentration in den artifiziellen Membranen der Konzentration des VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen entspricht. Bei einem BSFO von 1,0 kann ein D von $0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und ein MF von ca 80 % bestimmt werden. Diese Werte können ebenfalls bei einem BSFO von 1,3 ermittelt werden. Wird die Konzentration des mfVSG allerdings über einen kritischen Wert erhöht ($> 1,3$ BSFO), so ist eine drastische Reduzierung sowohl von D als auch von MF zu beobachten. Dies bedeutet, dass sobald die Konzentration der Proteine einen kritischen Schwellenwert erreicht die Diffusion und die Mobilität stark beeinträchtigt wird. Im folgenden soll dieser Grenzwert als Diffusionsschwellenwert (DSW) bezeichnet werden.

Was bedeutet dieses Ergebnis nun für die Diffusion des VSG in BSF-Trypanosomen? Die Ergebnisse zeigen, dass die Diffusion des VSG auf der Zelloberfläche der Parasiten offensichtlich nicht von der lateralen Dichte des VSG beeinflusst wird. Vielmehr scheint es, als wäre eine begrenzte Anzahl an zusätzlichem VSG toleriert ohne direkt in einem Überschreiten des DSW zu resultieren. Dies ist grundsätzlich ein sehr interessantes Ergebnis, allerdings bleibt die Frage, durch welche Faktoren die Diskrepanzen zwischen den Diffusionsmessungen *in vivo* und in den artifiziellen Membranen ausgelöst werden, unbeantwortet. Die nächste nahliegende Frage wäre nun, welchen potentiellen Einfluss die zusätzlichen Proteine in der Plasmamembran der BSF-Zelloberfläche auf die Diffusion des VSG ausüben. Um dieser Frage nachzukommen, wurde die Diffusion des VSG in artifiziellen Proben in der Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen zusätzlicher nicht-VSG Proteine untersucht.

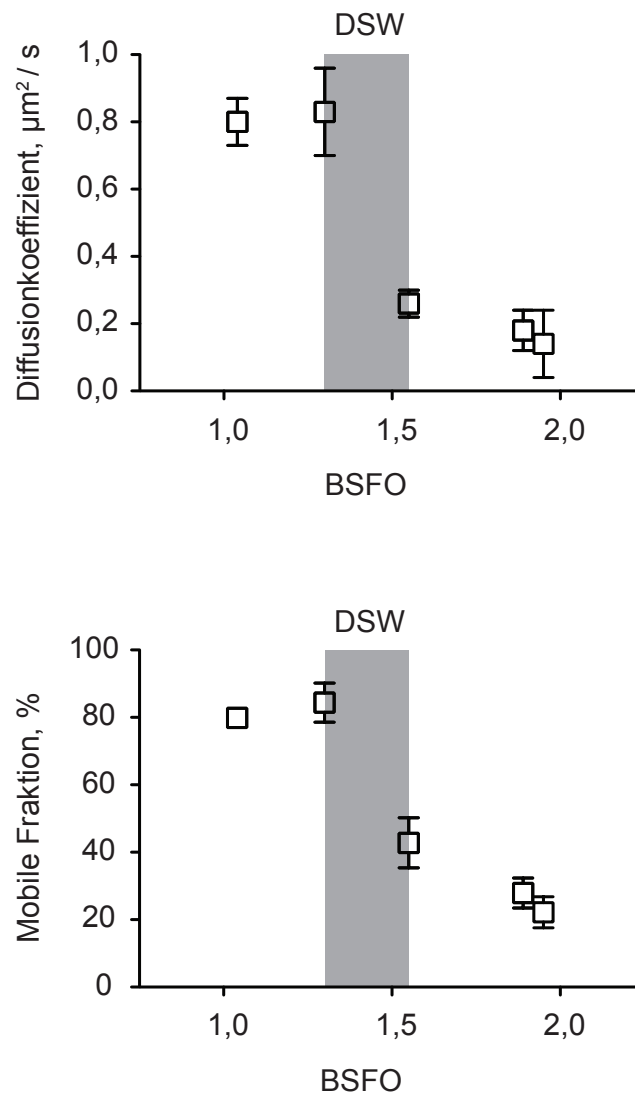


Abbildung 2.4: Die Diffusion im VSG-Mantel ist in der Nähe des Diffusionsschwellenwertes. FRAP-Messungen bei unterschiedlichen VSG-Dichten in artifiziellen Membranen: Oben, Diffusionskoeffizienten (D) in $\mu\text{m}^2/\text{s}$ gegen BSF-Oberflächenäquivalente (BSFO). Unten, mobile Fraktionen in % gegen BSFO. Ein BSFO von 1 entspricht der VSG-Dichte auf den BSF-Trypanosomen. Wird ein BSFO $> 1,3$ erreicht ist der Diffusionsschwellenwert überschritten und D und MF werden drastisch reduziert. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.2.2 Zusätzliche membranverankerte Proteine üben einen starken Effekt auf den Diffusionskoeffizienten des VSG aus

Die Plasmamembran der BSF-Trypanosomen ist zu 90% mit VSG bedeckt. Was steckt aber unter diesem Mantel? Bislang ist eine vergleichsweise geringe Anzahl von zusätzlichen Membranproteinen der BSF-Trypanosomen detailliert charakterisiert. Die invarianten Oberflächenglykoproteine (*engl.: Invariant Surface Glycoproteins*, ISG) machen ungefähr 5% der gesamten Proteinmenge an der Plasmamembran aus [84]. Neben den ISGs befinden sich allerdings eine nicht unerhebliche Anzahl (> 500) verschiedener weiterer Proteine in der Plasmamembran [85]. Die zelluläre Lokalisation und deren Abundanz ist bei diesen Proteinen nicht geklärt. Da eine Vielzahl der Membranproteine zellbiologisch essentielle Aufgaben ausüben, wäre eine gezielte Analyse durch das Entfernen einzelner Komponenten *in vivo* nicht nur zeit-intensiv, sondern wahrscheinlich frei von Artefakten nicht möglich.

Aus diesem Grund sollte der Einfluss von nicht-VSG Proteinen auf die Diffusion des mfVSG in artifiziellen Proben untersucht werden. Hierzu wurden durch die Fusion von SUVs auf hydrophilen Objektträgern (vgl. Kapitel 4.2.5.3) Membranen hergestellt, welche mit verschiedenen Konzentrationen an biotinylierten Lipiden (DOPE-Biotin) versehen waren. Um die zusätzlichen nicht-VSG Proteine zu simulieren, wurde nach der Integration des fluoreszierend markierten mfVSG, das Biotin bindende Neutravidin an die Membranen gebunden. Um einen Einfluss der veränderten Lipid-Zusammensetzung auszuschließen, wurde die Diffusion des mfVSG vor der Zugabe des Neutravidin analysiert. Auf diese Weise konnte der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von nicht-VSG Proteinen auf die Diffusion des mfVSG untersucht werden. Es wurden DOPE-biotin Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0,05 und 10% (molar) untersucht. Abbildung 2.5 zeigt die Ergebnisse der Diffusionsmessungen. Interessanterweise scheinen vergleichsweise geringe Konzentrationen an zusätzlichen nicht-VSG Proteinen in der Membran auszureichen, um einen deutlichen Effekt auf die Diffusion des mfVSG auszuüben. Bereits in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 1% (molar) DOPE-biotin ist eine Reduzierung des D von ungefähr 50% zu beobachten. Die MF der mfVSG bleibt in diesem Fall allerdings bei einem relativ hohem Wert von 80%. Erst bei hohen DOPE-Biotin Konzentrationen $> 5%$ (molar) wird eine Reduzierung der MF des mfVSG auf ca 20% erreicht.

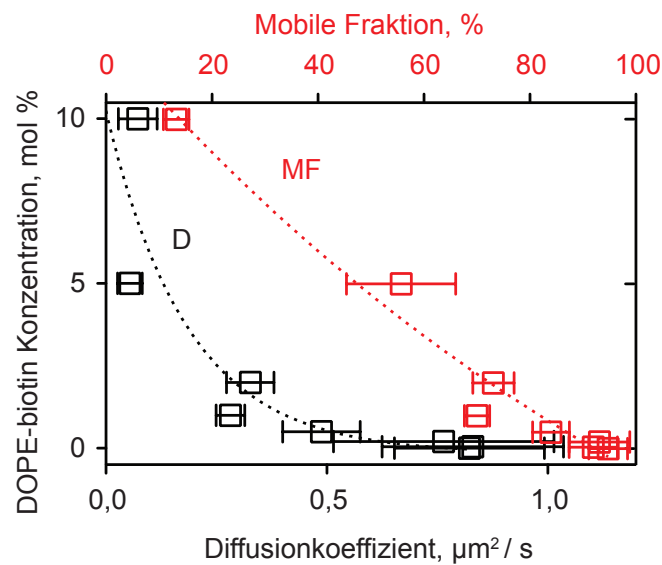
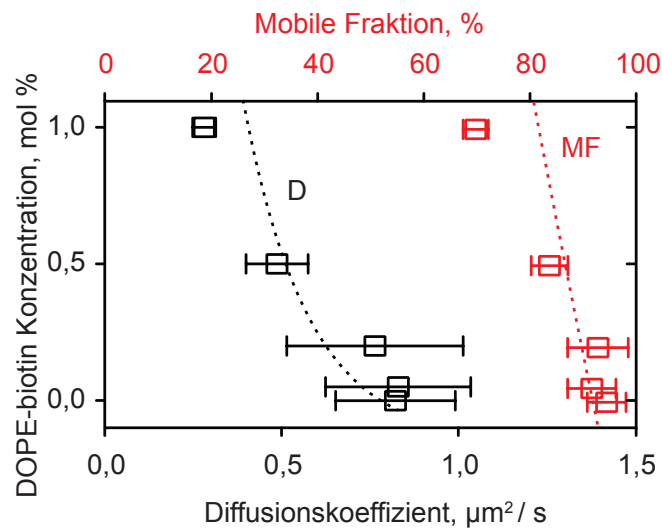


Abbildung 2.5: Einfluss verschiedener Konzentrationen von nicht-VSG Proteinen auf die Diffusion des mfVSG. Diffusionskoeffizienten (D , schwarze Symbole), mobile Fraktionen (MF, rote Symbole). Oben, 0,05-1% (molar) DOPE-biotin: Der Diffusionskoeffizient des mfVSG wird durch das Neutravidin bereits bei geringen DOPE-biotin Konzentrationen um ca 50% reduziert. Hingegen bleiben ungefähr 80% der Proteine mobil. Unten, 0,05-10% (molar) DOPE-biotin: Erst bei sehr hohen Konzentrationen ($> 5\%$) an DOPE-biotin üben die zusätzlichen nicht-VSG einen starken Effekt auf die Proteinmobilität aus. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

Es scheint also, als üben die zusätzlichen nicht-VSG Proteine einen anderen Effekt auf die Diffusion des mfVSG aus, als das mfVSG selbst. Um diesen Zusammenhang zu verdeutlichen, sind in Abbildung 2.6 die Diffusionskoeffizienten über die entsprechenden mobilen Fraktionen der Diffusionsmessungen der reinen (homogenen) mfVSG-Proben (vgl. Kapitel 2.2.1) und der Proben mit zusätzlichen nicht-VSG (heterogenen) aufgetragen. In dieser Art der Darstellung wird jedem ermittelten Diffusionskoeffizienten die entsprechende mobile Fraktion zugeordnet. Es wird deutlich, dass das Neutravidin einen schwächeren Effekt auf die mobile Fraktion, als die mfVSG bei vergleichbarem Diffusionskoeffizienten ausüben können. Die mobilen Fraktionen der homogenen mfVSG Proben werden bei vergleichbarem Diffusionskoeffizienten stärker reduziert, als die mobilen Fraktionen der heterogenen Proben. Dies bedeutet, dass der Diffusionskoeffizient der VSG in lebenden Trypanosomen, durch die zusätzlichen Proteine in der Plasmamembran deutlich reduziert werden kann, wobei die mobile Fraktion der VSG nur geringfügig beeinflusst wird. Dieses Ergebnis gibt einen Ansatz zu der Klärung der Unterschiede der Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen.

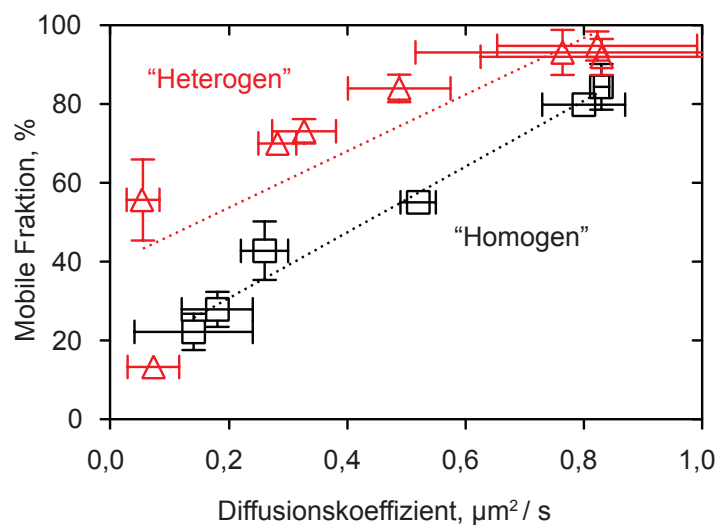


Abbildung 2.6: Diffusion des mfVSG in homogenen und heterogenen Proteinproben. Diffusionskoeffizienten ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) gegen die mobile Fraktionen (%) des mfVSG in homogenen (□) und heterogenen (Neutravidin-VSG, △) Proteinproben. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.3 Einfluss der N-Glykosylierung auf die Diffusion des VSG

2.3.1 N-Glykane erhalten die Mobilität des VSG in lebenden Trypanosomen

Alle VSG der BSF-Trypanosomen sind zumindest mit einer N-Glykosylierung posttranslational modifiziert. Um den Effekt der N-Glykosylierung auf die Diffusion des VSG zu untersuchen, wurden zwei Zelllinien generiert, welche ausschließlich N-Glykan freie (Δ Glykan) VSG auf der Zelloberfläche präsentieren. Die Zelllinien wurden von Dr. Nicola Jones und Dr. Marsilius Mues in Vorarbeiten etabliert. Hierfür wurden Doppelexpressor-Zelllinien (DEX) generiert, bei welchen in den aktiven Ort der Expression neben dem endogenen MITat1.2, mutierte kodierende Sequenzen für das MITat1.4 Δ Glykan oder MITat1.6 Δ Glykan-VSG integriert wurden. In diesen mutierten Leserahmen wurden die Signalsequenzen der N-Glykosylierung mutiert, um das posttranslationale Anheften der N-Glykane zu verhindern. Nach der erfolgreichen Integration der Konstrukte in die BSF-Trypanosomen wurde der Leserahmen des endogenen MITat1.2-VSG durch eine Resistenz-Kassette ersetzt. Auf diese Weise wurden zwei Zelllinien generiert, die ausschließlich N-Glykan freie VSG des Typ-1 auf der Zelloberfläche präsentieren.

Die Diffusion des VSG der Δ Glykan-Zelllinien wurde wie bei den wildtyp Zellen durch FRAP-Messungen analysiert. In Tabelle 2.5 sind die Ergebnisse der Diffusionsmessungen aufgeführt. Die statistische Auswertung der FRAP-Messung der beiden Δ Glykan-Zelllinien ergab in beiden Fällen keine signifikante Änderung der Diffusionskoeffizienten. Erstaunlicherweise wurde in beiden Zelllinien die mobile Fraktion der VSG hoch signifikant (p -Wert $\leq 0,0001$) reduziert. In Abbildung 2.7 und 2.8 sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen der beiden Δ Glykan-Zelllinien als Häufigkeitsverteilungen und der Anpassung einer Gaußschen Verteilung an die relativen Häufigkeiten dargestellt. In dieser Art der Darstellung wird die Reduzierung der mobilen Fraktion des VSG als Verschiebung der Häufigkeitsverteilung zu kleineren Werten deutlich. Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick durchaus verwunderlich, da durch die Entfernung, also die Verkleinerung des Proteins, eine Reduzierung der Proteinmobilität hervorgerufen wird. Dies deutet darauf hin, dass N-Glykosylierungen die Mobilität der Proteine

begünstigen können. Um dieses Phänomen genauer zu charakterisieren, wird im nächsten Abschnitt der Einfluss der N-Glykosylierung auf die Diffusion des mfVSG in artifizialen Membranen beschrieben.

Tabelle 2.5: N-Glykane erhalten die Mobilität des VSG in lebenden Trypanosomen. Ergebnisse der FRAP-Messungen der MITat1.4 und MITat1.6-wildtyp (wt) bzw Δ Glykan-VSG BSF-Trypanosomen: Diffusionskoeffizienten (D), mobile Fraktionen (MF) und Anzahl der analysierten MITat1.4 oder MITat1.6-wt und Δ Glykan BSF-Trypanosomen. Die D der analysierten VSG zeigen keine signifikante Änderung, hingegen wird die MF der VSG hoch signifikant um 5 % (MITat1.4 Δ Glykan) oder 10 % (MITat1.6 Δ Glykan) reduziert. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen und die p-Werte eines t-Tests für unverbundene Stichproben.

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
MITat1.4 wt	$0,028 \pm 0,009$	80 ± 6	43
MITat1.4 Δ Glykan	$0,029 \pm 0,013$	75 ± 6	36
p-Werte	0,35	$\leq 0,0001$	
MITat1.6 wt	$0,024 \pm 0,010$	79 ± 9	94
MITat1.6 Δ Glykan	$0,021 \pm 0,009$	71 ± 7	56
p-Werte	0,16	$\leq 0,0001$	

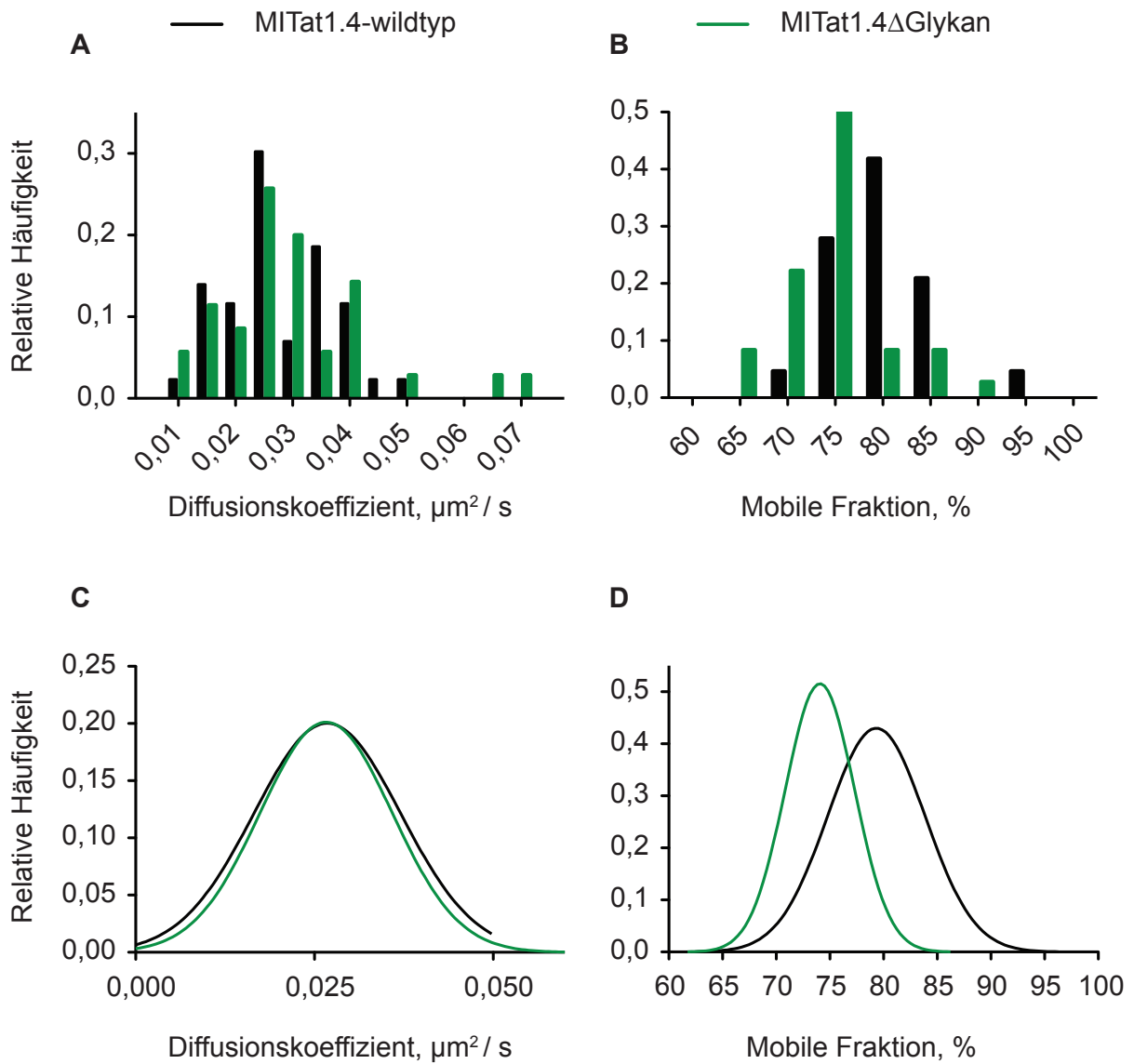


Abbildung 2.7: Analyse der Diffusion des MITat1.4ΔGlykan-VSG. A bis D: MITat1.4-wildtyp (schwarz) und MITat1.4ΔGlykan (grün). A und B: Häufigkeitsverteilungen der Diffusionskoeffizienten und der mobilen Fraktionen. C und D: Anpassung einer Gaußschen Normalverteilung an die Häufigkeitsverteilungen. Die Diffusionskoeffizienten der ΔGlykan-VSG zeigen keine Abweichung zu der Diffusion der wildtyp Proteine. Hingegen werden die mobilen Fraktionen zu kleineren Werten verschoben.

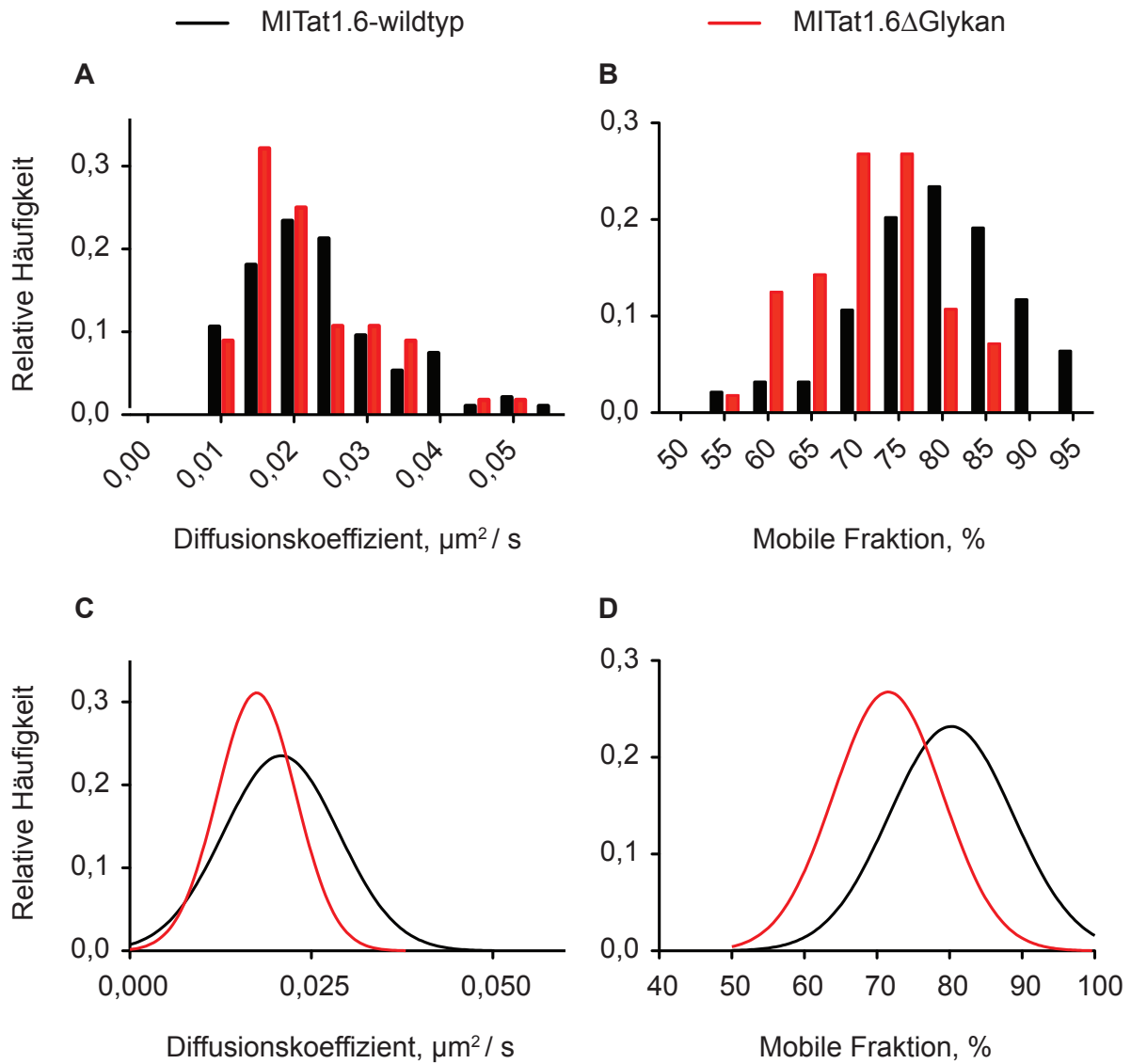


Abbildung 2.8: Analyse der Diffusion des MITat1.6 Δ Glykan-VSG. A bis D: MITat1.6-wildtyp (schwarz) und MITat1.6 Δ Glykan (rot). A und B: Häufigkeitsverteilungen der Diffusionskoeffizienten und der mobilen Fraktionen. C und D: Anpassung einer Gaußschen Normalverteilung an die Häufigkeitsverteilungen. Die Diffusionskoeffizienten der Δ Glykan-VSG zeigen keine Abweichung zu der Diffusion der wildtyp Proteine. Hingegen werden die mobilen Fraktionen zu kleineren Werten verschoben.

2.3.2 N-Glykosylierung beeinflusst den Diffusionsschwellenwert des VSG in artifiziellen Membranen

In lebenden Trypanosomen hat das Entfernen der N-Glykosylierung des VSG zu einer Verkleinerung der Mobilität der Proteine geführt. Um dieses Ergebnis genauer zu charakterisieren, wurde die Diffusion der HPLC-gereinigten und fluoreszierend markierten wildtyp (wt) und Δ Glykan-mfVSG in artifiziellen Membranen untersucht. Um eine hohe laterale Dichte der mfVSG zu erreichen, wurden diese in Proteoliposomen rekonstituiert. Die Quantifizierung der lateralen Dichte der VSG wurden in diesem Fall durch die Bestimmung des Lipid-zu-Protein Verhältnisses der mfVSG-Proteoliposomen bewerkstelligt. Somit war es möglich eine absolute Quantifizierung der lateralen Dichte in einem zell-freien Bezugssystem durchzuführen. Um die laterale Dichte der mfVSG in den artifiziellen Proben zu variieren, wurden die mfVSG-Proteoliposomen vor der Fusion auf Lipid-Einzelschichten durch protein-freie Liposomen verdünnt. Die Herstellung der artifiziellen Membranen, die Präparation der mfVSG-Proteoliposomen und deren Quantifizierung werden detailliert in Kapitel 4.2.4.1 beschrieben.

Abbildung 2.9 zeigt die Ergebnisse der FRAP-Messungen des mfVSG bei verschiedenen lateralen Dichten. Der Diffusionsschwellenwert (DSW) der wt-mfVSG wird zwischen einem lateralem Abstand von 2 und 8 nm erreicht. Der Vergleich der Ergebnisse der wt und der Δ Glykan-mfVSG zeigt, dass der DSW der unglykosylierten Proteine bei deutlich größeren Proteinabständen erreicht wird. Der DSW des Δ Glykan-mfVSG wird bereits bei einem Proteinabstand von ungefähr 12 nm erreicht. Grundsätzlich kann also das Ergebnis der Analyse der Diffusion des Δ Glykan-VSG in lebenden Trypanosomen, nämlich die Aufrechterhaltung der Proteinmobilität bei geringen Proteinabständen, in den artifiziellen Membranen bestätigt werden. Auch in den artifiziellen Membranen führt das Entfernen der N-Glykane zu einer Verringerung der Proteinmobilität bei vergleichbaren Abständen. Allerdings ist zusätzlich eine deutliche Beeinflussung des Diffusionskoeffizienten der VSG zu beobachten. Dies ist für die Diffusion der VSG in lebenden Trypanosomen nicht der Fall. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, können zusätzliche nicht-VSG die Diffusionskoeffizienten stärker beeinträchtigen als die Proteinmobilität. Dies bedeutet, dass der Effekt der fehlenden N-Glykane auf den Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen, durch die Beeinflussung der Diffusion durch zusätzliche nicht-VSG überdeckt werden könnte. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde im

folgenden die Diffusion des wt und des Δ Glykan-mfVSG in der Gegenwart verschiedener Konzentrationen von nicht-VSG Proteinen untersucht.

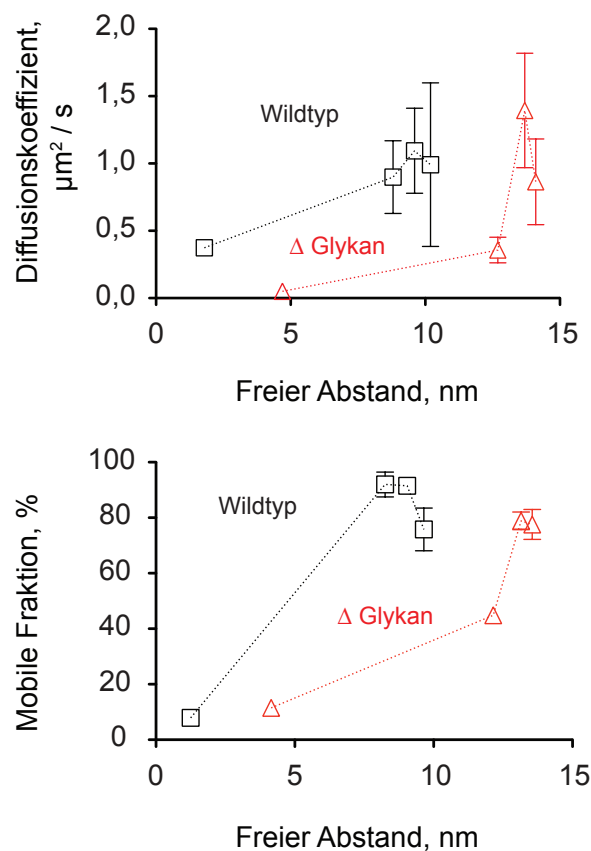


Abbildung 2.9: N-Glykosylierung beeinflusst den Diffusionsschwellenwert des VSG in artifizialen Membranen. Einfluss des lateralen Proteinabstandes auf die Diffusion des wildtyp (wt) und Δ Glykan-mfVSG in artifizialen Membranen: (\square) wt-mfVSG und (\triangle) Δ Glykan-mfVSG. Oben: Diffusionskoeffizienten in $\mu\text{m}^2/\text{s}$ gegen den mittleren freien VSG-Abstand in nm. Unten: Mobile Fraktionen in % gegen den mittleren freien VSG-Abstand in nm. Der Diffusionsschwellenwert des wt-mfVSG wird zwischen 8 und 2 nm überschritten. Im Fall der Δ Glykan-mfVSG wird die Diffusion und Mobilität bereits ab einem Abstand von ungefähr 12 nm verringert. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.3.2.1 Der Effekt der N-Glykane des VSG kann von nicht-VSG Proteinen überlagert werden

Um die Abweichungen der Ergebnisse der FRAP-Messungen der Δ Glykan-VSG in lebenden Trypanosomen und in den artifiziellen Membranen genauer zu charakterisieren, wurde die Diffusion der Δ Glykan-mfVSG in heterogenen Proteinproben untersucht. Die Vorbereitung der heterogenen Δ Glykan-mfVSG Proben wurde, wie für die heterogenen wt-mfVSG Proben durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2 und 4.2.5.3). Der Einfluss der nicht-VSG Proteine auf die Diffusion der Δ Glykan-mfVSG wurde bei DOPE-biotin Konzentrationen von 0, 2, 5 bzw 10 % (molar) untersucht.

In Abbildung 2.10 sind die Ergebnisse der Diffusionsmessungen des wt- und des Δ Glykan-mfVSG nach der Zugabe des Neutravidin dargestellt. Die Daten der wt-mfVSG sind aus der bereits beschriebenen Untersuchung (siehe Kapitel 2.2.2) übernommen. Die Diffusionskoeffizienten der wt- und der Δ Glykan-mfVSG werden durch die zusätzlichen nicht-VSG Proteine vergleichbar beeinflusst. Dies bedeutet, dass der Effekt der fehlenden N-Glykane auf den Diffusionskoeffizienten durch den Effekt der zusätzlichen nicht-VSG Proteine überdeckt werden kann. Hingegen weichen die mobilen Fraktionen der wt und Δ Glykan-mfVSG geringfügig voneinander ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzlichen Proteine den Effekt der fehlenden N-Glykane der VSG auf der Ebene des Diffusionskoeffizienten überdecken können und zugleich ein Effekt der fehlenden N-Glykane auf der Ebene der mobilen Fraktion messbar ist.

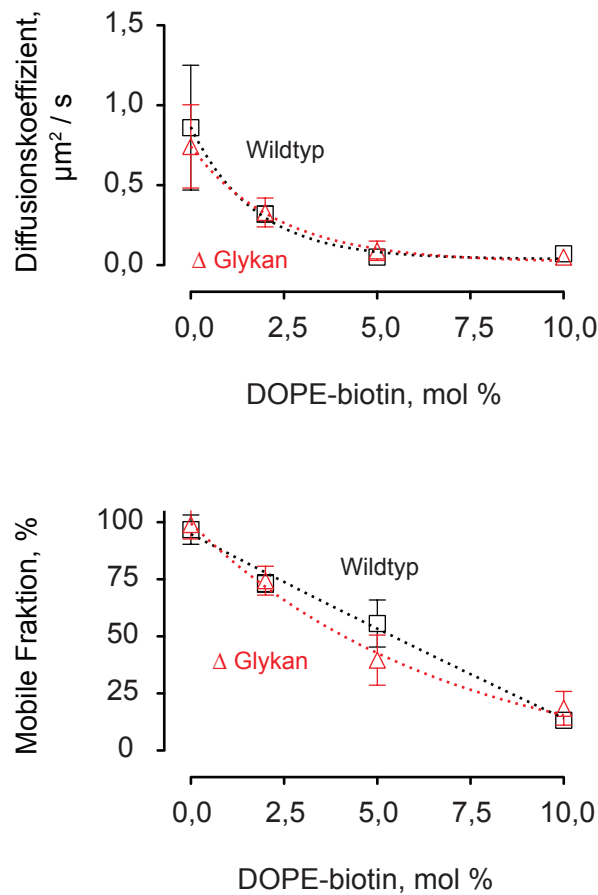


Abbildung 2.10: Der Effekt der N-Glykane des VSG kann von nicht-VSG Proteinen überlagert werden. Effekt zusätzlicher nicht-VSG auf die Diffusion des Δ Glykan-mfVSG in artifiziiellen Membranen: (\square) Wildtyp-mfVSG und (\triangle) Δ Glykan-mfVSG. Oben, Diffusionskoeffizienten in $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und unten, mobile Fraktionen des VSG in % gegen die molare Konzentration von DOPE-Biotin in %. Die Diffusionskoeffizienten zeigen keine unterschiedliche Abhängigkeit von der Konzentration der zusätzlichen nicht-VSG. Die mobilen Fraktionen weichen zwischen 2 und 7% DOPE-biotin geringfügig voneinander ab. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

2.4 Die Größe von GPI-verankerten Proteinen hat einen Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten

Nachdem die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen charakterisiert wurde, der Einfluss der lateralen Dichte des VSG und der Effekt der N-Glykosylierung beleuchtet wurden, sollte nun der Einfluss der Proteindomäne auf die Diffusion des VSG studiert werden. Hierfür wurde die Proteindomäne des VSG entweder vergrößert oder verkleinert. Eine Verkleinerung der Domäne des VSG wurde durch die proteolytische Spaltung mithilfe von Trypsin erreicht. Die Vergrößerung der Domänen wurde durch die Bindung von monovalentem Streptavidin (mSAV) an biotinylierte VSG bewerkstelligt. Der Einfluss der Größe der Proteindomäne auf die Diffusion des VSG wurde sowohl in lebenden Trypanosomen als auch in artifiziellen Membranen analysiert.

2.4.1 Die Verkleinerung der Proteindomäne führt zu einer Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten

Das VSG kann mithilfe der Protease Trypsin in der Gelenkregion, der Bindestelle zwischen der N- und der C-term Domäne, gespalten werden. Durch die Spaltung des VSG entsteht ein kleines Fragment (ca 15 kDa), welches den GPI-Anker trägt und ein größeres Fragment (ca 40 kDa), welches nicht länger membrangebunden vorliegt [27–29].

Analyse in lebenden Trypanosomen. Um den Einfluss einer Verkleinerung des VSG auf dessen Diffusion in lebenden Trypanosomen zu untersuchen, wurden die BSF-Zellen fluoreszierend markiert, ein Trypsin-Verdau des VSG-Mantels durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.2.6), die Zellen in Gelatine immobilisiert und die Diffusion des VSG durch FRAP-Messungen untersucht. Die Analyse der Diffusionsmessungen zeigt einen deutlichen Anstieg der Diffusionskoeffizienten des VSG der trypsinbehandelten BSF-Trypanosomen. Der Diffusionskoeffizient des VSG wird im Vergleich zu den unbehandelten BSF-Trypanosomen um einen Faktor von zwei vergrößert (siehe Tabelle 2.6). Interessanterweise bleibt die mobile Fraktionen der VSG unverändert. Dies bedeutet, dass die Verkleinerung der VSG-Domäne auf lebenden Trypanosomen zu einer Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten bei gleichzeitigem Erhalt der mobilen Fraktionen führt.

Tabelle 2.6: Die Verkleinerung der Proteindomäne des VSG führt zu einer Vergrößerung der Diffusionskoeffizienten auf lebenden Trypanosomen. Analyse der FRAP-Messungen von trypsinbehandelten Trypanosomen: Diffusionskoeffizienten (D) und mobile Fraktionen (MF) des VSG, und Anzahl der untersuchten BSF-Trypanosomen. p-Werte des t-Test für unverbundene Stichproben. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
Unbehandelt	$0,024 \pm 0,010$	79 ± 8	110
Trypsinbehandelt	$0,043 \pm 0,013$	78 ± 6	18
p-Wert	$\leq 0,0001$	$\gg 0,0001$	

Analyse in artifiziellen Membranen. Nachdem der Einfluss der Verkleinerung der Proteingröße auf lebendigen BSF-Trypanosomen analysiert wurde, sollte dies ebenso in artifiziellen Membranen geschehen. Dafür wurden fluoreszierend markierte mfVSG, nach der Herstellung der artifiziellen Membranen durch die Fusion von SUVs auf hydrophilen Objektträgern, dem Pufferüberstand der Membran zugegeben. Nach der Einlagerung der mfVSG in die Membran wurden diese gründlich gewaschen und die Diffusion des mfVSG analysiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min, wurde der Puffer der Probenkammer gegen trypsinhaltigen Puffer ausgetauscht (siehe auch Kapitel 4.2.5.4). Die Diffusion des mfVSG wurde dann zeitlich aufgelöst untersucht.

In Abbildung 2.11 ist die Änderung der Diffusion des mfVSG im Verlauf des Experimentes dargestellt. Die mobile Fraktion der mfVSG ist für den gesamten Zeitraum des Experimentes unverändert $\geq 90\%$. Hingegen wird der Diffusionskoeffizient direkt nach der Zugabe des Trypsins deutlich vergrößert. Interessanterweise wird auch hier der Diffusionskoeffizient um einen Faktor von ungefähr 2 vergrößert. Somit zeigt sich in den artifiziellen Membranen die gleiche Auswirkung der Verkleinerung der Proteindomäne des mfVSG, nämlich eine Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten bei gleichbleibender mobiler Fraktion.

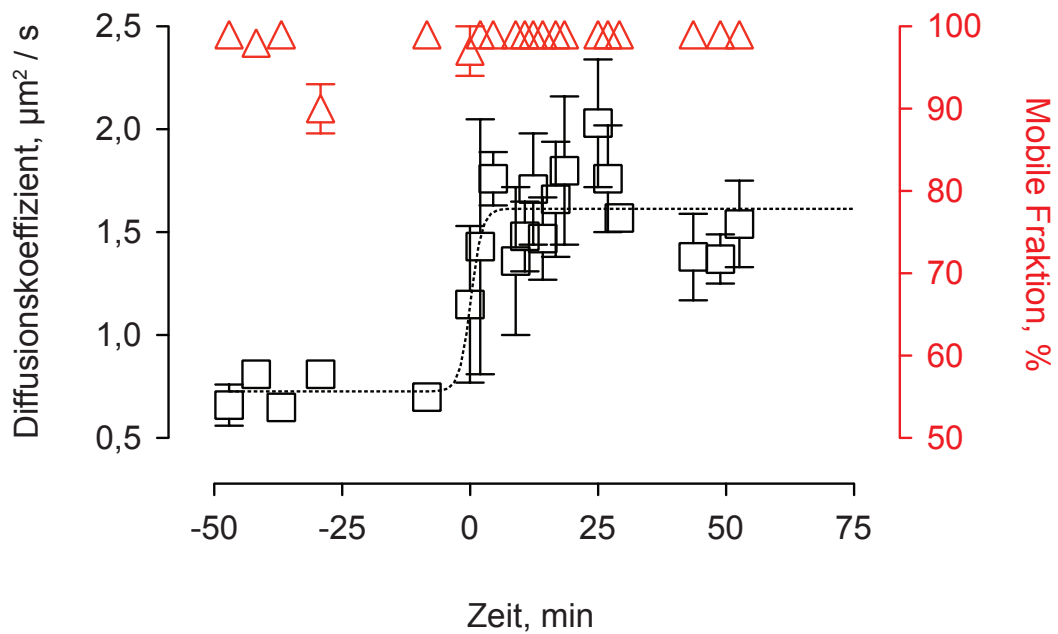


Abbildung 2.11: Die Verkleinerung der Proteindomäne führt zu einer Vergrößerung der Diffusionskoeffizienten des mfVSG in artifiziellen Membranen. Zeitlich aufgelöste FRAP-Messreihe: (□) Diffusionskoeffizienten in $\mu\text{m}^2 / \text{s}$; (△) mobile Fraktion in %. $t = 0$ min entspricht dem Moment der Trypsinzugabe. Der Diffusionskoeffizient des mfVSG wird direkt nach der Zugabe des Trypsin vergrößert. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Diffusionskoeffizienten und mobilen Fraktionen von drei getrennten, aber gleichzeitig untersuchten FRAP-Bereichen.

2.4.2 Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten

Die nachfolgenden Ergebnisse sind zu großem Teil in der Masterarbeit von Marius Glogger in unserem Labor entstanden [86]. Die Vergrößerung der Proteindomäne wurde durch die Bindung von Streptavidin an biotinylierte mfVSG bewerkstelligt. Um Quervernetzungen der VSG zu vermeiden, wurde monovalentes Streptavidin (mSAV) verwendet. Da dies kommerziell nicht erhältlich ist, wurde es rekombinant nach dem Protokoll von Howarth *et al.* hergestellt [87].

Analyse in lebenden Trypanosomen. Um den Einfluss der Vergrößerung der Proteindomäne auf die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen zu untersuchen, wurde der VSG-Mantel parallel mit fluoreszierenden Farbstoffen und Biotingruppen markiert. Die kovalente Bindung des Sulfo-NHS Biotin an das VSG erfolgte, wie die Bindung der fluoreszierenden Farbstoffe, basierend auf der Reaktion des Succinimidyl-Esters mit den primären Aminen der VSG. Im Anschluss an die Markierung des VSG-Mantels wurden die BSF-Trypanosomen in der Gegenwart des mSAV inkubiert, in Gelatine immobilisiert und die Diffusion der VSG mittels FRAP-Messungen untersucht. In Tabelle 2.7 sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen des VSG und der mSAV-VSG Komplexe in lebenden Trypanosomen aufgeführt. Die Vergrößerung der Domäne des VSG durch die Bindung des mSAV führt zu einer Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten um einen Faktor von 3. Die mobile Fraktion des VSG wird um ungefähr 5 % reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Diffusion des VSG durch die Vergrößerung der Proteindomäne reduziert wird. Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurde der Einfluss der Bindung des mSAV auf die Diffusion des mfVSG in artifiziiellen Membranen untersucht.

Tabelle 2.7: Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung der Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen. Analyse der FRAP-Messungen in Gegenwart (+) und ohne (-) mSAV: Diffusionskoeffizienten und mobile Fraktionen des VSG, und Anzahl der untersuchten BSF-Trypanosomen. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Ergebnisse der Masterarbeit von Marius Glogger [86].

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
- mSAV	$0,027 \pm 0,008$	80 ± 5	20
+ mSAV	$0,010 \pm 0,003$	75 ± 12	17

Analyse in artifiziellen Membranen. Nachdem der Effekt der Vergrößerung der Domäne auf die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen untersucht wurde, sollte dies ebenso für das mfVSG in artifiziellen Membranen geschehen. Hierzu wurden die mfVSG während der Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen mit Biotingruppen versehen (siehe oben). Nach der Herstellung der Membranen durch die Fusion von SUVs auf hydrophilen Objektträgern wurde das mfVSG dem Pufferüberstand der Membranen zugegeben und somit in die Membranen integriert. Die Änderung der Diffusion des mfVSG wurde dann vor und nach der Zugabe des mSAV zeitlich aufgelöst analysiert. Um einen unspezifischen Effekt des mSAV auf die Diffusion des mfVSG auszuschließen, wurde die Probe nach 60 min gewaschen. In Abbildung 2.12 sind die Ergebnisse der Analyse der FRAP-Messungen abgebildet. Durch die Bindung des mSAV an das mfVSG wird der Diffusionskoeffizient des mfVSG um einen Faktor von 2 verkleinert. Die mobile Fraktion des mfVSG wird im Verlauf des Experimentes nur um maximal 10 % reduziert. Hiermit kann der Effekt der Vergrößerung der Proteindomäne, der in den lebenden Trypanosomen beobachtet wurde, in den artifiziellen Membranen reproduziert werden.

Um die vorangegangenen Ergebnisse kurz zusammenzufassen, kann also festgehalten werden, dass eine Verkleinerung der Proteindomäne zu einer Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten führt. Wird die Proteindomäne hingegen vergrößert, so kann eine Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten beobachtet werden. Die potentiellen Gründe für diesen Zusammenhang sollen in dem Abschnitt 3.4 der nachfolgenden Diskussion genauer beleuchtet werden.

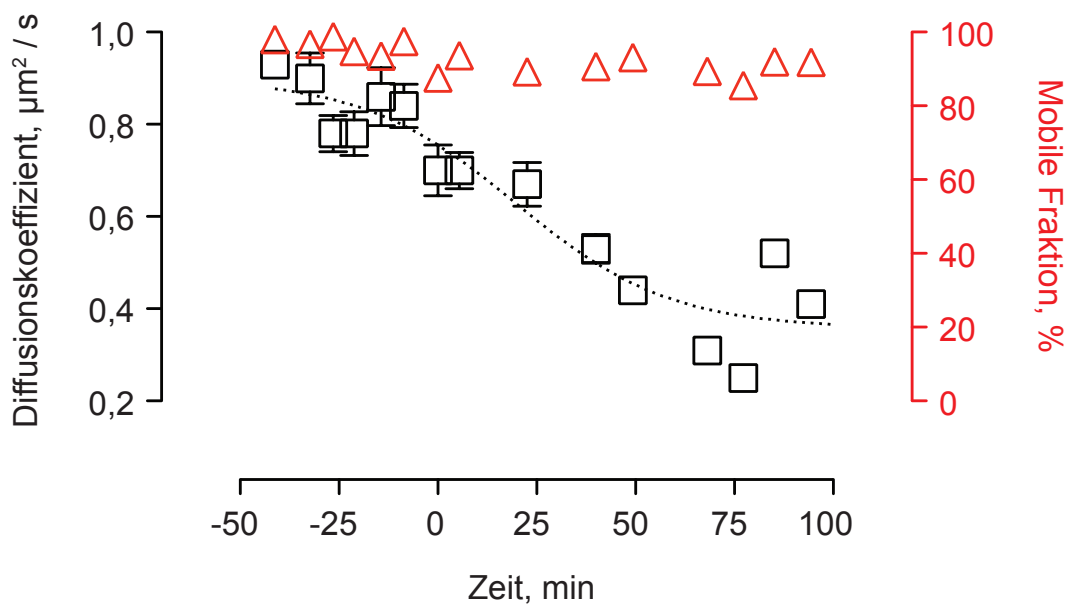


Abbildung 2.12: Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung der Diffusionskoeffizienten des VSG in artifizialen Membranen. Zeitlich aufgelöste FRAP-Messreihe: (\square) Diffusionskoeffizienten in $\mu\text{m}^2 / \text{s}$ und (\triangle) mobile Fraktion in %. $t = 0$ min entspricht dem Moment der Zugabe des monovalenten Streptavidins. Nach ca 60 min wurde die Probe gewaschen. Nach der Zugabe des mSAV wird der Diffusionskoeffizient der mfVSG um einen Faktor von ungefähr 2 verkleinert. Die mobile Fraktion der Proteine bleibt bei $\geq 90\%$. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei getrennten, aber gleichzeitig untersuchten Bereichen. Ergebnisse der Masterarbeit von Marius Glogger [86].

3 Diskussion

3.1 Diffusion des VSG *in vivo* und in artifiziellen Membranen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Diffusion GPI-verankerter Proteine untersucht werden. Hierzu wurden der VSG-Mantel der Trypanosomen und Membranform-VSG (mfVSG) in artifiziellen Membranen, als biologisches bzw. artifizielles Modellsystem verwendet. Zu Beginn der Arbeit wurde die Diffusion verschiedener VSG in diesen beiden Modellsystemen näher charakterisiert.

Mit Hilfe der zu Beginn der vorliegenden Arbeit etablierten Immobilisierungsprozedur wurde die Diffusion von verschiedenen VSG in lebenden Trypanosomen untersucht. Somit war es möglich nachzuweisen, dass die Diffusion der fünf verschiedenen analysierten VSG in lebenden Trypanosomen, trotz struktureller und biochemischer Unterschiede sehr ähnlich ist. So konnten Diffusionskoeffizienten in einem Bereich zwischen $0,02-0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und mobile Fraktionen zwischen 75-80% bestimmt werden. Für die Diffusion des VSG der BSF-Trypanosomen war diese Tatsache eine weitläufig akzeptierte Eigenschaft wurde aber bislang nicht im Detail nachgewiesen.

Bülow *et al.* studierten die Diffusion des MITat1.2-VSG in Trypanosomen [72]. Die Autoren konnten ebenso hohe mobile Fraktionen (ca 80%) und kleine Diffusionskoeffizienten (ca $0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$) ermitteln. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Diffusionskoeffizienten weichen um einen Faktor von 2-3 von den Werten der vorhergehenden Arbeit ab. Die Abweichung können anhand der folgenden grundlegenden Unterschiede der methodischen Ansätze erklärt werden.

In der Arbeit von Bülow *et al.* wurden die BSF-Trypanosomen mit Hilfe von Pentalenolacton und der Einbettung in Agarose immobilisiert. Pentalenolacton ist ein irreversibler Inhibitor des glykolytischen Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Inhibierung der GAPDH führt zu einer Stoffwechselfanalyse. Die Zellen sind dann nicht mehr in der Lage den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) zu regenerieren. Die Auswirkungen der Stoffwechselfanalyse auf grundlegende zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel dem Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose, sind nicht geklärt. So wäre es möglich, dass die Stoffwechselfanalyse den VSG-Transport beeinflusst. Dies könnte zu einer Änderung des Verhältnisses zwischen Endo- und Exozytose führen. Diese Änderung wiederum, könnte zu einer Erhöhung der lateralen

Dichte des VSG-Mantels führen. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, ist die Diffusion des VSG generell stark von der lateralen Dichte der Proteine abhängig. Daher würde die Erhöhung der Dichte des VSG-Mantels durch die vorangegangene Hypothese zu einer Reduzierung der Diffusion des VSG führen. Der detaillierte Zusammenhang zwischen der lateralen Dichte des VSG in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen wird in Kapitel 3.2 der Diskussion beschrieben.

Weiterhin haben Bülow *et al.* die Diffusion des VSG mit Hilfe von fluoreszierend markierten Antikörper Fragmenten (F_{ab}) analysiert. Durch die Bindung der F_{ab} Fragmente an die VSG werden die Proteine vergrößert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung von monovalentem Streptavidin an biotinylierte VSG den Diffusionskoeffizienten sowohl *in vivo* als auch in artifiziellen Membranen signifikant reduziert [86]. Monovalentes Streptavidin (mSAV) hat ein Molekulargewicht (MG) von 54 kDa. Dieses ist vergleichbar mit dem MG der F_{ab} Fragmente (ca 50 kDa). Daher kann der Unterschied der Diffusionskoeffizienten, zwischen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Bülow *et al.*, am besten durch die Änderung der Größe des diffundierenden Teilchens erklärt werden. In Kapitel 3.4 wird der Einfluss der Proteingröße auf die Diffusion der VSG im Detail diskutiert.

Neben den Diffusionsmessungen *in vivo* haben Bülow *et al.* die Diffusion der VSG in einem heterologen System analysiert. Hierzu wurde affinitätsgereinigtes mfVSG in die Plasmamembran von BHK-Zellen integriert. Die Diffusion wurde im Anschluss mittels fluoreszierend markierten F_{ab} Fragmenten bei 4 °C verfolgt. Die Autoren berichten, dass die mfVSG in dem heterologen System einen Diffusionskoeffizienten von 0,007 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und eine mobile Fraktion von 56 % aufweisen. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass der vergleichsweise kleine Diffusionskoeffizient charakteristisch für die Diffusion des VSG sei.

In Kapitel 2.1.3 wurde die Analyse der Diffusion des HPLC gereinigten und fluoreszierend markiertem mfVSG in artifiziellen Membranen beschrieben. Es konnten Diffusionskoeffizienten zwischen 0,7 und 1,0 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und mobile Fraktionen von $\geq 95\%$ bestimmt werden. Diese Werte stehen in guter Relation zu Analysen der Diffusion von GPI-verankerten Proteinen in artifiziellen Membranen (z.B. Prionen Proteine, [83]) und zeigen, dass die von Bülow *et al.* berichteten kleinen Diffusionskoeffizienten nicht typisch für die Diffusion des VSG sind.

Der Vergleich der Diffusionsmessungen des VSG *in vivo* und in artifiziellen Membranen zeigt, dass VSG in artifiziellen Membranen mit einer ungefähr 50-fach höheren Diffusionsrate verteilt werden. Solche Diskrepanzen werden häufig berichtet, wenn die Diffusion von Proteinen in biologischen und artifiziellen Modellsystemen verglichen wird [88, 89]. Für die Unterschiede werden Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, Hindernissen in der Plasmamembran und, für den Fall von Transmembran-Proteinen (TM-Proteine), die Interaktion der intrazellulären Domänen mit zytoplasmatischen Bestandteilen verantwortlich gemacht [90, 91]. In unserem Fall können direkte Interaktionen der VSG mit intrazellulärer Strukturen und der extrazellulären Matrix ausgeschlossen werden. Direkte Interaktionen mit intrazellulären Komponenten und den VSG sind ausgeschlossen, da der GPI-Anker des VSG nur in die äußere Schicht der Membran eingelagert wird. Interaktionen des VSG mit einer extrazellulären Matrix sind ebenso ausgeschlossen, da solche Strukturen bei Trypanosomen nicht vorkommen. Allerdings ist die Interaktion zwischen TM-Proteinen der Plasmamembran und intrazellulären Strukturen der Parasiten durchaus plausibel. Eine derartige Interaktion könnte dann indirekt einen Einfluss auf die Diffusion der VSG ausüben. Des Weiteren können direkte laterale Interaktionen zwischen peripheren Proteinen, wie zum Beispiel den invarianten Oberflächenglykoproteinen (ISGs), und den VSG eine Rolle spielen.

Die Erhöhung der VSG-Mobilität nach dem osmotischen Schwellen der BSF-Trypanosomen unterstützt die Hypothese der indirekten Interaktion. Die Erhöhung der Mobilität könnte durch die Reduzierung der Interaktionen zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Strukturen, wie den subpellikulären Mikrotubuli-Filamenten ausgelöst werden. Effekte, welche nach der Entkopplung der Plasmamembran von dem darunter liegenden Zytoskelett auftreten, sind ein bereits in den 1980iger Jahren beschriebenes Phänomen der Membranproteine roter Blutkörperchen [60]. In roten Blutkörperchen wird hierfür die Interaktion einer Reihe von Proteinen mit dem Protein Spektrin verantwortlich gemacht. Spektrin interagiert direkt mit dem Aktin des Zytoskeletts und ist somit lokal mit diesem assoziiert. In den roten Blutkörperchen stehen die TM-Proteine Ankyrin, Glykoprotein-C und das *Band-3* Protein mit Spektrinen in Verbindung und verknüpfen so die Plasmamembran mit dem Zytoskelett. Das Schwellen von roten Blutkörperchen führt zu der Auflösung dieser Interaktion und somit zu einer Erhöhung der Mobilität der Membranproteine. In Trypanosomen sind spektrinähnliche-Proteine beschrieben, von welchen eine vergleichbare Funktion erwartet

wird [92]. In diesem Fall stehen die spektrinähnlichen-Proteine mit den subpellikulären Mikrotubuli in Verbindung [93]. Somit wäre es gut vorstellbar, dass das osmotische Schwellen auch in Trypanosomen zu einer Entkoppelung der Plasmamembran von dem Zytoskelett führt und somit die Interaktion von TM-Proteinen mit diesem auflöst. Die Diffusionsmessungen an Trypanosomen in welchen das Gen der GPI-spezifischen Phospholipase C (GPI-PLC) deletiert wurde, zeigen dass die Erhöhung der Mobilität der VSG nicht in Verbindung mit einem Ausdünnen des VSG-Mantel stehen.

Um die Diskrepanz der Diffusionsmessungen in lebenden Trypanosomen und in artifiziellen Membranen genauer zu untersuchen, sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Einfluss die laterale Dichte generell und auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen auf die Diffusion des VSG ausübt.

3.2 Einfluss der lateralen Dichte auf die Diffusion des VSG

Der Schutzmechanismus des VSG-Mantels setzt zwei grundlegende Anforderungen voraus. Der Oberflächenmantel muss eine hohe laterale Dichte der VSG aufweisen und zugleich muss die Mobilität der Proteine gewährleistet sein. Die hohe laterale Dichte des VSG ist notwendig, um die invarianten Oberflächenbestandteile vor der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes abzugrenzen. Die hohe Mobilität der VSG muss dabei erhalten bleiben, um eine homogene Verteilung des VSG auf der Zelloberfläche zu gewährleisten. Eine hohe laterale Proteindichte und der Erhalt einer hohen Proteinmobilität stehen in direktem widersprüchlichen Zusammenhang. Es scheint logisch, dass Proteinen ihre uneingeschränkte Mobilität verlieren, wenn deren Konzentration über einen bestimmten Wert erhöht wird. In Extremfällen konnte für lösliche Proteine sogar eine Ausbildung von kristallinen Strukturen beschrieben werden [94]. Würde allerdings die laterale Dichte der VSG zu weit reduziert werden, so würde das Immunsystem in der Lage sein die ISG, oder andere Komponenten der BSF Zelloberfläche, zu detektieren. Dies würde zu einer sofortigen Erkennung und Lyse der Parasiten durch das Komplementsystem des Wirtes führen. Dieser Zusammenhang zeigt, dass die laterale Dichte der VSG in Trypanosomen eine entscheidende Rolle für den Organismus spielt.

Der Effekt der lateralen Dichte auf die Diffusion des VSG wurde in artifiziellen Membranen untersucht. Hier wurde die Proteinkonzentration in Relation zu der Menge des VSG auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen eingestellt. Auf diese Weise war es möglich einen Einblick zu bekommen, ob die Diffusion des VSG auf der Zelloberfläche von dessen lateralen Dichte beeinflusst wird. Die Diffusion der mfVSG war bis zu einer 1,3-fachen VSG-Konzentration (zellbezogen) unbeeinflusst. Wurde die Konzentration weiter erhöht, so wurde der Diffusionsschwellenwert (DSW) überschritten und die Diffusion und Mobilität des VSG drastisch reduziert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Diffusion der GPI-verankerten VSG eng verbunden mit deren lateralen Dichte ist. Außerdem wird deutlich, dass die Diffusion des VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen nicht von der lateralen Dichte des VSG selbst beeinflusst wird. Allerdings ist die VSG-Konzentration sehr dicht an dem DSW. Eine Erhöhung der

Konzentration des VSG um ca 40 - 60 % würde also wahrscheinlich zu einer signifikanten Reduzierung der Proteinmobilität führen. Tatsächlich zeigt die Überexpression des VSG in Trypanosomen solch einen Effekt. In BSF-Trypanosomen, welche eine kurzweilige Überexpression des VSG zulassen, kann eine Verringerung des Diffusionskoeffizienten um ungefähr 20 % festgestellt werden.

Tabelle 3.1: Die Überexpression des VSG reduziert dessen Diffusionskoeffizienten. Die induzierbare Überexpression von VSG führt zu einer Reduzierung des Diffusionskoeffizienten (D) um ca 20 %. Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. p-Werte des t-Test für unverbundene Stichproben beziehen sich auf den Vergleich der Messungen bei einer 1,0 bzw 1,4-fachen Überexpression. Die VSG-Überexpressionszelllinie wurde während der Promotion von Christopher Batram in unserem Labor hergestellt und im Detail charakterisiert.

Relative VSG-Überexpression	D , $\mu\text{m}^2 / \text{s}$	MF, %	Anzahl
1,0	$0,020 \pm 0,005$	78 ± 11	18
1,2	$0,019 \pm 0,010$	79 ± 11	28
1,4	$0,016 \pm 0,013$	77 ± 11	29
p-Wert	0,005		

Im Vergleich der Zusammensetzung der artifiziellen Proben und der BSF-Zelloberfläche sollten folgende Faktoren berücksichtigt werden. In den artifiziellen Membranen werden ausschließlich Interaktionen der VSG untereinander und mit der Membran selbst betrachtet. Auf der Zelloberfläche der Parasiten hingegen sind weitere Komponenten vorhanden. So wäre vorstellbar, dass direkte Interaktionen zwischen peripheren Proteinen (z.B. ISG) oder TM-Proteinen mit den VSG die Proteinmobilität beeinflussen. Um den Effekt der zusätzlichen Proteine auf die Diffusion des VSG zu analysieren, wurde die Diffusion des VSG in den heterogenen (mfVSG und Neutravidin) Proteinproben in artifiziellen Membranen untersucht. Mit diesen Proben konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen nicht-VSG Proteine einen stärkeren Effekt auf den Diffusionskoeffizienten als auf die Proteinmobilität ausüben können. Hiermit kann die Diskrepanz der Diffusionsmessungen des VSG in Trypanosomen und in den artifiziellen Membranen, zumindest teilweise, erklärt werden. Die zusätzlichen Membranproteine in der Plasmamembran können den Diffusionskoeffizienten der VSG durch direkte Interaktionen reduzieren ohne dabei einen schweren Effekt auf die Proteinmobilität auszuüben. Als Schlussfolgerung kann also festgehalten werden, dass die kleinen Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen nicht durch die laterale Dichte der VSG ausgelöst werden,

sondern vielmehr durch die nicht-VSG Proteine der Zelloberfläche zustande kommen. Dennoch ist die Konzentration des VSG auf der Zelloberfläche erstaunlich dicht an dem DSW.

3.3 Einfluss der N-Glykosylierung des VSG auf die Diffusion

Die N-Glykosylierung der VSG scheint ein elementarer Bestandteil der Proteine zu sein, da alle VSG der BSF-Trypanosomen zumindest eine dieser Modifikationen tragen [95]. Allerdings ist für den Fall der Typ-1 VSG (MITat1.4 oder MITat1.6) keine N-Glykosylierung notwendig, um ein Überleben der Parasiten *in vitro* zu gewährleisten (Nicola Jones *et al.*). Die Effekte der Protein N-Glykosylierung werden in Verbindung mit einer Vielzahl verschiedener Funktionen diskutiert [96–98]. Høiberg-Nielsen *et al.* haben für lösliche Proteine bei hoher Konzentration postuliert, dass N-Glykane repulsive elektrostatische Kräfte aufrechterhalten können. Jene repulsiven Kräfte sollen Prozesse wie Aggregation oder Präzipitation der Proteine verhindern [66]. Bislang wurde dieser oder ein vergleichbarer Effekt für Membranproteine nicht beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der N-Glykane auf die laterale Diffusion des VSG untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die N-Glykane einen starken Einfluss auf die Diffusion der GPI-verankerten Proteine ausüben können. So zeigten die Δ Glykan-mfVSG in den artifiziellen Membranen eine deutliche Verschiebung des Diffusionsschwellenwertes (DSW) zu größeren Proteinabständen. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die N-Glykane der VSG die Mobilität bei hohen lateralen Dichten (um 5-10 nm) begünstigen und unterstützt somit das Postulat von Høiberg-Nielsen. Hingegen zeigt die Analyse der Diffusion des Δ Glykan-VSG in Trypanosomen keine signifikante Änderung der Diffusionskoeffizienten. Allerdings ist in beiden Zelllinien (MITat1.4 Δ Glykan und MITat1.6 Δ Glykan) eine signifikante Reduzierung der mobilen Fraktionen von bis zu 10 % zu erkennen (siehe Abbildung 2.7 und 2.8). Die Reduzierung der mobilen Fraktionen des VSG in Trypanosomen unterstützt ebenso die vorangegangene Schlussfolgerung, dass N-Glykane die Mobilität der VSG bei niedrigen lateralen Abständen begünstigt.

In den artifiziellen Membranen ist ein deutlicher Effekt auf den Diffusionskoeffizienten der VSG zu erkennen, in den Trypanosomen jedoch nicht. Diese Diskrepanz lässt durch den bereits beschriebenen Zusammenhang erklären. Der Diffusionskoeffizient des VSG ist in lebenden Trypanosomen dominant durch die nicht-VSG Proteine beeinflusst. Dadurch wird der Effekt der fehlenden Glykane auf den Diffusionskoeffizienten, welcher in den

artifiziellen Membranen sichtbar ist in den Trypanosomen überlagert und ist somit nicht detektierbar. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Diffusion des Δ Glykan-VSG zusätzlich in heterogenen (Neutravidin und mfVSG) artifiziellen Membranen untersucht. Interessanterweise ist für den Verlauf der Diffusionskoeffizienten der wildtyp- und Δ Glykan-mfVSG, in Abhängigkeit der Konzentration der nicht-VSG Proteine kein deutlicher Unterschied feststellbar. Der Verlauf der mobilen Fraktionen zeigt, dass diese im Fall der Δ Glykan-mfVSG in einem definiertem Bereich zusätzlicher Proteine, um 10 - 15 % reduziert werden. Dies bedeutet, dass der Effekt der fehlenden Glykane auf den Diffusionskoeffizienten durch den Einfluss der nicht-VSG Proteine überdeckt werden kann. Die Differenz der mobilen Fraktionen deutet jedoch darauf hin, dass bei bestimmten Verhältnissen von VSG zu nicht-VSG Proteinen das Fehlen der Glykane einen messbaren Effekt auf die Mobilität der Proteine ausübt.

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich mit Typ-1 VSG durchgeführt. Diese Proteine besitzen lediglich eine N-Glykosylierung. Im Vergleich hierzu sind beispielsweise Typ-3 VSG mit bis zu drei N-Glykanen modifiziert. Untersuchungen von Dr. Nicola Jones *et al.* an VSG des Typ-2 (MITat1.1) und Typ-3 (MITat1.5) zeigen deutlich, dass in diesem Fall die komplette Entfernung der N-Glykane nicht ohne eine Beeinflussung der Vitalität der Parasiten möglich ist. Grundsätzlich kann aber aus den präsentierten Ergebnissen abgeleitet werden, dass die N-Glykosylierung des VSG einen positiven Effekt auf die mobile Fraktion der Proteine ausübt, wenn diese in großer Nähe sind. Somit stellt die N-Glykosylierung ein Beispiel der Proteinchemie dar, welches einen Einfluss auf den Diffusionsschwellenwert ausübt.

3.4 Einfluss der Proteingröße auf die Diffusion GPI-verankerter Proteine

Zhang *et al.* haben bereits 1991 in einer weitreichenden Untersuchung die Diffusion von TM- und GPI verankerten Proteinen studiert [70]. Die Autoren haben aus TM- und GPI-verankerten Proteinen verschiedene chimäre Proteine hergestellt, um den Einfluss der Membranverankerung und der extrazellulären Domäne auf die Diffusion der Proteine zu analysieren. Die Experimente zeigten, dass die Diffusion GPI-verankerter Proteine auch abhängig von der extrazellulären Domänen ist und durch die Art der Membranverankerung nur geringfügig beeinflusst wird. Die Autoren schlugen vor, dass der Strömungswiderstand welcher auf das gesamte GPI-verankerte Protein (f_{Total}) wirkt, in zwei Strömungswiderstände aufgeteilt werden kann. f_{Total} würde sich dann, aus dem Strömungswiderstand der extrazellulären Domäne (f_{Extra}) und dem Strömungswiderstand des Lipid-Ankers ($f_{Lipid\ Anker}$) zusammensetzen:

$$f_{Total} = f_{Extra} + f_{Lipid\ Anker}. \quad (3.1)$$

Auf diese Weise konnten die Autoren zeigen, dass verschiedene extrazelluläre Domänen einen bis zu 40-fachen Unterschied des f_{Extra} erzeugen. Die Berechnung der Strömungswiderstände beruhen auf den experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten und der Annahme, dass ein Lipid Anker ohne extrazelluläre Bestandteile vergleichbar mit einem einzelnen Lipid in der Membran diffundiert. Die Diffusionsmessungen der verschiedenen Chimären-Proteine wurden in einem heterologen Expressionssystem durchgeführt, daher war es den Autoren nicht möglich die Beeinflussung der Diffusion durch Plasmamembran assoziierte Faktoren und der extrazellulären Matrix auszuschließen.

Um den Einfluss der Größe der extrazellulären Proteindomäne frei von diesen Faktoren zu analysieren, wurde die Diffusion der VSG in Abhängigkeit der Größe der extrazellulären Domäne in artifiziellen Membranen studiert. Die Größe der extrazellulären Domäne wurde durch zwei Strategien variiert.

(I) Die Verkleinerung der Proteindomäne wurde durch die Proteolyse der VSG mittels Trypsin erreicht.

(II) Um die extrazelluläre Proteindomäne zu vergrößern, wurden die mfVSG gleichzeitig mit fluoreszierenden Farbstoffen und Biotin markiert. Anschließend wurde die Proteindomäne durch die Bindung des monovalenten Streptavidin (mSAV) vergrößert.

Mit Hilfe dieser beiden Strategien war es möglich die Größe der Proteindomäne des mfVSG zu variieren und gleichzeitig den Einfluss auf die Diffusion zu analysieren. In Kapitel 2.4.1 wurden die Diffusionsmessungen während der Proteolyse des mfVSG beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Zugabe des Trypsin der Diffusionskoeffizient der mfVSG signifikant erhöht wird. Die Anpassung einer sigmoidalen Funktion an die Diffusionskoeffizienten ergibt ein $D_{Vor\ Proteolyse}$ von $0,7\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ und ein $D_{Nach\ Proteolyse}$ von $1,6\ \mu\text{m}^2/\text{s}$. Der Diffusionskoeffizient der mfVSG wird durch die Verkleinerung der Proteindomänen, um einen Faktor von ca 2 erhöht. Ein Diffusionskoeffizient von $1,6\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ entspricht in Näherung dem Koeffizienten von einzelnen Lipidmolekülen in artifiziellen Membranen ($\approx 2\ \mu\text{m}^2/\text{s}$, [99]).

Die Zugabe von mSAV zu biotinylierten mfVSG in den artifiziellen Membranen führt zu einer deutlichen Reduzierung der Diffusionskoeffizienten (siehe Abbildung 2.12). Die Diffusionskoeffizienten des mfVSG werden von 0,8 auf circa $0,4\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ reduziert. Interessanterweise entspricht dies ebenso einer Änderung der Diffusionskoeffizienten um einen Faktor von 2. Ausgehend von einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 zu 1, wird die mfVSG Domäne durch das binden des mSAV um circa 50 kDa vergrößert. Diese Vergrößerung der Proteindomäne entspricht in etwa der Verkleinerung des mfVSG durch die Trypsin-Proteolyse. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Diffusion der GPI-verankerten mfVSG in direktem Zusammenhang mit der Größe der Proteindomäne steht. Wird die Größe der Proteine unter einen Grenzwert reduziert, so wird der Diffusionskoeffizient nahezu vollständig durch die Interaktionen des Lipid Ankers mit der Membran bestimmt.

Mit Hilfe der Gleichung 3.1 und der Annahme, dass der GPI-Anker einen Lipid ähnlichen Diffusionskoeffizienten besitzt ($\approx 2 \mu\text{m}^2 / \text{s}$), können für die ermittelten Diffusionskoeffizienten die Anteile der verschiedenen Domänen an dem Gesamt-Strömungswiderstand bestimmt werden. Für die Berechnungen wird eine Temperatur von 20°C bzw 293K verwendet. Im folgenden Beispiel wird exemplarisch der Strömungswiderstand für den Fall der Diffusion des mfVSG bestimmt.

Aus der Einstein Relation,

$$D = \frac{k * T}{f_{Total}} \quad (3.2)$$

ergibt sich

$$f_{Total} = \frac{k * T}{D} \quad (3.3)$$

mit der Boltzmann Konstante ($k = 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J / K}$), der absoluten Temperatur (T) in Kelvin, dem Diffusionskoeffizienten (D) in m^2 / s und dem Strömungswiderstand (f) in kg / s .

Für $D_{mfVSG} = 0,9 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ in Gleichung 3.3 ergibt sich:

$$f_{VSG_{Total}} = \frac{1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J / K} * 293 \text{ K}}{0,9 * 10^{-12} \text{ m}^2 / \text{s}} \quad (3.4)$$

$$f_{VSG_{Total}} = 4,496 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s}.$$

Analog hierzu ergibt sich für einen theoretischen Lipidanker mit einem $D_{Lipid} = 2 \mu\text{m}^2 / \text{s}$,

$$f_{Lipid\ Anker} = \frac{1,381^{-23} J / K * 293 K}{2,0 * 10^{-12} \text{ m}^2 / \text{s}} \quad (3.5)$$

$$f_{Lipid\ Anker} = 2,023 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s}.$$

Aus

$$f_{VSG_{Total}} = f_{Extra} + f_{Lipid\ Anker} \quad (3.6)$$

ergibt sich mit dem Strömungswiderstand aus 3.5,

$$f_{Extra} = f_{VSG_{Total}} - f_{Lipid\ Anker} \quad (3.7)$$

$$f_{Extra} = 4,469 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s} - 2,023 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s}$$

$$f_{Extra} = 2,473 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s}.$$

Das bedeutet, dass ca 55 % des $f_{VSG_{Total}}$ durch die extrazelluläre Proteindomäne bestimmt werden. Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode können nun die, den Diffusionskoeffizienten entsprechenden, Strömungswiderstände der Trypsin gespaltenen mfVSG, beziehungsweise der mSAV-mfVSG Komplexe bestimmt werden. In Tabelle 3.2 sind die Strömungswiderstände der verschiedenen Situationen dargestellt. Nach der Zugabe des mSAV fällt der Diffusionskoeffizient auf einen Wert von circa $0,4 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ ab. Die Reduzierung des Diffusionskoeffizienten ergibt eine Erhöhung des $f_{VSG_{mSAV}}$ auf $1,036 * 10^{-8} \text{ kg} / \text{s}$. Somit werden nach der Bindung der mSAV Proteine an das mfVSG circa 80 % des $f_{VSG_{mSAV}}$ durch die extrazelluläre Domäne verursacht.

Für den Fall der Verkleinerung der Proteindomäne des mfVSG durch die Proteolyse mittels Trypsin ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von circa $1,6 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ und somit ein $f_{VSG_{Trypsin}}$ von $2,563 * 10^{-9} \text{ kg} / \text{s}$. Dies entspricht einem Anteil der Proteindomäne an $f_{VSG_{Trypsin}}$ von circa 20 %.

3 Diskussion

Tabelle 3.2: Strömungswiderstände der mfVSG. VSG Diffusionskoeffizienten, f_{Total} und Anteil der extrazellulären Domäne an f_{Total} in %.

	$D, \mu\text{m}^2 / \text{s}$	$f_{Total}, \text{kg} / \text{s}$	Anteil der extrazellulären Domäne an $f_{Total}, \%$
mfVSG-mSAV	0,4	$1,012 * 10^{-8}$	80
mfVSG	0,9	$4,496 * 10^{-9}$	55
mfVSG Trypsin	1,6	$2,523 * 10^{-9}$	20
Theoretisches Lipid	2,0	$2,023 * 10^{-9}$	0

Somit kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Größe der extrazellulären Domäne einen substantiellen Anteil an dem gesamten Strömungswiderstand der GPI-verankerten mfVSG hat. Durch die Verwendung der artifiziellen Membranen kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Änderungen der Diffusion durch Bestandteile des Zytoskeletts oder laterale Interaktionen mit TM-Proteinen ausgeübt werden. In der Masterarbeit von Marius Glogger konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Vergrößerung der Proteindomäne auch auftritt, wenn die biotinylierten mfVSG einen lateralen Abstand von ca 25 nm aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss der Größe der Proteindomäne auch ohne laterale Interaktionen auftritt.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen konnte bis jetzt abgeleitet werden, dass die Diffusion der mfVSG durch die Größe der extrazellulären Domäne signifikant beeinflusst wird. Allerdings geben diese Ergebnisse keinen Rückschluss darüber, welche geometrische Größe der Proteine die Änderung verursacht. Strömungswiderstände sind grundsätzlich abhängig von der Interaktionsfläche der verschiedenen Objekte mit ihrer Umgebung. So wird die Reibung eines Quaders auf einer schiefen Ebene hauptsächlich durch die Größe der Auflagefläche bestimmt. Für ein sphärisches Objekt in einem dreidimensionalen System, wie zum Beispiel einem Fisch in dem atlantischen Ozean, wird die Reibung durch die gesamte Oberfläche des Fisches bestimmt. Für den Fall eines GPI-verankerten Proteins kann also angenommen werden, dass der Strömungswiderstand durch die Größe der Oberfläche maßgeblich bestimmt wird. Die Oberfläche eines zylindrischen Objektes wird durch die Kreiszahl π , den Radius und die Höhe definiert. Da, weder bei der Reduzierung, noch bei der Vergrößerung der Proteindomänen der Radius grundlegend verändert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Phänomene durch die Änderung der Proteinhöhe verursacht wurden.

Tanaka *et al.* haben die Diffusion von monomerem GFP und tetramerem dsRED in artifiziellen Membranen Proben studiert [100]. Die Proteine wurden über ein His-Tag an Kopfgruppen modifizierte NTA-Lipide gebunden. Die Autoren konnten trotz des Größenunterschiedes der Proteine keinen signifikanten Unterschied der Diffusionskoeffizienten feststellen. Monomeres GFP hat ein MG von circa 25 kDa und tetrameres dsRED ein MG von circa 100 kDa. Der Vergleich der Proteindimensionen zeigt, dass die GFP und dsRED Moleküle im Vergleich zu den VSG eine deutlich geringere Höhe aufweisen. Im Fall der dsRED-Tetramere ist außerdem nicht klar in welcher Orientierung sich das Tetramer zu der Membran befindet. In Abbildung 3.1 ist ein Größenvergleich der Proteine dargestellt. Für das dsRED sind die beiden Extremfälle der tangentialen Orientierung dargestellt. Eine Möglichkeit wäre, dass die dsRED-Tetramere mit ihrer Diagonale senkrecht zu der Membran orientiert sind. Dies würde einer Höhe von circa 8 nm entsprechen. Wenn das dsRED-Tetramer in der gleichen Orientierung wie das GFP Monomer zu der Membran steht, würde sich die Höhe der verschiedenen Proteine nicht unterscheiden.

Diese Annahme würde, unter Verwendung des folgenden vereinfachten Modelles, die Beobachtungen von Tanaka *et al.* erklären. Wenn zwei Zylinder mit einem gegebenen Radius lateral interagieren, so ist die Interaktionsfläche im Umfang, als Funktion des Radius, als Punkt zu beschreiben. Streng genommen ist die Fläche der Kontaktpunkte

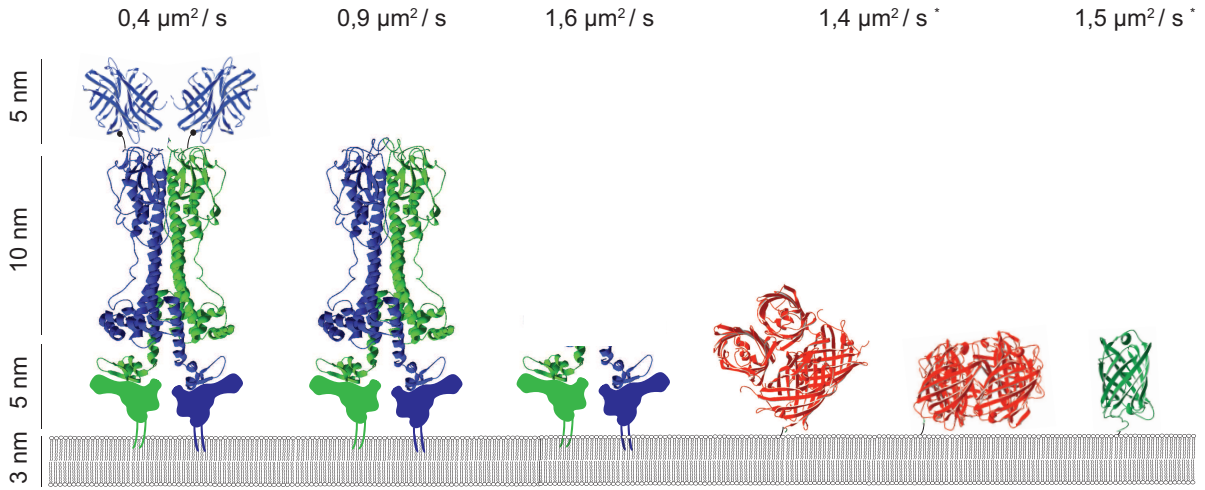


Abbildung 3.1: Größenvergleich von GFP, dsRED und mfVSG. Von links nach rechts: VSG-Streptavidin Komplex, VSG, trypsinverdautes VSG, dsRED-Tetramer *aufrecht*, dsRED Tetramer *liegend* und GFP, jeweils mit den entsprechenden Diffusionskoeffizienten. Die mit * gekennzeichneten Werte stammen aus Tanaka *et al.*, 2007 [100].

$A_{Punkt} = 0$. Die Interaktionsfläche wird außerdem durch die Höhe des Zylinders definiert. Allerdings würde die Interaktionsfläche ein, von der Höhe abhängiges, Vielfaches des Interaktionspunktes sein. Somit wäre die Interaktionsfläche der Zylinder ein Vielfaches von $A_{Punkt} = 0$. Da für Proteine angenommen werden kann, dass es sich um elastische Objekte handelt, kann mit Hilfe der Hertzschen Flächenpressung die Interaktionsfläche beschrieben werden [101]. Hierbei wird angenommen, dass die elastischen Objekte mit einer bestimmten Kraft (F) zusammengebracht werden. Durch diese Kraft werden die Objekte, bedingt durch das Elastizitätsmodul (E), an den Kontaktstellen verformt. Somit ist es möglich bei gegebenen F und E die Flächenpressung (p_{max}) zu bestimmen. In unserem Fall sind nur die Anteile des Radius und der Höhe an der Pressfläche von Interesse. Die übrigen Faktoren werden im weiteren als konstant angesehen und daher nicht berücksichtigt.

$$p_{max} = \sqrt{\frac{F * E}{2 * \pi * r_{Hertz} * l * (1 - \nu^2)}} \quad (3.8)$$

Für den Radius der Zylinder in Gleichung 3.8 (r_{Hertz}) gilt,

$$r_{Hertz} = \frac{r_1 * r_2}{r_1 + r_2} \quad (3.9)$$

wenn Objekte mit identischem Radius betrachtet werden gilt

$$r_1 = r_2, \quad (3.10)$$

dann folgt

$$\begin{aligned} r_{Hertz} &= \frac{r^2}{2 * r} \\ &= \frac{r}{2} \end{aligned} \quad (3.11)$$

Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Änderung des Radius nur mit $r/2$ in die Interaktionsfläche der Proteine eingeht. Der Radius $r/2$ beschreibt eine maximale Randbedingung der Verformung zweier Zylinder. Die beiden Zylinder werden in diesem Fall so weit verformt bis jeweils die Hälfte des Zylinderumfanges der beiden Objekte interagiert. In die Interaktionsfläche der Zylinder kann daher maximal $r/2$ einfließen. Im Gegensatz hierzu geht die Änderung der Proteinhöhe unvermindert in die Interaktionsfläche ein.

Aus den vorangegangenen Abschnitten stellen sich folgenden Fragen:

- Wird die Änderung der Diffusion nur durch laterale Interaktionen ausgeübt?

oder

- Kann die Proteinhöhe die Diffusion unabhängig von lateralen Interaktionen beeinflussen?

Um einen tieferen Einblick in diese Fragen zu bekommen, wurde die Diffusion von membranverankerten Partikeln mit Hilfe von computergestützten Molekulardynamik-Simulationen untersucht. Diese wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gernot Guigas und Prof. Matthias Weiss an der Universität Bayreuth angefertigt. Es wurde der Einfluss der Proteinhöhe auf den Diffusionskoeffizienten bei zwei verschiedenen lateralen Proteindichten simuliert. Die Systeme besaßen eine laterale Proteindichte von entweder 2500 oder 12500 Proteinen μm^{-1} . Die Ergebnisse der Simulationen zeigen deutlich, dass selbst bei einer geringen Proteindichte (2500 μm^{-1}) die Höhe der Proteine einen signifikanten Einfluss auf die Diffusion der Partikel hat (siehe schwarze Vierecke in Abbildung 3.2). Dieser Effekt wird bei steigender Proteindichte verstärkt (siehe rote Vierecke in Abbildung 3.2). Dieser Zusammenhang verdeutlicht, dass die Höhe und die laterale Dichte der Proteine im Zusammenspiel die Diffusion beeinflussen. Eine laterale Dichte von 2500 Proteinen μm^{-1} entspricht ungefähr einem zehntel der Konzentration des VSG auf der Zelloberfläche der Trypanosomen. Da die Diffusion des VSG erst bei Konzentrationen beeinträchtigt wird, welche höher sind als auf der Zelloberfläche der Trypanosomen, können also für den Fall des VSG laterale Interaktionen, welche durch die Vergrößerung der Proteine Zustände kommen, bei geringen Konzentrationen vernachlässigt werden. Dieser Zusammenhang und die Ergebnisse der Simulationen sind deutliche Indizien dafür, dass die Höhe der Proteindomäne alleine die Diffusion der Proteine beeinflussen kann.

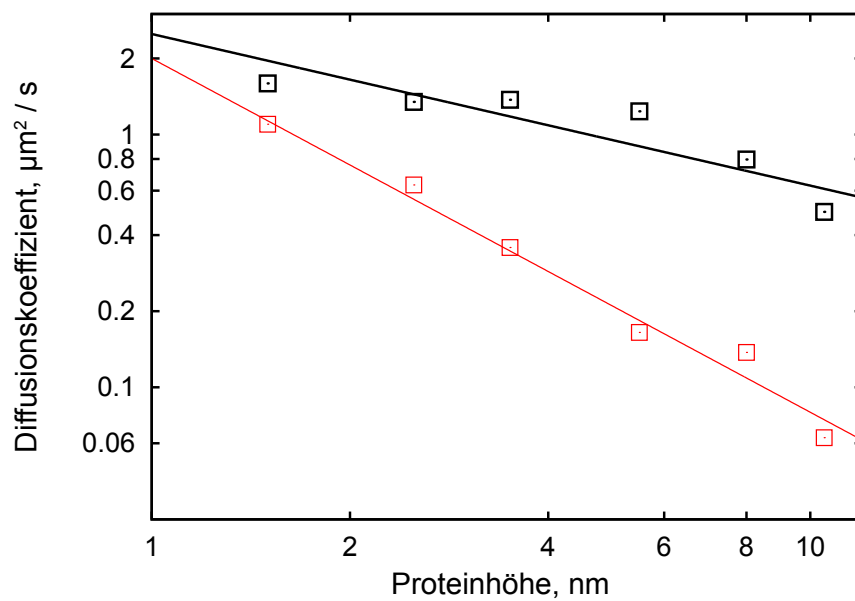


Abbildung 3.2: Einfluss der Proteinhöhe auf die Diffusion bei verschiedenen Proteindichten - Molekulardynamik-Simulationen. (□) 2500 Proteine μm^{-3} ; (◻) 12500 Proteine μm^{-3} . Diffusionskoeffizient in $\mu\text{m}^2/\text{s}$, Höhe der Partikel in nm. Die MD-Simulationen sind an der Universität Bayreuth bei Dr. Gernot Guigas und Prof. Matthias Weiss entstanden.

3.5 Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf Blutstromform-Trypanosomen

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und deren Bedeutung für die Blutstromform-Trypanosomen diskutiert werden.

Die Funktion des VSG-Mantels besteht in erster Linie in der Maskierung der invarianten Oberflächenbestandteile gegenüber dem Immunsystem der Wirtszelle und der Antigenen Variation. Wie bereits beschrieben benötigt ein funktioneller VSG-Mantel eine hohe laterale Dichte. Zugleich darf die Mobilität des VSG nicht negativ beeinflusst werden, da sonst die homogene Verteilung der Moleküle auf der Zelloberfläche gestört werden könnte. Da die Diffusion des VSG, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, in direktem Zusammenhang mit der lateralen Dichte des VSG steht, kann also folgender Zusammenhang beschrieben werden. Die laterale Dichte des VSG auf der BSF-Zelloberfläche ist nahe des Diffusion-Schwellenwertes. Wird dieser Schwellenwert überschritten, so wird die Mobilität und die Diffusion der Proteine stark beeinträchtigt. Für den Parasiten innerhalb des Blutstromes hätte diese Reduzierung der VSG-Mobilität schwerwiegende Auswirkungen und würde wahrscheinlich zu einer Entfernung der Parasiten durch das Immunsystems des Wirtes führen.

Aus Abbildung 2.4 wird deutlich, dass in einem homogenen VSG-System ca 30-40 % zusätzlichen VSGs (in Bezug auf die BSF-Zelloberfläche) ohne das Überschreiten des Diffusionsschwellenwertes (DSW) toleriert werden. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse aus den Überexpressions-Experimenten unterstützt (vgl Abschnitt 3.2). Hier zeigt sich bei ungefähr 40 % zusätzlichen VSGs eine signifikante Reduzierung des Diffusionskoeffizienten. Interessanterweise scheint jedoch eine bestimmte Menge an zusätzlichen VSG auf der Zelloberfläche Platz zu finden ohne direkt zu einer Störung der Diffusion zu führen. Somit wäre es möglich, dass ein kurzzeitiger Überschuss der Expression des VSG auf der Zelloberfläche kompensiert werden kann, ohne zu einer Überschreitung des DSW zu führen. Eine solche kurzfristige Überexpression wäre zum Beispiel bei dem Wechsel des aktiven Expressionsortes der VSG oder bei der Aktivierung des zweiten endoplasmatischen Retikulums, während der Zellteilung vorstellbar. Dies bedeutet, dass der VSG-Mantel eine optimale Dichte aufweist, um gleichzeitig die

Mobilität der Proteine, den effektiven Schutz gegen das Wirtsimmunsystem und eine kurzzeitige Proteinüberexpression gewährleisten zu können.

Alle VSG der BSF-Trypanosomen sind mit zumindest einer N-Glykosylierung post-translational modifiziert. Die Herstellung von BSF-Trypanosomen, welche ausschließlich N-Glykan freie VSG präsentieren, war bislang nur an einfach glykosylierten VSG möglich (N. Jones *et al.*). Obwohl die Aminosäuresequenzen der verschiedenen VSG stark variieren, sind Teile der Sekundärstrukturen hoch konserviert [102]. Eine mögliche Funktion der N-Glykosylierung könnte die Maskierung geladener oder besonders stark hydrophober Seitengruppen von Aminosäuren sein. Trägt ein VSG besonders viele Aminosäuren ungünstiger Ladungsverteilung, so würde eine höhere Glykosylierungsdichte benötigt werden, um einen bestimmten hydrophilen Charakter des Gesamtproteins zu gewährleisten. In diesem Fall wäre die komplette Entfernung der N-Glykosylierungen wahrscheinlich nicht mehr möglich, da bereits frühe Faltungs- und Transportprozesse des VSG gestört sein könnten. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Diffusionsmessungen der glykan-freien VSG folgendes deutlich. Die N-Glykane der einfach-glykosylierten VSG sorgen dafür, dass die Diffusion und Mobilität der VSG bei hohen lateralen Dichten begünstigt wird. Das Entfernen der N-Glykane hat sowohl in artifiziellen Membranen, als auch in lebenden Trypanosomen zu einer Reduzierung der Mobilität des VSG bei ähnlichen lateralen Dichten geführt. Høiberg-Nielsen *et al.* konnten für das glykosylierte Enzym *Peniophora lycii* Phytase postulieren, dass N-Glykane zu einer Aufrechterhaltung repulsiver elektrostatischer Interaktionen führen. Im Fall der VSG könnten solche repulsiven Interaktionen als proteineigener Aggregationsschutz dienen und somit eine Zusammenlagerung der Proteine verhindern. Das ein derartiger Aggregationsschutz für die Trypanosomen besonders wichtig zu sein scheint, zeigt folgendes Experiment. Werden die VSG des Oberflächenmantels biotinyliert und anschließend mit multivalentem Streptavidin quervernetzt, ist ein sofortiger Zelltod zu beobachten (M. Engster). Hingegen zeigen die BSF-Trypanosomen keine Beeinträchtigung der Vitalität, wenn diese mit monovalentem Streptavidin behandelt werden (M. Glogger). Zusammenfassend kann also die Schlussfolgerung getroffen werden, dass die N-Glykosylierung die hohe Mobilität der VSG nahe des DSW ermöglicht und somit eine zentrale Rolle bei der Funktionalität des VSG-Mantels innehat.

Für den Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen konnte ein Wert in der Größenordnung von $0,02 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ bestimmt werden. Es stellt sich die Frage, ob der

Diffusionskoeffizient, also die Rate der passiven Proteinausbreitung, eine übergeordnete zelluläre Rolle innehat. Ein durchschnittliches BSF-Trypanosom hat im Mittel eine Zelloberfläche von ungefähr $140 \mu\text{m}^2$. Mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,02 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ würde also ein VSG 7000s, oder ungefähr 2h, benötigen um die gesamte Fläche zu überqueren. Stellt die geringe passive Ausbreitungsrate der VSG die Zelle während der Antigenen Variation einem Problem gegenüber? Hierbei muss die Zelle alle VSG eines bestimmten Typus gegen ein immunologisch distinktes VSG austauschen. Die Proteine sind in der Lage innerhalb von 2h die gesamte Zelloberfläche zu überbrücken. Wenn die beiden Vorgänge, also das Entfernen des alten und das Präsentieren des neuen VSG, sich gegenseitig nicht stören, so würde die Zelle für den Austauschprozess, durch passive Diffusion, nicht weniger als 2h benötigen. Dies würde ungefähr einem Drittel der gesamten Zeit entsprechen, welche die BSF-Trypanosomen für einen kompletten Zellzyklus (6h) benötigen. Würde das VSG also größer sein, und dadurch langsamer diffundieren, so wäre unter Umständen die homogene Verteilung und der ständige Austausch des VSG gestört.

Zusammenfassend kann also folgendes Modell aufgestellt werden. Die Größe der VSG ist eben so groß, dass gleichzeitig die invarianten Komponenten der Zelloberfläche maskiert werden und eine ausreichend hohe Diffusion des VSG gewährleistet wird. Die Konzentration des VSG auf der Zelloberfläche ist unterhalb des Diffusionsschwellenwertes, allerdings wird der Diffusionskoeffizient durch die zusätzlichen nicht-VSG reduziert ohne die Mobilität der VSG zu gefährden. Die Mobilität der VSG in der Nähe des Diffusionsschwellenwertes wird durch die N-Glykosylierung ermöglicht. Dieser Zusammenhang zeigt also deutlich, dass der VSG-Mantel der BSF-Trypanosomen ein komplexes System ist, welches auf die Anforderungen der Parasiten adaptiert ist und somit die Pathogenität der Trypanosomen ermöglicht. Jede Beeinflussung dieses Systems wäre somit ein valides Ziel für die Entwicklung neuer Strategien um einer Bekämpfung der Parasiten nachzukommen.

Auf die zu Beginn gestellten Fragen können folgende Antworten gegeben werden:

- *Frage: Zeigen verschiedene VSG ähnliche Eigenschaften der Diffusion?*

Antwort: Ja, trotz struktureller und biochemischer Unterschiede ist die Diffusion von verschiedenen VSG sehr ähnlich

- *Frage: Ist die Diffusion des VSG in lebenden Trypanosomen durch dessen laterale Dichte beeinflusst?*

Antwort: Nein, in lebenden Trypanosomen ist die Diffusion des VSG nicht durch deren Dichte beeinflusst. Allerdings ist die Mobilität des VSG-Mantel durch die zusätzlichen nicht-VSG erstaunlich dicht an dem Diffusionsschwellenwert.

- *Frage: Haben N-Glykane einen Effekt auf die Diffusion des VSG?*

Antwort: Ja, N-Glykane üben einen positiven Effekt auf den Diffusionsschwellenwert aus und erhalten so die Mobilität des VSG-Mantels.

- *Frage: Kann die Größe der Proteindomäne von GPI-verankerten Proteinen die Diffusion beeinflussen?*

Antwort: Ja, die Größe der Proteindomäne von GPI-verankerten Proteinen hat einen signifikanten Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten, um so größer ein Protein ist, um so kleiner ist der Diffusionskoeffizient.

3.6 Einordnung der Ergebnisse in das allgemeine Bild biologischer Membranen

Seit Singer und Nicholson und der Beschreibung des *fluid mosaic model* hat sich das Bild biologischer Membranen deutlich verändert [44]. Mittlerweile werden Membranproteinen weitaus geringere laterale Freiräume zugesprochenen. Donald Engelman fasste diesen Zusammenhang mit den folgenden Worten zusammen, „*membranes are more mosaic than fluid*“ [46]. Wie hoch die tatsächliche Konzentration von Proteinen in der Plasmamembran lebender Zellen ist, bleibt für viele Zelltypen unbeantwortet. In stoffwechselaktiven Organellen, wie den Mitochondrien oder den Chloroplasten, können Membranproteine bis zu 75 % der Membranfläche einnehmen [103]. Der Plasmamembran werden solch hohe Proteinkonzentrationen bislang nicht zu gesprochen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber deutlich, dass die Konzentration an Proteinen in der Plasmamembran der Trypanosomen durchaus so hoch sein kann, dass der Diffusionsschwellenwert erreicht wird. Nach dem Modell von Saffman und Delbrück wird der Diffusionskoeffizient hauptsächlich durch die Viskosität der Membran bestimmt [55]. Die Viskosität des membranumgebenden Mediums ist in diesem Fall vernachlässigt, da diese als 100-fach kleiner angenommen wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen allerdings dafür, dass nicht die Viskosität des umgebenen Mediums relevant ist, sondern die resultierende Mikroviskosität der Proteinschicht. Diese Mikroviskosität wäre durch die Proteinkonzentration und durch die Dimensionen der Proteine definiert. Dies bedeutet, dass in Membranen geringer Proteinkonzentration die Viskosität von Wasser annäherungsweise der Mikroviskosität in der Proteinschicht entspricht und somit das SD-Modell Anwendung finden kann. In Membranen mit hoher Proteinkonzentration wäre die effektive Mikroviskosität in der Proteinschicht höher als die von Wasser und die Annahme des SD-Modells nicht mehr erfüllt. Dies bedeutet aber nicht, dass das SD-Modell in diesem Fall falsch wäre, sondern vielmehr, dass für Membranen hoher Proteinkonzentrationen eine Erweiterung des SD-Modell notwendig ist, in welcher nicht länger die Viskosität von Wasser, sondern die Mikroviskosität der Proteinschicht berücksichtigt wird.

Die lokale Organisation von GPI-verankerten Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen. So werden zum Beispiel verschiedene Krankheiten mit der Aggregation von GPI-verankerten Proteinen in Verbindung gebracht. Seit Beginn der 1990er Jahre ist eine heftige Diskussion über die Existenz, Größe und Funktion sogenannter „*lipid rafts*“ oder auch Mikrodomänen entbrannt [104]. Während die Diskussion über den Mechanismus, welcher derartige Strukturen entstehen lässt weiterhin geführt wird, scheint es einen generellen Konsens über die Größe und die Dynamik dieser Strukturen zu geben [105]. Zu Beginn wurden den Mikrodomänen Durchmesser von 500-1000 nm zugesprochen. In den vergangenen Jahren haben sich die Evidenzen gehäuft, dass die Mikrodomänen kleiner als 50-100 nm sind, einige Arbeiten sprechen mittlerweile sogar von weniger als 10 nm [106]. Unabhängig von der Größe der Mikrodomäne wird diesen aber eine hohe Dynamik der assoziierten Proteine zugesprochen. Dies bedeutet, dass die vorwiegend GPI-verankerten Proteine nur für kurze Zeit in den Mikrodomänen vorliegen und diese wieder verlassen. So konnte von Sharma *et al.* gezeigt werden, dass nur ca 20 % der GPI-verankerten Proteine auf der Zelloberfläche in Mikrodomänen mit einer Größe von 5-10 nm assoziiert vorliegen [106].

Zu der Dynamik der Mikrodomänen kann diese Arbeit abschließend folgende Hypothese beisteuern. Durch die Einlagerung der GPI-verankerten Proteine in die Mikrodomänen wird der Diffusionskoeffizient sowie die mobile Fraktion der Proteine durch die erhöhte laterale Dichte deutlich reduziert. Somit wäre das Auflösen der Mikrodomänen durch reine Diffusion nur möglich, wenn die Mobilität der Proteine zu einem gewissen Maß erhalten bleibt. Wie hier gezeigt werden konnte, erhalten N-Glykane die Mobilität von GPI-verankerten Proteinen wenn diese in großer Nähe sind.

Dieser Zusammenhang legt die Vermutung nahe, dass das Auflösen der Mikrodomänen durch die N-Glykane begünstigt wird, da diese eine anhaltende Zusammenlagerung der GPI-verankerten Proteine verhindern.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Die Hersteller der verwendeten Chemikalien werden bei der ersten Beschreibung im Text aufgeführt. In Tabelle 4.1 sind die genauen Bezeichnungen und Konzentrationen der Stamm- und Arbeitslösungen der verwendeten Lipide aufgeführt. In Tabelle 4.2 sind die verwendeten NHS- oder Sulfo-NHS Ester Verbindungen und deren entsprechende Stamm- und Arbeitskonzentrationen aufgeführt.

Tabelle 4.1: Lipide, Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen in mg / mL.

Abkürzung	Bezeichnung	Konzentration Stammlösung (mg / mL)	Konzentration Arbeitslösung (mg / mL)	Bemerkung
SOPC (Avanti Polar Lipids)	1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-Cholin	10	1	-
DOPE <i>Cap Biotin</i> (Avanti Polar Lipids)	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phospho-Ethanolamin-N-(<i>cap biotinyl</i>)	1	1	Botin an der Kopfgruppe

Tabelle 4.2: NHS- und Sulfo-NHS Verbindungen, Anwendung, Konzentrationen der Stammlösungen und finale Konzentrationen.

Verbindung	Anwendung	Konzentration Stammlösung	Final	Bemerkungen
Atto 488 NHS-Ester (Atto-Tec)	BSF Oberflächenfärbung	10 mM	1 μ M	Exzitation 488 nm, Emission 530 nm
EZ-Link Biotin (Thermo Fisher)	chemische Biotinylierung	100 mM	1 mM	

4.1.2 Medien und Puffer zur Kultivierung von BSF-Trypanosomen

4.1.2.1 Reinstwasser

Das Wasser zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde mit einer Reinstwasseranlage der Firma TKA (Thermo Electron LED GmbH) aufbereitet. Es wurde ausschließlich Wasser mit einem Leitwert von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Im weiteren Verlauf wird das Reinstwasser als mp-H₂O bezeichnet.

4.1.2.2 HMI-9

Für die Anfertigung von 10 L HMI-9 wurden folgende Stoffe benötigt:

- 176 g IMDM Pulver (Invitogen)
- 30,24 g Natriumhydrogencarbonat (Roth)
- 143 μL β -Mercaptoethanol (Roth)
- 100 mL Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
- 282 mg Bathocuproin (Serva)
- 390 mg Thymidin (Sigma-Aldrich)
- 1,36 g Hypoxanthin (Sigma-Aldrich)
- 1,8 g L-Cystein (Sigma-Aldrich)

Die zuvorstehenden Stoffe wurden in der oben aufgeführten Reihenfolge in einem Volumen von circa 8 L mp-H₂O aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von einer 1 M Natriumhydroxid (Roth) Lösung auf 7,5 eingestellt. Das Volumen wurde im Anschluss auf 9 L eingestellt. Das Medium wurde steril filtriert und mit 10 % (Vol. %) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich) vermischt. Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte für 1 h bei 56 °C. Das Medium wurde bei -20 °C langzeitgelagert. Aufgetautes Medium wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht.

4.1.2.3 *Trypanosoma dilution buffer* - TDB

Zur Herstellung von *Trypanosoma Dilution Buffer* (engl.: *Trypanosoma Dilution Buffer*, TDB) wurden die folgenden Stoffe in mp-H₂O gelöst.

- 5 mM Kaliumchlorid (Roth)
- 80 mM Natriumchlorid (Roth)
- 1 mM Magnesiumsulfat (Merck)
- 20 mM Di-Natriumhydrogenphosphat (Roth)
- 2 mM Natrium-di-hydrogenphosphat (Roth)
- 20 mM Glukose (Sigma-Aldrich)

Sofern erforderlich wurde der pH-Wert der Lösung mit Salzsäure oder Natriumhydroxid auf 7,6 eingestellt. Die Lösung wurden dann durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 µm filtriert und in sterile Schraubdeckelgefäße abgefüllt.

4.1.2.4 *Phosphate buffered saline* - PBS

Zur Herstellung der *phosphate buffered saline* (engl.: *phosphate buffered saline*, PBS) wurden die folgenden Stoffe in mp-H₂O gelöst:

- 137 mM Natriumchlorid
- 2,7 mM Kaliumchlorid (Roth)
- 10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
- 1,8 mM Kalium-di-hydrogenphosphat (Roth)

Der pH-Wert des PBS wurden mit Salzsäure oder Natriumhydroxid auf 7,4 eingestellt.

4.1.3 *Verwendete T. brucei brucei* Blutstromform-Zelllinien

In Tabelle 4.3 sind die in der Arbeit verwendeten Blutstromform- (BSF-) Trypanosomen mit den entsprechenden Antibiotika und den verwendeten Konzentrationen aufgeführt.

4 Material und Methoden

Die Abkürzung MITat steht für, *Molteno Institute Trypanosoma antigen type* und die nachfolgende Zahlenkombination dient als genaue Charakterisierung des VSG.

Tabelle 4.3: *T. brucei* Blutstromform Zelllinien, Antibiotika und Konzentrationen.

Zelllinie	Antibiotikaresistenz	Konzentration, $\mu\text{g} / \text{mL}$
MITat 1.1wt	-	-
MITat 1.2wt	-	-
MITat 1.4wt	-	-
MITat 1.5wt	-	-
MITat 1.5-GPI-PLC ^{-/-}	-	-
MITat 1.6wt	-	-
13-90	Neomycin (Sigma-Aldrich), Hygromycin (Roth)	2,5, 5
13-90.MITat1.2.K.O MITat1.4 Δ Glykan	Neomycin, Hygromycin, Pu- romycin	30, 5, 0,3
13-90.MITat1.2.K.O MITat1.6 Δ Glykan	Neomycin, Hygromycin, Bla- stacidin (Applichem)	30, 5, 20

4.2 Methoden

4.2.1 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1.1 *Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acrylamid Gel-Electrophoresis* - SDS PAGE

Die Analyse von Proteinen wurde mit Hilfe der diskontinuierlichen Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli durchgeführt [107]. Abhängig von dem Molekulargewicht der Proteine wurden 10-20%ige SDS Trenngele verwendet. Als Standard wurde ein 12,5%iges Trenngel benutzt.

Sammelgel:

- 0,39 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 : 0,8, Roth)
- 0,75 mL Sammelgel Puffer (0,5 M Tris-HCl (Roth), pH 6,8, 0,4 % SDS (Roth))
- 1,83 mL mp-H₂O
- 15 µL 10 % (Gew. %) Ammoniumperoxodisulfat (APS, Roth)
- 3 µL Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth)

Trenngel, 12,5%ig:

- 2 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 : 0,8)
- 1,5 mL Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS)
- 2,5 mL mp-H₂O
- 20 µL 10 % (Gew. %) APS
- 4 µL TEMED

10-20 µL der Proteinproben, gelöst in Probenauftragspuffer (2 % Natrium-dodecylsulfat (SDS), 10 % Glycerol, 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % β -Mercaptoethanol), wurden bei einer Spannung von konstant 130 mV in den Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel ausgelaufen war. Die Gele wurden mit einer Coomassie R-250 Lösung (10 % 2-Propanol (Roth), 5 % Essigsäure

(Roth), 0,5 g / L Coomassie R-250 (Applichem) für 10 min gefärbt und über Nacht (üN) in einer Entfärbelösung (10 % 2-Propanol, 5 % Essigsäure) kontrastiert.

4.2.1.2 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Standard Western Blot

Im Anschluss an die in Kapitel 4.2.1.1 beschriebene Auftrennung der Proteine, wurden die Proben auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektrotransfer überführt. Hierzu wurden 6 Lagen Whatman-Papier, das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran (Whatman) und 6 weitere Lagen Whatman-Papier auf der Blotting-Apparatur gestapelt. Die Whatman-Papiere wurden in der Blotting-Lösung (20 % Methanol, Roth) in Lämmli-Laufpuffer, 25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 0,1 % SDS) getränkt. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA / cm² durchgeführt.

Die Nitrozellulosemembran wurde dann für 1 h bei RT oder bei 4 °C üN in PBS mit 5 % Magermilchpulver (Roth) inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in PBS, 1 % Magermilchpulver und 0,1 % Tween-20 (Roth) für 1 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen in PBS mit 0,2 % Tween-20 wurden die Membranen mit dem Sekundär-Antikörper in PBS, 1 % Magermilchpulver und 0,1 % Tween-20 für 1 h bei RT inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dann viermal in PBS mit 0,2 % Tween-20 und abschließend in PBS gewaschen. Die Detektion der Antikörperkomplexe wurde mit Hilfe der Infrarotfluoreszenz der Fluorophore der Sekundär-Antikörper (LI-COR, IRDye 700 und IRDye 800), bei einer Anregungswellenlänge von 700 bzw 800 nm, an einem Odyssey Infrarot *Imaging* System (LI-COR Bioscience) durchgeführt. Die Verdünnungen der Primär- sowie der Sekundär-Antikörper sind aus der Tabelle 4.4 zu entnehmen.

Western Dot-Blot

Als Alternative zu der oben beschriebenen Methode wurden Proteinproben auf einem Western Dot-Blot analysiert. Hierzu wurde eine Nitrozellulosemembran für 5 min in PBS genässt und im Anschluss zwischen Whatman-Papieren getrocknet. Die Membran wurde in die Dot-Blot Apparatur eingespannt und mit jeweils 5-10 µL der entsprechenden Proteinproben beladen. Die Proben wurden für 5-10 min getrocknet. Die Inkubationen der Antikörper und die Analyse der Membran wurden analog zu der vorstehenden Methode durchgeführt.

Tabelle 4.4: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper.

Antikörper und Herkunft	Typ	Verdünnung
Primär-Antikörper		
MITat1.2 C-term, Marc Carrington	Polyklonal Kaninchen	1 : 5.000
MITat1.6wt, Marc Carrington	Polyklonal Kaninchen	1 : 1.000
PFR, Philippe Bastin	Monoklonal Maus	1 : 50
Sekundär-Antikörper		
IR-Dye 700 Anti-Maus (LI-COR)	Polyklonal Ziege	1 : 10.000
IR-Dye 800 Anti-Kaninchen (LI-COR)	Polyklonal Ziege	1 : 10.000

4.2.1.3 Absolute Proteinquantifizierung

Die absolute Quantifizierung von Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe der Aminosäuren spezifischen UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die Extinktionskoeffizienten (E) wurden basierend auf den Koeffizienten der einzelnen Aminosäuren berechnet. Dies wurde mit dem Internet Werkzeug *ProtParam* der Seite <http://web.expasy.org/protparam/> bewerkstelligt. Die VSG-Aminosäuresequenzen wurden über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> bezogen. Die VSG-Vorläuferpeptide, basierend auf der Arbeit von Carrington *et al.*, wurden in der Berechnung der Koeffizienten nicht berücksichtigt [26]. Die Proteinkonzentrationen (c) wurden dann mit Hilfe des Lambert-Behrenschen Gesetz (4.1) berechnet. D bezeichnet die Schichtdicke der Messküvette.

$$Absorption_{280\text{ nm}} = E * c * d \quad (4.1)$$

4.2.2 Zellkultur und Handhabung von Blutstromform-Trypanosomen

4.2.2.1 Kultivierung von Blutstromform-Trypanosomen

Die BSF-Trypanosomen wurden unter den folgenden Standardbedingungen kultiviert.

- 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre.
- HMI-9 Medium mit 10 % (Vol. %) fetalem Kälberserum (FCS), siehe Kapitel 4.1.2.2.
- Inkubation in Suspensionskulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel (Sarstedt).

Wildtyp (wt) BSF-Trypanosomen wurden ohne die Zugabe zusätzlicher Antibiotika kultiviert. Im Fall von transgenen BSF-Trypanosomen wurden die Antibiotika entsprechend der vermittelten Resistenzen dem Medium zugefügt. Eine Auflistung der verwendeten Antibiotika und der entsprechenden Konzentrationen ist in Tabelle 4.3 aufgeführt. BSF-Trypanosomen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit 1400 * g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Zellzahlen, in Zellen pro mL, wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Kulturen wurden spätestens bei einer maximalen Zellzahl von 1 * 10⁶ Zellen / mL mit frischem HMI-9 Medium verdünnt. Die Vernichtung, von nicht weiter benötigten Kulturen, wurde mittels Autoklavierung erreicht (121 °C, 15 min in Sattedampf).

4.2.2.2 Kultivierung der Blutstromform Trypanosomen bei hohen Zellzahlen

Um Tierexperimente zu vermeiden, wurde ein alternatives Protokoll zu der Kultivierung von BSF-Trypanosomen bei hoher Zellzahl verwendet. Diese Kultivierungsmethode wurde in der Diplomarbeit von Anne Hermann in unserem Labor etabliert und ermöglicht das Wachstum der BSF-Trypanosomen bis zu einer Zellzahl von 1 * 10⁷ Zellen / mL innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase [108]. Es wurden folgende Änderungen zu den Standard-Kultivierungsbedingungen angewendet:

- Erhöhung des FCS-Gehaltes auf 20 % (Vol. %)
- Kultivierung in konischen Glasgefäßen

- Füllung der Gefäße mit maximal 20 % des Gesamtvolumens
- Konstante Agitation der Kulturen bei 80 U / min

4.2.2.3 Herstellung von Gesamtproteinproben

Die entsprechend der Anwendung vorbereiteten BSF-Trypanosomen wurden bei 1400 * g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der gesamte Pufferüberstand wurde entfernt und das verbleibende Sediment in 1 mL eiskaltem TDB suspendiert und weitere zweimal gewaschen. Um eine Zelldichte von $5 * 10^5$ Zellen / 10 μ L zu erreichen, wurde das Sediment nach dem letzten Waschschrift in einem der Gesamt-Zellzahl entsprechendem Volumen Probenauftragspuffer suspendiert. Direkt im Anschluss wurden die Gesamtproteinproben für 10 min bei 100 °C denaturiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.2.4 Herstellung, Lagerung und Verwendung von Langzeitstabilaten

Die Langzeitlagerung der BSF-Trypanosomen wurde bei einer Temperatur von -150 °C durchgeführt. Nach dem Entfernen des HMI-9 Mediums wurden für jedes Stabilat $5 * 10^6$ BSF-Trypanosomen in 1 mL Einfriermedium (90 % HMI-9 und 10 % Glycerol) suspendiert. Die BSF-Trypanosomen wurden nach dem Resuspendieren direkt in die -150 °C Tiefgefriertruhe (Sanyo, Sales and Marketing Europe GmbH) überführt. Für die Reaktivierung der Kryostabilate wurden diese zügig in einem auf 37 °C geheiztem Wasserbad aufgetaut. Direkt im Anschluss an das Auftauen wurden die BSF-Trypanosomen in 9 mL HMI-9 Medium überführt und bei 1400 * g 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 mL frischem HMI-9 Medium aufgenommen und in ein Zellkulturgefäß für Suspensionskulturen überführt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Zellzahl / mL bestimmt und entsprechend angepasst. Bei der Verwendung von transgenen Zelllinien wurden zu diesem Zeitpunkt die entsprechenden Antibiotika zugegeben (siehe Tabelle 4.3).

4.2.2.5 Oberflächenfärbung von BSF-Trypanosomen

Die Oberflächenfärbung von BSF-Trypanosomen wurde durch die kovalente Bindung von fluoreszierenden Farbstoffen erreicht. Die verwendeten kommerziellen Farbstoffe waren mit einer reaktiven Gruppe substituiert (NHS-Ester), welche unter leicht alkalischen Bedingungen (pH 8,0-9,0) eine kovalente Bindung mit primären Aminen eingeht. $1 \cdot 10^7$ BSF-Trypanosomen wurden vor der Färbereaktion dreimal mit eiskaltem TDB gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Zellzahl auf ca $1 \cdot 10^8$ Zellen / mL eingestellt und eine finale Konzentration von $1 \mu\text{M}$ des Farbstoffes hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 15 min unter Lichtausschluss in einem Eisbad durchgeführt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreifaches Waschen der Zellen mit jeweils 1 mL TDB entfernt. Die chemische Biotinylierung basiert auf dem oben erklärten Prinzip. In Tabelle 4.2 sind die entsprechenden Stoffbezeichnungen und Konzentrationen aufgeführt.

4.2.2.6 Trypsinverdau des VSG-Mantels

Die proteolytische Spaltung des VSG mithilfe des Trypsin wurde basierend auf der Arbeit von Bülow *et al.* durchgeführt [72]. Hierfür wurden $5 \cdot 10^6$ BSF-Trypanosomen dreimal in eiskaltem TDB gewaschen und anschließen in einem Volumen vom 1 mL aufgenommen. Der Trypsinverdau des VSG wurde durch die Zugabe von $10 \mu\text{g}$ Trypsin (Roth) und die anschließende Inkubation der Zellen bei 37°C für 5 min erreicht. Anschließend wurden die BSF-Trypanosomen dreimal mit eiskaltem TDB gewaschen.

4.2.2.7 Immobilisierung von Trypanosomen

Die Immobilisierung von BSF-Trypanosomen wurde mittels Einbettung in Gelatine erreicht. Hierzu wurde Typ-A Gelatine aus Schweinehaut (Sigma-Aldrich, G-1890) verwendet. Eine 10 %ige (Gew. %) Gelatinelösung in TDB wurde wie folgt angesetzt. Die Gelatine wurde für 15 min bei 65°C in 90 % des gewünschten Endvolumens geschmolzen. Der pH-Wert der Gelatinelösung wurde mit einer 1 M Natriumhydroxid-Lösung und unter Verwendung von pH-Indikatorpapier auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Im Anschluss wurde das gewünschte Endvolumen eingestellt. Die Gelatine wurde aliquotiert bei 4°C gelagert und nach einmaligem erneuten Schmelzen nicht weiter verwendet.

An dieser Stelle soll deutlich auf folgendes hingewiesen werden. Das Autoklavieren der Gelatine, sowie ein nicht ausreichend alkalischer pH-Wert sorgen dafür, dass die Gelstärke der Gelatine deutlich reduziert wird. Dies hat eine schwache Immobilisierung der Parasiten zur Folge.

Die Immobilisierung der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

- 5 μ L der Gelatinelösung wurden auf einem Deckglas (Hecht, Assistent) mit 3 μ L der fluoreszierend markierten Trypanosomen vermischt (Vorbereitung, siehe 4.2.2.5)
- Die Zell-Gelatine Mischung wurde mit einem weiteren Deckglas abgedeckt und in die Probenkammer eingespannt
- Die Temperatur der Probenkammer wurde auf konstant 20 °C eingestellt

4.2.2.8 Rekultivierung von Trypanosomen nach Immobilisierung

Die Rekultivierung von immobilisierten Trypanosomen wurde wie folgt durchgeführt. Die Deckgläser wurden aus der Probenkammer entfernt und in einer Schale mit 37 °C warmem HMI-9 Medium für 5-10 min inkubiert. Die beiden Deckgläser wurden dann vorsichtig getrennt und mit HMI-9 Medium gründlich gespült. Die Zellen wurden im Anschluss unter Standardbedingungen kultiviert. Wenn die Zellen zuvor am Mikroskop untersucht wurden, ist vor der Rekultivierung besonders darauf zu achten jegliche Spuren des Immersionsöls zu entfernen. Um den generellen Einfluss der Gelatine auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurden die BSF-Trypanosomen in einem entsprechenden Volumen Gelatine aufgenommen und für unterschiedlich lange Zeiträume bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zell-Gelatine Gemisch bei 37 °C gelöst und in 10 mL HMI-9 aufgenommen. Die BSF-Trypanosomen wurden im Anschluss unter Standardbedingungen kultiviert.

4.2.3 Reinigung von membranform-VSG mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie aus BSF-Trypanosomen

Die Reinigung von membranform VSG (mfVSG) wurde basierend auf der Arbeit von Clarke *et al.* mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durchgeführt [109]. Um eine Gesamtzahl von $5 \cdot 10^9$ BSF-Trypanosomen zu erlangen, wurden BSF Kulturen mit circa 1,2L Volumen angesetzt. Die Kultivierung wurde mit den in Abschnitt 4.2.2.2 beschriebenen Änderungen durchgeführt. Die gesamte Kultur wurde durch wiederholte Zentrifugationsschritte in einem 50 mL Reaktionsgefäß vereint und viermal mit 50 mL eiskaltem TDB gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in einem möglichst kleinen Volumen (1 - 2 mL) vorsichtig resuspendiert. Um die Scherkräfte während des Resuspendierens zu reduzieren wurden die letzten 5 - 7 mm einer 1000 μ L Pipettenspitze entfernt. Die Zell-Paste wurde dann umgehend mit einem Volumenäquivalent einer 0,2%igen (Vol. %) Trifluoressigsäure (TFA) Lösung (Roth) gemischt und in einem Eisbad für 5 min inkubiert. Das Zellextrakt wurde für 5 min mit $5000 \cdot g$ bei 4°C zentrifugiert. Die Extraktion wurde zweimal mit jeweils 1 mL einer 0,1% TFA-Lösung wiederholt. Um sicher zu stellen, dass keine unlöslichen zellulären Bestandteile in der Lösung zurück bleiben, wurden die zuvor vereinten Überstände für 10 min bei $20000 \cdot g$ zentrifugiert.

Das gesamte Zellextrakt wurde dann, zu Fraktionen von je 1 mL, in die Probenschleife des HPLC-Systems (Dionex) injiziert und auf die präparative HPLC-Säule (PerfectSil 300 C4, 5 μ m Partikelgröße, 250 x 10 mm) appliziert. Zwischen den Injektionen wurde jeweils ein HPLC-Säulenvolumen mit Eluent A gespült. Die Proteine wurden mit dem nachstehenden Stufengradienten (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2) von der Säule eluiert. Typischerweise wurden die mfVSG Fraktionen nach einer Retentionszeit von 40 - 50 min detektiert. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der Absorption bei 280 und 260 nm detektiert und automatisch gesammelt. Jeweils 100 μ L der Fraktionen wurden abgenommen und in einem Rotationsverdampfer komplett eingengt. Die eingengten Fraktionen wurden dann in 20 μ L Probenauftragspuffer aufgenommen und auf einer 12,5%igen SDS-PAGE analysiert. Um den 2-Propanol Gehalt zu reduzieren, wurden die mfVSG Fraktionen vereint und im Anschluss bei 37°C eingengt. Die eingengten Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Gefriertrocknungsanlage

(Martin Christ GmbH) komplett lyophilisiert. Die trockenen mfVSG Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C auf Blaugel gelagert.

4.2.3.1 Koppelung von fluoreszierenden Farbstoffen an mfVSG

Die Koppelung fluoreszierender Farbstoffe an mfVSG erfolgte auf Grundlage der in Kapitel 4.2.2.5 beschriebenen Reaktion. Die verwendeten Sulfo-NHS bzw NHS-Ester Verbindungen und dazugehörigen Konzentrationen sind aus Tabelle 4.2 zu entnehmen. Folgende Stoffe wurden für die Koppelungsreaktion verwendet:

- Lösung A: PBS, pH 7,4
- Lösung B: 0,2 M Natriumbicarbonat (Roth)-Lösung, pH 9,0
- Lösung C: 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 0,5 mM CaCl_2
- Natriumdeoxycholat (Applichem)
- PD-10, Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen (GE-Healthcare)

Lösung A und B wurden in einem Verhältnis von 20 zu 1 gemischt und 1% (Gew. %) Natriumdeoxycholat hinzugegeben. In dieser Lösung wurden die gefriergetrockneten mfVSG Proben (siehe Kapitel 4.2.3) zu einer Konzentration von 2 mg/mL gelöst. Die Konzentration der mfVSG Lösung wurde mittels der UV-Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des freizugänglichen ProtParam Algorithmus bestimmt. Hierzu wurden die reifen VSG Sequenzen verwendet [26].

Ein dreifacher molarer Überschuss der fluoreszierenden Farbstoffe wurde bei RT für 1 h mit den mfVSG Proben inkubiert. Um freien Farbstoff aus der mfVSG Lösung zu entfernen, wurde diese auf einer mit Lösung C äquilibrierten PD-10 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Proben wurden mit Lösung C eluiert. Fraktionen zu je 10 Tropfen (ca 200 μL) wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gesammelt und auf den Protein- und Farbstoffgehalt überprüft. Die Fraktionen mit höchstem Proteingehalt wurden vereint und das Farbstoff zu Proteinverhältnis (DOL) bestimmt. Die Bestimmung des DOL wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die fluorophorgekoppelten mfVSG Proben wurden zu 25 bzw 50 μL aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Abbildung 4.1: HPLC Stufengradient.

Zeit, min	Eluent A, % (Vol. %)	Eluent B, % (Vol. %)	Flussrate, mL / min
0-5	100	0	5
5-15	70	30	5
15-65	35	65	5
65-70	20	80	2,5
70-85	20	80	2,5
85-90	100	0	5
90-110	100	0	5

Eluent A: 100 % mp-H₂O, 0,1 % TFA

Eluent B: 90 % 2-Propanol (HPLC-grade, Roth), 10 % mp-H₂O, 0,1 % TFA

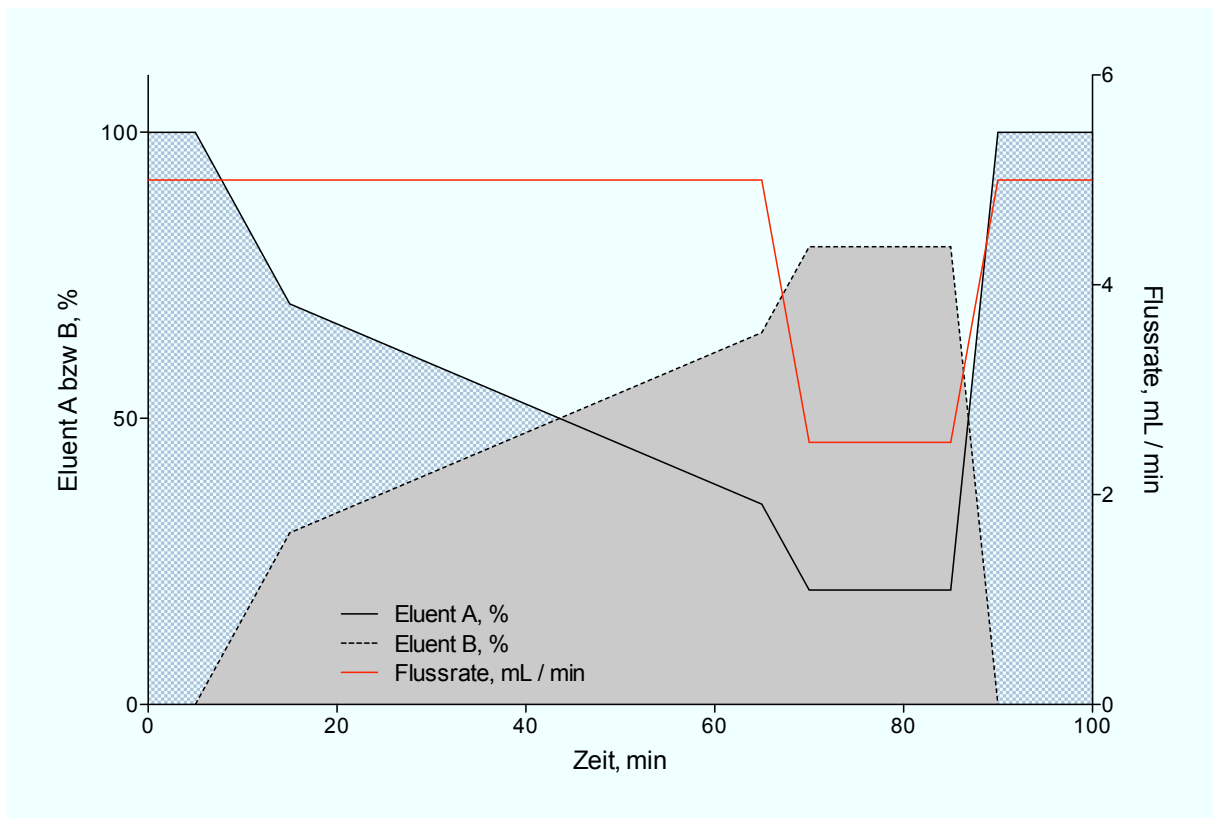


Abbildung 4.2: Grafische Darstellung des verwendeten HPLC Stufengradient.

Fläche hellgrau und Linie unterbrochen, Eluent A; Fläche dunkelgrau und Linie durchgezogen, Eluent B jeweils in % (Vol. %); rote Linie, Flussrate in mL / min.

4.2.4 Rekonstitution von membranform VSG in Lipid-Vesikel

Die Herstellung der mfVSG Proteoliposomen wurde unter zu Hilfenahme zwei verschiedener Varianten bewerkstelligt. Beide Varianten basieren auf der Mischung von Proteinlösungen mit Lipiden und Detergenzien und dem anschließenden Entfernen der Detergenzien aus den Lösungen. Während die Detergenzien aus der Mischung entfernt werden, bilden sich sogenannte Proteoliposomen. Das Ziel beider Varianten war die Herstellung von mfVSG Proteoliposomen mit unterschiedlichen lateralen mfVSG Abständen.

4.2.4.1 Variante A

Variante A beinhaltet die absolute Quantifizierung der Proben und sah folgenden experimentellen Ablauf vor:

- Herstellung von mfVSG Proteoliposomen mit höchstmöglichem mfVSG-zu-Lipid Verhältnis
- Trennung der mfVSG Proteoliposomen von freiem mfVSG oder GPI Anker freiem VSG mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation
- Absolute Bestimmung des Protein und Lipidgehaltes
- Schrittweise Verdünnung der erhaltenen mfVSG Proteoliposomen mit proteinfreien Lipid-Vesikeln

Variante A der Rekonstitution des mfVSG in Lipid-Vesikel wurde basierend auf den Arbeiten Hu *et al.* und Erb *et al.* durchgeführt [76, 83, 110]. Die Herstellung der Lipid-Vesikel wird in Kapitel 4.2.5.3 beschrieben. Um das höchstmögliche Protein-zu-Lipid Verhältnis in den Proteoliposomen zu erreichen, wurde die Rekonstitution bei einem molaren Verhältnis von 50 Lipiden pro mfVSG-Dimer durchgeführt. Die Lösung des markierten mfVSG wurde hierzu mit einem entsprechenden Volumen einer Lipidlösung gemischt. Zu der Mischung aus mfVSG und Phospholipiden wurde 1% (Gew.%) Natriumdeoxycholat hinzugefügt. Die Protein-Lipid-Detergenz (PPD) Mischung wurde dann für 2 h bei 30 °C inkubiert. Um die Detergenzien aus der Lösung zu entfernen, wurde die PPD Mischung zweimal mit 50 mg / mL Bio-Beads SM (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

für 30 min bei RT inkubiert. Die Bio-Beads wurden durch wiederholtes Zentrifugieren aus der Lösung entfernt.

Die Lösung wurde im Anschluss auf einen vierstufigen Saccharose-Gradienten (2, 1,2, 0,8 und 0,4 M Saccharose (Roth) in Lösung C) aufgeschichtet und bei $125000 \times g$ für 18 h zentrifugiert. Die mfVSG Proteoliposomen wurden aus der Interphase zwischen der 2 und 1,2 M Stufe des Saccharosegradienten entfernt und zweimal für mindestens 8 h gegen Lösung C dialysiert.

Quantifizierung des Lipidgehaltes

Die Bestimmung des Lipidgehaltes wurde durch die absolute Quantifizierung des organischen Phosphatgehaltes in den Proben durchgeführt. Die verwendete Methode basiert auf der Arbeit von Bartlett *et al.* mit den Abänderungen von Anderson *et al.* [111, 112]. Die Änderungen beinhalten den Austausch, der bei Bartlett *et al.* verwendeten Perchlorsäure gegen konzentrierte Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid. Die Detektion des organischen Phosphates wurde durch die kolorimetrische Reaktion mit dem Substrat Ammoniummolybdat und dem organischen Phosphat bei einer Wellenlänge von 797 nm durchgeführt. Die Quantifizierung der Proben wurde mit Hilfe einer Eichgeraden einer Phosphat-Standardlösung (0,65 mM, Sigma-Aldrich) realisiert. Sofern ausreichend Probenmaterial zu Verfügung stand, wurden die Proben in dreifacher Ausführung analysiert. Die Proben unbekannter Phosphat-Konzentration und die Proben der Eichgeraden wurden parallel nach folgendem Protokoll prozessiert:

- Vorbereitung der Proben für die Eichgerade, 0 bis 65 nmol Phosphat in Glasreaktionsgefäßen
- 25-100 μL der Proben unbekannter Phosphat-Konzentration wurden in Glas-Reaktionsgefäße überführt
- Eintrocknen der Proben bei 100°C
- Zugabe von 100 μL konzentrierter Schwefelsäure (Roth)
- Inkubation bei 155°C für 15 min

- Abkühlen auf RT und Zugabe von 50 μL 6 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung (Applichem)
- Inkubation bei 155 °C für 40 min
- Abkühlen auf RT und Zugabe von 2 mL mp-H₂O
- Zugabe von 800 μL Färbelösung (6,25 g / L Ammoniummolybdat (Merck) und 4,5 g / L Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich) gelöst in Wasser)
- Inkubation bei 100 °C für 10- 15 min
- Abkühlen auf RT und anschließende Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 797 nm

Quantifizierung der Proteinmenge

Die absolute Konzentration der mfVSG in den Proteoliposomen wurde photometrisch durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.1.3).

Berechnung des lateralen Proteinabstandes

Mit dem molaren Lipid-zu-Protein (LzP) -Verhältnis, der Fläche einer Lipidkopfgruppe ($A_{Lipid} = 0,6 \text{ nm}^2$) und dem folgenden Zusammenhang kann der Abstand von Mittelpunkt eines Proteins zu dem Mittelpunkt des benachbarten Proteins bestimmt werden:

$$\langle x \rangle = \sqrt{\frac{A_{Lipid}}{\frac{1}{LzP}}} \quad (4.2)$$

Um den freien Abstand zwischen zwei Proteinen zu bestimmen muss von $\langle x \rangle$ der Durchmesser eines Proteins abgezogen werden. Im Fall des VSG wurden 5 nm von den berechneten Werten abgezogen. Der laterale Abstand der mfVSG Proben wurde durch die Verdünnung der mfVSG-Proteoliposomen mit proteinfreien Liposomen bekannter Konzentration eingestellt.

4.2.4.2 Variante B

Variante B beinhaltet die Quantifizierung der mfVSG Mengen in Relation zu der VSG Menge, welche auf der Zelloberfläche der Parasiten präsentiert wird. Diese Aufgabenstellung wurde mit folgendem methodischen Ansatz verfolgt:

- Herstellung von mfVSG Proteoliposomen verschiedener mfVSG-zu-Lipid Verhältnisse
- Fusion der mfVSG Proteoliposomen auf Lipid-Einzelschichten (Herstellung, siehe Kapitel 4.2.5.2)
- Entfernen der überschüssigen mfVSG Proteoliposomen und freien mfVSG Molekülen
- Relative, zellbezogene Quantifizierung der mfVSG Mengen

Die Rekonstitution von mfVSG nach *Variante B* ist grundsätzlich, bis zu dem Schritt der Dichtegradienten-Zentrifugation, identisch zu der in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen *Variante A*. Ein zentraler Unterschied der beiden Varianten ist, dass bei *Variante B* von Beginn an die Lipid-Konzentration variiert wurden. Somit wurden mfVSG-Proteoliposomen mit unterschiedlicher Proteinkonzentration hergestellt. Diese wurden dann auf Lipid-Einzelschichten appliziert (Herstellung, siehe Kapitel 4.2.5.2). Direkt nach der Zugabe der mfVSG-Proteoliposomen zu dem Pufferüberstand der Lipid-Einzelschichten wurde die Probe 1 entnommen. Die artifiziellen Membranen wurden dann für 1 h bei 37°C inkubiert und eine weitere Probe des Überstandes (Probe 2) entnommen. Im Anschluss wurden die artifiziellen Membranen gründlich mit Vesikelpuffer gewaschen. Die Proben 1 und 2 wurden dann für die Quantifizierung der mfVSG Mengen in den artifiziellen Membranen verwendet.

Quantifizierung der mfVSG Mengen in artifiziellen Membranen mittels BSF-Zelloberflächenäquivalenten. Die relative Quantifizierung der mfVSG Mengen, in Bezug auf die VSG Menge auf der Zelloberfläche der BSF-Trypanosomen, wurde mit Hilfe einer Eichgeraden von Gesamtproteinproben der BSF-Trypanosomen und den Proben 1 und 2 (siehe oben) bewerkstelligt. Die Analyse wurde mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweis mittels Dot-Blot durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.1.2). Um möglichst akkurate Zellzahlen der Proteinproben zu gewährleisten, wurden ca $3 \cdot 10^7$

BSF-Trypanosomen, nach dreimaligem Waschen in eiskaltem TDB, auf eine Zellzahl von $5 \cdot 10^7$ Zellen / mL resuspendiert. Die genaue Zellzahl wurde im Anschluss in einer Neubauer-Zählkammer (Dimensionen $0,02 \text{ mm} \times 0,0025 \text{ mm}^2$) unter Zuhilfenahme einer linearen Verdünnungsreihe der Zellsuspension ermittelt. Um nachfolgende Verdünnungen zu vermeiden, wurden die Proben zu je $50 \mu\text{L}$ aliquotiert und umgehend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe dieser Gesamtproteinproben konnte dann die genaue Anzahl der Zelläquivalente in den Proben 1 und 2 bestimmt werden. Aus der Differenz der beiden Proben ergab sich dann die Anzahl der Zelläquivalente auf den artifiziellen Membranen. Für die Berechnung der BSF-Zelloberflächenäquivalente (BSFO) wurde eine mittlere Fläche von $140 \mu\text{m}^2$ für die BSF-Trypanosomen verwendet [113]. Als Gesamtfläche der artifiziellen Probe wurden $4 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2$ (11 mm Radius der Objekträger) verwendet. Somit sind $2,8 \cdot 10^6$ BSF-Trypanosomen notwendig, um ein BSFO von 1 zu erreichen.

4.2.5 Herstellung von artifiziellen Membranen

Die Herstellung der artifiziellen Membranen wurde, abhängig des Vorhabens, auf verschiedenen Wegen bewerkstelligt. Kapitel 4.2.5.2 beschreibt die Beschichtung der Deckgläser mit einer Lipid-Einzelschicht per Langmuir-Blodgett Transfer. Diese wurden für die Fusion der Proteoliposomen (siehe oben) verwendet. In Kapitel 4.2.5.3 wird die Herstellung von Lipid-Doppelschichten durch die Fusion von kleinen unilamellaren Vesikeln (engl.: *Small Unilamellar Vesicle*, SUV) auf hydrophilen Deckgläsern beschrieben. Die Vorbereitung der Deckgläser wurde unabhängig der nachfolgenden Nutzung durchgeführt. Die Methode wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2.5.1 Herstellung hydrophiler Deckgläser

Die Deckgläser wurden mit dem nachstehenden Protokoll vorbereitet:

- Deckgläser (Hecht Assistent, $\text{Ø}24 \text{ mm}$, No. 1) aufrecht in Deckglashaltevorrichtung platzieren
- Haltevorrichtung in Färbeschale stellen und gründlich mit mp-H₂O waschen

- Inkubation für jeweils 15 min im Ultraschallbad in Aceton (Roth), Ethanol (Roth) und abschließend Methanol
- Inkubation bei 70 °C für 30 min in RCA Lösung (1 : 1 : 5 (Vol. %) 30 % Wasserstoffperoxid, 25 % Ammoniak, mp-H₂O)
- Waschen der Deckgläser mit ca 1 L mp-H₂O

Die Deckgläser wurden entweder sofort verwendet oder in Wasser maximal 3 Tage gelagert. Alle Glaswaren die für den Umgang mit Lipid- oder Vesikellösungen bestimmt waren, wurden mit dem oben stehenden Protokoll gereinigt.

4.2.5.2 Langmuir-Blodgett Transfer

Das Beschichten der hydrophilen Deckgläsern mit Lipid-Einzelschichten wurde mittels Langmuir-Blodgett Transfer bewerkstelligt. Hierzu wurde ein Kibron MicroTrough X-LB System (Kibron, Inc.) verwendet. Als Subphase kam ausschließlich mp-H₂O zum Einsatz. Das Spreiten der Lipid-Einzelschichten auf der Subphase wurde durch die tropfenweise Zugabe von in Chloroform (Roth) gelösten Lipiden zu 1 mg / mL erreicht. Das Spreiten wurde beendet sobald ein über 5 min konstanter Oberflächendruck von ≥ 5 mN / m erreicht wurde. Die Lipid-Einzelschichten wurden bei einem konstanten Oberflächendruck von 32 mN / m und einer Austausch-Geschwindigkeit von ≤ 1 mm / min übertragen. Die genauen Spezifikationen und Konzentrationen der verwendeten Lipide sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Die beschichteten Deckgläser wurden sofort verwendet.

4.2.5.3 Vesikelfusion auf hydrophilen Deckgläsern

Um Deckgläser mit einer Lipid-Doppelschicht zu beschichten, wurden diese wie in Kapitel 4.2.5.1 vorbereitet und in der Probenkammer fixiert. Es wurden 400 μ L einer 1 mg / mL Vesikellösung (Herstellung siehe unten) appliziert. Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit 25 mL Lösung C (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM Natriumchlorid und 0,5 mM Calciumchlorid) gespült.

Um mfVSG Proteine in diese Lipid-Doppelschichten zu inkorporieren, wurden 25 μ L der fluoreszierend markierten Proteinproben (siehe Kapitel 4.2.3.1) in die mit Puffer

gefüllte Probenkammer appliziert. Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit ca 25 mL Lösung C gewaschen.

Die Vesikellösungen wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

- Eindampfen der in Chloroform gelösten Lipide mittels Stickstoffbegasung
- Rehydrieren des entstandenen Lipidkuchens in Lösung C
- Gründliches Durchmischen der Lösung
- Ultraschallbehandlung für 30- 45 min (bis eine durchsichtige Lösung entsteht)

Die verwendeten Konzentrationen sind Tabelle 4.1 aufgeführt. In Normalfall wurden Vesikellösungen zu 1 mM hergestellt. Die Vesikellösungen wurden bei 4 °C gelagert und vor dem Gebrauch erneut mit Ultraschall behandelt.

4.2.5.4 Trypsinverdau des mfVSG in artifiziellen Proben

Die proteolytische Spaltung der mfVSG in den artifiziellen Proben wurde durch den Austausch des Vesikelpufferüberstandes der Membran gegen Vesikelpuffer mit 0,06 % (Gew. %) Trypsin erreicht.

4.2.6 Bestimmung der Diffusion durch Fluoreszenz Wiederkehr nach irreversiblen Photobleichen

Die Diffusion der membranverankerten Proteine wurde mit Hilfe der Methode der Fluoreszenz-Wiederkehr nach irreversiblen Photobleichen (engl.: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) analysiert. Durch einen kurzen und intensiven Laserpuls wurden hierbei die Fluorophore eines ausgewählten Bereiches irreversibel zerstört. Durch die Wiederkehr der Fluoreszenz in den zuvor gebleichten Bereich, ist es möglich den Diffusionskoeffizienten (D) und den prozentualen Anteil der mobilen Proteine (MF) zu bestimmen. D und MF wurden in beiden Modellsystemen mit Hilfe unterschiedlicher Prozeduren analysiert. In den folgenden Kapiteln wird daher auf die Analyse der FRAP-Messungen auf lebenden Parasiten und in den artifiziellen Membranen getrennt eingegangen. Alle FRAP-Messungen wurden an einem automatisierten, inversen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (iMIC, TILL Photonics) durchgeführt, welches für die Steuerung der Laser (473 und 561 nm, Cobold Inc.) mit einem *Yanus Digital Scan Head* (TILL Photonics) und den entsprechenden Anregungs- und Emissionsfiltern ausgestattet war. Die Einzelbilder wurden mit einer digitalen CCD-Kamera (Sensicam qe, Pixelgröße 6,4 μm , PCO) unter der Verwendung eines 60-fach Objektivs (Nikon, Öl, NA 1,45) aufgenommen. Die Steuerung des Mikroskopes und die Datenanalyse erfolgte mithilfe der Softwarepakete *Live Acquisition* (TILL Photonics) bzw. *Offline Analysis* (TILL Photonics). Die t-Tests der FRAP-Experimente wurden mit der Software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) als Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

4.2.6.1 Analyse der lateralen Diffusion auf lebenden BSF-Trypanosomen

Um die laterale Diffusion des VSG in der Plasmamembran der BSF-Trypanosomen zu analysieren, wurden die Proteine der Zelloberfläche mit der in Kapitel 4.2.2.5 beschriebenen Methode markiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Gelatine immobilisiert, siehe Kapitel 4.2.2.7. Die Temperatur der Probekammer wurde auf konstant 20 °C eingestellt. Es wurden 10 Bilder vor dem Bleichen (I_{Vor}) und, abhängig von der Halbwertszeit der Fluoreszenzrückkehr (τ), bis zu 150 Bilder nach dem Bleichen ($I_{FRAP}(t)$), in einem zeitlichen Intervall von 500 ms aufgenommen. Auf der Zelloberfläche wurde die Fluoreszenz in einem linienförmigen Bereich ($I_{FRAP}(t)$) durch einen Laserimpuls mit

20 ms Dauer und 25 % Laserintensität ausgebleicht. Die Breite des ausgebleichten Bereiches (2 X) wurde unter Zuhilfenahme der Analyse eines Intensitätsverlaufes, orthogonal zu der ausgebleichten Region, bestimmt. Das aufnahmebedingte Bleichen wurde mit Hilfe eines Ganzzell (I_{Gesamt}) Bereiches von Interesse (ROI) und einem Hintergrund-ROI ($I_{Hintergrund}$) durch eine doppelte Normierung nach Phair *et al.* (4.3) korrigiert [79]. Im Anschluss wurde eine Anpassung einer einfach exponentiellen Funktion (4.4) an die korrigierten und normierten FRAP-Daten durchgeführt. Durch die Anpassung wurden die Werte τ (4.4) und MF (4.5) ermittelt. Aus τ und dem zuvor bestimmten X^2 konnte mit Hilfe der Formel (4.6) D bestimmt werden.

$$I_{FRAP-norm}(t) = \frac{I_{GesamtVor}}{I_{Gesamt}(t) - I_{Hintergrund}(t)} * \frac{I_{FRAP}(t) - I_{Hintergrund}(t)}{I_{FRAPVor}} \quad (4.3)$$

$$I(t) = y_0 + Ae^{-\tau * t} \quad (4.4)$$

$$MF = \frac{-A}{1 - (y_0 + A)} \quad (4.5)$$

$$D = \frac{X^2}{4 * \tau} \quad (4.6)$$

4.2.6.2 Bestimmung der lateralen Diffusion in artifiziellen Membranen

Die Bestimmung der lateralen Diffusion in artifiziellen Membranen wurde ebenso mit der FRAP-Technik durchgeführt. Die Probenkammer wurde auf eine Temperatur von konstant 20 °C eingestellt. Es wurde eine kreisförmige ROI mit einem Radius von 5 µm ausgebleicht. Die Dauer und Intensität des Laserpulses betrug 100 ms und 20-30 %. Es wurden 10 Bilder vor dem Bleichen (I_{Vor}) und, abhängig von der Halbwertszeit der Fluoreszenz-Wiederkehr (τ), bis zu 150 Bilder nach dem Bleichen ($I_{FRAP}(t)$), in einem zeitlichen Intervall von 2000 ms aufgenommen. Die Korrektur des aufnahmevermittelten Bleichens und die nachfolgende Analyse der Daten wurde, basierend auf der Arbeit von Soumpasis *et al.*, mithilfe eines ungebleichten Bereiches ($I_{base}(t)$) durchgeführt [82]. Die Normierung der Daten erfolgte per doppelter Normierung mit den Formeln 4.7 und 4.8. Die Funktion 4.9 wurde an die Daten angepasst, I_0 und I_1 stehen für Bessel-Funktionen der ersten und zweiten Ordnung. A in Gleichung 4.9 entspricht der MF. Die Werte für D wurden mit Hilfe der Gleichungen 4.10 bestimmt. w^2 beschreibt den Radius der ausgebleichtenen ROI.

$$I_{FRAP-norm}(t) = \frac{I_{FRAP}(t) - I_{base}(t)}{I_{FRAP_{Vor}}} \quad (4.7)$$

$$I_{FRAP-dnorm}(t) = \frac{I_{FRAP-norm}(t)}{I_{FRAP-Vor} - I_{FRAP-Bleichen}} \quad (4.8)$$

$$f = A * e^{\frac{2\tau}{t}} [I_0(2\tau/t) + I_1(2\tau/t)] \quad (4.9)$$

$$D = \frac{w^2}{\tau} \quad (4.10)$$

Abbildungsverzeichnis

1.1	Verbreitung und Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i> sp. . . .	5
1.2	Grundlagen der Pathogenität von Trypanosomen	6
1.3	Vereinfachter Aufbau eines Blutstromform-Trypanosoms und des VSG-Mantels	7
1.4	Illustration der Antigenen Variation	8
1.5	Illustration der <i>antibody clearance</i>	9
1.6	Zelluläre Membranen	12
1.7	Typen der Membranverankerung	14
1.8	Das Saffman-Delbrück Model	16
2.1	Wachstumskurven von BSF-Trypanosomen nach Immobilise- rung in Gelatine	25
2.2	FRAP-Experiment an einem immobilisierten BSF-Trypanosom	28
2.3	FRAP-Messung an einem osmotisch-geschwollenen BSF- Trypanosom	32
2.4	Die Diffusion im VSG-Mantel ist in der Nähe des Diffusions- schwellenwertes	37
2.5	Einfluss verschiedener Konzentrationen von nicht-VSG Protei- nen auf die Diffusion des mfVSG	39
2.6	Diffusion des mfVSG in homogenen und heterogenen Protein- proben	40
2.7	Analyse der Diffusion des MITat1.4 Δ Glykan-VSG	43
2.8	Analyse der Diffusion des MITat1.6 Δ Glykan-VSG	44
2.9	N-Glykosylierung beeinflusst den Diffusionsschwellenwert des VSG in artifiziellen Membranen	46

2.10	Der Effekt der N-Glykane des VSG kann von nicht-VSG Proteinen überlagert werden	48
2.11	Die Verkleinerung der Proteindomäne führt zu einer Vergrößerung der Diffusionskoeffizienten des mfVSG in artifiziellen Membranen	51
2.12	Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung der Diffusionskoeffizienten des VSG in artifiziellen Membranen	54
3.1	Größenvergleich von GFP, dsRED und mfVSG	71
3.2	Einfluss der Proteinhöhe auf die Diffusion bei verschiedenen Proteindichten - Molekuldynamik-Simulationen	74
4.1	HPLC Stufengradient	96
4.2	Grafische Darstellung des verwendeten HPLC Stufengradient	96

Tabellenverzeichnis

2.1	Die Diffusion verschiedener VSG ist in lebenden Trypanosomen sehr ähnlich	27
2.2	Die Diffusion verschiedener VSG in einem Mosaik-Mantel ist kompatibel	30
2.3	Intrazelluläre Strukturen üben potentiell einen Einfluss auf die Diffusion des VSG aus	31
2.4	Membranform-VSG ist in artifiziellen Membranen hoch mobil .	34
2.5	N-Glykane erhalten die Mobilität des VSG in lebenden Trypanosomen	42
2.6	Die Verkleinerung der Proteindomäne des VSG führt zu einer Vergrößerung der Diffusionskoeffizienten auf lebenden Trypanosomen	50
2.7	Die Vergrößerung der Proteindomäne führt zu einer Verkleinerung der Diffusionskoeffizienten des VSG in lebenden Trypanosomen	52
3.1	Die Überexpression des VSG reduziert dessen Diffusionskoeffizienten	61
3.2	Strömungswiderstände der verschiedenen mfVSG	69
4.1	Lipide, Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen in mg / mL	83
4.2	NHS- und Sulfo-NHS Verbindungen, Anwendung, Konzentrationen der Stammlösungen und finale Konzentrationen	83
4.3	<i>T. brucei</i> Blutstromform Zelllinien, Antibiotika und Konzentrationen	86
4.4	Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
D	Diffusionskoeffizient
g	Erdschwerebeschleunigung
IMDM	<i>Iscone's Modified Dulbecco's Medium</i>
BSF	Blutstromform
bzw	beziehungsweise
C-term	Carboxy-terminal
ca	circa
DOL	Farbstoff-zu-Protein Verhältnis
ES	engl.: <i>Expression site</i> , Ort der Expression
FCS	Fetales Kälberserum
FRAP	Fluoreszenz Wiederkehr nach irreversiblen Photobleichen
Gew. %	Gewicht Prozent
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GPI-PLC	GPI spezifische Phospholipase C
h	Stunde
HAT	Humane Afrischanische Trypanosomiasis
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
ISG	engl.: <i>Invariant Surface Glycoprotein</i> , invariantes Oberflächenglykoprotein
K.O.	<i>Knock Out</i>
L	Liter
MF	Mobile Fraktion, beschreibt den Anteil der mobilen Proteine in dem untersuchten Bereich
mfVSG	Membranform-VSG

MG	Molekulargewicht
min	Minute
mp-H ₂ O	Reinstwasser
N-Glyk	N-Glykosylierung
PAGE	<i>Poly-Acrylamid-Gel-Electrophoresis</i>
PBS	engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PPD	Protein-Lipid-Detergenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
U / min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol. %	Volumen Prozent
VSG	engl.: <i>Variable Surface Glycoprotein</i> , variables Oberflächenglykoprotein
wt	Wildtyp
üN	Über Nacht

Literaturverzeichnis

- [1] D. Steverding. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors*, 1(1):3, 2008.
- [2] F LL Griffith. Hieratic Papyri from Kahun and Gurob (Principally of the Middle Kingdom). Gilbert and Rivington, January 1898.
- [3] S. Winkle. Geisseln der Menschheit. Artemis & Winkler Verlag, 2005.
- [4] Sir David Bruce. Preliminary Report on the Tsetse Fly Disease Or Nagana, in Zululand, 1895.
- [5] Francis E G Cox. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(2):231–245, May 2004.
- [6] Reto Brun and Johannes Blum. Human African trypanosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2):261–273, June 2012.
- [7] P J Johnson, J M Kooter, and P Borst. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*, 51(2):273–281, October 1987.
- [8] William J Murphy, Kenneth P Watkins, and Nina Agabian. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: Evidence for Trans splicing. *Cell*, 47(4):517–525, November 1986.
- [9] J E Feagin, D P Jasmer, and K Stuart. Developmentally regulated addition of nucleotides within apocytochrome b transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 49(3):337–345, May 1987.
- [10] M L Kable, S D Seiwert, S Heidmann, and K Stuart. RNA Editing: A Mechanism for gRNA-Specified Uridylate Insertion into Precursor mRNA. *Science (New York, NY)*, 273(5279):1189–1195, August 1996.

- [11] B Sollner-Webb. Trypanosome RNA Editing—Resolved. *Science (New York, NY)*, 273(5279):1182–1183, August 1996.
- [12] G A Cross. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 71(3):393–417, December 1975.
- [13] M L Cardoso de Almeida, L M Allan, and M J Turner. Purification and properties of the membrane form of variant surface glycoproteins (VSGs) from *Trypanosoma brucei*. *The Journal of protozoology*, 31(1):53–60, February 1984.
- [14] M A Ferguson, M G Low, and G A Cross. Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry*, 260(27):14547–14555, November 1985.
- [15] W Cantrell. Mutation Rate and Antigenic Variation in *Trypanosoma Equiperdum*. *Journal of Infectious Diseases*, 103(3):263–271, November 1958.
- [16] K Vickermann and A G Luckins. Localization of Variable Antigens in the Surface Coat of *Trypanosoma brucei* using Ferritin Conjugated Antibody. *Nature*, 224(5224):1125–1126, December 1969.
- [17] G A Cross. Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 18(4):283–291, April 1996.
- [18] Gustavo A Zelada-Guillén, Ailis Tweed-Kent, Moritz Niemann, H Ulrich Göringer, Jordi Riu, and F Xavier Rius. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. *Cell*, 41:366–371, March 2013.
- [19] R Ross and D Thomson. A Case of Sleeping Sickness Studied by Precise Enumerative Methods: Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 82(557):411–415, July 1910.
- [20] K Vickermann. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *Journal of cell science*, 5(1):163–193, July 1969.

- [21] P J Bridgen, G A M Cross, and P J Bridgen. N-terminal amino acid sequences of variant-specific surface antigens from *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 1976.
- [22] G A Cross. Isolation, structure and function of variant specific surface antigens. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, pages 1–14, November 1977.
- [23] G A Cross. Release and purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Journal of cellular biochemistry*, 24(1):79–90, 1984.
- [24] G Allen, Gurnett, L.P., and G A Cross. Complete amino acids sequence of a variant surface glycoprotein (VSG 117) from *Trypanosoma brucei*. *Journal of molecular biology*, 157(3):527, 1982.
- [25] C A Auffret and M J Turner. Variant specific antigens of *Trypanosoma brucei* exist in solution as glycoprotein dimers. *The Biochemical journal*, 193(2):647–650, January 1981.
- [26] M Carrington, N Miller, M Blum, I Roditi, D Wiley, and M Turner. Variant specific glycoprotein of *trypanosoma brucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues. *Journal of molecular biology*, 221(3):823–835, October 1991.
- [27] T O Frommel, A Seyfang, and A E Balber. *Trypanosoma brucei* spp.: cleavage of variant specific and common glycoproteins during exposure of live cells to trypsin. *Experimental parasitology*, 66(2):213–224, August 1988.
- [28] P Metcalf, J A Down, M J Turner, and D C Wiley. Crystallization of amino-terminal domains and domain fragments of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei brucei*. *The Journal of biological chemistry*, 263(32):17030–17033, November 1988.
- [29] J G Johnson. Selective Cleavage of Variant Surface Glycoproteins from *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 1979.
- [30] A Mehlert, N Zitzmann, J M Richardson, A Treumann, and M A Ferguson. The glycosylation of the variant surface glycoproteins and procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 91(1):145–152, March 1998.

- [31] Ziv Roth, Galit Yehezkel, and Isam Khalaila. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012(2):1–10, 2012.
- [32] Tetley L, K Vickermann, and S K Mooloo. Absence of a surface coat from metacyclic *Trypanosoma vivax*: possible implications against vivax trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, January 1981.
- [33] A Ferrante and A C Allison. Natural agglutinins to African trypanosomes. *Parasite Immunology*, 5(6):539–546, November 1983.
- [34] J David Barry and Richard Mc Culloch. Antigenic variation in trypanosomes: Enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. In *Elsevier*, pages 1–70. Elsevier B.V., 2001.
- [35] Jesse E Taylor and Gloria Rudenko. Switching trypanosome coats: what’s in the wardrobe? *Trends in genetics : TIG*, 22(11):614–620, November 2006.
- [36] Etienne Pays. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends in parasitology*, 21(11):517–520, November 2005.
- [37] P Webster, D C Russo, and S J Black. The interaction of *Trypanosoma brucei* with antibodies to variant surface glycoproteins. *Journal of cell science*, 96 (Pt 2):249–255, June 1990.
- [38] Markus Engstler, Thomas Pfohl, Stephan Herminghaus, Michael Boshart, Geert Wiegertjes, Niko Heddergott, and Peter Overath. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell*, 131(3):505–515, November 2007.
- [39] Michael Edidin. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5):414–418, May 2003.
- [40] I Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1. *Journal of the American Chemical Society*, 39(9):1848–1906, 1917.
- [41] E Gorter. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, 41(4):439–443, March 1925.
- [42] James Frederic Danielli and Hugh Davson. A contribution to the theory of permeability of thin films. *Parasite Immunology*, 5(4):495–508, February 1935.

- [43] L D Frye and M Edidin. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *Journal of cell science*, 7(2):319–335, September 1970.
- [44] S J Singer and G L Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, NY)*, 175(4023):720–731, February 1972.
- [45] Helmut Kirchhoff, Silvia Haferkamp, John F Allen, David B A Epstein, and Conrad W Mullineaux. Protein diffusion and macromolecular crowding in thylakoid membranes. *Plant physiology*, 146(4):1571–1578, April 2008.
- [46] Donald M Engelman. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature cell biology*, 438(7068):578–580, December 2005.
- [47] A J Verkleij, R F A Zwaal, B Roelofsen, P Comfurius, D Kastelijn, and L L M van Deenen. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Cell*, 323(2):178–193, October 1973.
- [48] Mark S Bretscher. Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nature*, 236(61):11–12, March 1972.
- [49] William M Oldham and Heidi E Hamm. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 9(1):60–71, January 2008.
- [50] P Piccardo, J C Manson, D King, B Ghetti, and R M Barron. Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11):4712–4717, March 2007.
- [51] Pauline M Rudd, Anthony H Merry, Mark R Wormald, and Raymond A Dwek. Glycosylation and prion protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5):578–586, 2002.
- [52] Martino Calamai and Francesco S Pavone. Partitioning and confinement of GM1 ganglioside induced by amyloid aggregates. *FEBS letters*, March 2013.
- [53] A Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560, 1905.
- [54] Reinhard Lipowsky, Erich Sackmann, and A J Hoff. Handbook of biological physics - Chapter 6. Elsevier, 1995.

- [55] P G Saffman and M Delbrück. Brownian motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8):3111–3113, August 1975.
- [56] B D Hughes, B A Pailthorpe, and L R White. The translational and rotational drag on a cylinder moving in a membrane. *Journal of Fluid Mechanics*, 110(-1):349, March 1980.
- [57] R Merkel, E Sackmann, and E Evans. Molecular friction and epitactic coupling between monolayers in supported bilayers. *Journal de Physique*, 50(12):1535–1555, 1989.
- [58] Y Gambin, R Lopez-Esparza, M Reffay, E Sierrecki, N S Gov, M Genest, R S Hodges, and W Urbach. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7):2098–2102, February 2006.
- [59] M P Sheetz, M Schindler, and D E Koppel. Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature*, 285(5765):510–511, June 1980.
- [60] J D Corbett, P Agre, J Palek, and D E Golan. Differential control of band 3 lateral and rotational mobility in intact red cells. *Journal of Clinical Investigation*, 94(2):683–688, August 1994.
- [61] Leann Tilley, Gerard B Nash, Graham L Jones, and William H Sawyer. Decreased rotational diffusion of band 3 in melanesian ovalocytes from Papua, New Guinea. *The Journal of membrane biology*, 121(1):59–66, April 1991.
- [62] A Che, R J Cherry, L H Bannister, and A R Dluzewski. Aggregation of band 3 in hereditary ovalocytic red blood cell membranes. Electron microscopy and protein rotational diffusion studies. *Journal of cell science*, 105 (Pt 3):655–660, June 1993.
- [63] D E Koppel, M P Sheetz, and M Schindler. Matrix control of protein diffusion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6):3576–3580, June 1981.
- [64] M J Saxton. Lateral diffusion in a mixture of mobile and immobile particles. A Monte Carlo study. *Biophysical journal*, 58(5):1303–1306, November 1990.

- [65] S Barbour and M Edidin. Cell-specific constraints to the lateral diffusion of a membrane glycoprotein. *Journal of cellular physiology*, 150(3):526–533, February 1992.
- [66] R Høiberg-Nielsen, P Westh, L K Skov, and L Arleth. Interrelationship of steric stabilization and self-crowding of a glycosylated protein. *Biophysical journal*, 97(5):1445–1453, September 2009.
- [67] C Vasquez, R A Siddiqui, A P Moreno, and E J Berbari. A fibroblast-myocyte model which accounts for slow conduction and fractionated electrograms in infarct border zones. *Computers in Cardiology. Proceedings*, pages 245–248, September 2002.
- [68] A Ishihara, Y Hou, and K Jacobson. The Thy-1 antigen exhibits rapid lateral diffusion in the plasma membrane of rodent lymphoid cells and fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987.
- [69] L M Smith, J W Parce, B A Smith, and H M Mc Connell. Antibodies bound to lipid haptens in model membranes diffuse as rapidly as the lipids themselves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4177–4179, September 1979.
- [70] F Zhang, B Crise, B Su, Y Hou, JK Rose, A Bothwell, and K Jacobson. Lateral diffusion of membrane-spanning and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins: toward establishing rules governing the lateral mobility of membrane proteins. *Journal of Cell Biology*, 115(1):75–84, 1991.
- [71] Yasuhiro M Umemura, Marija Vrljic, Stefanie Y Nishimura, Takahiro K Fujiwara, Kenichi G N Suzuki, and Akihiro Kusumi. Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking. *Biophysical journal*, 95(1):435–450, July 2008.
- [72] R Bülow, P Overath, and J Davoust. Rapid lateral diffusion of the variant surface glycoprotein in the coat of *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*, 27(7):2384–2388, April 1988.
- [73] Niko Heddergott, Timothy Krüger, Sujin B Babu, Ai Wei, Erik Stellamanns, Sravanti Uppaluri, Thomas Pfohl, Holger Stark, and Markus Engstler. Trypanosome Motion Represents an Adaptation to the Crowded Environment of the Vertebrate Bloodstream. *PLoS pathogens*, 8(11):e1003023, November 2012.

- [74] A A Brian and H M McConnell. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19):6159–6163, October 1984.
- [75] A Albersdörfer, T Feder, and E Sackmann. Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study. *Biophysical journal*, 73(1):245–257, July 1997.
- [76] E M Erb, K Tangemann, B Bohrmann, B Müller, and J Engel. Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*, 36(24):7395–7402, June 1997.
- [77] P Y Chan, M B Lawrence, M L Dustin, L M Ferguson, D E Golan, and T A Springer. Influence of receptor lateral mobility on adhesion strengthening between membranes containing LFA-3 and CD2. *Journal of Cell Biology*, 115(1):245–255, October 1991.
- [78] Helen P Price, Lorna MacLean, Joanne Marrison, Peter J O’Toole, and Deborah F Smith. Validation of a new method for immobilising kinetoplastid parasites for live cell imaging. *Molecular and biochemical parasitology*, 169(1):66–69, January 2010.
- [79] Robert D Phair, Stanislaw A Gorski, and Tom Misteli. Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy. *Methods in enzymology*, 375:393–414, 2004.
- [80] J L Muñoz-Jordán, K P Davies, and G A M Cross. Stable expression of mosaic coats of variant surface glycoproteins in *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, NY)*, pages 1795–1796, 1996.
- [81] Helena Webb, Roisin Burns, Louse Ellis, Nicola Kimblin, and M Carrington. Developmentally regulated instability of the gpi-plc mrna is dependent on a short-lived protein factor. *Nucleic Acids Research*, 33(1503–1512), 2005.
- [82] D M Soumpasis. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical journal*, 41(1):95–97, 1983.
- [83] Schubert, Barmann, Rusp, Granzer, and Tanaka. Diffusion of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored bovine prion protein (PrP^c) in supported lipid membranes studied by single-molecule and complementary ensemble methods. *Journal of Membrane Science*, 321(1):8–8, July 2008.

- [84] P Overath, M Chaudhri, D Steverding, and K Ziegelbauer. Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology today (Personal ed)*, 10(2):53–58, February 1994.
- [85] Daniel J Bridges, Andrew R Pitt, Orla Hanrahan, Kiva Brennan, H Paul Voorheis, Pawel Herzyk, Harry P de Koning, and Richard J S Burchmore. Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics*, 8(1):83–99, January 2008.
- [86] Marius Glogger. Untersuchung der lateralen Diffusion Glykosylphosphatidylinositol-verankerter Proteine am Beispiel des variablen Oberflächenglykoproteins . Master’s thesis, Universität Würzburg, March 2013.
- [87] Mark Howarth, Daniel J-F Chinnapen, Kimberly Gerrow, Pieter C Dorrestein, Melanie R Grandy, Neil L Kelleher, Alaa El-Husseini, and Alice Y Ting. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nature methods*, 3(4):267–273, April 2006.
- [88] Akihiro Kusumi, Chieko Nakada, Ken Ritchie, Kotono Murase, Kenichi Suzuki, Hideji Murakoshi, Rinshi S Kasai, Junko Kondo, and Takahiro Fujiwara. Paradigm Shift Of The Plasma Membrane Concept From The Two-Dimensional Continuum Fluid To The Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2005.
- [89] D W Tank, E S Wu, and W W Webb. Enhanced molecular diffusibility in muscle membrane blebs: release of lateral constraints. *The Journal of cell biology*, 92(1):207–212, 1982.
- [90] Akihiro Kusumi, Hiroshi Ike, Chieko Nakada, Kotono Murase, and Takahiro Fujiwara. Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Seminars in Immunology*, 17(1):19–19, January 2005.
- [91] F Zhang, G M Lee, and K Jacobson. Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 15(9):579–588, September 1993.

- [92] A A Schneider, H U HU Lutz, R R Marugg, P P Gehr, and T T Seebeck. Spectrin-like proteins in the paraflagellar rod structure of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science*, 90 (Pt 2):307–315, May 1988.
- [93] A Hemphill, T Seebeck, and D Lawson. The *Trypanosoma brucei* cytoskeleton: ultrastructure and localization of microtubule-associated and spectrin-like proteins using quick-freeze, deep-etch, immunogold electron microscopy. *Journal of structural biology*, 107(3):211–220, November 1991.
- [94] Rudolf Koopmann, Karolina Cupelli, Lars Redecke, Karol Nass, Daniel P DePonte, Thomas A White, Francesco Stellato, Dirk Rehders, Mengning Liang, Jakob Andreasson, Andrew Aquila, Sasa Bajt, Miriam Barthelmess, Anton Barty, Michael J Bogan, Christoph Bostedt, Sébastien Boutet, John D Bozek, Carl Caleman, Nicola Coppola, Jan Davidsson, R Bruce Doak, Tomas Ekeberg, Sascha W Epp, Benjamin Erk, Holger Fleckenstein, Lutz Foucar, Heinz Graafsma, Lars Gumprecht, Janos Hajdu, Christina Y Hampton, Andreas Hartmann, Robert Hartmann, Günter Hauser, Helmut Hirsemann, Peter Holl, Mark S Hunter, Stephan Kassemeyer, Richard A Kirian, Lukas Lomb, Filipe R N C Maia, Nils Kimmel, Andrew V Martin, Marc Messerschmidt, Christian Reich, Daniel Rolles, Benedikt Rudek, Artem Rudenko, Ilme Schlichting, Joachim Schulz, M Marvin Seibert, Robert L Shoeman, Raymond G Sierra, Heike Soltau, Stephan Stern, Lothar Strüder, Nicusor Timneanu, Joachim Ullrich, Xiaoyu Wang, Georg Weidenspointner, Uwe Weierstall, Garth J Williams, Cornelia B Wunderer, Petra Fromme, John C H Spence, Thilo Stehle, Henry N Chapman, Christian Betzel, and Michael Duszynski. In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology. *Nature methods*, 9(3):259–262, January 2012.
- [95] Angela Mehlert, Charles S Bond, and Michael A J Ferguson. The glycoforms of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein and molecular modeling of a glycosylated surface coat. *Glycobiology*, 12(10):607–612, October 2002.
- [96] Olga Vagin, Jeffrey A Kraut, and George Sachs. Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(3):F459–69, March 2009.
- [97] Marc C Patterson. Metabolic mimics: the disorders of N-linked glycosylation. *Seminars in pediatric neurology*, 12(3):144–151, September 2005.

- [98] B Imperiali and S E O'Connor. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current opinion in chemical biology*, 3(6):643–649, December 1999.
- [99] Radek Macháň and Martin Hof. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *BBA-Biomembranes*, 1798(7):1377–1391, July 2010.
- [100] Motomu Tanaka, Joachim Hermann, Ilka Haase, Markus Fischer, and Steven G Boxer. Frictional drag and electrical manipulation of recombinant proteins in polymer-supported membranes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(10):5638–5644, May 2007.
- [101] H Hertz. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, 1882.
- [102] D M Reinitz, B D Aizenstein, and J M Mansfield. Variable and conserved structural elements of trypanosome variant surface glycoproteins. *Molecular and biochemical parasitology*, 51(1):119–132, March 1992.
- [103] Allison D Dupuy and Donald M Engelman. Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8):2848–2852, February 2008.
- [104] Anton Rietveld and Kai Simons. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376(3):467–479, November 1998.
- [105] D Lingwood and K Simons. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (New York, NY)*, 327(5961):46–50, December 2009.
- [106] Pranav Sharma, Rajat Varma, R C Sarasij, Ira, Karine Gousset, G Krishnamoorthy, Madan Rao, and Satyajit Mayor. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*, 116(4):577–589, February 2004.
- [107] U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, August 1970.
- [108] Anne Hermann. Optimisation of *Trypanosoma brucei* cell cultivation. Master's thesis, TU Darmstadt, August 2008.

- [109] M W Clarke, R W Olafson, and T W Pearson. Rapid preparative scale purification of myristylated variant surface glycoproteins from African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology*, 17(1):19–34, October 1985.
- [110] B Hu, D Finsinger, K Peter, Z Guttenberg, M Bärmann, H Kessler, A Escherich, L Moroder, J Böhm, W Baumeister, S F Sui, and E Sackmann. Intervesicle cross-linking with integrin alpha IIb beta 3 and cyclic-RGD-lipopeptide. A model of cell-adhesion processes. *Biochemistry*, 39(40):12284–12294, October 2000.
- [111] G R Bartlett. Phosphorus assay in column chromatography. *The Journal of biological chemistry*, 1959.
- [112] R L Anderson and S Davis. An organic phosphorus assay which avoids the use of hazardous perchloric acid. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 121(1):111–116, May 1982.
- [113] Christoph G Grünfelder, Markus Engstler, Frank Weise, Heinz Schwarz, York-Dieter Stierhof, Michael Boshart, and Peter Overath. Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(8):547–559, August 2002.

A Anhang

A.1 Erklärung gemäß §4 (3) der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Diese Dissertation wurde betreut durch Prof. Dr. Markus Engstler und hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren bereits vorgelegen. Ein Verzeichnis der bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten liegt bei.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich früher außer dem Studienabschluss an der TU Darmstadt mit dem Dipl. Biol. keine weiteren akademischen Grade erworben habe, oder zu erwerben versucht habe.

Andreas J. W. Hartel

A.2 Publikationsliste

Andreas J. W. Hartel, Nicola G. Jones, Anne Hermann, Wasim Abuillan, Motomu Tanaka, and Markus Engstler. N-glycosylation enables high lateral mobility of GPI-proteins at a molecular crowding threshold. Eingereicht, Manuskript beiliegend.

Andreas J. W. Hartel, Marius Glogger, Nicola G. Jones, Susanne Fenz, Gernot Guigas, Matthias Weiss, and Markus Engstler. The molecule size determines the lateral diffusion of GPI-anchored proteins. In Vorbereitung.

Wasim Abuillan, Alexei Vorobiev, Andreas Hartel, Nicola G Jones, Markus Engstler, and Motomu Tanaka. Quantitative determination of the lateral density and intermolecular correlation between proteins anchored on the membrane surfaces using grazing incidence small-angle X-ray scattering and grazing incidence X-ray fluorescence. *J Chem Phys*, 137(20), November 2012.

John M. Harrington, Chris Scelsi, Andreas Hartel, Nicola G. Jones, Markus Engstler, Paul Capewell, Annette MacLeod, Stephen Hajduk. Novel African Trypanocidal Agents: Membrane Rigidifying Peptides. *PLOS-One*, doi:10.1371, September 2012.

Thomas Guthmann, Charlotte von Chappuis, Jörg Balss, Andreas Hartel, Tobias Meckel, Adam Bertl, James L. Van Etten, Anna Moroni, Gerhard Thiel. Mutations in the C-Terminal Transmembrane Domain Shift Sorting of a Small K⁺ Channel from Mitochondria to Plasma Membrane. 2013, eingereicht bei Biochemistry. Manuskript beiliegend.

Jens-Uwe Sutter, Christian Sieben, Andreas Hartel, Cornelia Eisenach, Gerhard Thiel, and Michael R. Blatt. Abscisic Acid Triggers the Endocytosis of the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel and Its Recycling to the Plasma Membrane. *Current Biology*, 17, 1396–1402, August 2007.

Astrid Elter, Andreas Hartel, Christian Sieben, Brigitte Hertel, Elke Fischer-Schliebs, Ulrich Lüttge, Anna Moroni, and Gerhard Thiel. A Plant Homolog of Animal Chloride Intracellular Channels (CLICs) Generates an Ion Conductance in Heterologous Systems. *JCB*, 282 (12), pp.8786–8792, März 2007.

A.4 Danksagung

Markus Engstler, der mir mehr als einmal die Chance gegeben hat das Projekt zu bearbeiten und mich in meiner Entwicklung ausdauernd unterstützt hat.

Markus Sauer für die bereitwillige Begutachtung meiner Arbeit.

Motomu Tanaka und Wasim Abuillan für die spannende Kollaboration mit lehrreichen und gastfreundlichen Aufenthalten in Heidelberg.

Matthias Weiss und Gernot Guigas möchte ich für die Kollaboration und die wunderschönen Simulationen danken .

Nicola Jones für die Betreuung der Arbeit und der aufopfernde Initiative das Schiff hart am Wind zu halten.

Susanne Fenz für die hilfreichen und anregenden Diskussionen.

Der gesamten Zoo1 für das wunderbare Arbeitsklima mit all seinen Facetten. Vor allem möchte ich insbesondere denen Danken, die durch ihre Arbeit unsere Arbeit erst ermöglichen. Ganz besonders möchte ich Elisabeth, Reinhild, Katrin und Ulli danken. Ohne euch würde der Laden nicht so laufen!

Gülcin, Zdenka und Janne für die neue angenehme Brise im Nordflügel.

Der AG Alzheimer/Benavente für die herzliche Aufnahme der Invasion aus Darmstadt.

Vor allem möchte ich meinen Doktor(anden)kollegen und liebgewonnenen Freunden Barti + Jamin, Marius, Murphy + Biene, Eva + Andi, Hannah + Sebastian, dem Brillo-Bär + der Kleinen und Christopher + Catarina für die zahlreichen und wundervollen Abende und Freitagnachmittage danken.

Klaro Diggi, bei dir möchte ich mich natürlich ganz besonders bedanken, tu ich aber nicht...Oi du Ratte.

Milena möchte ich danken, da du mir eine besonders große Stütze gewesen bist, als ich diese wirklich gebraucht habe. Ich wünsche dir auf deinem Weg viel Erfolg.

Meinen Eltern ohne deren Unterstützung ich nicht diese Worte hätte schreiben könne.