

Nachweis und Charakterisierung von Galaktosyltransferasen in *Trypanosoma brucei brucei*

Sabine Pingel, D. Mecke, M. Duszenko

Einleitung

Die afrikanischen Trypanosomen, die einen Teil ihres Lebenszyklus als Parasiten in der Blut- und Lympflüssigkeit des Menschen und anderer Vertebraten verbringen, sind in weiten Teilen Afrikas überall dort verbreitet, wo die Tsetse-Fliege beheimatet ist. Den Trypanosomen des Brucei-Komplexes kommt als Erreger der unbehandelt tödlich verlaufenden Schlafkrankheit des Menschen sowie wichtiger Viehseuchen große medizinische und wirtschaftliche Bedeutung zu.

Die Blutformen von *Trypanosoma brucei brucei* sind vollständig mit einem 12-15 nm dicken, elektronendichten Oberflächenmantel bedeckt (13). Dieser surface coat besteht aus ca. 10^7 Molekülen eines einzigen für jeden Trypanosomenklon charakteristischen Glykoproteins (VSG, variant surface glycoprotein) (3).

Aufgrund der Antigen-Variation der Trypanosomen (1) gilt die Entwicklung protektiver Impfstoffe gegenwärtig als aussichtslos. Umso wichtiger erscheint daher die Erforschung der Biosynthese der VSG-Moleküle, um hier eventuell Ansatzpunkte für spätere Therapiemöglichkeiten der Parasitosen zu liefern.

Die VSG-Moleküle sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 60.000 D, die mit einem glykosyl-phosphatidylinositol Anker an die Zellmembran gebunden sind (6). Alle bisher untersuchten varianten Oberflächenglykoproteine von *Trypanosoma brucei* enthalten in der C-terminalen Region der Polypeptidkette mindestens ein an Asn-X-Ser/Thr Gruppen N-glykosidisch geknüpft Glykan, das die Kohlenhydrate N-Acetylglucosamin, Mannose und Galaktose enthalten kann (7).

Für die Antigenvariante 117 von *Trypanosoma brucei brucei* konnte die komplette Struktur des Membranankers aufgeklärt werden (6), dessen Kohlenhydratanteil aus einem linearen Tetrasaccharidkern aus drei Mannose-Molekülen und einem nicht-acetylierten Glucosamin besteht. Das Glykan weist weiterhin zwischen zwei und vier Galaktose-Einheiten auf (6, 11).

Die Glykane des Glykoproteinteils und des Membranankers unterscheiden sich im Bindungstyp ihrer Kohlenhydratsequenzen. Die Synthese der N-Glykane erfolgt tunicamycin-sensitiv (5) und Galaktose steht in β -1, 4-glykosidischer Bindung zu N-Acetylglucosamin. Für die Übertragung der Galaktosereste existieren in Trypanosomen, wie in anderen Eukaryonten, vermutlich im Golgi-Apparat der Zellen lokalisierte β -Galaktosyltransferasen (12). Im VSG-Membrananker ist die Galaktose dagegen α -glykosidisch (Gal- α 1, 2-Gal; Gal- α 1, 6-Gal; Gal- α 1, 3-Man) gebunden (6, 11). Diese neuartigen Bindungstypen wurden bisher nur in Trypanosomen gefunden. Für die Übertragung dieser Galaktosemoleküle müssen daher auch spezielle Galaktosyltransferasen in den Trypanosomenzellen postuliert werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivitäten von Galaktosyltransferasen in verschiedenen Klonen von *Trypanosoma brucei brucei* nachzuweisen.

Material und Methoden

Trypanosomenstämme

Es wurden die klonierten Linien MITat (Moltano Institute Trypanozoon Antigen Type, Cambridge (GB)) 1.4, 1.5 und 1.6 (bzw. Antigenvarianten 117, 118 und 121) des *Trypanosoma brucei brucei* Stammes 427 verwendet (3). Der Klon AnTat 1.8 (Antwerp Trypanosome Antigen Type, Antwerpen) entstammt dem *Trypanosoma brucei brucei* Stamm EATRO 1125 (10).

Präparation der Trypanosomen

Die Trypanosomen wurden, wie anderorts beschrieben, aus dem Blut infizierter Ratten isoliert (3). Die Reinigung von sVSG wurde nach CROSS (4) durchgeführt.

UDP-Galaktose: Glykoprotein Galaktosyltransferase

Der Transfer von D-[¹⁴C] Galaktose von UDP-D-[¹⁴C] Galaktose auf Ovalbumin, sVSG oder TCA-unlösliche interne Akzeptoren wurde modifiziert nach STEIGER (12) in einem Reaktionsvolumen von 100 µl gemessen. 5-15 mg Trypanosomenproteine wurden in 100 mM Tris-HCL-Puffer (pH 7,7), 5 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0,02% NaN₃, 1,6% Triton-X-100, 1% Ovalbumin (bzw. 0,1% sVSG) und 0,05 µCi (> 200 mCi/mmol) UDP-D-[U-¹⁴C] Galaktose (Amersham Buchler, Braunschweig) bei 37° C inkubiert. Die Konzentration der Protease-Inhibitoren Chymostatin, Pepstatin und Leupeptin war jeweils 1 µM. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten (10-300 min) durch Zugabe von eiskalter TCA (10%) gestoppt. Die Präzipitate wurden auf Whatman GF/C Glass Microfibre Paper filtriert, mit TCA gefolgt von Essigsäure (eiskalt, 1%) gewaschen, getrocknet und in jeweils 5 ml PCS[®]-Szintillationsflüssigkeit (Amersham Buchler, Braunschweig) gezählt.

Elektrophorese, Fluorographie, Proteinbestimmung

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten nach LAEMMLI (9). Die Gele wurden 30 min in Amplify[®] (Amersham Buchler, Braunschweig) getränkt, getrocknet und auf Kodak X-Omat AR 5 Röntgenfilm bei -70° C exponiert. Die Proteinbestimmungen wurden nach BRADFORD (2) mit dem Bio-RAD Proteinassay (Bio-RAD, München) durchgeführt.

Ergebnisse

Die spezifische Aktivität der UDP-Galaktose: Glykoprotein Galaktosyltransferase wurde in verschiedenen *T. brucei* Klonen untersucht. Den mit Detergens lysierten Trypanosomenzellen wurde radioaktiv markierte UDP-Galaktose (die aktivierte Form der Galaktose) angeboten und die β-glykosidische Übertragung der Galaktose auf extern zugesetztes Ovalbumin gemessen. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, wurden Klone mit reziprokem Galaktose-Vorkommen in den VSG-Molekülen untersucht. Während der Klon 118 Galaktose ausschließlich in der β-Form in den N-Glykanen aufweist, tritt in den Klonen 117, 121 und AnTat 1.8 lediglich α-glykosidisch gebundene Galaktose in den VSG-Membranankern auf. Die spezifischen Aktivitäten der β-Galaktosyltransferase in den vier Klonen in Abhängigkeit von verschiedenen Substraten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei Verwendung von Ovalbumin ließ sich die spezifische Aktivität in

TABELLE 1
Galaktose-Vorkommen in VSG-Molekülen

<i>T. brucei</i> clone	N-glycosylation sites	membrane anchor
118	+	—
117	—	+
ANTat 1.8	—	+
121	—	+

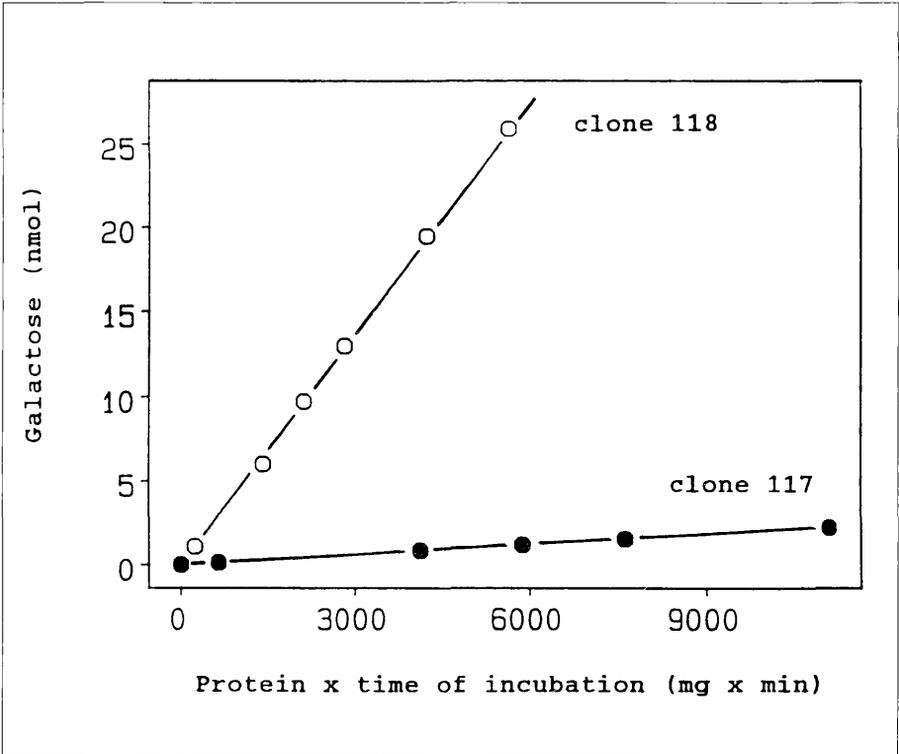


Abb. 1:

Kinetik der β -Galaktosyltransferase von *Trypanosoma brucei*. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten der *T. brucei* Klone 117 und 118 bei Verwendung von Ovalbumin als Galaktoseakzeptor.

den Trypanosomen des Klones 118 mit $4,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ bestimmen. Die Aktivität des Enzyms lag damit etwa 10fach über der des entsprechenden Experimentes mit Klon 117 (Abb. 1). Die beiden dem Klon 117 entsprechenden Klone AnTat 1.8 und 121 zeigen mit $0,6$ bzw. $0,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ebenfalls nur etwa ein Zehntel der in Klon 118 gefundenen Aktivität. Als Substrat der für die Klone 117, 121 und AnTat 1.8 zu postulierenden α -Galaktosyltransferasen sollte sich das sVSG 118 eignen, da es über einen Membrananker verfügt, der zwar galaktosefrei aber in der Kernstruktur völlig identisch ist. Für den Klon 117 ergab sich kein Transfer der UDP-Galaktose auf das Substrat sVSG 118. Die Aktivitäten der Klone 121 und AnTat 1.8 lagen für das Substrat sVSG

118 mit $0,3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ in der Größenordnung von Kontrolleexperimenten, bei denen kein externes Akzeptorprotein verwendet wurde. Dargestellt ist in Tabelle 2 die Übertragung der UDP-Galaktose auf interne Trypanosomenproteine für den Klon 117 ($0,2 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

Die dominierende Rolle der VSG-Moleküle als Glykoproteine in der Trypanosomenzelle wird bei Betrachtung des Klones 118 noch einmal deutlich. Hier lagen die β -Galaktosyltransferase Aktivitäten (unabhängig davon ob den Zellen sVSG 117, das homologe sVSG 118 oder gar kein externes Substrat angeboten wurde) um $3,5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die Aktivitäten waren damit nur geringfügig niedriger als mit Ovalbumin als Galaktose-Akzeptor. Es war daher fraglich, ob bei dem Klon 118 überhaupt Ovalbumin das bevorzugte Substrat der β -Galaktosyltransferase ist, oder ob hauptsächlich interne Trypanosomenproteine galaktosyliert werden. Die Abbildung 2 zeigt ein SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese-Gel und dessen Fluorographie. Es zeigt sich, daß lediglich VSG sichtbar radioaktiv markiert ist.

Diskussion

Die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen zum Nachweis von Galaktosyltransferasen in *Trypanosoma brucei* wurden mit einem Testansatz durchgeführt, der auf die UDP-Galaktose: Glykoprotein Galaktosyltransferase zugeschnitten ist. Den größten Anteil trypanosomaler Glykoproteine stellen die VSG-Moleküle dar, die etwa 10% der gesamten Zellproteine ausmachen. Alle untersuchten Klone, deren VSG-Moleküle keine internen Galaktosylierungen aufweisen (Klon 117, 121 und AnTat 1.8) zeigten verglichen mit dem β -galaktosylierten Klon 118 eine auf ein Zehntel reduzierte β -Galaktosyltransferase-Aktivität. Die Trypanosomen der Antigenvarianten 117, 118 und 121 stellen drei klonierte Linien des *T. b. brucei* Stammes 427 dar (3). Der Klon AnTat 1.8 ist immunologisch kreuzreaktiv mit dem Klon 117. Bisher ist es nicht gelungen, Mutanten dieses offenbar diploiden Eukaryonten (8) zu erzeugen, wodurch die Annahme unwahrscheinlich wird, daß die Klone 117, 121 und AnTat 1.8 nicht über die genetische Information der Glykoprotein Galaktosyltransferase verfügen. Vielmehr läßt sich vermuten, daß die Exprimierung des Enzyms in Anpassung an den zellulären Bedarf reguliert wird.

Die sehr geringen Galaktosyltransferase-Aktivitäten der drei nur im Membrananker galaktosylierten Klone und der nicht erfolgte Transfer von UDP-Galaktose auf den Membrananker des galaktosefreien sVSG 118 sind Indizien dafür, daß die für Trypanosomen spezifischen α -Galaktosyltransferasen in diesem Versuchsansatz nicht aktiv waren. Die Etablierung geeigneter Inkubationsbedingungen für diese Enzyme ist das Ziel unserer weiteren Arbeiten.

TABELLE 2
Spezifische Aktivität der Galaktosyltransferase in *T. brucei*

<i>T. brucei</i>	Specific activity ($\text{pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)			
	endogenous proteins	exogenous acceptors		
clone		Ovalbumin	sVSG 117	sVSG 118
118	3.8	4.5	3.1	3.4
117	0.2	0.4	n. d.	0
ANTat 1.8	n. d.	0.6	n. d.	0.3
121	n. d.	0.5	n. d.	0.3

n. d. = not determined

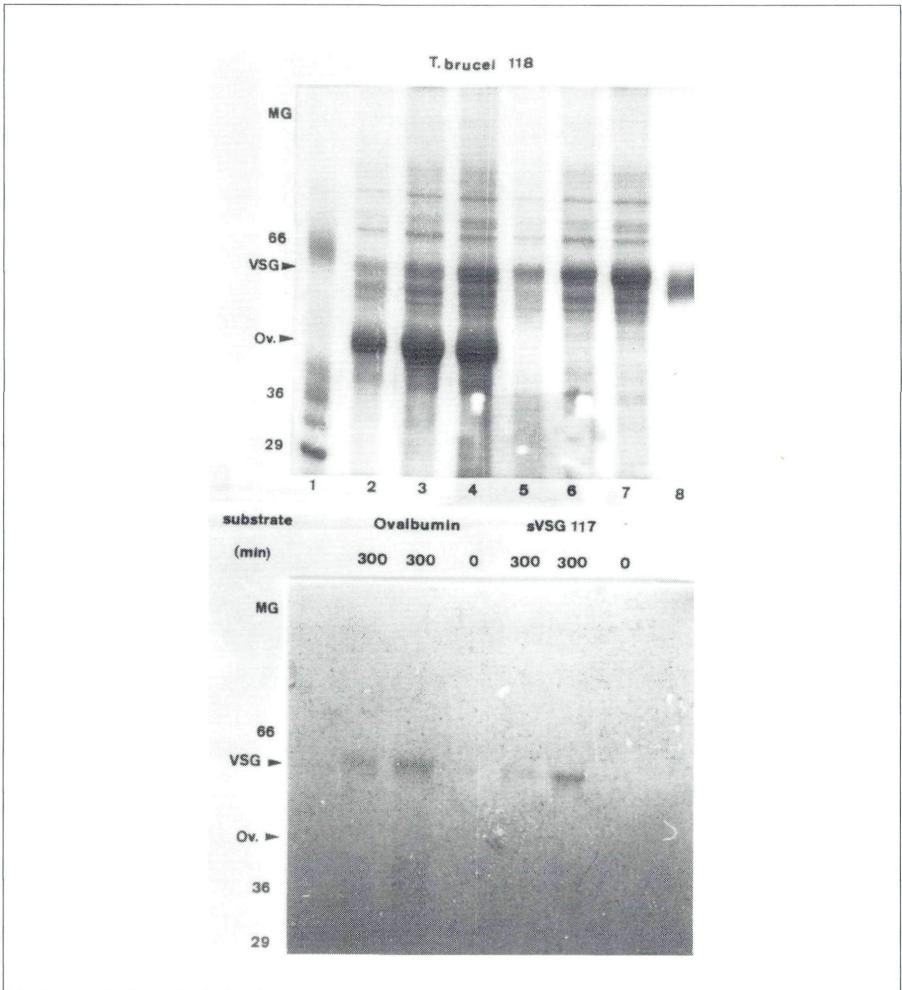


Abb. 2:

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Fluorographie der β -Galaktosyltransferase Reaktion von *T. brucei* 118. Das bevorzugte Akzeptorprotein ist VSG.

Zusammenfassung

Es wurde die Galaktosyltransferase-Aktivität in *Trypanosoma brucei* untersucht. Die UDP-Galaktose: Glykoprotein Galaktosyltransferase erreicht in der Antigenvariante 118 eine etwa 10fach höhere Aktivität als in den Antigenvarianten 117, 121 und AnTat 1.8. Damit zeigen die Trypanosomenklone, deren N-Glykane in den VSG-Molekülen keine Galaktose enthalten, eine reduzierte Transferaseaktivität. Wir schließen daraus, daß die Exprimierung der β -Galaktosyltransferase in Korrelation zur Galaktosylierung der N-Glykane des vorherrschenden Glykoproteins der Trypanosomenzelle (VSG) reguliert wird. Für die Trypanosomen der Antigenvarianten 117, 121 und AnTat 1.8 müssen zusätzliche Galaktosyltransferasen postuliert werden, die für die α -Galaktosylierungen des glykosyl-phosphatidylinositol Membranankers der VSG-Moleküle verantwortlich sind. Die Galaktosylierung des galaktosefreien sVSG 118 Membranankers ließ sich unter diesen Inkubationsbedingungen nicht erreichen.

Schlüsselwörter

Trypanosoma brucei, Glycosyl-phosphatidylinositol Membrananker, Galaktosyltransferase, Variantes Oberflächenglykoprotein.

Summary

Demonstration and characterization of galactosyltransferase in *Trypanosoma brucei brucei*

β -Galactosyltransferase activity of differently galactosylated clones of *Trypanosoma brucei* were tested. Our results show a 10fold decrease in enzyme activity in those clones (117 and 121, AnTat 1.8) not galactosylated in internal glycans but in the glycosylated membrane anchor, as compared with the inversely galactosylated clone 118. These findings suggest that the expression of β -galactosyltransferase is correlated to the galactosylation of VSG N-glycans. Additionally, clones 117, 121 and AnTat 1.8 are supposed to express α -galactosyltransferase activities needed for galactosylation of the membrane anchor. However, using isolated VSG 118, which shows no galactosylation of the membrane anchor, as an external substrate in antigenclone 117 lysates, we were unable to demonstrate α -galactosyltransferase activity.

Key words

Trypanosoma brucei, glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor, galactosyltransferase, variant surface glycoprotein.

Literatur

1. BORST, P. (1986):
Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes.
Annu. Rev. Biochem. 55, 701-732.
2. BRADFORD, M. (1976):
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254.
3. CROSS, G. A. M. (1975):
Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*.
Parasit. 71, 393-417.
4. CROSS, G. A. M. (1984):
Release and purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.
J. Cell Biochem. 24, 79-90.
5. FERGUSON, M. A. J., DUSZENKO, M., LAMONT, G. S., OVERATH, P., CROSS, G. A. M. (1986):
Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor.
J. Biol. Chem. 261, 356-362.
6. FERGUSON, M. A. J., HOMANS, S. W., DWEK, R. A., RADEMACHER, T. W. (1988):
Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane.
Science 239, 753-759.
7. HOLDER, A. A., CROSS, G. A. M. (1981):
Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. C-terminal location of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties.
Mol. Biochem. Parasitol. 2, 135-150.

8. JENNI, L., WELLS, J. M., SCHWEIZER, J., BETSCHART, B., LE PAGE, R. W. F., WELLS, J. M., TAIT, A., PAINDAVOINE, P., PAYS, E., STEINERT, M. (1986):
Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission.
Nature 322, 173-175.
9. LAEMMLI, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
10. PAYS, E., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., STEINERT, M. (1981):
Gene duplication and transposition linked to antigenic variation in *Trypanosoma brucei*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2673-2677.
11. SCHMITZ, B., KLEIN, R. A., DUNCAN, I. A., EGGE, H., GUNAWAN, J., PETER-KATALINIC, J., DABROWSKI, U., DABROWSKI, J. (1987):
MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from *Trypanosoma brucei brucei* MITat 1.6 variant specific glycoprotein.
Biochem. Biophys. Res. commun. 146, 1055-1063.
12. STEIGER, R. F., OPPERDOES, F. R., BONTEMPS, J. (1980):
Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases.
Eur. J. Biochem. 105, 163-175.
13. VICKERMAN, K. (1969):
On the surface coat and flagella adhesions in trypanosomes.
J. Cell Sci. 5, 163-193.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl. Biol. Sabine Pingel
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen
Hoppe-Seyler-Straße 4
D-7400 Tübingen · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: [12](#)

Autor(en)/Author(s): Pingel Sabine, Mecke D., Duszenko M.

Artikel/Article: [Nachweis und Charakterisierung von Galaktosyltransferasen in Trypanosoma brucei brucei. 163-170](#)