



UPPSALA  
UNIVERSITET

Human afrikansk trypanosomiasis (sömn sjuka)  
och *Trypanosoma brucei* - den patogena  
zooflagellaten

Johan Frankelius

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Human afrikansk trypanosomiasis (HAT) eller afrikansk sömnsjuka är en endemisk parasit-sjukdom som förekommer i spridda områden i Afrika söder om Sahara. Den sprids genom bitt från infekterade tsetseflugor av släktet *Glossina*, vektorn för den patogena zooflagellaten *Trypanosoma brucei*. *T. brucei* är en obligat parasit som genomgår en komplicerad livscykel i insektsvektorn och däggdjursvärden, där sex utvecklingsstadier kan urskiljas. Tre av dessa trypanosomformer förökar sig genom långsgående fission, medan de andra tre utvecklingsformerna av parasiten är mitotiskt inaktiva. Trypanosomer undgår upptäckt av värdjurets immunsystem genom antigenisk variation, vilket innebär att trypanosomerna, som uppehåller sig extracellulärt i blodet, periodiskt ändrar en viss typ av glykoprotein, benämnt VSG, som finns i ett stort antal på parasitens cellyta. De VSG som uttrycks är belägna intill telomererna i s.k. expressionssäten (ES). En närmast obegränsad mängd olika VSG-typer kan uttryckas, men en population trypanosomer (den långa smala formen) uttrycker kollektivt endast en VSG-typ vid en given tidpunkt i blodet hos sin värd. Duplikativ- och segmental genkonversion, telomerutväxling och ES-byte är mekanismer parasiten använder vid VSG-skifte. VSG-molekylerna är förankrade i trypanosomernas plasmamembraner genom s.k. GPI-ankare, vars fettsyra är myristinsyra (C14). Parasiten behöver stora mängder myristinsyra för sina GPI-ankare. En betydande del av parasitens lipogenes står elongaserna (ELO)-1–3 för: ELO1 förlänger huvudsakligen C4 till C10, ELO2 förlänger huvudsakligen C10 till C14 och ELO3 förlänger C14 till C18. Kväveoxid (NO) genererad av makrofager spelar en viktig roll vid försvaret mot en trypanosominfektion. Parasiten har dock lärt sig att undvika de toxiska effekterna av molekylen. Genom att aktivera arginas minskar koncentrationen av arginin. Det resulterar i sin tur i minskad NO-syntes och ökad syntes av ornitin, prekursor till såväl polyaminer som trypanotion, vilka trypanosomerna använder sig av för sin tillväxt och för att skydda sig mot fria radikaler (t.ex. NO). CTP används vid syntesen av nukleinsyror och fosfolipider. Parasiten är helt beroende av *de novo* CTP-syntes genom CTP-syntetas. Acivicin, ett känt cytostatikum, inhiberar enzymet och har förmåga att genomtränga blod-hjärnbarriären. Läkemedlet skulle därför kunna användas vid behandling av patienter som befinner sig i ett senare skede av HAT, då parasiterna invaderat det centrala nervsystemet (CNS). Antalet nya fall av HAT uppskattades år 2012 till 30 000 från att ha uppskattats till 50 000–70 000 år 2005. Fortsatta ansträngningar samt innovativa tillvägagångssätt krävs för att sjukdomen skall kunna anses vara eliminerad såsom ett allmänt hälsoproblem. För att nå dit behövs bl.a. effektivare och säkrare läkemedel.

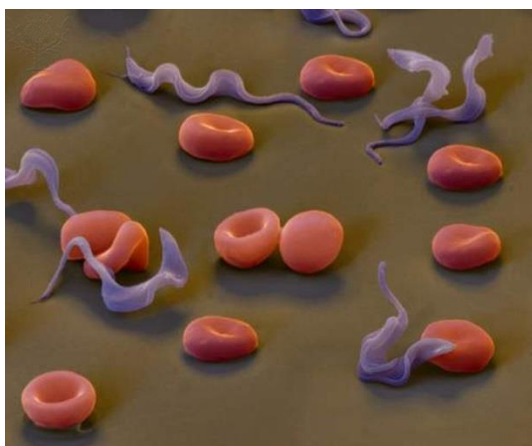
## Inledning

Human afrikansk trypanosomiasis (HAT) eller afrikansk sömnsjuka är en endemisk parasit-sjukdom som förekommer i över 250 spridda områden i Afrika söder om Sahara (Malvy & Chappuis 2011). Uppskattningsvis 70 miljoner människor lever i dessa riskområden, där fattigdom och bristande sjukvård också är utbredd (Malvy & Chappuis 2011, WHO 2013). Den sprids genom bitt från infekterade tsetseflugor av släktet *Glossina*, vektorn för den patogena zooflagellaten *Trypanosoma brucei* (Stich m.fl. 2002) (Figur 1).



**Figur 1.** En tsetsefluga (*Glossina* spp) som suger blod från människa, Okavangodeltat, Botswana, Afrika. (*Encyclopædia Britannica Image Quest*. Hämtad 2013-11-05, från [http://quest.eb.com/images/149\\_2050208](http://quest.eb.com/images/149_2050208)).

Trypanosomer (*T. brucei*) överförs via tsetseflugan till människor huvudsakligen från vilda djur eller boskap (*T. b. rhodesiense*) och från andra människor (*T. b. gambiense*). De lever och förökar sig extracellulärt i blodet, lymfan, interstitialvätskan och, i ett senare skede av HAT, i cerebrospinalvätskan hos dess värd (Malvy & Chappuis 2011, WHO 2013), samt i mittarmen och i spottkörtlarna hos tsetseflugan (Vickerman m.fl. 1988). Det finns flera arter av afrikanska trypanosomer, men den som har störst betydelse för människan är *T. brucei*. Den delas upp i tre morfologiskt identiska underarter, varav *T.b. gambiense* och *T.b. rhodesiense* infekterar människor (El-Sayed m.fl. 2000) (Figur 2). Den förra återfinns i västra och centrala Afrika och orsakar västafrikansk HAT (*T.b.g.* HAT), medan den senare återfinns i östra och södra Afrika och orsakar östafrikansk HAT (*T.b.r.* HAT) (WHO 1998). Infektion med dessa två har dödlig utgång om inte den infekterade får behandling (El-Sayed m.fl. 2000). Att sjukdomen ännu är, och har varit historiskt sett, svår att få kontroll över beror till stor del på att trypanosomerna har utvecklat olika strategier för att angripa sina värdar (däggdjursvärdar), kringgå immunsystemet samt utnyttja värdarnas tillväxtfaktorer. Exempelvis undkommer parasiterna att bli attackerade av värdens immunsystem genom att kontinuerligt ändra molekylstrukturerna på sina cellmembraner och hindrar därigenom värden från att utveckla immunitet (Malvy & Chappuis 2011). Denna egenskap hos trypanosomer är orsaken till att man inte har lyckats utveckla ett effektivt vaccin mot HAT (Fijolek m.fl. 2007).



**Figur 2.** Trypanosomer bland erythrocyter. Bilden är tagen med svepelektronmikroskop och är digitalt färglagd. Förstoring: x1750 vid 6x6cm storlek. (*Encyclopædia Britannica Image Quest*. Hämtad 2013-11-05, från [http://quest.eb.com/images/139\\_1917438](http://quest.eb.com/images/139_1917438)).

## Syfte

Syftet med den här sammanfattningsartikeln är att, förutom att ge en allmän översikt över patogenen och sjukdomen, beskriva några biologiska mekanismer som har stor betydelse för trypanosomer: antigenisk variation, arginasinduktion och fettsyrsyntes. Med ökad kunskap om dessa skulle nya strategier för att t.ex. få fram antitrypanosomala läkemedel kunna utvecklas.

## Sjukdomsbilden vid HAT

Kännetecknande för HAT är att sjukdomen delas upp i två distinkta stadier. Det hemolymfatiska stadiet är det första i vilket trypanosomerna uppehåller sig i blodet och lymfsystemet, medan det meningoencefaliska stadiet är det andra i vilket de har passerat blod-hjärnbarriären och spritt sig i det centrala nervsystemet (CNS) (Malvy & Chappuis 2011). Det första stadiet föregås av lokala symtom som ger sig till känna några dagar efter tsetseflugans bett. Vid bettstället kan en smärtsam skarpt avgränsad och indurerad lesion, en s.k. trypanosomal schanker, uppkomma (Figur 3). Den åtföljs vanligen av en regional lymfkörtelförstoring. Dessa symtom förekommer oftare vid infektion med *T.b. rhodesiense* än med *T.b. gambiense* (Stich m.fl. 2002). Ett av de vanligaste symtomen vid första stadiet av HAT är kronisk och periodiskt återkommande feber. Febertopparna uppkommer i samband med att parasiterna förökar sig i blodet. Dödligheten i *T.b.r.* HAT är omkring 10 % redan vid första stadiet, såvida inte behandling sätts in i rätt tid. För *T.b.g.* HAT inträder det andra stadiet av sjukdomen efter ett antal månader, för *T.b.r.* HAT endast efter ett antal veckor (Stich m.fl. 2002). Det andra stadiet resulterar i kronisk encefalopati, kännetecknad bl.a. av huvudvärk, sömnrubbingar och olika neurologiska och psykiatriska störningar (Malvy & Chappuis 2011, Stich m.fl. 2002). *T.b.g.* HAT står för 98 % av alla inrapporterade fall av HAT (WHO 2013).



**Figur 3.** En trypanosomal schanker på huden orsakad av bitt från infekterad tsetseflugan. (*Encyclopædia Britannica Image Quest*. Hämtad 2013-11-05, från [http://quest.eb.com/images/132\\_1261463](http://quest.eb.com/images/132_1261463)).

## Livscykel

*T. brucei* är en obligat parasit som genomgår en komplicerad livscykel i insektsvektorn (tsetseflugan) och däggdjursvärden (människan), där flera morfologiskt distinkta utvecklingsstadier av parasiten kan urskiljas (Vickerman m.fl. 1988). Tre av dessa trypanosomformer förökar sig genom långsgående fission: den långa smala trypomastigoten som finns i blodet hos däggdjursvärden, samt den procykliska trypomastigoten och epimastigoten som båda finns inuti tsetseflugan.<sup>1</sup> Tre utvecklingsformer av parasiten är mitotiskt inaktiva: den mesocykliska trypomastigoten och den metacykliska trypomastigoten som båda finns inuti tsetseflugan, samt den korta trubbiga trypomastigoten som finns i blodet hos däggdjursvärden. Den metacykliska formen är det sista utvecklingsstadiet i tsetseflugan och är den form som infekterar människan, medan den korta trubbiga formen är det sista utvecklingsstadiet i däggdjursvärden och är den form som infekterar tsetseflugan (Vickerman m.fl. 1988). Dessa två infektiösa stadier befinner sig i G0-fasen av cellcykeln och har en begränsad livslängd såvida inte de överförs till sina respektive värdjur (människan eller tsetseflugan), där de kan vidareutvecklas till nästa stadie (Barry & McCulloch 2001).

Tsetseflugan infekteras av blodtrypomastigoter (långa smala och korta trubbiga trypomastigoter) när den suger blod från en smittad däggdjursvärd. Endast den korta trubbiga trypomastigotformen överlever inuti tsetseflugan, eftersom den är föranpassad till att klara övergången från en anaerob miljö i blodet hos däggdjursvärden till en aerob miljö inuti tsetseflugan. Det infekterade blodet tas upp av tsetseflugan via labium och förs därifrån till krävan varifrån det förs vidare genom proventriculus (tuggmagen) till mittarmens lumen. I bakre delen av mittarmen omvandlas den korta trubbiga formen till den procykliska formen, som här går igenom en aktiv celledelning. De procykliska trypomastigoterna tränger sedan igenom det peritrofiska membranet som omsluter lumen och når då det ektoperitrofiska utrymmet.

1. *mastig-* eller *mastigo-* härrör från grekiskan; *mastix*: 'gissel', 'piska' (stam: *mastig*), dvs. flagell.

Härifrån förflyttar de sig sedan framåt mot proventriculus, medan de omvandlas till mesocykliska trypomastigoter. De mesocykliska trypomastigoterna penetrerar sedan det ekto-peritrofiska membranet vid proventriculus och fortsätter därefter att röra sig igenom proventriculus och vidare via esofagus, proboscis och hypofarynx till tsetseflugans spottkörtlar (Vickerman m.fl. 1988).

Både trypanosomformerna i vektorns mittarm (de procykliska och mesocykliska trypomastigoterna) och blodtrypomastigoterna är fritt simmande. Men när de mesocykliska trypomastigoterna når spottkörtlarna har de omvandlats till epimastigoter, vilka sätter sig fast i spottkörtlarnas mikrovilli med hjälp av förgrenade utväxter från flagellen. Fastsittande i spottkörtlarna omvandlas sedan epimastigoterna till metacykliska trypomastigoter, vilka lossnar från mikrovilli och blir åter fritt simmande. Denna utvecklingscykel inuti tsetseflugan tar 3–5 veckor (Vickerman m.fl. 1988). När tsetseflugan sedan biter en människa överförs dessa infektiösa metacykliska trypomastigoter via tsetseflugans saliv till lymfan (Barry & McCulloch 2001), varifrån de tar sig in i blodet, där de omvandlas till långa smala trypomastigoter (El-Sayed m.fl. 2000). Därefter sprider sig dessa först åter till lymfan och till interstitialvätskan, och i ett senare skede av infektionen till CNS (El-Sayed m.fl. 2000). Den långa smala trypomastigoten omvandlas så småningom till den korta trubbiga formen (Mathieu-Daudé m.fl. 1997), vilken har kapacitet att infektera en ny tsetsefluga.

Övergången från den korta trubbiga trypomastigoten till den metacykliska trypomastigoten innebär både strukturella och biokemiska förändringar relaterade till parasitens metabolism (Vickerman m.fl. 1988). Glykosomer är trypanosomspecifika organeller som innehåller de enzymer som verkar i glykolysen. Vid övergången från den korta trubbiga formen i blodet hos människan till den procykliska formen i tsetseflugan ändrar glykosomerna form från att vara sfäriska till att bli stavformiga. Samtidigt expanderar parasitens enda mitokondrie och utvecklar då ett förgrenat nätverk med diskoida cristae. När sedan parasiten omvandlas från epimastigot till metacyklisk trypomastigot i spottkörtlarna, så återgår glykosomerna till sin sfäriska form, medan mitokondrien antar en enklare oförgrenad struktur. Dessa strukturella förändringar är intimt förknippade med parasitens energiutvinning. I tsetseflugans mittarm (aerob miljö) använder de procykliska och mesocykliska trypomastigoterna sig i huvudsak av citronsyracykeln och andningskedjan i mitokondrien för utvinning av energi, medan de långa smala och de korta trubbiga trypomastigoterna i blodet (anaerob miljö) använder sig av glykolysen i cytosolen samtidigt som mitokondriens funktion är avstängd (Vickerman m.fl. 1988).

## Antigenisk variation

När trypanosomer (*T. brucei*) uppehåller sig i blodet är de i ständig kontakt med immunsystemet och de använder därför olika strategier för att undslippa den immunologiska responsen, däribland antigenisk variation. Antigenisk variation innebär att de extracellulära trypanosomerna ändrar en viss typ av glykoprotein (agerande som ett antigen), ett s.k. VSG (eng. *variant surface glycoprotein*), som finns på cellytan inkluderat flagellen, till en annan, vilkens epitop skiljer sig från den förra (El-Sayed m.fl. 2000). Periodisk antigenisk variation förekommer

endast hos den långa smala reproducerande trypomastigoten (Mathieu-Daudé m.fl. 1997). När denna omvandlats till den korta trubbiga formen kan den inte längre genomgå VSG-skifte, utan uttrycker endast det VSG som den långa smala formen senast uttryckte före differerentieringen till den korta trubbiga formen.

Omkring tio miljoner identiska VSG-molekyler (fem miljoner VSG-homodimerer) uttrycks på den metacykliska trypomastigotens och blodtrypomastigoternas (den långa smala formen och den korta trubbiga formen) cellyta, som därigenom täcks av ett homogent glykoproteinlager (El-Sayed m.fl. 2000, Stockdale m.fl. 2008). Den enda kända funktionen som detta VSG-lager har hos blodtrypomastigoterna är att fungera som en skyddsbarriär mot angrepp från immunförsvaret på andra antigener (fungerande som t.ex. jonkanaler, receptorer och transportproteiner), som är icke-variabla och såsom VSG-molekylerna är inkorporerade i cellmembranet (El-Sayed m.fl. 2000). VSG-homodimerlagret skyddar mot komplementförmiddad lysis av cellen (Taylor & Rudenko 2006). På cellytan hos de procykliska och mesocykliska trypomastigoterna samt epimastigoterna finns ett ungefär lika stort antal icke-variabla molekyler av typen procykliner. Detta procyklinlager byts ut mot ett VSG-lager då epimastigoten övergår till en metacyklisk trypomastigot i tsetseflugans spottkörtlar (El-Sayed m.fl. 2000).

De icke-variabla molekylerna finns över hela cellytan hos blodtrypomastigoterna men är som talrikast i en lökformad invagination, eller ficka, igenom vilken trypanosomens flagell sträcker sig ut från cellkroppen (Rudenko 2011). Här fungerar dessa molekyler som receptorer och transportörer för näringsämnen som parasiten genom pinocytos tar upp från sin omgivning. En särskild struktur vid flagellens mynning hindrar värdjurets antikroppar från att ta sig in i flagellfickan i vilken de icke-variabla molekylerna, i motsats till de som finns på den yttre cellytan, inte är skyddade av ett tätt VSG-lager. Denna flagellficka är också platsen för återvinning av VSG-molekyler. Återvinningen av VSG-molekyler sker i mycket snabb takt. Man har uppskattat att hela arsenalen av VSG-molekyler på cellytan kan endocyteras och återföras till cellytan under loppet av tolv minuter. Att detta är möjligt beror på att VSG-lagret har en fluiditet, trots att VSG-molekylerna är tätt packade i plasmamembranet. VSG-molekylerna kan härigenom förflytta sig över cellytan (Rudenko 2011). Förmågan att endocytera partiklar från flagellfickan upphör när den korta trubbiga trypomastigoten omvandlas till en procyklisk trypomastigot i tsetseflugans mittarm (Vickerman m.fl. 1988).

Blodtrypomastigoternas simförmåga är nödvändig för parasiternas överlevnad i blodet, där parasiterna är utsatta för angrepp från värdens immunförsvaret (Rudenko 2011). När de simmar i blodet med hjälp av flagellen uppstår hydrodynamiska krafter som verkar på VSG-antikroppkomplexen. När en trypanosom simmar framåt får dessa krafter komplexen att fösas bakåt mot flagellfickan, i vilken komplexen internaliseras. Antikropparna i komplexen på cellytan fungerar här analogt som segel, vilket gör att internaliseringen av VSG-antikroppkomplexen blir mer effektiv jämfört med om parasiten inte hade rört sig i blodet medels flagellen. Vesiklarna innehållande komplexen fuserar sedan med lysosomer, varvid antikropparna avskiljs från VSG-molekylerna, vilka åter transporteras till cellytan.

Egenskapen hos *T. brucei* att på en kort tid kunna endocytera stora mängder VSG-molekyler och VSG-antikroppkomplex samt egenskapen att VSG-antikroppkomplexen kan dras till flagellfickan genom de hydrodynamiska krafterna, medför att parasiten kan överleva länge i blodet hos sin värd, trots att denne har producerat en viss mängd anti-VSG-antikroppar. Till slut ökar dock koncentrationen av anti-VSG-antikroppar i blodet till den grad att trypanosomerna inte längre förmår att endocytera alla antikropp-VSG-molekylkomplex. Vid det skedet överlever endast de trypanosomer som har genomgått VSG-skifte (Rudenko 2011).

Det afrikanska trypanosomgenomet innehåller mer än 1 500 olika VSG-gener, av vilka en betydande del är pseudogener, men hos blodformparasiten (den långa smala trypomastigoten) är det endast en VSG-gen i taget som transkriberas från en av många telomeriska VSG-expressionssäten (Rudenko 2011). I likhet med blodtrypomastigoterna har varje enskild metacyklisk trypomastigot endast en sorts VSG på cellytan, men i tsetseflugan kan en metacyklisk trypomastigotpopulation på tiotals tusen till hundra tusen individer i sin helhet uttrycka upp till 27 olika VSG (Barry & McCulloch 2001). När en heterogen population av metacykliska trypomastigoter har överförts till blodet hos en människa, omvandlas de efter några dagar till långa smala trypomastigoter som kollektivt endast uttrycker en VSG-typ (El-Sayed m.fl. 2000). Transkriptionen av en viss VSG-gen fortsätter i snabb takt hos de snabbt reproducerande långa smala trypomastigoterna. Den upphör endast hos den korta trubbiga icke-reproducerande formen, till vilken vissa långa smala trypomastigoter omvandlas då koncentrationen av trypanosomer i blodet blir tillräckligt hög (Taylor & Rudenko 2006).

VSG-molekyler aktiverar effektivt immunsystemet, vilket gör att en adaptiv immunologisk respons riktad mot ett visst VSG avdödar (genom antikroppförmedlad lysis) de trypanosomer som uttrycker just detta VSG (El-Sayed m.fl. 2000). Vid varje celldelning finns dock möjligheten att en dottercell kommer att uttrycka ett annat VSG än det som modercellen uttrycker. Sannolikheten för ett sådant VSG-skifte uppskattas vara ungefär en procent hos *T. b. rhodesiense* (Turner & Barry 1989). Detta nya VSG ( $VSG^b$ ) kommer emellertid inte att kännas igen av de antikroppar som genererades som svar på det tidigare uttryckta VSG:t ( $VSG^a$ ). Att utveckla en immunologisk respons på ett visst VSG tar flera dagar och under den tiden hinner de trypanosomer som gick igenom VSG-skifte (från  $VSG^a$  till  $VSG^b$ ) snabbt att reproducera sig och en fraktion av dem gå igenom ännu ett VSG-skifte (från  $VSG^b$  till  $VSG^c$ ) innan immunsystemet hunnit detektera den andra generationens VSG ( $VSG^b$ ). Upprepning av denna cykel gör ett utsläckande av den infekterande trypanosompopulationen omöjlig och möjliggör istället kronisk förekomst av parasiter i extracellulärvätskan hos däggdjursvärden. Resultatet av denna process är på varandra följande vågor av trypanosomer i blodet. *In vitro*-experiment med trypanosomer visar att VSG-skifte sker spontant i frånvaro av antikroppar (Barry & McCulloch 2001).

*T. brucei*s nukleära genom (dvs. oräknat kinetoplast-DNA:t i mitokondrien) uppskattas innehålla något fler än 100 kromosomer: 11 par megakromosomer (1–6 Mb) och ett obestämt antal intermediära kromosomer (200–900 kb) och minikromosomer (50–150 kb) av okänd ploiditet ( $n$ ,  $2n$  etc.). Eftersom de nukleära kromosomerna hos organismen inte kondenserar under mitosen är det inte möjligt att räkna dem (El-Sayed m.fl. 2000). De cirka 1 500 icke-



uttryckta (tysta) *VSG*-generna och *VSG*-pseudogenerna är utspridda bland de tre olika kromosomtyperna, medan de *VSG*-gener som uttrycks alltid är belägna intill vissa av megabas- och intermediärkromosomernas telomerer i s.k. expressionssäten (ES) (El-Sayed m.fl. 2000, Stockdale m.fl. 2008). Antalet blodforms-ES i *T. brucei* genom har inte fastlagts, men kan uppgå till omkring 20 (Stockdale m.fl. 2008).<sup>2</sup> Ett ES består av de DNA-sekvenser som sträcker sig mellan *VSG*-promotorn och telomerrepetitionsssekvenserna, (TTAGGG)<sub>n</sub>: en *VSG*-gen intill telomeren, ett antal ES-associerade gener (*ESAG*) och en serie av 70 bp-upprepningssekvenser uppströms från *VSG*-genen (El-Sayed m.fl. 2000, Stockdale m.fl. 2008) (Figur 4). Antalet olika *ESAG* i ett ES är vanligen mellan fem och tio, där vissa av dem är pseudo-*ESAG* (Berriman m.fl. 2005). ES:t föregås vanligen av en 10–40 kb lång serie av 50 bp-upprepningssekvenser (El-Sayed m.fl. 2000).



**Figur 4.** En schematisk illustration av ett expressionssäte (ES) hos blodformen av *T. brucei*. Promotorn i ena änden av kromosomen, som representeras av den horisontella linjen, illustreras med en liten ifylld cirkel. Telomerupprepningssekvenserna, (TTAGGG)<sub>n</sub>, illustreras med två små trianglar. Det polycistroniska ES:t består av ett flertal olika *ESAG* (ES-associerade gener), här illustrerade med ofärgade rektanglar, samt en *VSG*-gen (blå rektangel) intill telomeren. Vissa *ESAG* är pseudogener, vilka illustreras med Ψ (psi). Karakteristiska upprepningssekvenser uppströms från promotorn (50 bp-upprepningar) och uppströms från *VSG*-genen (70 bp-upprepningar) illustreras med lodrätt streckade rektanglar. Transkriptionen (polycistronisk) indikeras med en pil, som utgår från promotorn. (Omarbetad efter Rudenko & Taylor 2006.)

De molekylära mekanismer i en given blodformparasit som inducerar transkription vid ett visst ES och förhindrar genuttryck vid de andra ES:na är inte kända (El-Sayed 2000). Det är dock mycket troligt att epigenetiska processer som t.ex. kromatinremodellering och histonmodifiering fyller viktiga funktioner vid ES-kontroll. Man har exempelvis påvisat att ett aktivt ES är associerat med betydligt färre nukleosomer jämfört med tysta (inaktiva) ES (Rudenko 2011). *ESAG*-generna kodar för proteiner som möjliggör för parasiten att överleva i blodet hos olika arter av däggdjur. Exempelvis kodar *ESAG6–7* för polymorfiska transferrinreceptorsubenheter, vilka fyller en funktion vid upptag av transferrin från däggdjursvärdens blod (Rudenko 2011).

Transkriptionen av ES:t utförs av RNA polymeras I, som annars transkriberar pre-RNA-gener i eukaryota celler (Stockdale m.fl. 2008). Då transkriptionen av *ESAG*-generna och *VSG*-genen i ES:t styrs av endast en promotor, resulterar transkriptionen av ES:t i ett polycistroniskt transkript – ett pre-mRNA från vilket individuella mRNA (fem till tio *ESAG*-mRNA och ett *VSG*-RNA) sedan produceras genom *trans*-splittingsning och polyadenylering (Stockdale m.fl. 2008). Vid *trans*-splittingsningen fogas 5'-ändan av ett snRNA ihop med 5'-ändan av varje enskilt mRNA (Günzl 2010). 5'-ändan av snRNA:t är 29 nukleotider lång och innehåller en

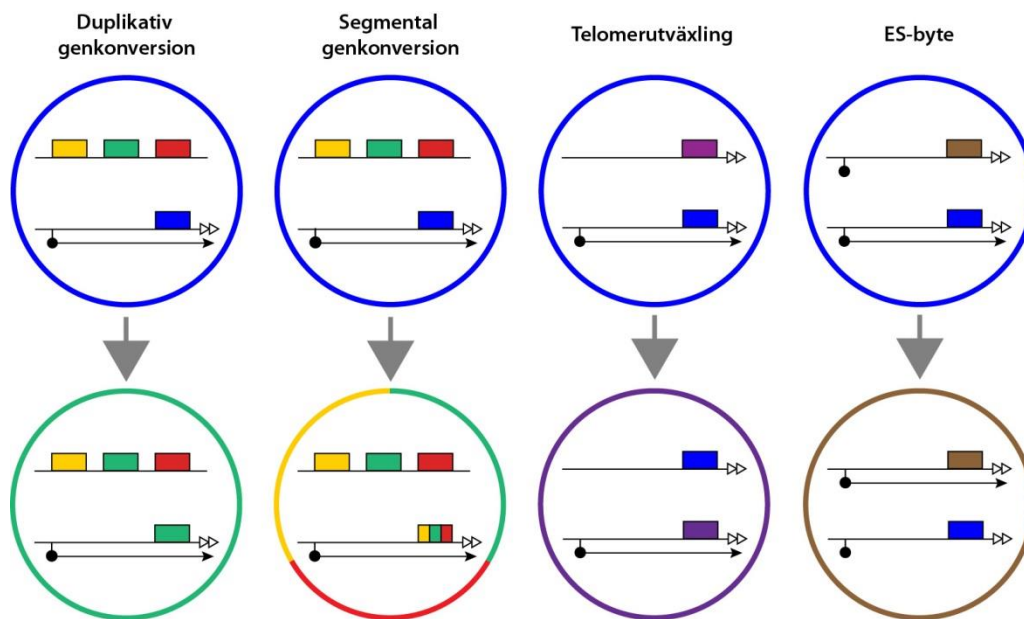
2. Den metacykliska formen av parasiten har särskilda ES.

7-metylguanosincap ( $m^7G$  cap). Genom *trans*-splitsningen förses således de omogna mRNA-molekylerna med 5'-cappar (Michaeli 2011).

Det finns flera olika mekanismer för hur *T. brucei* byter sitt aktiva *VSG* mot ett annat (Figur 5). Duplikativ genkonversion, segmental genkonversion och telomerutväxling är mekanismer som baseras på homolog rekombination, medan ES-byte baseras på transkriptionsreglering (Rudenko 2011). Vid duplikativ genkonversion kopieras en tyst *VSG*-gen från ett subtelomeriskt kluster av *VSG*-gener och förs in i det aktiva ES:et, medan den föregående *VSG*-genen däri avlägsnas.<sup>3</sup> Segmental genkonversion är en snarlik process, med den skillnaden att segment från flera *VSG*-gener – inte sällan pseudo-*VSG*-gener – kopieras och infogas i ES:et, som då kommer att innehålla en aktiv mosaik-*VSG*-gen (chimär-*VSG*-gen). Segmenten från olika *VSG*-gener kan kombineras på många olika sätt. Det gör det möjligt för parasiten att generera en närmast oändlig mängd *VSG*-lagervarianter. Vid telomerutväxling sker reciprok rekombination mellan två telomerer (och närliggande sekvenser). *VSG*-skifte kan också ske genom ES-byte, där det aktiva ES:et tystas ned samtidigt som ett annat ES aktiveras.

Rekombination möjliggörs av att det finns en homolog sekvens dels uppströms från varje tyst *VSG*-gen, dels i ett speciellt bevarat segment längst ut i 3'-ändan av varje *VSG*-gen. Den homologa sekvensen uppströms från varje tyst *VSG*-gen utgörs av ett varierat antal 70 bp-repetitionssekvenser av samma typ som finns i ett ES (se Figur 4). Antalet 70 bp-repetitionssekvenser i ett ES är dock större än det som finns uppströms från varje tyst *VSG*-gen i *VSG*-arkivet.

3. Med *subtelomerisk* avses sekvensen mellan telomeren och den första hushållningsgenen (eng. *housekeeping gene*).



**Figur 5.** Mekanismer för VSG-skifte vid antigenisk variation hos *T. brucei*. *T. brucei*-genomet innehåller omkring 1 500 VSG-gener (inkl. VSG-pseudogener). I figuren visas sex olika VSG-gener representerade av sex rektanglar i olika färger (gul, grön, röd, blå, lila och brun). Cirkelarna indikerar vilken VSG-gen som en blodformtrypanosom eller en blodformtrypanosompopulation uttrycker vid ett visst skede. Den VSG-gen som uttrycks före ett VSG-skifte illustreras med en blå rektangel och transkriberas från ett expressionssäte (ES) beläget intill telomeren. Pilarna mellan cirkelarna representerar VSG-skifte. Vid duplikativ genkonversion kopieras en tyst VSG-gen från en subtelerisk serie av VSG-gener och infogas i ett ES samtidigt som den VSG-gen som befann sig där tidigare raderas ut. Mekanismen för segmental genkonversion är densamma som för duplikativ genkonversion med den skillnaden att segment från flera VSG-gener (ofta pseudo-VSG-gener) kopieras in i ett ES och på så vis ger upphov till en fungerande mosaik-VSG-gen (chimär-VSG-gen). Vid telomerutväxling sker crossing-over mellan två kromosomändar. VSG-gendonatorn finns då antingen intill en minikromosomtelomer eller i ett inaktivt ES. I det här fallet kan utbytet sträcka sig antingen från 70 bp-repetitionssekvenserna eller, om donatorgenen befinner sig i ett inaktivt ES, från ESAG-klustrets början, och i båda fallen vidare till telomerrepetitionssekvenserna. I figuren visas DNA-utväxling mellan en minikromosomände och ett aktivt expressionssäte i ena änden av en megakromosom eller en intermediär kromosom (minikromosomer saknar ES). Vid ES-byte förekommer inte rekombination, utan istället aktiveras ett nytt ES medan det tidigare ES:t tystas ned. För ytterligare beskrivning av använda symboler, se Figur 4. (Omarbetad efter Rudenko 2011 och Rudenko & Taylor 2006.)

## Fettsyrasyntes

Varje VSG-molekyl är förankrad i blodtrypomastigoternas plasmamembran genom ett s.k. glykosylfosfatidylinositol (GPI)-ankare, vars fettsyra alltid är myristinsyra (C14;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ ). Via myristyl-CoA inkorporeras myristinsyran i GPI-prekursorn genom en mikrosomal fettsyraomstruktureringsreaktion, vilken byter ut en lång fettsyra mot myristinsyra i ER-membranet (myristylering). I motsats till blodtrypomastigoterna myristylerar inte den procykliska trypomastigoten GPI-ankarna till sina glykoproteiner (Lee m.fl. 2006).

Blodtrypomastigoter behöver stora mängder myristinsyra för sina GPI-ankare (Lee m.fl. 2006). Man har länge antagit att de var oförmögna att syntetisera fettsyror *de novo* och att de istället tog tillvara samtliga typer av fettsyror från det omgivande blodet. De kan förvisso på

ett effektivt sätt tillvarata redan befintliga fettsyror i blodet, men myristinsyrhalten är inte tillräckligt hög där för att cellmembranets alla GPI-ankare skall kunna vara myristylerade då blodet innehåller stora mängder trypanosomer. Senare studier visar emellertid att *T. brucei* använder en tidigare okänd mekanism för att syntetisera fettsyror, inklusive myristinsyra (Lee m.fl. 2006).

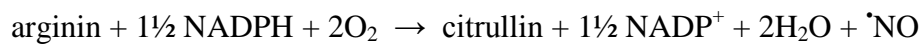
Alla organismer, såväl prokaryota som eukaryota, förmodas använda typ I- eller typ II-fettsyrasyntas (FSS) för *de novo* lipogenes (Lee m.fl. 2006). Eukaryota celler använder dessutom mikrosomala elongaser (ELO), som finns i det endoplasmatiska nätverket (ER), för att syntetisera fettsyror utifrån redan befintliga fettsyror. *T. brucei* saknar genen som kodar för typ I FSS, varför ingen fettsyrasyntes äger rum i cytosolen, där lipogenes genom typ I FSS sker. Visserligen kan organismen syntetisera fettsyror i mitokondriematrixen genom typ II FSS, men där är produktionen av fettsyror inte tillräckligt stor för att tillgodose parasitens behov. *In vitro*-studier av *T. brucei* visar att huvuddelen av lipogenesen istället sker med hjälp av olika mikrosomala elongaser: ELO1 förlänger huvudsakligen C4 (fettsyror innehållande fyra kolatomer) till C10, ELO2 förlänger huvudsakligen C10 till C14 och ELO3 förlänger C14 till C18. En jämförelse mellan procykliska trypomastigoter och blodtrypomastigoter har visat att de längsta fettsyrorerna i cellmembranen hos de förra är stearinsyra (C18), medan de hos de senare merendels är myristinsyra (C14), som följaktligen kan användas i GPI-ankare. En fördel med att syntetisera fettsyror via ELO1–3 är att syntesen sker i närheten av det ställe där fettsyrorerna nyttjas, nämligen i ER-membranet, varifrån fettsyrorerna enkelt kan transporteras till plasmamembranet. Exempelvis kan GPI-myristylering hos blodtrypomastigoter ske i nära anslutning till myristinsyrasyntesen, som utförs av ELO2. En ytterligare fördel är att den stegvisa syntesen av fettsyror till C10, C14 och C18 gör det möjligt att på ett enkelt sätt reglera hur mycket av varje fettsyra som skall tillverkas beroende på vilken miljö trypanosomen befinner sig i, t.ex. inuti spottkörtlarna hos vektorn eller i blodet hos däggdjursvärden (Lee m.fl. 2006).

Att lipogenes genom ELO kan regleras beroende på omgivande miljö understöds av experiment som utförts på bl.a. procykliska trypanosomer (Lee m.fl. 2006). Resultat från dem visar att lipogenesen uppregleras när trypanosomerna odlas i ett medium med låg fettsyrakoncentration. När exempelvis blodtrypomastigoter invaderar cerebrospinalvätskan, där fettsyrhalten är betydligt lägre än i blodet, torde därför en uppreglering av lipogenesen (inklusive myristinsyra för GPI-ankarna) genom ELO ske hos trypanosomerna. Att ELO är essentiella för procykliska trypomastigoter är tydligt. Det är dock ännu oklart huruvida ELO-tillvägagångssättet att syntetisera fettsyror är nödvändigt för blodtrypomastigoternas tillväxt. Men om framtida studier skulle visa att det har betydelse för tillväxten hos dem, skulle eventuellt läkemedel kunna utvecklas med avsikt att störa ELO-mekanismen hos blodtrypomastigoterna som uppehåller sig i däggdjursvärden (Lee m.fl. 2006).

## Arginasinduktion

Forskning under senare hälften av 1980-talet och början av 1990-talet har visat att kväveoxid (NO), som genereras i celler hos vitt skilda djurarter, spelar en viktig roll i flera biokemiska system. Exempelvis fungerar molekylen både som neurotransmittor och vasodilator samt har hämmande verkan på blodkoagulation (Bredt & Snyder 1994). NO fyller också en funktion vid eliminering av tumörceller och patogener (Daintith 2008) och det har visat sig att NO genererad av cytokinaktiverade makrofager spelar en viktig roll vid försvaret mot en trypanosominfektion (Vincendeau & Bouteille 2006). Trypanosomer använder sig dock av en mekanism för att delvis undvika de toxiska effekterna av NO. Genom att hos makrofager aktivera arginas minskar halten arginin, som behövs för deras produktion av NO. Det resulterar i minskad NO-syntes och ökad syntes av bl.a. polyaminer, vilka är nödvändiga för parasitens tillväxt.

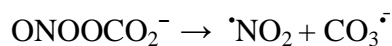
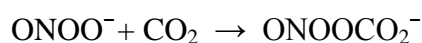
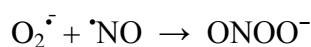
NO ( $\cdot\text{NO}$ ) är en fri radikal som med hjälp av kväveoxidsyntas (NOS) produceras endogent genom oxidation av arginin. Både syrgas och NADPH är nödvändiga för NO-syntes (Wang m.fl. 1993, Bredt & Snyder 1994):



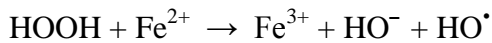
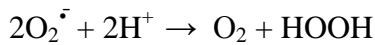
Det finns två typer av NOS; kalciumberoende konstitutiv NOS producerar små mängder (pikomol) NO under en kortare period, medan kalciumoberoende inducerande NOS producerar stora mängder (nanomol) NO under en längre tid (Vincendeau & Bouteille 2006). NO diffunderar obehindrat genom biologiska membraner. Molekylen är dessutom mycket reaktiv, vilket begränsar dess diffusionsräckvidd till omkring 1 mm från det ställe där den produceras. Det är en instabil molekyl som därför inte kan lagras (Nelson & Cox 2008). NO kan dock omvandlas till nitrosylerade föreningar som kan transportera och frigöra NO i områden som ligger långt bort från de NO-producerande cellerna (Vincendeau & Bouteille 2006). Vid infektion uttrycker makrofager NOS samtidigt som dess membranbundna enzym NAD(P)H-oxidase aktiveras (Gregus & Klaassen 2001). Det senare enzymet ger upphov till superoxidradikalen ( $\text{O}_2^-$ ) ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) från syrgas (Wang m.fl. 1993):



Under normala förhållanden hålls den intracellulära koncentrationen av  $\text{O}_2^-$  låg genom superoxid-dismutas, som omvandlar radikalen till väteperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{O}_2^-$  kan dock även reagera med NO och bilda peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), som i sin tur kan ge upphov till två andra fria radikaler, nämligen kvävedioxid ( $\text{NO}_2$ ) ( $\cdot\text{NO}_2$ ) och karbonatjonen ( $\text{CO}_3^-$ ) ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) (Wang m.fl. 1993, Bredt & Snyder 1994):

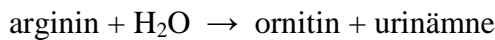


Utöver dessa radikaler och anjoner kan också hydroxylradikalen (HO) (HO<sup>•</sup>) bildas genom att O<sub>2</sub><sup>-</sup> reagerar med vätejoner (H<sup>+</sup>) och bildar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, som i sin tur reagerar med tvåvärt järn (Fe<sup>2+</sup>) (fentonreaktionen):



Fria radikaler och superoxider har antimikrobiell effekt, men de kan också skada frisk omgivande vävnad. Proteiner, lipider och nukleinsyror kan samtliga ta skada av t.ex. ONOO<sup>-</sup> (Gregus & Klaassen 2001). Ett flertal parasiter, däribland trypanosomer tillhörande *T. brucei*-gruppen, är ytterst känsliga för NO och dess derivat (Vincendeau m.fl. 2003).

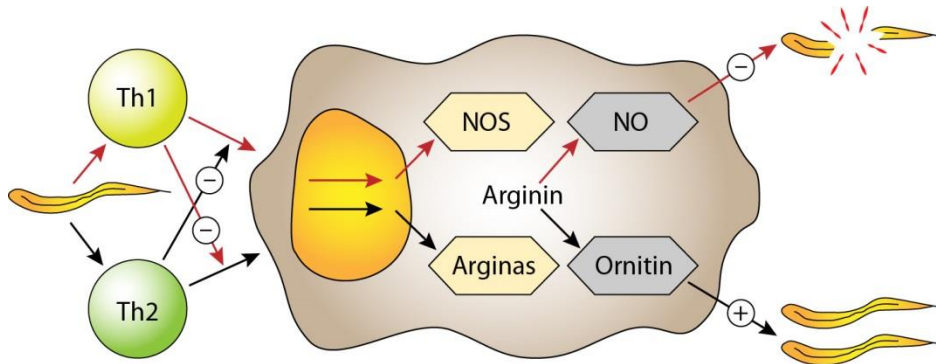
Arginin är dock inte enbart ett substrat för NOS utan också för arginas (Vincendeau & Bouteille 2006):



Ornitin, som bildas i cytosolen, transporteras vanligen till mitokondriematrixen för att där inleda en ny rond av urinämnescykeln (Berg m.fl. 2007). Trypanosomer har dock lärt sig att utnyttja värdcellernas immunologiska mekanismer till sin egen fördel genom att via cytokiner inducera arginasaktivitet (Malvy & Chappuis 2011). Ornitin är nämligen en för parasiten essentiell aminosyra. Av trypanosominducerad arginasaktivitet följer emellertid en förbrukning av arginin, substratet för NOS, vilket leder till minskade halter cytotoxisk NO och ökad produktion av ornitin, prekursor till såväl polyaminer som trypanotion (en ovanlig form av tripeptiden tillika antioxidanten glutation), vilka parasiten använder sig av för sin tillväxt (Vincendeau m.fl. 2003) respektive för att skydda sig mot fria radikaler (Malvy & Chappuis 2011). Genom att inducera arginasaktivitet kringgår trypanosomer således NO-syntes och drar istället nytta av ornitinsyntes.

Vid den immunologiska responsen på en trypanosominfektion inducerar antigener från parasiten både NOS- och arginasaktivitet (Vincendeau m.fl. 2003). Parasitantigener inducerar hjälpar-T-lymfocyter typ 1 och typ 2 (Th1 och Th2) att frigöra olika typer av cytokiner, däribland interferon (IFN)- $\gamma$  från Th1 och interleukin (IL)-10 från Th2, vilka har en avgörande betydelse för vilken respons som ger sig till uttryck. Hos makrofager leder en Th1-respons till produktion av såväl NO som tumörnekrosfaktor (TNF)- $\alpha$ , vilka båda är trypanocida faktorer. En Th2-respons leder däremot till ornitinsyntes, vilken ju är nödvändig för parasitens fortlevnad och tillväxt. Vidare inhiberar Th1-cytokiner arginasaktivitet, medan Th2-cytokiner inhiberar NOS-aktivitet (den kalciumoberoende inducerande typen). Arginas inhiberas dessutom av N- $\omega$ -Hydroxyarginin (NOHA). NOHA bildas av NOS från arginin innan enzymet vidare ger upphov till citrullin och NO (ej visad i reaktionen på s. 13) (Vincendeau m.fl. 2003). Genom att upprätta en balans mellan Th1- och Th2-cytokiner reglerar och begränsar således immunförsvaret NO-syntesen, men de substanser som trypanosomerna utsöndrar vid infektion

förskjuter jämvikten mot en parasitbefrämjande Th2-respons snarare än mot en parasitocid Th1-respons (Figur 6).



**Figur 6.** Jämvikten mellan kväveoxidsyntas (NOS) och arginas och påverkan av makrofager på trypanosomer. Röda pilar indikerar makrofagers kväveoxid (NO)-beroende parasitocida verkan genom NOS (och Th1), medan svarta pilar indikerar deras parasitbefrämjande verkan genom arginas (och Th2). Minustecknen till vänster i figuren indikerar hämmande påverkan av Th1-cytokiner på arginasinduktion och Th2-cytokiner på NOS-induktion. En nedreglering av Th2-responsen är nödvändig för att förhindra arginasaktivering och för att upprätthålla tillräckligt hög intracellulär argininkoncentration för NOS-aktivitet (kalciumoberoende inducerande NOS). Trypanosomer påverkar jämvikten genom att förskjuta den mot ökad arginasaktivitet. (Omarbetad efter Vincendeau m.fl. 2003.)

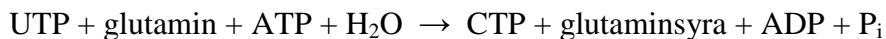
Att producera NO är nödvändigt under speciella betingelser, men som redan nämnts kan molekylerna vara skadliga inte bara för parasiten utan också för den infekterade värdorganismen. Vid en infektion innebärande en stegring av både Th1 och Th2 i kombination med parasitens skydd mot NO genom trypanotion, leder det så småningom till skadliga halter av inflammatoriska substanser (t.ex. ornitin, NO och TNF- $\alpha$ ) som slutligen ger upphov till svår utmätning (kakexi) och död (Malvy & Chappuis 2011). En framtida identifiering av de parasitsubstanser som orsakar arginasaktivering, de membranreceptorer som de verkar på, samt de second messengers som är inblandade, skulle kunna möjliggöra behandling av sjukdomen genom framställning av inhibitorer mot vissa av dem. Arginasinhibering kan därför visa sig vara användbart i vissa vävnadstyper där NO-produktion är nödvändig men bör undvikas i andra där NO-produktionen måste hållas nere (Vincendeau m.fl. 2003).

## Behandling

Vilken typ av behandling som sätts in mot HAT beror på vilket sjukdomsstadium patienten befinner sig i. Läkemedlen som används vid det första sjukdomsstadiet är mindre toxiska och enklare att ge än de som ges vid det andra stadiet, där läkemedlet måste ta sig igenom blod-hjärnbarriären för att kunna nå och ha verkan på parasiten. Ju tidigare sjukdomen upptäcks desto större är sannolikheten att patienten kommer att tillfriskna (WHO 2013). Antitrypanosomala läkemedel kan fås kostnadsfritt från WHO (Malvy & Chappuis 2011).

Vid behandling av det första stadiet av *T.b.g.* HAT och *T.b.r.* HAT ges pentamidin respektive suramin. Oftast förekommande biverkningar av pentamidin är smärta som uppkommer efter injektion, hypoglykemi och hypotoni (Malvy & Chappuis 2011). Allergiska reaktioner och problem relaterade till urinvägarna kan uppstå vid medicinering med suramin (WHO 2013). Vid behandling av det andra stadiet av HAT används melarsoprol och eflornitin. Eflornitin är dock verksamt endast mot *T.b.g.* HAT, då *T. b. rhodesiense* är inherent resistent mot läkemedlet. Melarsoprol innehåller arsenik och är förenat med många allvarliga biverkningar, t.ex. encefalopati, hepatopati, neuropati och flebit (Malvy & Chappuis 2011). Läkemedlet har en dödlighet på 4–12 % (Stich m.fl. 2002). Vidare har en ökad resistens mot melarsoprol noterats från flera områden (WHO 2013). Eflornitin är mindre toxiskt än melarsoprol (WHO 2013), men behandlingen av patienter med läkemedlet är besvärlig att utföra (Malvy & Chappuis 2011). Eflornitin kan dock (sedan 2009) kombineras med nifurtimox, vilket förenklar behandlingen (WHO 2013).

Studier som gjorts av Fijolek m.fl. (2007) vid Umeå universitet visar att acivicin, ett cytostatikum som kan penetrera blod-hjärnbarriären, skulle kunna användas vid behandling av andra stadiet av HAT utan att läkemedlet får toxisk effekt på CNS. Experiment med trypanosomer odlade i laboratorium har visat att acivicin har trypanocid verkan vid en koncentration av 1 µM under minst fyra dygn (Fijolek m.fl. 2007). Acivicin är en glutaminanalog som irreversibelt inhiberar CTP-syntetas (Fijolek m.fl. 2007). Enzymet, som tillhör gruppen glutaminamidotransferaser, omvandlar UTP till CTP med hjälp av ATP genom att överföra en aminogrupp från glutamin till UTP (Berg m.fl. 2007):



Acivicin verkar genom att alkylera ett nukleofilt cysteinresiduum i aktiva sätet hos enzymet (Fijolek m.fl. 2007). CTP behövs för syntesen av nukleinsyror och fosfolipider. *In vitro*-studier av *T. brucei* indikerar att CTP-koncentrationen i trypanosomer är betydligt lägre än i andra typer av eukaryota celler. Orsaken till det är dels att UTP-koncentrationen är lägre (0,28 mM i *T. brucei*, 0,6 mM i fibroblastceller hos däggdjur), dels att CTP-syntetas har ett högre  $K_m$ -värde för UTP hos *T. brucei* än hos andra cellodlade eukaryota celler. Trypanosomenzymets  $K_m$ -värde för UTP är mer än två gånger högre än det som uppmätts för motsvarande enzym i kalvleverceller (0,16 respektive 0,07 mM). En annan viktig egenskap hos trypanosomer är att de, till skillnad från däggdjursceller, saknar förmåga att återskapa CTP från cytidin och cytosin. De är således helt beroende av *de novo* CTP-syntes genom CTP syntetas. Mot bakgrund av detta skulle enligt Fijolek m.fl. (2007) en inhibering av just detta enzym – medels acivicin – kunna vara ett sätt att döda parasiten. En fördel med acivicin jämfört med melarsoprol och eflornitin är att läkemedlet kan ges i tablettform, vilket skulle göra behandlingen enklare att utföra än vid behandling med melarsoprol eller eflornitin (Fijolek m.fl. 2007).



## Diskussion

Tack vare ökade insatser för att få HAT under kontroll har antalet nya rapporterade fall av sjukdomen de senaste åren minskat från 37 991 (år 2005) till 7 197 (år 2012). Det verkliga antalet fall uppskattas för närvarande till 30 000, från att ha uppskattats till 50 000–70 000 år 2005 (WHO 2013). Att det verkliga antalet årligen insjuknade i HAT är okänt beror på att majoriteten av de infekterade lever i områden där möjligheten att komma under läkarvård är liten eller obefintlig (El-Sayed m.fl. 2000). Fortsatta ansträngningar samt innovativa tillvägagångssätt krävs dock för att HAT skall kunna anses vara eliminerad såsom ett allmänt hälsoproblem. Det bör noteras att man med begreppet *eliminera* inte avser *utrota*. Med eliminering avses en tidpunkt i bekämpningen av sjukdomen vid vilken insatserna mot den inte längre är kostnadseffektiv (Simarro m.fl. 2011). För att nå dit behövs nya diagnostiska metoder, effektivare och säkrare läkemedel samt nya verktyg för vektorkontroll (Malvy & Chappuis 2011).

## Tack

Jag vill tacka min handledare doc. Jan Örberg vid Institutionen för organismbiologi, Uppsala universitet, samt Frida Löv och Emma Vianden för de synpunkter de bidragit med på de olika manusversionerna av uppsatsen.

## Referenser

- Barry JD, McCulloch R. 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Advances in Parasitology* **49**: 1–70.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2007. *Biochemistry*. 6:e uppl. W. H. Freeman and Company, New York.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C m.fl. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416–422.
- Bredt DS, Snyder SH. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* **63**: 175–195.
- Daintith J. (ed.). 2008. *Oxford Dictionary of Chemistry*. 6:e uppl. Oxford University Press.
- El-Sayed NM, Hegde P, Quackenbush J, Melville SE, Donelson JE. 2000. The African trypanosome genome. *International Journal for Parasitology* **30**: 329–345.
- Fijolek A, Hofer A, Thelander L. 2007. Expression, purification, characterization, and *in vivo* targeting of trypanosome CTP synthetase for treatment of African sleeping sickness. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 11858–11865.
- Gregus Z, Klaassen CD. 2001. Mechanisms of toxicity. Klaassen CD (red.). *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, ss. 35–81. McGraw-Hill.
- Günzl A. 2011. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic Cell* **9**: 1159–1170, doi: 10.1128/EC.00113-10.
- Lee SH, Stephens JL, Paul KS, Englund PT. 2006. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. *Cell* **126**: 691–699.
- Malvy D, Chappuis F. 2011. Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection* **17**: 986–995.

- Mathieu-Daudé F, Welsh J, Davis C, McClelland M. 1997. Differently expressed genes in the *Trypanosoma brucei* life cycle identified by RNA fingerprinting. *Molecular and Biochemical Parasitology* **92**: 15–28.
- Michaeli S. 2011. *Trans*-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology* **6**: 459–474.
- Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehringer Principles of Biochemistry*. 5:e uppl. W. H. Freeman and Company, New York.
- Rudenko G. 2011. African trypanosomes: the genome and adaptations for immune evasion. *Essays in Biochemistry* **51**: 47–62.
- Simarro PP, Abdoulaye D, Postigo JAR, Franco JR, Jannin JG. 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000–2009: the way forward. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **5**: 1–7.
- Stich A, Abel PM, Krishna S. 2002. Human African trypanosomiasis. *BMJ* **325**: 203–206.
- Stockdale C, Swiderski MR, Barry JD, McCulloch R. 2008. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. *PLOS Biology* **6**: e185, doi: 10.1371/journal.pbio.0060185.
- Taylor JE, Rudenko G. 2006. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends in Genetics* **22**: 614–620.
- Turner CMR, Barry JD. 1989. High frequency of antigenic variation in *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections. *Parasitology* **99**: 67–75.
- Wang JF, Komarov P, de Groot H. 1993. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: the role of NO, O<sub>2</sub>-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304**: 189–196.
- WHO. Trypanosomiasis, Human African (sleeping sickness). Fact sheet No. 259, updated and revised in June 2013. WWW-dokument: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>. Hämtad 2013-11-11.
- WHO. 1998. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series* **881**: 1–120. Genève: WHO.
- Vickerman K, Tetley L, Hendry KAK, Turner MR. 1988. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biology of the Cell* **64**: 109–119.
- Vincendeau P, Bouteille B. 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **78**: 645–665.
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD. 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends in Parasitology* **19**: 9–12.