

**Aus dem Interfakultären Institut für Biochemie
der Universität Tübingen
Abteilung: Biochemie II
Direktor: Professor Dr. T. Stehle**

**Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv
monomeres Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen
zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung
von *Trypanosoma brucei brucei* im Gewebe des zentralen
Nervensystems**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sven Acker
aus
Balingen**

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kahle

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2009 bis Oktober 2011 im Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko durchgeführt und durch das Promotionsstipendium „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät Tübingen, im Bereich des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung, unterstützt und gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Professor Michael Duszenko für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die stetige Unterstützungs- und Diskussionsbereitschaft in allen Bereichen sowie für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und die schöne Zeit, die ich in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Dr. Björn Bassarak und Herrn Stefan Mogk danke ich für die hervorragende Betreuung, Zusammenarbeit, Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente, für viele fachliche Ratschläge und Denkanstöße sowie für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Ebenso gebührt mein Dank Jasmin Stein, Torsten Barth, Björn Buchholz, Claudia Frey, Rudolph Koopmann, Matthias Huber, Andrea Wegner, Derya Demirsal und Caroline Schönfeld, die mir für meine zahlreichen Fragen jederzeit zur Verfügung standen, mich immer nach besten Kräften unterstützten und für eine freundliche, aufgeschlossene und durch Interesse geprägte Arbeitsatmosphäre sorgten.

Besonders Torsten Barth, Björn Buchholz, Stefan Mogk und Jasmin Stein danke ich für das Lesen dieser Promotionsarbeit sowie für ihre Anregungen.

Ein herzliches Dankeschön sage ich auch dem medizinischen Dekanat für die unermüdliche Beantwortung meiner Fragen.

Dem Promotionskolleg „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät gilt mein Dank, da das Kolleg mir neben der finanziellen Förderung viele Möglichkeiten eröffnete, neue Themengebiete zu entdecken und Einblicke in andere Forschungsbereiche außerhalb der Biochemie zu gewinnen.

Besonders bedanke ich mich auch bei Professorin Marlies Knipper, die uns Stipendiaten immer wieder erinnerte, sich Ziele zeitnah zu setzen und zu erreichen. Desweiteren danke ich der Medizinischen Fakultät für die einmalige Chance am Nobelpreisträgertreffen 2011 in Lindau teilzunehmen. Hierbei gilt mein besonderer Dank Professor Gerhard Jahn, Professorin Marlies Knipper und Professor Michael Duszenko, die mich bei der Bewerbung unterstützten und Fachgutachten erstellt haben.

Ein herzlicher Dank gebührt der Abteilung der Allgemeinen Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen. Hierbei danke ich ganz besonders Herrn Professor Hartwig Wolburg und seinen Mitarbeitern, die zahlreiche Gewebeproben elektronenmikroskopisch untersucht und somit zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Ebenso danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinen Bekannten, die sich stets für mich und meine Arbeit interessierten und mich auf diese Weise immer wieder motivierten.

Mein größter Dank gebührt meiner Freundin, Friederike Mareike Susanne Schwarz, die mich während meines Studiums und während der Promotionsarbeit immer unterstützt hat. Ohne ihre liebevollen, aufmunternden und auch kritischen Worte, die mich ständig neu angetrieben und zur kritischen Reflektion angeregt haben und ohne ihren Beistand in schwierigen Situationen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Authentizitätserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv monomeres Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung von *Trypanosoma brucei brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems“ von mir selbstständig verfasst und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Stellen, die dem Sinne oder dem Wortlaut nach anderer Werke entnommen sind, habe ich in durch Angabe der Quelle und der verwendeten Sekundärliteratur gekennzeichnet.

Tübingen, im November 2013

Sven Acker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
Abbildungsverzeichnis	12
Formelverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	13
Zusammenfassung	16
1. Einleitung	19
1.1 Trypanosomen.....	19
1.1.1 Taxonomie und Einordnung	19
1.1.2 Morphologie und zellbiologische Besonderheiten	20
1.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	21
1.2.1 Verbreitungsgebiet und Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	21
1.2.2 Medizinische Bedeutung von <i>T. brucei</i>	23
1.2.3 Humane Afrikanische Trypanosomiasis	23
1.3 Das Problem des meningoenzephalitischen Stadiums.....	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Geräte.....	31
2.1.1 Zellkultur.....	31
2.1.2 Molekularbiologie	31
2.1.3 Proteinbiochemie	32
2.1.4 Fluoreszenzmikroskopie	32
2.1.5 Präparation von Versuchstieren.....	32
2.1.6 Computer, Software und Datenbanken.....	32
2.1.7 Sonstige Geräte	33
2.2 Materialien.....	34
2.2.1 Chemikalien	34
2.2.2 Enzyme, Puffer und Marker.....	37

2.2.3 Antibiotika	39
2.2.4 Lösungen und Medien.....	39
2.2.4.1 Lösungen und Medien zur Kultivierung von Bakterien	39
2.2.4.2 Lösungen und Medien zur Isolierung, Reinigung und Selektion von <i>T. brucei</i>	40
2.2.4.3 Lösungen und Medien zur Kultivierung von Trypanosomen.....	41
2.2.4.4 Lösungen für die Elektroporation.....	43
2.2.4.5 Lösungen für die Fixierung von Trypanosomen und Rattengehirnen	44
2.2.4.6 Antibiotikum zur Selektion rekombinanter Trypanosomen.....	45
2.2.4.7 Lösungen zur Herstellung von Trypanosomen Stabilaten	45
2.2.4.8 Lösungen für molekularbiologische Experimente	46
2.2.5 Kits	48
2.2.6 Verbrauchsmaterialien	49
2.2.7 Verwendete Organismen	51
2.2.8 Verwendete Plasmide	53
2.3 Methoden	55
2.3.1 Kultivierung von Zelllinien	55
2.3.1.1 Kultivierung von <i>E.coli</i> in Flüssigkultur	55
2.3.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> auf solidem Nährmedium	55
2.3.1.3 <i>In vitro</i> Kultivierung von <i>T. brucei</i> in flüssigem Medium.....	55
2.3.1.4 <i>In vitro</i> Kultivierung von <i>T.brucei</i> AnTat 1.1 auf semi-soliden HMI9-0,65% Agarose Platten	56
2.3.1.5 Isolierung von <i>T. brucei</i> aus Gewebe des zentralen Nervensystems	57
2.3.2 Molekularbiologische Methoden	57
2.3.2.1 Primer und Primerdesign.....	57
2.3.2.2 Polymerasekettenreaktion.....	58
2.3.2.3 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	59
2.3.2.4 Gelextraktion von DNA Fragmenten.....	60
2.3.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration	60
2.3.2.6 Subklonierung – <i>Topo TA Cloning</i>	60
2.3.2.7 Transformation.....	61
2.3.2.8 Transformationskontrolle pCR®2.1-TOPO®-mCherry	61
2.3.2.9 Transformationskontrolle pHD309-HYG-mCherry	62
2.3.2.10 Plasmidisolierung	63

2.3.2.11 Sequenzierung von DNA Fragmenten	63
2.3.2.12 Restriktionsverdau	64
2.3.2.13 Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR	64
2.3.2.14 Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry	65
2.3.2.15 Restriktionsverdau pHG309-HYG-mCherry	65
2.3.2.16 Ligation pHD309-HYG mCherry.....	66
2.3.2.17 Herstellung von <i>E. coli</i> Stabilaten in Glycerin.....	68
2.3.2.18 Elektroporation	68
2.3.2.19 Selektion transgener Trypanosomen	69
2.3.2.20 Amplifikation und Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten	
AnTat 1.1 pHD309-HYG-mCherry	69
2.3.3 Nachweis der genomischen Integration des MCP-Gens und Nachweis der	
Expression des monomeren Cherry Proteins in <i>T. brucei</i>	70
2.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA und Kontrolle der genomischen	
Integration des MCP-Gens	70
2.3.3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Proteinexpression des	
monomeren Cherry Proteins in <i>T. brucei</i> und Kontrolle der	
Expressionsstabilität im Infektionsverlauf sowie in Gefrierschnitten	71
2.3.3.3 Proteinbiochemie.....	72
2.3.3.3.1 Lyse von Trypanosomen.....	72
2.3.3.3.2 Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen.....	73
2.3.3.3.3 Gelherstellung	73
2.3.3.3.4 SDS-PAGE und <i>Western blot</i>	74
2.3.3.3.5 Entwicklung von <i>Western blots</i>	74
2.3.4 Anzucht und Isolierung von <i>T. brucei</i> Stamm AnTat 1.1 MCP	75
2.3.4.1 Infektion von Versuchstieren	75
2.3.4.2 Blutabnahme zur Bestimmung der Parasitämie.....	75
2.3.4.2.1 Blutausstrich	76
2.3.4.2.2 Auszählen mittels Neubauer-Zählkammer	76
2.3.4.3 Präparation von Versuchstieren zur Blutentnahme	77
2.3.4.4 Isolierung von Trypanosomen aus Vollblut.....	77
2.3.5 Lokalisierung von <i>T. brucei</i> in Gefrierschnitten von Rattengehirnen	78
2.3.5.1 Perfusion, Fixierung und Entnahme von Gehirnen.....	78
2.3.5.2 Einfrieren von Gehirnen.....	79
2.3.5.3 Herstellung von Gefrierschnitten	79

2.3.6 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von <i>T. brucei</i> im Gewebe des zentralen Nervensystems	79
2.3.6.1 Entnahme, Perfusion, Fixierungen und Vorbereitung von Gehirnen für elektronenmikroskopische Aufnahmen	80
2.3.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	80
2.3.7 Isolierung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	80
2.3.7.1 Perfusion, Entnahme und Vorbereitung von Gehirnen für Isolierungsexperimente	80
2.3.8 Färbemethoden	81
2.3.8.1 Giemsa Färbung	81
2.3.8.2 Bisbenzimidfärbung isolierter Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	81
3. Ergebnisse	83
3.1 Herstellung von rot fluoreszierenden, MCP exprimierenden Trypanosomen	84
3.1.1 Amplifikation des MCP-Gens aus pAAV-MCS-mCherry mittels Polymerasekettenreaktion	84
3.1.2 Restriktionsverdau pDH309-HYG-PUR	85
3.1.3 Subklonierung, Transformation in <i>E. coli</i> und Kontrolle der Rekombinanten	87
3.1.4 Sequenzierung des MCP-Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry	88
3.1.5 Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry	90
3.1.6. Kontrolle des Restriktionsverdaus von pHD309-HYG-PUR	91
3.1.7 Ligation des MCP-Gens in pHD309-HYG, Transformation in <i>E. coli</i> und Kontrolle der Rekombinaten	92
3.1.8 Linearisierung von pHD309-HYG-mCherry	93
3.1.9 Elektroporation, Selektion und <i>in vivo</i> Amplifikation transgener Trypanosomen	93
3.2 Kontrolle der genomischen Integration und Proteinexpression	95
3.2.1 Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens in AnTat 1.1 MCP	95
3.2.2 Kontrolle der Proteinexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie	96
3.2.3 Kontrolle der Proteinexpression mittels <i>Western blot</i>	98
3.3 Lokalisierung von <i>T. brucei</i> im Gewebe des zentralen Nervensystems	100
3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von <i>T. brucei</i> AnTat 1.1 MCP in Gefrierschnitten von Rattenhirnen	100

3.3.2 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von <i>T. brucei</i> im Gewebe des zentralen Nervensystems.....	102
3.4 Isolierung von <i>T. brucei</i> aus Gewebe des zentralen Nervensystems	110
3.5 Morphologische Beschreibung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	111
3.5.1 Morphologische Beschreibung von <i>T. brucei</i> aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems mittels Phasenkontrastmikroskopie	111
3.5.2 Bisbenzimidfärbung von <i>T. brucei</i> aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	112
3.5.3. Elektronenmikroskopische Beschreibung von <i>T. brucei</i> im Gewebe des zentralen Nervensystems.....	114
4. Diskussion.....	115
4.1 Herstellung von rot fluoreszierenden, MCP exprimierenden Trypanosomen und Lokalisierung von <i>T. brucei</i> im Gewebe des zentralen Nervensystems	115
4.2 Beschreibung des Infektionsverlaufs anhand von elektronenmikro- skopischen Aufnahmen	120
4.3 Isolierung von <i>T. brucei</i> aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	126
4.4 Morphologische Beschreibung von isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems	126
5. Literaturverzeichnis.....	129
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AnTat	Antwerp Trypanozoon Antigen Type
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonat
BSF	Blutstromform von <i>Trypanosoma brucei</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CGA	Citrat-Glukose-Antikoagulans
CSF	<i>Cerebral spinal fluid</i>
DEAE	Diethylaminoethyl-
Dest	Destilliert / destilliertes
DFMO	Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalzdihydrat
HAT	Humane afrikanische Trypanosomiasis
HEPES	n-(2-Hydroxyethyl-)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDNA	Kinetoplasten-DNA
LB	Luria Broth
MCP	Monomeres Cherry Protein exprimierend
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PCF	Prozyklische Form von <i>Trypanosomen brucei</i>
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>Post infection</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
<i>T. brucei</i>	<i>T. brucei</i> wird in der vorliegenden Arbeit als Abkürzung für <i>Trypanosoma brucei brucei</i> verwendet
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit

VSG	<i>Variant surface glycoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitungsgebiete verschiedener Glossinen-Arten	22
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	22
Abbildung 3: Hämatolymphatisches Krankheitsstadium	23
Abbildung 4: Meningoenzephalitisches Stadium	24
Abbildung 5: Gibt es eine an das Gewebe des zentralen Nervensystems angepasste Form von <i>T. brucei</i> ?	26
Abbildung 6: Aufbau des Ausgangsplasmids pAAV-MCS-mCherry	53
Abbildung 7: Aufbau der MCS des Plasmids pAAV-MCS.....	53
Abbildung 8: Aufbau des Expressionsplasmids pHD309-HYG-PUR	54
Abbildung 9: Aufbau des Subklonierungsvektors pCR®2.1.-Topo®	61
Abbildung 10: Anregungs-und Emissionsspektrum fluoreszierender Proteine.....	72
Abbildung 11: Herstellung eines Blutausstriches	76
Abbildung 12: Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des MCP-Gens	85
Abbildung 13: Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR	86
Abbildung 14: Kontrolle der Subklonierung	87
Abbildung 15: Ergebnis des Sequenzalignment des MCP-Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry von Klon 1	89
Abbildung 16: Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry	90
Abbildung 17: Kontrolle des Restriktionsverdaus pHD309-HYG-PUR	91
Abbildung 18: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry	92
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle AnTat 1.1 MCP.....	94
Abbildung 20: PCR-Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens	96
Abbildung 21: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von AnTat 1.1 MCP und AnTat 1.1	97
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopie von AnTat 1.1. MCP nach 34 Tage <i>in vivo</i> Kultivierung.	98
Abbildung 23: <i>Western blot</i> monomeres Cherry Protein	99
Abbildung 24: Fixierungsmethoden AnTat 1.1 MCP	101
Abbildung 25: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>T. brucei</i> auf Gewebe des zentralen Nervensystems.....	102
Abbildung 26: Schematischer Aufbau des <i>Plexus choroideus</i>	103
Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von <i>T. brucei</i> im Stroma des <i>Plexus choroideus</i>	104
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von <i>T. brucei</i> im <i>Plexus choroideus</i> und im <i>Liquor cerebrospinalis</i>	105

Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>T. brucei</i> im <i>Liquor cerebrospinalis</i>	106
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines intravasal lokalisierten Trypanosoms im Kapillargefecht des <i>Plexus choroideus</i>	107
Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>T. brucei</i> im Stroma des <i>Plexus choroideus</i>	108
Abbildung 32: <i>T. brucei</i> im Stroma des <i>Plexus choroideus</i>	109
Abbildung 33: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme isolierter Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems.	110
Abbildung 34: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen nach Isolierung aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems.....	112
Abbildung 35: Bisbenzimidfärbung eines isolierten Trypanosoms mit <i>stumpy</i> Form	113
Abbildung 36: Bisbenzimidfärbung eines isolierten Trypanosoms mit <i>slender</i> Form	113
Abbildung 37: Bisbenzimidfärbung isolierter Trypanosomen mit langem Flagellum und verlängertem, schlankem Zellkörper	114
Abbildung 38: Schema der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums	125

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel zur Berechnung der Insertmasse	66
Formel 2: Formel zur Berechnung der Trypanosomenkonzentration	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte für Zellkulturexperimente	31
Tabelle 2: Verwendete Geräte für molekularbiologische Experimente	32
Tabelle 3: Geräte zur Analyse von Proteinen	32
Tabelle 4: Geräte zur Fluoreszenzmikroskopie	32
Tabelle 5: Geräte für die Präparation von Versuchstieren	32
Tabelle 6: Software, Computer und Datenbanken	33
Tabelle 7: Sonstige Geräte.....	34
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien	37
Tabelle 9: Verwendete Enzyme, Puffer und Marker	38
Tabelle 10: Verwendete Antibiotika.....	39

Tabelle 11: Zusammensetzung 2x LB- Medium	39
Tabelle 12: Zusammensetzung 2x Agar-Agar.....	39
Tabelle 13: Lösungen zur Antibiotika-Selektion von Bakterien	40
Tabelle 14: Zusammensetzung PBS	40
Tabelle 15: Zusammensetzung TDB	40
Tabelle 16: Zusammensetzung CGA.....	40
Tabelle 17: Zusammensetzung Separations-Puffer	41
Tabelle 18: Zusammensetzung Grundmedium	42
Tabelle 19: Zusammensetzung Blutstromformmedium.....	42
Tabelle 20: Zusammensetzung IMDM Grundmedium.....	43
Tabelle 21: Zusammensetzung HMI9 Medium.....	43
Tabelle 22: Zusammensetzung Cytomix	43
Tabelle 23: Antibiotikum zur Selektion von Trypanosomen.....	45
Tabelle 24: Zusammensetzung Einfriermedium.....	46
Tabelle 25: Zusammensetzung TAE-Puffer (50x)	46
Tabelle 26: Zusammensetzung Waschpuffer	46
Tabelle 27: Zusammensetzung TBS.....	46
Tabelle 28: Zusammensetzung Transferpuffer.....	47
Tabelle 29: Zusammensetzung Blockierungspuffer.....	47
Tabelle 30: Zusammensetzung Alkalische-Phosphatase-Puffer.....	47
Tabelle 31: Zusammensetzung Färbelösung	47
Tabelle 32: Tris HCl Puffer (1M).....	48
Tabelle 33: Verwendete Kits	48
Tabelle 34: Verbrauchsmaterialien für Zellkulturexperimente	49
Tabelle 35: Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente	50
Tabelle 36: Verbrauchsmaterialien zur Mikroskopie.....	50
Tabelle 37: Allgemeine Verbrauchsmaterialien	51
Tabelle 38: Verwendeter Trypanosomenstamm	51
Tabelle 39: Verwendete Bakterienstämme	52
Tabelle 40: Verwendete Versuchstiere.....	52
Tabelle 41: Zusammensetzung 3 ml Flüssigkultur von <i>E. coli</i>	55
Tabelle 42: Zusammensetzung 50 ml Flüssigkultur von <i>E. coli</i>	55
Tabelle 43: Zusammensetzung der HMI9-0,65% Agarose Platten.....	56
Tabelle 44: Daten <i>forward Primer</i>	58
Tabelle 45: Daten <i>reverse Primer</i>	58

Tabelle 46: Mastermix PCR Ansatz	58
Tabelle 47: Durchführungsbedingungen der Polymerasekettenreaktion	59
Tabelle 48: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry PstI.....	63
Tabelle 49: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry NcoI	63
Tabelle 50: Verwendete Restriktionsenzyme	64
Tabelle 51: Verwendete Puffer zum Restriktionsverdau	64
Tabelle 52: Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR	65
Tabelle 53: Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry	65
Tabelle 54: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry	66
Tabelle 55: Ligationsbedingungen pHD309-HYG-mCherry.....	67
Tabelle 56: Elektroporation von AnTAT 1.1. pHD309-HYG-mCherry	69
Tabelle 57: Fluoreszenzmikroskopie mCherry Protein.....	71
Tabelle 58: Zusammensetzung Lysepuffer	72
Tabelle 59: Zusammensetzung 12% SDS Trenngel.....	73
Tabelle 60: Zusammensetzung 12% SDS Sammelgel	73
Tabelle 61: Entwicklung <i>Western blot</i>	74
Tabelle 62: Fluoreszenzmikroskopie Bisbenzimid	82
Tabelle 63: Konzentrationen von genomischen DNA Proben	95

Zusammenfassung

Afrikanische Trypanosomen verursachen beim Menschen die Schlafkrankheit (*human African trypanosomiasis*: HAT); eine Krankheit, die unbehandelt stets tödlich verläuft. Die Krankheit wird durch zwei Unterarten der Spezies *Trypanosoma brucei* ausgelöst und durch die Tsetse-Fliege (verschiedene *Glossina* Arten) auf den Menschen übertragen. Das Verbreitungsgebiet der HAT ist auf den natürlichen Lebensraum der Glossinen, also auf Gebiete südlich der Sahara, begrenzt. Die HAT bedroht etwa 60 Millionen Menschen und verursacht, nach Schätzungen der Weltgesundheitsbehörde (WHO), jährlich 30.000 Neuinfektionen [WHO, 2010].

Der Verlauf der Schlafkrankheit gliedert sich in zwei Stadien:

- 1) ein primäres hämatolymphatisches Stadium, das medikamentös relativ gut behandelt werden kann und
- 2) ein sekundäres meningoenzephalitisches Stadium, für dessen Behandlung arsenhaltige und toxische Medikamente zur Verfügung stehen.

Die stark limitierten Möglichkeiten zur erfolgreichen Behandlung der HAT im sekundären Krankheitsstadium resultieren zum großen Teil auch daraus, dass bislang Trypanosomen in neuronalen Geweben nur rudimentär untersucht wurden und somit Unklarheiten über die Pathogenese des sekundären Krankheitsstadiums bestehen [Bafort et al, 1987]. Zwar wird vermutet, dass *Trypanosoma brucei* entweder über die Blut-Hirn-Schranke [Mhlanga et al 2001] oder den *Liquor cerebrospinalis* [Schmidt, 1983] in das zentrale Nervensystem eindringt, wie dies jedoch geschieht und welcher Weg tatsächlich genutzt wird, ist bislang nicht geklärt [Lonsdale-Eccles und Grab, 2002]. Ebenso ist es bislang unklar, in welchem Stadium des Lebenszyklus sich Trypanosomen im neuronalen Umfeld befinden und ob sie morphologische und biochemische Besonderheiten aufweisen.

Diese Promotionsarbeit ist Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten „Deutsch-Afrikanischen Kooperationsprojektes in der Infektiologie“ zur Beschreibung und genaueren Untersuchung von *T. brucei* im zentralen Nervensystem.

Ziel der Promotionsarbeit war es, gentechnisch veränderte, pleomorphe Trypanosomen (Stamm AnTat1.1), die konstitutiv das monomere Cherry Protein (MCP) exprimieren, herzustellen und eine Lokalisierung und morphologische Charakterisierung von *Trypanosoma brucei brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems zu ermöglichen.

Zur Herstellung dieser Parasiten wurde das Gen, das für das monomere Cherry Protein codiert, mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry amplifiziert und mittels gentechnischer Verfahren in das modifizierte, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG kloniert. Dieses Expressionsplasmid wurde zur Transfektion in *T. brucei* (Stamm AnTat 1.1), die mittels Elektroporation und anschließender homologer Re-

kombination durchgeführt wurde, verwendet. Anschließend erfolgte die Selektion und Amplifikation rekombinanter Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) mittels Hygromycin B auf semi-soliden HMI9-0,65% Agaroseplatten und Kultivierung in NMRI Mäusen. Rekombinante Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) wurden auf die Expression des MCPs sowohl durch *Western blot* als auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen kontrolliert. Die Stabilität der Proteinexpression, die im Tierexperiment über einen Zeitraum von 34 Tagen fluoreszenzmikroskopisch überprüft wurde, eröffnete die Möglichkeit rekombinante Trypanosomen zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung von *T. brucei* im zentralen Nervensystem einzusetzen.

Die Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des ZNS erfolgte mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse von Gefrierschnitten von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.i.) und anschließender Transmissionselektronenmikroskopie. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden im Bereich der Blut-Hirnschranke, des *Plexus choroideus*, des *Corpus striatum*, des *Cerebellum* und des *Kortex* in Kooperation mit Professor Wolburg aus dem Institut für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen sich Trypanosomen konstant im Stroma des *Plexus choroideus* lokalisieren. Bei vielen, der im Stroma des *Plexus choroideus* lokalisierten Trypanosomen konnte ein Oberflächenmantel aus VSG dargestellt werden, während dieser bei einigen Trypanosomen eindeutig nicht nachzuweisen war.

Zur morphologischen Charakterisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems gelang es, in dieser Arbeit erstmals, Trypanosomen aus dem neuronalen Umfeld zu isolieren. Anhand einer phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnten diese morphologisch beschrieben werden. Phasenkontrastmikroskopisch ließen sich drei verschiedene Trypanosomenpopulationen bzw. Formen feststellen. Bei zwei von den drei beschriebenen Formen handelte es sich um bekannte *slender* und *stumpy* Formen, während die dritte Form keiner bislang bekannten Trypanosomenform zugeordnet werden konnte. Diese unbekannte Trypanosomenform wurde als verlängert, einen langen, schmalen Zellkörper besitzend und ein langes Flagellum tragend beschrieben. Durch eine Bisbenzimidfärbung und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die drei beschriebenen Trypanosomenpopulationen eine trypomastigote Differenzierung aufwiesen.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich bei der bislang unbeschriebenen Trypanosomenform um ein neues Lebensstadium von *T. brucei* im neuronalen Umfeld handeln könnte. Ebenso deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Trypanosomen in der Initialphase des meningoenzephalitischen Stadiums zunächst den *Plexus choroideus* besiedeln. Der *Plexus choroideus* könnte eine Art Zwischenstation für Trypanosomen

darstellen und durch bislang unbekannte Faktoren eine Differenzierung und Anpassung an das zentrale Nervensystem begünstigen. Möglicherweise entsteht dabei eine neue, bislang unbekannte Trypanosomenform, die sich durch morphologische und/oder biochemische Anpassungen auszeichnet und in dieser Arbeit erstmals näher beschrieben werden konnte.

1. Einleitung

1.1 Trypanosomen

Trypanosomen sind weltweit verbreitete, parasitisch lebende, einzellige Eukaryonten [Kayser, 2006]. Der Name *Trypanosoma* leitet sich aus dem Griechischen von den Worten „*trypanon*“ = „Bohrer“ und „*soma*“ = „Körper“ ab und beschreibt die Bewegungsart dieser spindelförmigen Flagellaten [Kayser, 2006]. Trypanosomen vollführen einen komplexen Lebenszyklus mit Gestaltwandel, in dem sie auf einen obligaten Wirtswechsel angewiesen sind [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Desweiteren besitzen Trypanosomen auch morphologische, genetische und biochemische Besonderheiten [Duszenko, 1998].

Trypanosomen und andere Parasiten der Familie der Trypanosomatidae haben sich während der stammesgeschichtlichen Entwicklung an ein breites Wirtsspektrum, das unter anderem Pflanzen, Arthropoden, Insekten und Vertebraten umfasst, angepasst [Camargo, 1999]. Viele dieser Arten sind nicht humanpathogen und lösen selten veterinäre Erkrankungen aus. Jedoch gibt es drei Arten, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma cruzi*, die humanpathogene Infektionen auslösen [Kayser, 2006]. In seltenen Fällen wurde beobachtet, dass auch tierpathogene Trypanosomenstämme wie z.B. *Trypanosoma evansi* auf empfängliche, humane Wirte übertragen werden und schwere Krankheitsverläufe auslösen können [WHO, 2004]. Trypanosomen spielen vor allem auf der Südhalbkugel in Entwicklungsländern, die in Afrika, in Gebieten südlich der Sahara und in Mittel- und Südamerika liegen, eine große Rolle, da in diesen Regionen das natürliche Verbreitungsgebiet der human- und tierpathogenen Arten und ihrer Vektoren liegt [Cook und Zumla, 2009]. In diesen Gebieten bedrohen Trypanosomen nicht nur die Gesundheit des Menschen sondern fügen ihm auch, durch Infektion der Nutztiere, in ökonomischer Hinsicht enormen Schaden zu [Ilemobade, 2009].

1.1.1 Taxonomie und Einordnung

Zusammen mit anderen Organismen wie z.B. Leishmanien und Crithidien gehören Trypanosomen zur Ordnung Kinetoplastida. Kennzeichnend für die Ordnung der Kinetoplastida ist das Vorkommen eines elektronenmikroskopisch sichtbaren Selbstteilungskörpers, der die gesamte mitochondriale DNA (Kinetoplasten-DNA (kDNA)) innerhalb eines lang gestreckten Mitochondriums enthält und als Kinetoplast bezeichnet wird [Chen, 1995]. Alle Kinetoplastidae besitzen in mindestens einem Stadium ihres Lebenszyklus ein oder mehrere Flagellen. Anhand der Anzahl der Flagellen kann man die Unterordnungen Trypanosomatina (ein Flagellum) und Bodonina (zwei Flagellen) unterscheiden [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Die Gattung *Trypanosoma* gehört der Familie Trypanosomatidae an und zählt zu den Trypanosomatina.

Die taxonomische Einordnung von *Trypanosoma brucei brucei* [Levine et al, 1980]:

System:	Protozoa
Stamm:	Sacromastigophora
Unterstamm:	Mastigophora (Flagellata)
Klasse:	Zoomastigophora
Ordnung:	Kinetoplastida
Familie:	Trypanosomatidae
Gattung:	Trypanosoma
Art:	Trypanosoma brucei
Unterart:	Trypanosoma brucei brucei Trypanosoma brucei gambiense Trypanosoma brucei rhodesiense

1.1.2 Morphologie und zellbiologische Besonderheiten

Lichtmikroskopisch betrachtet sind Trypanosomen 15-40 µm lange, im Durchmesser 0,5-2 µm große, spindelförmige Einzeller, deren äußere Gestalt stark vom Stadium der Entwicklung abhängig ist [Kayser, 1996]. Jedes Trypanosom besitzt ein Flagellum, das seinen Ursprung am hinteren Ende des Trypanosoms, nahe der Flagellumtasche hat und über zahlreiche Maculae adhaerentes an die Zellmembran angelagert ist, so dass bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Eindruck einer undulierenden Membran entsteht [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Lediglich der vordere Teil des Flagellums ist frei und nicht über Kontakte mit der Zellmembran verbunden. Dieses Flagellum dient dem Parasit einerseits in Form einer Zuggeißel als essentielles Mittel zur Fortbewegung [Kayser, 1996] und andererseits ist die Mobilität des Flagellums essentiell für das Überleben der Trypanosomen [Broadhead et al., 2006]. Im Bereich der Flagellumtasche finden zahlreiche Endo- und Exozytosevorgänge statt, so dass in diesem Bereich ein stark ausgeprägtes vesikuläres System ausgebildet ist [Landfear und Ignatushchenko, 2001]. Je nach Entwicklungsstadium ist die morphologische Gestalt der Trypanosomen und somit die Lage der Flagellumtasche und des Kinetoplasts zum Zellkern verändert. Seit 1966 unterscheidet man nach Hoare und Wallace das amastigote, das epimastigote, das promastigote und das trypomastigote Stadium [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Das runde, amastigote Stadium ist ein rein intrazelluläres Stadium, das zum Beispiel bei *Trypanosoma cruzi* auftritt, während es bei *Trypanosoma brucei* als obligatem, extrazellulären Parasiten nicht vorkommt. Das promastigote Stadium ist dadurch gekennzeichnet, dass die Flagellumtasche weit vor dem Zellkern liegt. Beim epimastigoten Stadium liegt die Flagellumtasche unmittelbar vor dem

Zellkern, während sie sich beim trypomastigoten Stadium hinter dem Zellkern befindet [Cook und Zumla, 2009].

Charakteristisch für Trypanosomen ist, dass sie nur ein langgestrecktes Mitochondrium besitzen, das im Bereich der Flagellumtasche den Kinetoplasten beherbergt. Desweiteren besitzen Trypanosomen ein dicht gepacktes System aus parallel angeordneten Mikrotubuli, das unter der Plasmamembran in gegeneinander verschiebbaren Strängen verläuft und somit ein flexibles Netz bildet, das Endo- und Exozytosevorgänge an anderen Stellen als an der Flagellumtasche verhindert und auf diese Weise die Zelle stabilisiert [Hemphill et al, 1991]. Außerdem zeigen Trypanosomen eine Fülle verblüffender zellbiologischer und biochemischer Eigenheiten [Duszenko, 1998]. Diese sind zum Beispiel speziell angefertigte Zellorganellen wie Glykosomen, in denen die meisten Reaktionen der Glykolyse ablaufen, ein alternatives System zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies, in dem Gluthation durch Trypanothion ersetzt ist und zahlreiche genetische Besonderheiten, wie RNA-Editing und diskontinuierliche Transkription [Duszenko, 1998].

Der wohl bekannteste und erstaunlichste zellbiologische Trick des Parasiten ist jedoch die Veränderung der Oberflächenproteine (VSG = variant surface glycoprotein), die es ihm ermöglicht stets die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen. Alleine für dieses Manöver stehen mehr als 1000 unterschiedliche VGS-Gene, die ungefähr zehn Prozent des trypanosomalen Genoms einnehmen, zur Verfügung [Sternberg, 2004]. Diese zellbiologischen und biochemischen Eigenheiten machen Trypanosomen einzigartig, wecken das Interesse der Forschung für neue, medikamentöse Behandlungsansätze und sichern dem Parasit das Überleben im ständigen Wettlauf mit dem Immunsystem des Wirtes.

1.2 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei ist der Erreger der humanen, afrikanischen Trypanosomiasis, der in dieser Dissertationsarbeit genauer betrachtet werden soll.

1.2.1 Verbreitungsgebiet und Lebenszyklus von *T. brucei*

Trypanosoma brucei vollführt einen komplexen Lebenszyklus, in dem er auf einen Wirtswechsel angewiesen ist. Dieser Wirtswechsel ist essentiell für den Parasiten, denn nur über einen Überträger kann sich der Parasit weiter entwickeln. Dieser Vektor ist eine 8 – 17 mm große Fliegenart der Gattung *Glossina*; besser bekannt als die Tsetse-Fliege [Ilemobade, 2009]. Daher beschränkt sich das Verbreitungsgebiet von *Trypanosoma brucei* auf den natürlichen Lebensraum bestimmter Tsetse-Fliegen, die den Gruppen *Palpalis* und *Morsitans* angehören [WHO, 2006]. Dieses Verbreitungsgebiet liegt in Afrika in Gebieten südlich der Sahara, zwischen den Breitengraden 15°N und 18°S und wird auch als Tsetse-Gürtel bezeichnet [Dönges, 1988]. In diesen Gebieten sind bis zu 60 Millionen Menschen in

36 Ländern von der humanen afrikanischen Trypanosomiasis bedroht, wobei *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Ostafrika und *Trypanosoma brucei gambiense* vor allem in Westafrika vorkommt [WHO, 2006]. Schätzungsweise 0,1-0,4% der dort lebenden Tsetse-Fliegen sind mit humanpathogenen Trypanosomen infiziert [Mehlhorn und Piekarski, 2002].

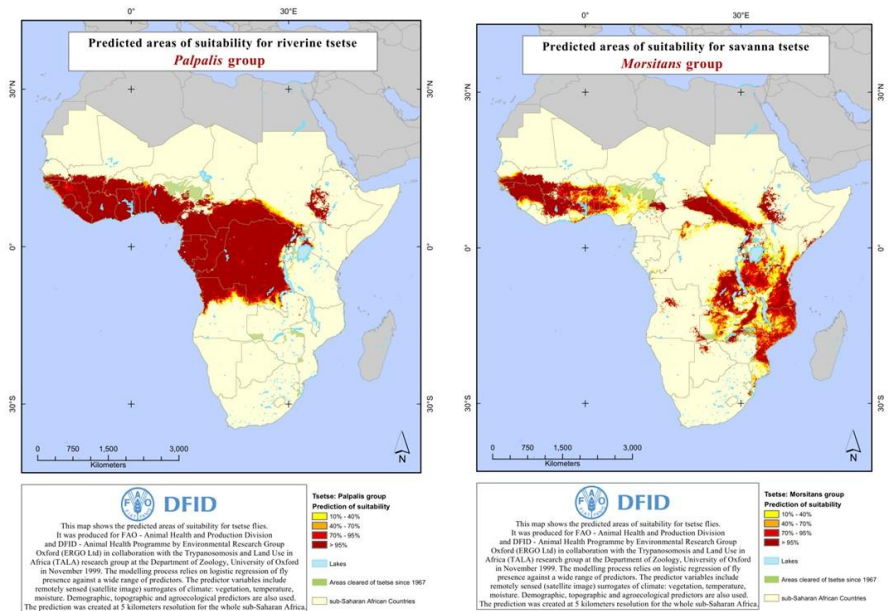


Abbildung 1: Verbreitungsgebiete verschiedener Glossinen-Arten

Quelle: WHO

Eine Tsetse-Fliege infiziert sich mit *Trypanosoma brucei* beim Biss an einem infizierten Menschen oder frei lebenden Tier, das häufig ein natürliches Reservoir für Trypanosomen darstellt [WHO, 2006]. Dabei nimmt die Fliege trypomastigote Formen auf. Sobald diese, beim Saugakt in Mitteldarm der Tsetse-Fliege gelangt sind, gestalten sich die trypomastigoten *stumpy* Formen zu procyclischen Formen um, scheiden ihre VSG-Hülle ab und ersetzen diese durch ein anderes Glykoprotein (PARP) [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Diese procyclischen Formen dringen aus dem Mitteldarm in die Speicheldrüsen der Fliege ein und differenzieren sich zu epimastigoten Formen. Epimastigote Formen differenzieren durch Lektinkontakt, zu metazyklischen Formen, die in die Speichelgänge der Tsetse-Fliege wandern [Cook und Zumla, 2009]. Bis zu 50.000 dieser, für Vertebraten infektiösen, metazyklischen Formen, werden bei der nächsten Mahlzeit der Tsetse-Fliege mit dem Speichel in die Haut des Wirtes

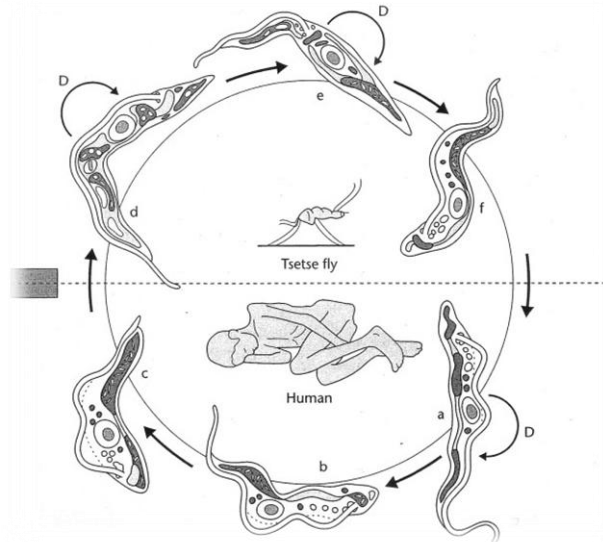


Abbildung 2: Lebenszyklus von *T. brucei*

- a= Slender form
- b= Intermediate form
- c= Stumpy form
- d= Procyclic form
- e= Epimastigote form
- f= Metacyclic form

Quelle: Manson's Tropical Diseases. 2009

inokuliert [Kayser, 2006] und gelangen auf diese Weise über den Lymphabfluss in dessen Blut [Mehlhorn und Piekarski, 2002]. Im Blut differenzieren die metazyklischen Formen zu Formen, die aufgrund ihrer länglichen Gestalt als *slender* Formen bezeichnet werden und durch Längsteilung rasch proliferieren. Durch bislang unbekannte Faktoren entwickeln sich *slender* Formen über eine intermediate Form und differenzieren schließlich zu *stumpy* Formen [Zaman, 1979]. *Stumpy* Formen sind teilungsunfähig und stellen wiederum infektiöse Formen für den Vektor (die Tsetse Fliege) dar, so dass sich der Lebenszyklus schließt [Cook und Zumla, 2009]. *Trypanosoma brucei* ist nach bisherigem Wissenstand ein rein extrazellulärer Parasit, der keine intrazelluläre, amastigote Form wie z.B. *Trypanosoma cruzi* besitzt.

1.2.2 Medizinische Bedeutung von *T. brucei*

Zwei Arten von *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei gambiense*, verursachen die humane afrikanische Trypanosomiasis, eine Infektionskrankung, die auch als Schlafkrankheit oder *sleeping sickness* bezeichnet wird.

1.2.3 Humane Afrikanische Trypanosomiasis

Die humane afrikanische Trypanosomiasis ist eine parasitäre Infektionskrankheit, die durch *Trypanosoma brucei gambiense* oder *rhodesiense* verursacht wird und nach Einschätzung der Weltgesundheitsbehörde zu der Gruppe der *neglected diseases* gehört [WHO, 2006]. Es wird geschätzt, dass weltweit 300.000 Menschen infiziert sind und pro Jahr 10.000 – 30.000 Neuinfektionen auftreten [WHO, 2010]. Trotz Verbesserungen in der Diagnostik im Bereich des Screening wird die Dunkelziffer sehr hoch eingeschätzt, da viele Fälle nicht erfasst und aufgezeichnet werden [Cecchi et al, 2009]. Die Krankheit verläuft in zwei Stadien und ist ohne adäquate Diagnostik und Behandlung stets letal. Eine genaue Unterscheidung zwischen dem ersten und zweiten Krankheitsstadium ist nicht immer einfach, jedoch für die Behandlung wichtig, da in den unterschiedlichen Krankheitsstadien verschiedene Medikamente eingesetzt werden [Binford und Conner, 1976].



Abbildung 3: Hämato-lymphatisches Krankheitsstadium

Afrikanischer Junge mit zervikaler Lymphadenopathie (Winterbottom-Zeichen).
Quelle: Manson's Tropical Diseases. 2009

Lange Zeit wurde die HAT auch „Krankheit der Ausnahmen“ genannt, da das klinische Krankheitsbild vielgestaltig sein kann [Gilles und Peters, 1995]. Die Infektion beginnt durch die Übertragung des Parasiten durch den Biss der Tsetse-Fliege. Im Bereich des Einbisses entsteht der sogenannte Trypanosomenschanter, eine drei bis vier cm große, mesenchymale Entzündung [Binford und Conner, 1976], die mehrere Wochen persistiert und von der aus infektiöse, metazyklische Trypanosomen über das Lymphsystem in das Blut gelangen und sich zu *slender* Formen differenzieren, die proliferieren und sich hämatogen ausbreiten. Während dieses Stadiums kommt es zu unspezifischen Krankheitssymptomen, gekennzeichnet durch eine zervikale und allgemeine Lymphadenopathie (Winterbottom-Zeichen), Gesichtsrötung, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie durch rezidivierende Fieberschübe. Dieses primäre Krankheitsstadium wird als febrilglanduläres oder hämatolymphatisches Stadium bezeichnet [Kayser, 1996].

Nach mehreren Wochen bis Monaten überwinden die Trypanosomen möglicherweise die Blut-Hirn-Schranke und dringen in das zentrale Nervensystem ein. Die Invasion der Trypanosomen in das ZNS erzeugt u.a. eine Meningoenzephalitis, selten epileptische Anfälle, Apathie, Tremor, Faszikulationen, Ataxie, extrapyramidale Störungen, Dysregulationen des Schlaf-Wachrhythmus und Somnolenz bis hin zum Koma [Guerrant, 2001]. Dieses Stadium wird als meningo-



Abbildung 4: Meningoenzephalitisches Stadium

Ein junger Mann im meningoenzephalitischen Stadium liegt apatisch im Bett

Quelle: Manson's Tropical Diseases. 2009

enzephalitisches Stadium bezeichnet und verläuft unbehandelt stets letal [Kayser, 1996].

Ein großes Problem im Kampf gegen die Schlafkrankheit stellt die Diagnose und medikamentöse Behandlung dar. Nach wie vor erfolgt die Diagnose hauptsächlich durch ein Screening, das über einen direkten Erregernachweis durch Lymphknotenaspiration und Blutaussstriche erfolgt. Alternativ steht bei *Trypanosoma brucei gambiense* ein indirekter Nachweis über den Karten-Agglutination-Test für Trypanosomen (CATT) zur Verfügung [Cook und Zumla, 2009].

Sobald ein direkter oder indirekter Nachweis von Trypanosomen im Blut gelingt, muss zum Staging der Erkrankung zwingend eine Lumbalpunktion durchgeführt werden. Werden dabei Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* diagnostiziert, so befindet sich der Patient im sekundären Krankheitsstadium [Guerrant, 2001].

Ein negatives Testergebnis schließt jedoch den Befall des zentralen Nervensystems nicht aus. Deshalb stellt das Staging der Erkrankung ein enormes, bislang unzureichend gelöstes Problem bei der Diagnostik der humanen afrikanischen Trypanosomiasis (HAT) dar.

Ähnliche Probleme bestehen bei der medikamentösen Behandlung der Schlafkrankheit. Zwar stehen einerseits Medikamente für die Behandlung des ersten Stadiums wie Suramin und Pentamidin zur Verfügung, die relativ gut verträglich sind, selten aber auch Nebenwirkungen wie z.B. Agranulozytosen aufweisen, jedoch sind andererseits Medikamente zur Behandlung des zweiten Krankheitsstadiums spärlich verfügbar [Cook und Zumla, 2009]. So werden nach wie vor das arsenhaltige Medikament Melarsoprol und das Medikament Eflornithin trotz ihrer Nebenwirkungen und Toxizität eingesetzt [Cook und Zumla, 2009]. Allein Melarsoprol weist nach Applikation eine 3-10 prozentige Mortalitätsrate auf, da das Medikament eine *post treatment reactive encephalitis* verursachen kann [Braakman et al, 2006].

Zudem wird vermutet, dass ein erheblicher Anteil der Medikamente durch aktive oder passive Effluxmechanismen der Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten wird [Na-Bangchang et al, 2004], so dass therapeutische Wirkungsbereiche im ZNS schwer zu erreichen sind [Sanderson et al, 2008]. Dieses Problem könnte zumindest für Eflornithin durch eine Kombinationstherapie mit Nifurtimox teilweise gelöst sein [Priotto et al, 2007].

Bislang ist das Ziel, vor allem für das zweite Krankheitsstadium, nebenwirkungsarme Medikamente mit verbessertem Wirkungsspektrum und besserer Applikationsmöglichkeit zu entwickeln nicht erreicht bzw. nur unzureichend gelöst, so dass weiterhin die bereits genannten Medikamente verabreicht werden, gegen die der Parasit bereits Resistenzen entwickelt [Kibona et al, 2006].

1.3 Das Problem des meningoenzephalitischen Stadiums

Zur Überwindung der Probleme, die sich in der Diagnostik und Behandlung des zweiten Krankheitsstadiums ergeben, muss die Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums genauer erforscht werden, um neue, therapeutische Ansatzmöglichkeiten zu entwickeln.

Leider ist das zweite Krankheitsstadium der HAT bislang nur wenig erforscht, so dass zahlreiche ungelöste Fragen und nicht geklärte Aspekte im Hinblick auf die Pathogenese [Bafort et al, 1987] des meningoenzephalitischen Stadiums und im Hinblick auf den Erreger selbst, bestehen. Bisherige Arbeiten mit *Trypanosoma brucei brucei* [Masocha et al, 2004], *Trypanosoma evansi* [Rodrigues et al, 2009; Tuntasuvan et al, 2000] und *Trypanosoma brucei rhodesiense* [Bafort und Schmidt, 1983], die sich mit dem meningoenzephalitischen Stadium befassten, zeigten, dass Trypanosomen im Tiermodell zwischen dem 21. und 63. Tag nach einer Blutinfektion [Bafort und Schmidt, 1983] zu einer Invasion des zentralen Nervensystems führen und Trypanosomen nahe den Gefäßen, im Virchow-Robin Raum,

lokalisiert werden können [Rodrigues et al, 2009; Tuntasuvan et al, 2000; Bafort und Schmidt, 1983]. Ebenfalls wurden Trypanosomen in den weichen Hirnhäuten und im Bereich des *Plexus choroideus* [Bafort und Schmidt, 1983] sowie in den septalen Kerngebieten, im Neocortex und der weißen Substanz [Masocha et al, 2004] beschrieben, wobei die Parasiten deutlich häufiger in der weißen Substanz als in der grauen Substanz lokalisiert werden konnten [Masocha et al, 2004]. Eine ausführliche, morphologische Beschreibung von Trypanosomen im meningo-enzephalitischen Stadium erfolgte bislang jedoch nicht. Beschriebene Trypanosomen wurden lediglich als ausschließlich extrazellulär, dünn, teilweise verlängert [Schmidt und Bafort, 1987] und Flagellum tragend [Poltera et al, 1980] beschrieben. Das Auftreten von amastigoten Formen, wie von Ormerod und Venkatesan vermutet [Ormerod und Venkatesan, 1971], konnte in anderen experimentellen Ansätzen nicht bestätigt werden [Poltera et al, 1980]. Aufgrund der mangelnden Daten ist weiterhin unklar, in welchem Stadium des Lebenszyklus sich Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems befinden und ob und wie sie sich an dieses angepasst haben.

Ebenso ist nicht abschließend geklärt, auf welche Weise Trypanosomen den intravasalen Raum verlassen und in das Parenchym des Gehirnes eindringen [Lonsdale-Eccles und Grab, 2002]. Einige Forscher gehen davon aus, dass Trypanosomen das Gehirn über den *Liquor cerebrospinalis* erreichen [Schmidt, 1983], während andere eher die Blut-Hirn-Schranke favorisieren [Lonsdale-Eccles und Grab, 2002; Mhlanga et al, 2001; Lambert et al, 1981; Masocha et al, 2004]. Einige Experimente sprechen dafür, dass Trypanosomen über die Blut-Hirn-Schranke in das neuronale Gewebe eindringen. Ein Mechanismus dazu ist weitgehend unbekannt, jedoch werden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen [Rodrigues et al, 2009]. So könnten Trypanosomen das Gehirnparenchym an Orten, an denen die Blut-Hirn-Schranke fehlt und durch fenestrierendes Endothel ersetzt ist

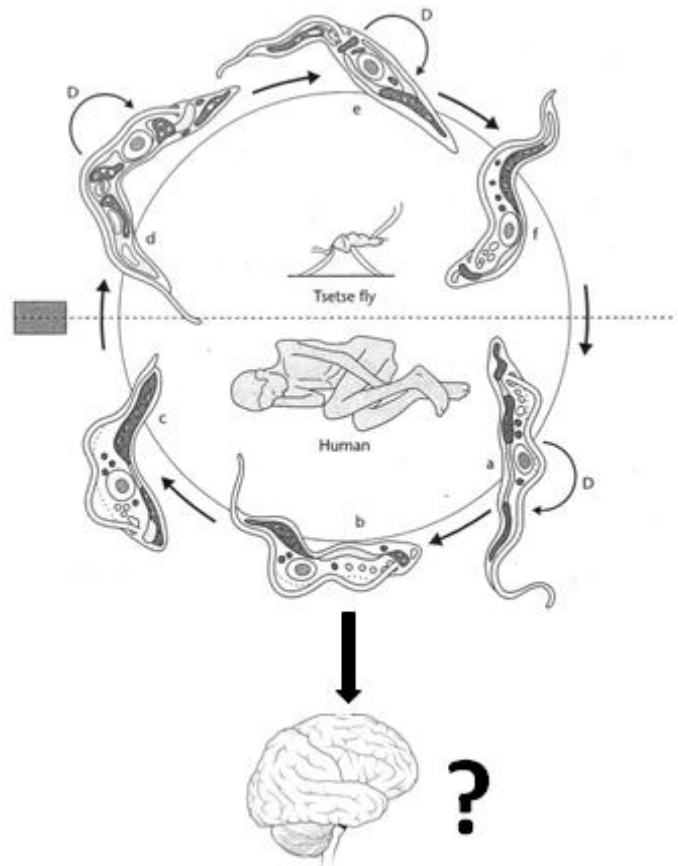


Abbildung 5: Gibt es eine an das Gewebe des zentralen Nervensystems angepasste Form von *T. brucei*?

Quelle: Manson's Tropical Diseases.2008

Modifizierte Abbildung nach Manson's Tropical Diseases.

[Kristensson et al, 2009], wie an den zirkumventrikulären Organen [Mhlanga et al, 1997] oder durch Sekretion von Substanzen, die *tight junctions* der Blut-Hirn-Schranke auflösen [Lonsdale-Eccles und Grab, 2002] oder durch komplexe Zytokin verursachte Permeabilitätssteigerungen der Blut-Hirn-Schranke überwinden [Masocha et al, 2004]. Wie vorgeschlagen, soll es sich um komplexe, biochemische Interaktionen zwischen dem Parasit, dem Immunsystem des Wirtes und den zellulären und extrazellulären Komponenten der Blut-Hirn-Schranke handeln, die dann möglicherweise zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke führen [Masocha et al, 2004; Grab et al, 2009; Nikolskaia et al, 2006]. Auf diese Weise könnten Trypanosomen ähnlich wie Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden [Masocha et al, 2004]. Ob dieser Vorgang parazellulär oder transzellulär geschieht, ist nicht abschließend geklärt [Engelhardt und Wolburg, 2004; Philipp et al, 1994; Mulenga et al, 2001].

Bisherige Erkenntnisse über die Pathogenese der Gehirninfection deuten jedoch auf einen anderen Mechanismus hin. Sie gehen davon aus, dass sich Trypanosomen zunächst in der Blutbahn befinden, von dort in zirkumventrikuläre Organe [Schulzenberg et al, 1988] und in das *Interstitium* des *Plexus choroideus* eindringen, eine inflammatorische Reaktion auslösen, die die Migration der Trypanosomen in den *Liquor cerebrospinalis* und von dort zu anderen zerebralen Strukturen ermöglicht [Poltera et al, 1980; Kristensson et al, 2009]. Möglicherweise könnte die Pathogenese also in drei Teile gegliedert sein [Schmidt, 1983]: Zunächst erfolgt eine Invasion des *Plexus choroideus* und des *Liquor cerebrospinalis* (Phase 1), die wiederum den Ausgangspunkt zur Entwicklung einer Enzephalitis darstellt [Schmidt, 1983]. Zur Entwicklung der Enzephalitis dringen Trypanosomen vom *Liquor cerebrospinalis*, entlang der Hirnhäute und des subarachnoidalen Raums, in die Virchow-Robin Räume ein (Phase 2), von wo aus sie schließlich in das Parenchym des Gehirnes gelangen (Phase 3) [Schmidt, 1983].

Jedoch gibt es bislang keine endgültige Sicherung dieser These, da der Weg der Pathogenese mittels Lichtmikroskopie nur unsicher beschrieben und bislang durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nicht eindeutig belegt werden konnte.

Die durch Trypanosomen in der dritten Phase verursachte, vor allem perivaskuläre, inflammatorische Reaktion mit lymphozytären T- und B-Zell Infiltraten [Masocha, 2004], in denen unter anderem spezielle Plasmazellen (*Mott Cells*) mit Einschlusskörperchen (*Russel bodies*) auftreten sowie eine daraus resultierende Ödembildung und Entstehung einer Meningitis konnte mehrfach beschrieben werden [Rodrigues et al, 2009; Tuntasuvan et al, 1997]. Wie Trypanosomen als extrazelluläre Parasiten in einem Gewebe wie dem Gehirn überleben, ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Experimente in denen Blutstromform-Trypanosomen abgestillten und nicht abgestillten Mäusen durch eine intrathekale Injektion in das Gehirngewebe appliziert wurden [Bafort et al, 1987] sowie Experimente in denen die Blut-Hirn-Schranke mechanisch zerstört wurde

[Schmidt und Bafort, 1987], zeigten vergleichbare Ergebnisse. Zunächst konnten diese Trypanosomen nach einer primären Proliferationsphase in Gewebsschnitten nahe des Einstichkanals oder der mechanischen Läsion nachgewiesen werden [Schmidt und Bafort, 1987, Bafort et al, 1987]. In beiden Fällen begannen die Trypanosomen jedoch nach 12-14 Tagen zu degenerieren und konnten schließlich nicht mehr nachgewiesen werden [Bafort et al, 1987]. Möglicherweise deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Blutstromform-Trypanosomen langfristig kein optimales Umfeld zum Überleben im extrazellulären Milieu des Gehirns haben [Schmidt und Bafort, 1987] und sich erst an das neuronale Umfeld anpassen müssen.

Ein weiteres Rätsel stellt die Entstehung der Krankheitssymptome des meningoenzephalitischen Stadiums durch Trypanosomen dar [Bruzzone et al, 2009]. Da Trypanosomen extrazelluläre Parasiten sind, sollten neurologische Symptome entweder vom Parasit selbst, durch sezernierte Substanzen, durch das Immunsystem des Wirtes oder durch ein Zusammenspiel von beiden verursacht werden [Kristensson et al, 2009]. Bekannt ist, dass Infektionen mit *Trypanosoma brucei brucei* bei Ratten Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus auslösen und zu einer Expressionsveränderung in endogenen Rhythmen wie z.B. der Expression von *clock*-Genen im Schlaf-Wach-Rhythmus in Epiphyse, *Nucleus supra-chiasmaticus*, Hypophyse und Milz führen [Lundkvist et al, 2010]. Möglicherweise könnte auch die Regulation der trypanosomalen Zelldichte über Prostaglandin D₂ zu Alternationen des Schlaf-Wach-Rhythmus führen [Figarella et al, 2005].

Erstaunlicherweise konnten in magnetresonanztomographischen Untersuchungen des Gehirnes von HAT infizierten Reisenden, die sich bereits im sekundären Krankheitsstadium befanden, verschiedene hyperintensive Signale (T2 gewichtet), die auf Demyelinisierungen hinweisen könnten, in supratentoriellen Regionen der weißen Substanz, im Hirnstamm, im Kleinhirn und Läsionen in der grauen Substanz festgestellt werden [Kager et al, 2009, Braakman et al, 2006]. Sicherlich spielen bei der Entstehung der Krankheitssymptome eine gesteigerte Immunantwort, bei der auch Antikörper gegen körpereigene Strukturen gebildet werden [Galvao-Castro et al, 1978] und massive Veränderung in der Zytokinausschüttung eine entscheidende Rolle [Kristensson et al, 2009], während ein direkt zellschädigender Effekt durch Trypanosomen eher als unwahrscheinlich gilt, aber nicht ausgeschlossen werden kann [Galvao-Castro et al, 1978].

Trotz intensiver Bemühungen, das Wissen über das meningoenzephalitische Stadium zu erweitern, ist weiterhin nicht endgültig geklärt, wie Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems aussehen und wo sie sich „verstecken“, um sich dem Immunsystem und einer medikamentösen Behandlung zu entziehen [Bruzzone et al, 2009]. Deshalb kann nach wie vor das Wiederauftreten der Schlafkrankheit nach erfolgreicher Behandlung (Relapse),

ohne erneute Infektion, nur spekulativ als Wiedereintritt von Trypanosomen aus dem Gehirn in die Blutbahn erklärt werden.

Vielleicht gelingt es in absehbarer Zeit, die Kenntnis über das menigoenzephalitische Stadium zu erweitern und Besonderheiten von Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems zu entschlüsseln, so dass diese möglicherweise als therapeutischer Ansatz im Kampf gegen die humane afrikanische Trypanosomiasis nutzbar gemacht werden können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Promotionsarbeit mit dem Titel „Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv monomeres Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung von *Trypanosoma brucei brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems“ ist es, gentechnisch veränderte, pleomorphe Trypanosomen (Stamm AnTat1.1), die konstitutiv das monomere Cherry Protein exprimieren, herzustellen und eine Lokalisierung und morphologische Charakterisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems zu ermöglichen.

Bisherige Arbeiten zeigten, dass sich Trypanosomen mit lichtmikroskopischen Methoden und histopathologischen Färbetechniken [Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009] im neuronalen Gewebe nur schlecht darstellen lassen, so dass bislang eine morphologische Beschreibung von Trypanosomen im zentralen Nervensystem nur schwer möglich war. Aus diesem Grund sollte der pleomorphe Trypanosomenstamm AnTat 1.1 mit einem fluoreszierenden Protein markiert werden.

Zahlreiche fluoreszierende Proteine, wie eGFP, ds Red, mBanana, mCherry, etc., die bereits in vielen Experimenten eingesetzt wurden, stehen für eine Anwendung dieser Art zur Verfügung. Aufgrund der langen Belichtungszeiten, die für eine Lokalisierung von Trypanosomen im neuronalen Gewebe zu erwarten sind, musste ein fluoreszierendes Protein, das für die Lokalisierung verwendet werden sollte, möglichst eine hohe Photostabilität und eine geringe Phototoxizität [Olympus, 2009] aufweisen. Deshalb wurde zur Markierung der Trypanosomen, das monomere Cherry Protein, ein rot fluoreszierendes Protein der mFruit Familie, das der zweiten Generation von rot fluoreszierenden Proteinen angehört [Shu et al, 2006], ausgewählt.

Zur Herstellung MCP exprimierender Trypanosomen (Stamm AnTat 1.1) sollte das Gen, das für das monomere Cherry Protein codiert, mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry amplifiziert und mittels gentechnischer Verfahren in das modifizierte, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG kloniert werden. Dieses Expressionsplasmid sollte zur Transfektion in *T. brucei*, die mittels Elektroporation und anschließender homologer Rekombination in die β -Tubulin Region des trypanosomalen

Genoms erfolgen sollte, verwendet werden. Anschließend war beabsichtigt, die Selektion und Amplifikation rekombinanter Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) mittels Hygromycin B auf semi-soliden HMI9-0,65% Agaroseplatten und Kultivierung in NMRI Mäusen durchzuführen. Rekombinante Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) sollten auf die Expression des MCPs sowohl durch *Western blot* als auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen kontrolliert werden. Die Stabilität der Proteinexpression sollte im Tierexperiment über einen Zeitraum von 34 Tagen fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden, um festzustellen, ob sich rekombinante Trypanosomen zum Nachweis einer Gehirninfection, die sich primär in diesem Zeitraum manifestiert [Bafort und Schmidt, 1983], eignen und somit eine Lokalisierung und morphologische Charakterisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems ermöglichen.

Die Lokalisierung von *T. brucei* im zentralen Nervensystem sollte mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse von Gefrierschnitten von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.I.) und anschließender Elektronenmikroskopie erfolgen. Dabei sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen in fluoreszenzmikroskopisch auffälligen Bereichen sowie im Bereich der Blut-Hirn-Schranke, des *Plexus choroideus*, des *Corpus striatum*, des *Cerebellum* und des *Kortex* in Kooperation mit Herrn Professor Wolburg aus dem Institut für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt werden. Eine abschließende, primäre morphologische Charakterisierung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems sollte durch Isolierung dieser Trypanosomen sowie durch Auswertung elektronen-, phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen erfolgen.

Ziele dieser Arbeit waren es also einerseits eine Lokalisierung und morphologische Charakterisierung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems durchzuführen und andererseits durch eine Isolierung dieser Trypanosomen einen Zugang für weitere biochemische Analysen zu eröffnen.

Vermutlich ließe sich durch eine solche, verbesserte morphologische und biochemische Charakterisierung von Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems mehr über den Lebenszyklus und Besonderheiten von Trypanosomen im neuronalen Umfeld herausfinden. Möglicherweise könnte somit ein neuer Weg für eine verbesserte Diagnostik und Behandlung der humanen afrikanischen Trypanosomiasis im sekundären Krankheitsstadium eröffnet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Zur Durchführung der beschriebenen Experimente wurden die im Folgenden aufgelisteten Geräte verwendet:

2.1.1 Zellkultur

Gerät	Firma
Brutschrank HERA cell, 37 °C mit CO ₂	Heraeus, Osterode, Deutschland
Begasung	
Deckglas für Häemocytometer optisch plan, 22 x 22 mm	Thermo Fischer Scientific, Walldorf, Deutschland
Fireboy plus	INTEGRA Biosciences, Gießen, Deutschland
Lab-Shaker Modell Kühner	Braun, Melsungen, Deutschland
Mikropipetten	STARLAB, Ahrensburg, Deutschland
Standard Zellkultur Flaschen (50 ml, 250 ml, 650 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Sterilbank, LaminAir®HLB 2448 GS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zählkammer, nach Neubauer (Tiefe 20 µm)	Brand, Wertheim, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte für Zellkulturexperimente

2.1.2 Molekularbiologie

Gerät	Firma
Brutschrank, 37 °C	neoLAB, Heidelberg, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS301	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Gelkammer, BlueMarine100	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
GenePulser Xcell	Bio-Rad, Hercules, USA
MiniCycler™	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland
Schüttler, Shaker Dos-10L	neoLAB, Heidelberg, Deutschland
Sterilbank HLB 2448 GS LaminAir	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler	VWR, Darmstadt, Deutschland

Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
-----------	-----------------------------

Tabelle 2: Verwendete Geräte für molekularbiologische Experimente

2.1.3 Proteinbiochemie

Gerät	Firma
Blotapparatur	Biotec Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS301	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Gelapparatur, Mighty Small II SE250	Hofer Scientific, San Francisco, USA
Gene Power Supply GPS200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Folienschweißgerät: Folio	Severin, Sundern, Deutschland
GeneQuant™ 1300 Spectrophotometer	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Tabelle 3: Geräte zur Analyse von Proteinen

2.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Gerät	Firma
Filter-Cube UG1	Olympus, Hamburg, Deutschland
Filter-Cube BP495	Olympus, Hamburg, Deutschland
Filter-Cube BP545	Olympus, Hamburg, Deutschland
Filter-Cube 41027 CAL CRIM C130855	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Geräte zur Fluoreszenzmikroskopie

2.1.5 Präparation von Versuchstieren

Gerät	Firma
Sterilbank Ceag Shirp	Envirco, Bork, Deutschland

Tabelle 5: Geräte für die Präparation von Versuchstieren

2.1.6 Computer, Software und Datenbanken

Die vorliegende Arbeit wurde unter Verwendung folgender Computer- und allgemein zugänglicher Internetprogramme erstellt:

Gerät	Firma
BLAST Nucleotide Blast	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
DNAMAN	Lynnon Biosoft, Quebec, Canada

GATC Viewer	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
HP Scanjet 2200 Software	Hewlett-Packard, Palo Alto, USA
Imaging Software Cell*	Olympus Imaging Software, Münster, Deutschland
Internet Explorer 7.0	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microsoft Powerpoint 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Paint Shop Pro 7.0	Corel, Ottawa, Kanada
PubMed	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
ScanJet 5370C	Hewlett-Packard, Palo Alto, USA
Sony Vaio VGN-NS31M	Sony Cooperation, Tokio, Japan
The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates	Paxinos G, Watson C, Academic Press, 1998
Windows 7	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Windows Vista	Microsoft Cooperation, Redmond, USA

Tabelle 6: Software, Computer und Datenbanken

2.1.7 Sonstige Geräte

Gerät	Firma
Autoklav, Dampfsterilisator LSS	Münchener Mechanik, Stadlern, Deutschland
Cryostat HM505E	Thermo Fischer Scientific, Walldorf, Deutschland
Digital-pH Photometer 539	Bachhofer, Reutlingen, Deutschland
Feinwaage, Analytical Plus	Ohaus GmbH, Giessen, Deutschland
Filtrationsapparatur 1225 Sampling Manifold	Millipore, Bedford, USA
Grobwaage PJ3000	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Heizblock neoBlock1	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Invertmikroskop ID02	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
LM Axiostar plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer, MR2002	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer, MR3001 K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikropipetten	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Microfuge E™	Beckman, München, Deutschland
Mikrozentrifuge MC-13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Sigma 312K Laborzentrifuge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,

	Deutschland
Ultrospec 3000	Pharmaci Biotech (Amersham Biosciences), Buckinghamshire, UK
UV-Meter, Ultrospec 300	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Vortex-2-Genie	Knick, Freiburg, Deutschland
Vortex Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Tabelle 7: Sonstige Geräte

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Adenosin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose Low Melt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98\%$ p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BCIP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BCS 1000x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BSA	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Calciumdichlorid $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
D-Glukose Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
2'Desoxythymidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Eosin Y	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,

	Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.A. 100%	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS (30 min 56°C)	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Formalin Solution neutral buffered 10%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gentamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Giemsa-Stammlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyde-Solution GradII, 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycerin 87%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B (1000x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hypoxanthin (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Iscove's modified Dulbecco's Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Arginin/HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Cystein (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Histidin/HCl * H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,

	Deutschland
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Ornithin/HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
MEM nicht essentielle Aminosäurenlösung (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
MEM Vitamin-Lösung (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol p.A. 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na_2 -EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,

	Deutschland
NEG 50	Thermo Fischer Scientific, Walldorf, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS Tabletten	GIBCO (Invitrogen™ GmbH), Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pyruvat (1000x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiophorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serum Plus™	SAFC Biosciences, Hampshire, UK
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED p.a. 99%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Thymidin (1000x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trinatriumcitrat Na ₃ -Citrat * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weise Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

2.2.2 Enzyme, Puffer und Marker

Enzyme, Puffer und Marker	Firma
1kb GeneRuler™ DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
AccuPrime PCR Buffer I	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BamHI (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Bugbuster Lysis Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix 5 mM	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eam1105I (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Eam1105I Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EcoRI (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast AP thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Fast AP Puffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
HindIII (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Klenow Fragment (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Kollagenase (≥125 CDU/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
NcoI (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
NEB Puffer 2	New England Biolabs (NEB) GmbH, Schwalbach, Deutschland
NotI (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Page Ruler, Prestained protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PEG 4000 Solution	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Protease-Inhibitor Mix (100x)	ThermoFisherScientific, Braunschweig, Deutschland
PstI (10 U/ul)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer BamHI (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer O (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer Tango (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Rapid Ligation Puffer (5x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Rotio Load 1 (4x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
SmaI (10 U/μl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4 Ligase (4 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Ligase (5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Ligase (1 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-Ligase Puffer (5x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Polymerase (5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Polymerase Puffer (5x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Enzyme, Puffer und Marker

2.2.3 Antibiotika

Folgende Antibiotika wurden zur Selektion von Bakterien oder Trypanosomen verwendet.

Antibiotikum	Firma
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Antibiotic Antimycotic Solution (100x) Stabilised	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Hygromycin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Antibiotika

2.2.4 Lösungen und Medien

Folgende Lösungen und Medien wurden für die Anzucht, Kultivierung, Isolierung und Selektion von Bakterien und Trypanosomen sowie für molekularbiologische Experimente verwendet:

2.2.4.1 Lösungen und Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.2.4.1.1 LB Medium (2x)

Bestandteil	Prozentualer Anteil (V/W) in %
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	1%
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	1%

Tabelle 11: Zusammensetzung 2x LB- Medium

Die angegebene Zusammensetzung ist für einen Liter zweifach LB-Medium gültig. Die Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst. Abschließend wurde der pH-Wert auf pH 7 eingestellt und das Medium autoklaviert.

2.2.4.1.2 Agar- Agar (2x)

Bestandteil	Prozentualer Anteil (V/W) in %
Agar-Agar	4

Tabelle 12: Zusammensetzung 2x Agar-Agar

Die angegebene Zusammensetzung ist für einen Liter zweifach Agar-Agar gültig. Die Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst. Abschließend wurde der pH-Wert auf pH 7 eingestellt und der 2x Agar-Agar autoklaviert.

2.2.4.1.3 Lösungen zur Antibiotika-Selektion

Bestandteil	Konzentration der Stammlösungen
Ampicillin	50 mg/ml
X-Gal	20 mg/ml

Tabelle 13: Lösungen zur Antibiotika-Selektion von Bakterien

X-Gal wurde in destilliertem Wasser und die Ampicillinlösung in 100% Ethanol hergestellt.

2.2.4.2 Lösungen und Medien zur Isolierung, Reinigung und Selektion von *T. brucei*

Folgende Lösungen und Medien wurden zur Isolierung, Reinigung und Selektion von Trypanosomen verwendet:

2.2.4.2.1 Phosphat Buffered Saline (PBS)

Bestandteil	Anteil
PBS Tabletten	Eine Tablette

Tabelle 14: Zusammensetzung PBS

Eine PBS Tablette wurde in 500 ml destilliertem Wasser gelöst.

2.2.4.2.2 Trypanosoma dilution buffer (TDB); pH7,7 [Cross,1975]

Bestandteil	Menge [mM]
KCl	5
NaCl	80
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	20
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	2
D-Glukose	20

Tabelle 15: Zusammensetzung TDB

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.

2.2.4.2.3 Citrat-Glucose-Antikoagulans (CGA); pH 7,7

Bestandteil	Menge [mM]
Na ₃ -Citrat * 2 H ₂ O	100
Glukose	40

Tabelle 16: Zusammensetzung CGA

Die Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst.

2.2.4.2.4 Separations-Puffer; pH 8,0

Bestandteil	Menge [mM]
Na ₂ HPO ₄	57
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	44
D-Glukose	55

Tabelle 17: Zusammensetzung Separations-Puffer

Die Bestandteile wurden in destilliertem Wasser gelöst.

2.2.4.3 Lösungen und Medien zur Kultivierung von Trypanosomen

Zur Kultivierung verschiedener Trypanosomenstämme wurden folgende Medien und Lösungen verwendet:

2.2.4.3.1 Grundmedium

Bestandteil	Menge [mg/l]
CaCl ₂ * H ₂ O	265
KCl	400
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	200
NaCl	6800
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	140
HEPES	140

Die Chemikalien wurden in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurden Adenosin sowie folgende Aminosäuren zugefügt:

Bestandteil	Menge [mg/l]
Adenosin	12
L-Arginin/HCl	126
L-Histidin/HCl * H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10

L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin/HCl	10

Tabelle 18: Zusammensetzung Grundmedium

Abschließend wurde das Medium durch folgende Stammlösungen ergänzt:

Bestandteil	Menge [ml/l]
MEM nicht essentielle Aminosäurenlösung (100x)	10
MEM Vitamin-Lösung (100x)	10

Das Grundmedium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.2.4.3.2 Blutstromformmedium

Zur Herstellung von Blutstromformmedium wurden dem Grundmedium folgende Reagenzien hinzugefügt:

Bestandteil	Menge [ml/l]
NaHCO ₃ (75 mg/ml H ₂ O dest.)	30
L-Cystein (3,03 mg/ml H ₂ O dest.)	10
BCS (0,56 mg/ml H ₂ O dest.)	1
2'Desoxythymidin (0,39 mg/ml H ₂ O dest.)	10
L-Glutamin (29,2 mg/ml H ₂ O dest.)	10
Hypoxanthin (1,36 mg/ml 0,1 M NaOH)	10
Myristinsäure/BSA-Lösung	20
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml bzw. 10 mg/ml)	5
Fötale Kälberserum (FCS)	150
D-Glukose	5405 mg/l

Tabelle 19: Zusammensetzung Blutstromformmedium

Die Myristinsäurelösung wurde nach Ferguson und Cross hergestellt [Ferguson & Cross, 1984]. Es wurden dabei 24 mg Myristinsäure in 100 µl Ethanol (95%) gelöst und schrittweise zur BSA-Lösung hinzugefügt (1 g fettsäurefreies BSA pro 20 ml H₂O dest.). Abschließend wurde das Medium steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.2.4.3.3 IMDM Grundmedium; pH 7,1-7,3

Bestandteil	Menge
Iscove's modified Dulbecco's Medium	Eine Flasche für 1 l Medium
H ₂ O dest.	1000 ml
Natriumbicarbonat	3,02 g/l

Tabelle 20: Zusammensetzung IMDM Grundmedium

2.2.4.3.4 HMI9 Medium, pH 7,4

Bestandteil	Menge in [ml]
IMDM Grundmedium	890
Hypoxanthin (100x)	11
L-Cystein (100x)	11
Pyruvat (1000x)	1,11
Thymidin (1000x)	1,11
BCS (1000x)	1,11
2-Mercaptoethanol	15,5 µl
Penicillin/Streptomycin (100x)	11
FBS (30 min 56°C)	110
Serum Plus™	110

Tabelle 21: Zusammensetzung HMI9 Medium

Das Medium wurde steril filtriert und bei 4° C aufbewahrt.

2.2.4.4 Lösungen für die Elektroporation

Folgende Lösungen wurden zur Elektroporation verwendet:

2.2.4.4.1 Cytomix ; pH7,6

Bestandteil	Menge
EGTA	0,38 g
KCl	4,44 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	9,6 mg
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	505 mg
Glukose	2,5 g
BSA	50 mg
HEPES	2,98 g
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (10x)	50 ml
Hypoxanthin (100x)	5 ml
H ₂ O dest.	Auf 500ml auffüllen

Tabelle 22: Zusammensetzung Cytomix

Der Elektroporationspuffer wurde mit einem 0,22 micron Filter steril filtriert und bei 4° C aufbewahrt.

2.2.4.5 Lösungen für die Fixierung von Trypanosomen und Rattengehirnen

Zur Fixierung von Trypanosomen und Gehirnen wurden folgende Lösungen verwendet:

Fixierungslösung

Standardlösung:

Formalinlösung 10%

Glutaraldehydlösung GradII, 25%

Formalinlösungen:

Die folgenden Fixierungslösungen wurden entweder durch Verdünnung von 10% Formalin in PBS / H₂O dest. oder durch Verdünnung von Glutaraldehyd in PBS / H₂O dest. hergestellt und zur Fixierung verschiedener Trypanosomenstämme verwendet. Dabei wurden die angefertigten Fixierungslösungen sowohl für Experimente mit dem nativen Trypanosomenstamm AnTat 1.1 als auch für Experimente mit dem rekombinanten Stamm AnTat 1.1 MCP verwendet:

Durchgeführte Fixierungen von Trypanosomen mit Formalin in PBS:

- Formalinlösung 5% in PBS
- Formalinlösung 2,5% in PBS
- Formalinlösung 1,25% in PBS
- Formalinlösung 0,6125% in PBS

Durchgeführte Fixierungen von Trypanosomen mit Formalin in H₂O dest.:

- Formalinlösung 5% in H₂O dest.
- Formalinlösung 2,5% in H₂O dest.
- Formalinlösung 1,25% in H₂O dest.
- Formalinlösung 0,6125% in H₂O dest.

Durchgeführte Fixierungen von Trypanosomen mit Variation des pH-Wertes von Formalin in PBS:

- Formalinlösung 0,6125%; pH 6,25
 - Formalinlösung 0,6125%; pH 6,7
-

-
- Formalinlösung 0,6125%; pH 7,0
 - Formalinlösung 0,6125%; pH 7,4
 - Formalinlösung 0,6125%; pH 7,7
 - Formalinlösung 0,6125%; pH 8,2

Durchgeführte Fixierungen von Trypanosomen mit Glutaraldehyd in PBS:

- Glutaraldehyd 0,1% in PBS
- Glutaraldehyd 0,5% in PBS
- Glutaraldehyd 1% in PBS
- Glutaraldehyd 2% in PBS
- Glutaraldehyd 5% in PBS

Durchgeführte Fixierungen von Trypanosomen mit Glutaraldehyd in H₂O dest.:

- Glutaraldehyd 0,1% in H₂O dest.
- Glutaraldehyd 0,5% in H₂O dest.
- Glutaraldehyd 1% in H₂O dest.
- Glutaraldehyd 2% in H₂O dest.
- Glutaraldehyd 5% in H₂O dest.

Fixierungslösung zur Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Rattengehirnen:

Formalinlösung 10% + 4% Glutaraldehyd

2.2.4.6 Antibiotikum zur Selektion rekombinanter Trypanosomen

Zur Selektion rekombinanter Trypanosomen wurde folgendes Antibiotikum eingesetzt:

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration
Hygromycin B (50mg/ml)	2,5 µg/ml

Tabelle 23: Antibiotikum zur Selektion von Trypanosomen

Selektionsdruck: 0,05 µl Hygromycin / ml HMI9 Medium

2.2.4.7 Lösungen zur Herstellung von Trypanosomen Stabilaten

Zur Herstellung von Cryo-Stabilaten wurden folgende Lösungen verwendet:

2.2.4.7.1 Einfriermedium für Stabilate (TDB-Glycerin)

Bestandteil	Volumen
TDB	77 ml
Glycerin (87%)	23 ml

Tabelle 24: Zusammensetzung Einfriermedium

2.2.4.8 Lösungen für molekularbiologische Experimente

Folgende Lösungen wurden für molekularbiologische Experimente eingesetzt:

2.2.4.8.1 TAE-Puffer (50×)

Bestandteil	Menge
Tris	242 g
Na ₂ EDTA	37,2 g
Essigsäure	57,1 ml

Tabelle 25: Zusammensetzung TAE-Puffer (50×)

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem H₂O gelöst und der pH-Wert auf pH 8 eingestellt. Einfacher TAE Puffer wurde aus einer 50-fachen Stammlösung hergestellt.

2.2.4.8.2 Lösungen für *Western blots*

Folgende Lösungen wurden für die Herstellung und Entwicklung von *Western blots* verwendet:

2.2.4.8.2.1 Waschpuffer

Bestandteil	Menge
Tris HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

Tabelle 26: Zusammensetzung Waschpuffer

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

2.2.4.8.2.2 TBS

Bestandteil	Menge [g]
Tris	3
KCl	0,2
NaCl	8

Tabelle 27: Zusammensetzung TBS

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

2.2.4.8.2.3 Transferpuffer

Bestandteile	Menge
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	10%
Methanol p.A.	20%

Tabelle 28: Zusammensetzung Transferpuffer

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert auf pH 9,2 eingestellt.

2.2.4.8.2.4 Blockierungspuffer

Bestandteil	Menge
PBS (2x)	100 ml
Milchpulver	10%

Tabelle 29: Zusammensetzung Blockierungspuffer

2.2.4.8.2.5 Alkalische-Phosphatase-Puffer

Bestandteil	Menge [mM]
Tris HCl	20
NaCl	150
MgCl ₂	10

Tabelle 30: Zusammensetzung Alkalische-Phosphatase-Puffer

Die Bestandteile wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert auf pH 8,9 eingestellt

2.2.4.8.2.6 Färbelösungen

BCIP: Bromo-Chloro-Indolyl- Phosphat (Sigma) 28,16 mg/ml wurden in 100% DMF gelöst.

NBT: Nitro-Blue-Tetrazolium (Sigma) 32,7 mg/ml wurden in 70% DMF gelöst.

Bestandteil	Menge
BCIP	0,38 mM = 500 µl
NBT	0,4 mM = 1 ml
AP-Puffer	100 ml

Tabelle 31: Zusammensetzung Färbelösung

2.2.4.8.2.7 1M Tris HCl- Pufferlösung (1M)

Bestandteil	Menge
Tris HCl	12.1 mg
H ₂ O dest.	100 ml

Tabelle 32: Tris HCl Puffer (1M)

Je nach gewünschtem Puffer wurde der pH-Wert auf pH 6,8 oder pH 8,8 eingestellt.

2.2.4.8.2.8 10% SDS Lösung

Bestandteil	Menge
SDS	10%

Die gewünschte Menge der Lösung wurde mit destilliertem Wasser hergestellt.

2.2.4.8.2.9 Ammoniumperoxodisulfatlösung

Bestandteil	Menge
Ammoniumpersulfat	0,1 g/ml

Die gewünschte Menge der Lösung wurde mit destilliertem Wasser hergestellt.

2.2.5 Kits

Folgende Kits wurden zur DNA Isolierung und Transformation verwendet:

Kit	Firma
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hot Start Taq Mix	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Nucleobond® PC 100	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation & Transformation Kit	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 33: Verwendete Kits

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

2.2.6.1 Verbrauchsmaterialien für Zellkulturexperimente

Verbrauchsmaterial	Firma
Cellstar® Tissue Culture Flasks (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²) mit Sterilfilter im Deckel	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Cyro.S mit Schraubverschluss, steril	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Gene Pulser® Cuvettes 0,2 cm	Bio-Rad, Hercules, USA
Kulturflaschen zur Bakterienkultivierung (300 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott Duran, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten (6-well)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten (24-well)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Multi®Ultra Tubes 0,2 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Rundfilter, 4,5 cm, 5,5 cm	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Deutschland
Surgical Disposable Scalpel	B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Röhrcchen für Bakterienkultivierung, 3 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, 25 cm	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 34: Verbrauchsmaterialien für Zellkulturexperimente

2.2.6.2 Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente

Verbrauchsmaterialien	Firma
Anatomische und chirurgische Pinzetten	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Butterfly®-19	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Discofix®C3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injekt-F® 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injekt® Solo 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Intrafix®Primeline	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

BD Microlance™ (G 23, G24)	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Ketamin Xylazine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Klemme	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
NaCl 0,9%, 250 ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Omnifix® 30 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Schere groß und klein	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Surgical Disposable Scalpel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tabelle 35: Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente

2.2.6.3 Verbrauchsmaterialien zur Mikroskopie

Verbrauchsmaterial	Firma
Deckgläser (22 × 22 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immu-Mount	Thermo Electron Corporation, Pittsburg, USA
Objektträger (76 × 26 mm / 3 × 1 Inch)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Polysine®Slides	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 36: Verbrauchsmaterialien zur Mikroskopie

2.2.6.4 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Becherglas 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 800 ml	Schott Duran, Wertheim, Deutschland
Chemikalienflasche 100 ml, 250 ml, 1000 ml, 2000 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
DermaClean® Latex	Ansell GmbH, Bruchsal, Deutschland
Einweg Pasteurpipette unsteril, 2 ml, 5 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf-Cup 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml, 100 ml	Schott Duran, Wertheim, Deutschland
Glocken-Sterilfilter MediKap-2 (Hohlfaserfilter, 0,2 µm)	Microgon, Laguna Hills, USA

Meliseptol® rapid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Messzylinder 100 ml, 230 ml, 500 ml, 1000 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Parafilm	Peching Plastic Packing, Menasha, USA
Pasteurpipette 3 ml, steril	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen kristall, kurz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, mittel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Standart nano-cup™	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratyp	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Purple Nitrile* Powder Free Exam Gloves	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, USA
Reaction Tubes 1,5 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Spritzenvorsatz-Sterilfilter mit SFCA-Membran (0,2 µm)	Nalge, Hereford, UK
Sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterilium®	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Tape	Tesa, Hamburg, Deutschland
UV-Küvetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Tabelle 37: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

2.2.7 Verwendete Organismen

Folgende Organismen wurden zur Durchführung von Experimenten verwendet:

2.2.7.1 Trypanosomen

Zur Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden Blutstromform-Trypanosomen der klonierten Linie AnTat 1.1 (Antwerp Trypanozoon Antigen Type) des pleomorphen Stammes von *Trypanosoma brucei brucei* verwendet.

Trypanosomen	Herkunft
AnTat 1.1	Christine Clayton, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 38: Verwendeter Trypanosomenstamm

Die Nomenklatur der Linie leitet sich von der Abkürzung des Institutes (Antwerp Institute = Antat), an dem die Klonierung erfolgte, der Nummer des verwendeten Klons (1) und der Nummer der Antigenvariante ab (1).

Die klonierte Linie AnTat 1.1 gehört einem pleomorphen Stamm an. Pleomorphe Stämme kennzeichnen sich durch Antigenvariation des VSG. Pleomorphe Stämme verursachen im

Versuchsorganismus rezidivierende Parasitämien, die durch das Immunsystem und die Variation des VSG-Mantels auftreten. Daher ähnelt der Infektionsverlauf von AnTat 1.1 dem Infektionsverlauf von humanpathogenen Trypanosomen (*Trypanosoma brucei rhodesiense* und *gambiense*).

2.2.7.2 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Firma
One Shot® Top 10 chemisch kompetente Zellen (<i>E.coli</i>)	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 39: Verwendete Bakterienstämme

2.2.7.3 Verwendete Versuchstiere

Tierart	Typ	Alter	Herkunft
Maus	NMRI: <i>HsdWin:NMRI</i> WISTAR:	Ehemalige Zuchttiere	Harlan
Ratte	<i>HsdRccHan</i> TM :WIST	Ehemalige Zuchttiere	Harlan

Tabelle 40: Verwendete Versuchstiere

2.2.8 Verwendete Plasmide

Für molekularbiologische Experimente wurden folgende Plasmide als Ausgangsmaterial oder als Vektoren für die Klonierung des MCP-Gens verwendet:

2.2.8.1 pAAV-MCS-mCherry

Das Ausgangsplasmid pAAV-MCS-mCherry umfasst 5355 Basenpaare (vgl. Abbildung 6). Das Gen, das für das monomere Cherry Protein codiert, befindet sich in der *multiple cloning site* (MCS) zwischen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII (vgl. Abbildung 7). Zusätzlich besitzt das Plasmid ein Gen, das für eine β -Laktamase codiert und somit eine Ampicillinresistenz vermittelt.

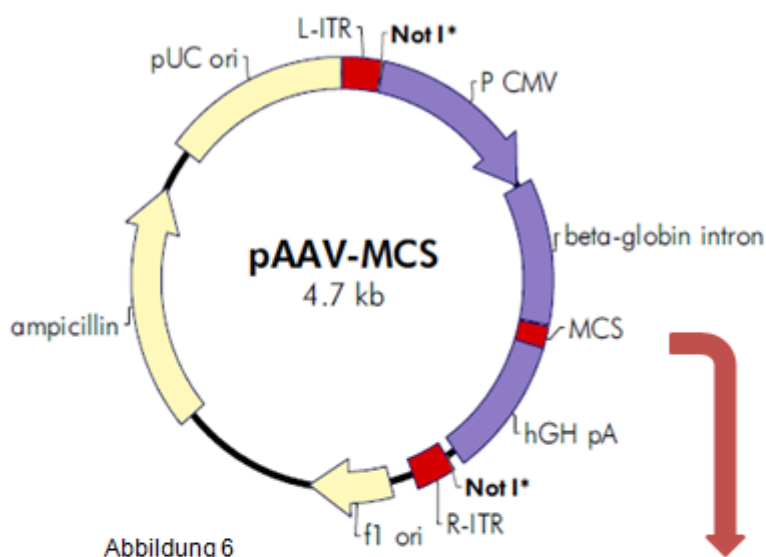


Abbildung 6: Aufbau des Ausgangsplasmids pAAV-MCS-mCherry

Abbildung 7: Aufbau der MCS des Plasmids pAAV-MCS

Quelle: <http://www.miamiproject.miami.edu> (modifizierte Abbildung)

2.2.8.2 pHD309-HYG-PUR

Das Plasmid pHD309-HYG-PUR umfasst 6145 Basenpaare (vgl. Abbildung 8) und wird als trypanosomales Expressionsplasmid verwendet. Das native Plasmid besitzt drei Gene für Antibiotika-Resistenzen: Erstens besitzt es ein Gen, das für eine Phosphotransferase für Hygromycin B codiert und somit eine Hygromycin B Resistenz vermittelt. Zweitens enthält das Plasmid ein Gen (609 bp), das für eine Puromycin N-Acetyltransferase codiert und somit eine Puromycinresistenz erzeugt und drittens enthält das Plasmid ein Gen, das für eine β -Laktamase codiert und somit eine Ampicillinresistenz vermittelt [Watanabe et al, 2005]. Das Puromycin N-Acetyltransferase-Gen liegt zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII. Zusätzlich enthält das Plasmid eine homologe Sequenz zur β -Tubulin Region des trypanosomalen Genoms. Innerhalb dieser homologen Sequenz existiert eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI. Das Plasmid kann somit, nach Linearisierung und Transfektion, zur homologen Rekombination in das trypanosomale Genom verwendet werden.

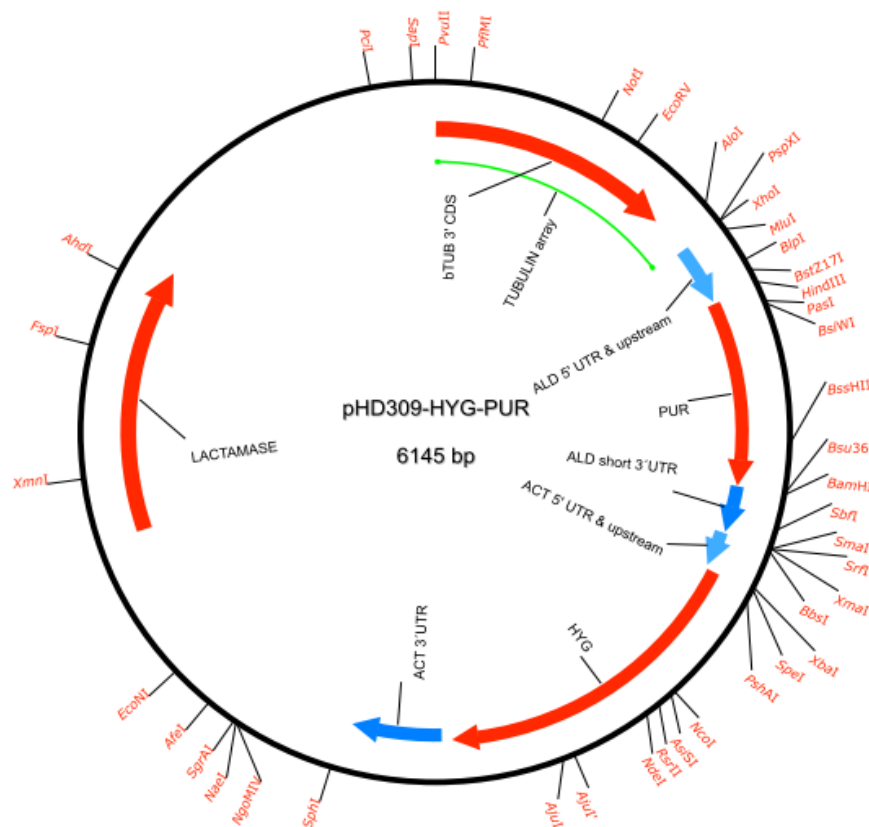


Abbildung 8: Aufbau des Expressionsplasmids pHD309-HYG-PUR

Quelle: <http://tryps.rockefeller.edu>

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Zur Kultivierung von verschiedenen Zelllinien wurden folgende Methoden eingesetzt:

2.3.1.1 Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur

Eine Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur erfolgte in 3 ml oder 50 ml Kulturen aus LB-Medium (1x). Zur Herstellung einer 3 ml Kultur wurde eine Bakterienkolonie von einer LB-Selektivplatte gepickt, während zur Anlage einer 50 ml Kultur die Kultur mit einem Milliliter einer zuvor hergestellten 3 ml Kultur angeimpft wurde. Zur Selektion rekombinanter One-Shot Top Ten® chemisch kompetenter *E. coli* wurde dem LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin hinzugefügt. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C bei kontinuierlichem Schütteln (225 – 240 rpm) inkubiert.

Bestandteil	Menge [ml]
2x LB Medium	1,5
H ₂ O dest.	1,5
<i>E. coli</i>	Pipettenspitze

Tabelle 41: Zusammensetzung 3 ml Flüssigkultur von *E. coli*

Bestandteil	Menge [ml]
2x LB Medium	12,5
H ₂ O dest.	12,5
<i>E. coli</i> (3 ml Kultur)	1

Tabelle 42: Zusammensetzung 50 ml Flüssigkultur von *E. coli*

2.3.1.2 Kultivierung von *E. coli* auf solidem Nährmedium

Die Kultivierung von *E. coli* auf solidem Nährmedium erfolgte auf 2% Agarplatten, die aus 2x LB Medium und 2x Agar-Agar (4% Agar) hergestellt wurden. Zur Kultivierung von One-Shot Top Ten® chemisch kompetenter *E. coli* wurde den Platten 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-Gal zugefügt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C für 30 min vorinkubiert und nach Ausplattieren von *E. coli* über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.3 *In vitro* Kultivierung von *T. brucei* in flüssigem Medium

Die *in vitro* Kultivierung des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 von *T. brucei* erfolgte im Brutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂. Als Kulturmedium

wurde für die Kultivierung des Stammes AnTat 1.1 HMI9-Medium verwendet, das vor Verwendung im Brutschrank für 30 min vorgewärmt wurde. Für die Kultivierung von AnTat 1.1 wurden $2,5 \times 10^5$ Trypanosomen in 50 ml HMI9-Medium vorkultiviert. Da der Stamm AnTat 1.1 nicht dauerhaft in Flüssigkulturen kultivierbar ist, wurden die Kulturen maximal für ein bis zwei Tage angelegt. Eine weiterführende Kultivierung von AnTat 1.1 erfolgte daraufhin auf semi-soliden HMI9-0,65% Agarose Platten (vgl. Kapitel 2.3.1.4).

2.3.1.4 *In vitro* Kultivierung von *T. brucei* AnTat 1.1 auf semi-soliden HMI9-0,65%

Agarose Platten

Da Blutstromformen des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 nicht wie Blutstromformen des monomorphen Stammes MiTAT 1.2 (VSG Typ: 221) über längere Zeit in flüssigen Medium kultiviert werden können, erfolgte die *in vitro* Kultivierung nach einem Kultivierungsmodell von pleomorphen Trypanosomenstämmen nach Vassella und Boshart [Vassella und Boshart, 1996]. Dieses Modell wurde in den durchgeführten Experimenten leicht modifiziert angewandt. Blutstromform-Trypanosomen des Stammes AnTat 1.1 benötigen für ihre Kultivierung einen Kontakt bzw. eine Interaktion zu einer festen Matrix. Diese feste Matrix stellt im Kultivierungssystem eine HMI9-0,65% Agarose Matrix dar. Ein Milliliter dieser Matrix (flüssig bei 50 °C) wurde pro Well auf einer 24-Well Platte zur Polymerisation ausgebracht. Durch Polymerisation bildete sich eine semi-solid Matrix, die mit 1 ml Flüssigkultur des Stammes AnTat 1.1, indem sich maximal 10^5 Trypanosomen befanden, beschichtet und anschließend für 5 bis 10 Tage kultiviert wurde.

Herstellung von HMI9-0,65% Agarose 24-Well Platten

Zur Herstellung von HMI9-0,65% Agarose 24-Well Platten wurden 50 ml einer 6,5% Agaroselösung und 450 ml HMI9-Medium bei einer Temperatur von 50 °C inkubiert und anschließend gemischt. Je 1 ml der hergestellten HMI9-0,65% Agaroselösung wurde pro Well auf einer 24-Well Platte unter sterilen Bedingung ausgebracht. Nach Polymerisation der Agarose wurden die 24-Well Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

Medium	Bestandteile	Menge in [ml]
HMI9 Medium	HMI9-Medium (vgl. Kapitel 2.2.4.3.4)	450
6,5% Agaroselösung	3,25 g Low melt Agarose 50 ml H ₂ O dest.	50

Tabelle 43: Zusammensetzung der HMI9-0,65% Agarose Platten

2.3.1.5 Isolierung von *T. brucei* aus Gewebe des zentralen Nervensystems

Um Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems zu isolieren wurde das Gehirn von Ratten nach 34 bzw. 35 Tagen p.i. entnommen (vgl. Kapitel 2.3.7). Das Gehirn wurde unmittelbar nach Entnahme mit einem sterilen Skalpell entlang des Hemisphärenspaltes geteilt. Beide Hemisphären wurden durch einen zum Hemisphärenspalt horizontal verlaufenden Schnitt getrennt, so dass das Gehirn in vier Teile gegliedert wurde. Jeder Teil des Gehirns wurde in 25 ml HMI9-Medium, das zuvor bei 37 °C für 30 min vorgewärmt wurde, aufgenommen. Im Kulturmedium wurde jeder Gehirnteil mit einem sterilen Skalpell durch vier Schnitte zerkleinert und mit HMI9-Medium umspült. Anschließend wurde die Kultur im Brutschrank für 2 h kultiviert, abschließend ausgezählt, zentrifugiert und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Für Kontrollexperimente wurden Gehirne von Ratten nach 3 bzw. 4 Tagen p.i. verwendet und auf dieselbe Weise verfahren.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Amplifikation und Klonierung des MCP-Gens in den modifizierten trypanosomalen Expressionsvektor pHD309-HYG sowie zur anschließenden Transfektion in AnTat 1.1 wurden folgende molekularbiologische Methoden verwendet.

2.3.2.1 Primer und Primerdesign

Primer, die zur Amplifikation des MCP-Gens aus dem Ausgangs-plasmid pAAV-MCS-mCherry eingesetzt wurden, konnten mit Hilfe des Programmes Primer 3 und dem Primerdesign Tool „Oligo Perfect™ Designer“ von der Firma Invitrogen erstellt werden. Für die Klonierung wurde der *forward Primer* mit einer Sequenz, die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII darstellt und der *reverse Primer* mit einer Sequenz, die eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI darstellt, ergänzt. Die eingefügten Sequenzen ermöglichten eine schnelle und effektive Klonierung des MCP-Gens, über Subklonierung in das Expressionsplasmid pHD309-HYG.

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen hergestellt. Sequenzen, Schmelztemperaturen sowie der GC Gehalt des *forward* und *reverse Primers* wurden unter Verwendung des Programmes Primer 3 berechnet und sind in folgenden Tabellen dargestellt (Tabelle 44 und 45):

Forward Primer:

Primer und Primername	Sequenz (5' → 3')	Primer- länge in bp	GC Gehalt in %	Schmelz- temperatur in °C
Forward Primer: mCherry-fw-hindIII	AAG CTT ATG GTG AGC AAG GGC G	22	54	52

Tabelle 44: Daten *forward Primer*

Rot markiert ist der Sequenzbereich für das Restriktionsenzym Hind III.

Reverse Primer:

Primer und Primername	Sequenz (5' → 3')	Primer- länge in bp	GC Gehalt in %	Schmelz- temperatur in °C
Reverse Primer: mCherry-re-bamHI	GGA TCC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G	28	50	56

Tabelle 45: Daten *reverse Primer*

Rot markiert ist der Sequenzbereich für das Restriktionsenzym BamHI.

2.3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation des MCP-Gens aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurde die AccuPrime High Fidelity Taq DNA Polymerase verwendet, da diese Polymerase im Gegensatz zu anderen Polymerasen, wie z.B. zur HotStar Taq Polymerase, eine *proof reading* Funktion besitzt. Als Ausgangs-DNA (*template*) wurde das Plasmid pAAV-MCS-mCherry eingesetzt. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurde zunächst ein 100 µl Reaktionsansatz (vgl. Tabelle 46) hergestellt, der anschließend in fünf Reaktionsansätze von je 20 µl aufgeteilt wurde, so dass jeder Reaktionsansatz 0,4 ng *template* DNA und 0,4 µM Primer enthält.

Bestandteil	Menge
10x AccuPrime PCR Buffer I	1x (10µl)
<i>Forward Primer</i> [1 uM]	1µM (2µl)
<i>Reverse Primer</i> [1 uM]	1µM (2µl)
<i>Template</i> DNA (pAAV-MCS-mCherry)	2ng (3,1µl)
H ₂ O dest.	82,9µl

Tabelle 46: Mastermix PCR Ansatz

Diese 20 µl Reaktionsansätze wurden, um ein ideales *annealing* der Primer zu ermöglichen, in der PCR mit unterschiedlichen *annealing* Temperaturen eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgte nach den Angaben des Herstellers und unter den in Tabelle 47 aufgelisteten Bedingungen.

Schritt	Zeitdauer [s]	Temperatur [°C]
1. Anfangsdenaturierung	180	98
2. Denaturierung	25	98
3. <i>Annealing</i>	25	Gradient: Ansatz 1: 48,1 Ansatz 2: 51,0 Ansatz 3: 53,6 Ansatz 4: 56,4 Ansatz 5: 58,2
4. Elongation	60	68
5. Wiederholung der Schritte 2-4 für 30 Zyklen		
6. Endelongation	600	68
7. Lagerung	∞	10

Tabelle 47: Durchführungsbedingungen der Polymerasekettenreaktion

2.3.2.3 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Um DNA Fragmente unterschiedlicher Länge voneinander zu trennen, z.B. zur Überprüfung von PCR Ergebnissen oder eines Restriktionsverdau wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1% oder 0,7% Agarosegele mit 1× TAE-Puffer gefertigt. Die Agaroselösung wurde in der Mikrowelle erhitzt, anschließend mit 0,3 µl/ml Ethidiumbromid versetzt und zur Polymerisierung in eine geschlossene Gelkammer gegossen. Nach Auspolymerisation der Lösung wurde das entstandene Gel mit 1× TAE Puffer beschichtet, die DNA Proben mit 1× Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Zur Bestimmung der Länge einzelner DNA Fragmente wurde ein 1kb Molekulargewichtsmarker verwendet. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei 50 ml oder 75 ml Gelen bei einer Spannung von 80 Volt und einer Laufzeit von 45 min, während für 150 ml Gele eine Spannung von 120 Volt und eine Laufzeit von 45 min verwendet wurde. Abschließend wurde das Gel mit den aufgetrennten DNA Fragmenten im UV-Transilluminator analysiert.

2.3.2.4 Gelextraktion von DNA Fragmenten

Zur Isolierung und Reinigung von DNA Fragmenten nach erfolgter Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten DNA Fragmente aus dem Agarosegel geschnitten, in Eppendorf Cups transferiert sowie die DNA unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* extrahiert und gereinigt.

2.3.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA Konzentration wurde die zu untersuchende DNA, wie in Kapitel 2.3.2.4 beschrieben, extrahiert und gereinigt. Anschließend wurde die Probe 1:50 mit H₂O dest. verdünnt. 100 µl der verdünnten Proben sowie 100 µl einer Leerprobe wurden in UV-Küvetten pipettiert und deren Extinktionen bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nach Lambert-Beersche Gesetz wurde aus der Extinktion die DNA Konzentration der Probe berechnet. Die Reinheit der Proben wurde über den Quotienten $OD \frac{260}{280}$ bestimmt.

2.3.2.6 Subklonierung – Topo TA Cloning

Um das mittels PCR gewonnene MCP-Gen zu amplifizieren, wurde der Subklonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® (vgl. Abbildung 6) eingesetzt. Da bei der PCR eine Taq-Polymerase eingesetzt wurde, besaß das PCR Produkt am 3' Ende einen Adenosin-Überhang (3'-dA). Dies ermöglichte es, den Vektor pCR®2.1-TOPO®, der am 3' Ende einen Thymidinüberhang (3'-dT) besitzt, für eine effiziente Klonierung zu verwenden.

Zuerst wurde das MCP-Gen in den Subklonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* (One Shot® Top 10) transformiert. Zur Subklonierung wurde das Topo TA Cloning® Kit verwendet und die Klonierung entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 min, anschließend wurde unmittelbar transformiert. Da der Subklonierungsvektor pCR®2.1-TOPO® eine Ampicillinresistenz sowie eine Klonierungsstelle innerhalb der LacZ-α Peptid kodierenden Sequenz besaß, war es möglich rekombinante *E. coli* über eine Ampicillin- und Blau-Weiß Selektion zu detektieren.

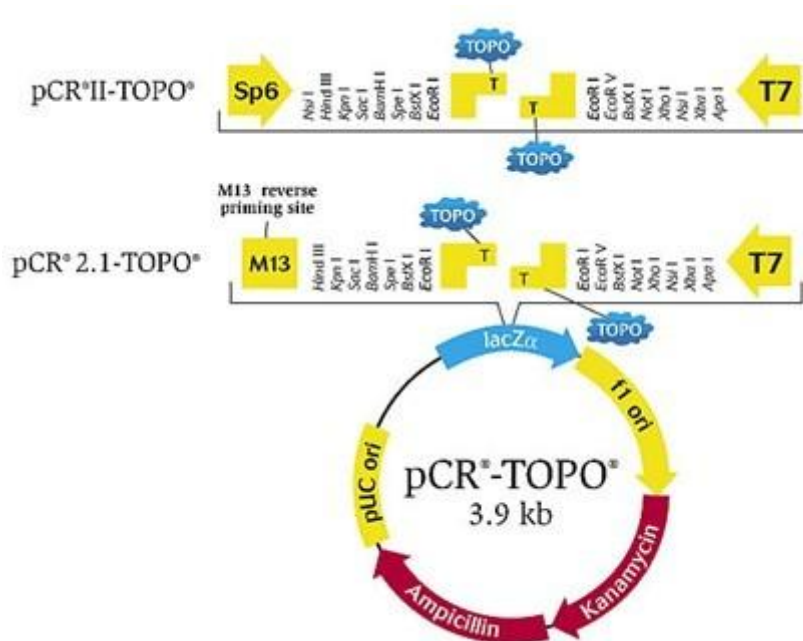


Abbildung 9: Aufbau des Subklonierungsvektors pCR®2.1.-Topo®

Quelle: www.invitrogen.com

2.3.2.7 Transformation

Alle durchgeführten Transformationen wurden unter Verwendung von chemisch kompetenten *E. coli* Stämmen (One Shot® Top10) und mittels Hitzeschock nach den Vorgaben des One Shot® Top10 Protokolls durchgeführt. Zunächst wurde ein Aliquot (50 µl) chemisch kompetenter *E. coli* für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden dem Aliquot 5 µl hitzeinaktivierter Ligationsansatz (max. 50 ng DNA) zugefügt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 s, bevor der Transformationsansatz erneut für 2 min auf Eis inkubiert wurde. Abschließend wurden 250 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium (37 °C) hinzugefügt und der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C im Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Nach exakt 1 h wurden verschiedene Mengen (10 µl / 100 µl / Rest) des Transformationsansatzes zur Vereinzelung der Zellen auf LB-Selektivplatten (vgl. Kapitel 2.3.1.2), die mit 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-Gal versetzt waren, ausplattiert. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert und abschließend bei 4 °C gelagert.

2.3.2.8 Transformationskontrolle pCR®2.1-TOPO®-mCherry

Zur Selektion erfolgreich transformierter, rekombinanter *E. coli* wurde die Methode der Blau-Weiß und Antibiotika-Selektion eingesetzt. Da der Subklonierungsvektor eine Klonierungsstelle innerhalb der LacZ-α Peptid kodierenden Sequenz und eine Ampicillin-Resistenz besaß, konnten beide Methoden eingesetzt werden, während es bei der Klonierung des

MCP-Gens in das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG nur möglich war eine Antibiotikumsselektion (Ampicillin) durchzuführen.

Da sowohl das trypanosomale Expressionsplasmid als auch der Subklonierungsvektor eine Ampicillinresistenz besitzen, können Bakterien, die das vollständig ligierte Plasmid (mit *Insert*), oder das religierte Plasmid (ohne *Insert*) aufnehmen, auf LB-Selektivplatten (vgl. Kapitel 2.3.1.2) wachsen. Zur Differenzierung der Bakterienkolonien mit vollständig ligiertem und religiertem Plasmid konnte bei der Subklonierung die Methode der Blau-Weiß-Selektion angewendet werden, während beim trypanosomalen Expressionsvektor eine Überprüfung mittels Restriktionsverdau notwendig war.

Das Prinzip der Blau-Weiß-Selektion beruht auf einer Farbänderung der rekombinanten Bakterienkolonie. Der Subklonierungsvektor besitzt in der LacZ- α Peptid kodierenden Sequenz eine Klonierungsstelle. Schließt sich der Vektor an dieser Stelle durch Religation ohne Insert, so erscheinen die Kolonie nach Transformation blau, da die Bakterienklone in der Lage sind eine Galaktosidase zu synthetisieren. Auf diese Weise sind die Bakterienklone in der Lage, das in den Selektivplatten enthaltene Glykosid X-Gal, zu Galaktose und dem Farbstoff Indigo-Blau umzusetzen. Wird jedoch das vollständig ligierte Plasmid mit *Insert* von den Bakterien aufgenommen, so können diese keine Galaktosidase exprimieren, so dass die Kolonien weiß erscheinen.

2.3.2.9 Transformationskontrolle pHD309-HYG-mCherry

Zur Transformationskontrolle des ligierten, trypanosomalen Expressionsplasmids pHD309-HYG-mCherry wurden zunächst Bakterienkolonien, die nach Transformation auf LB-Selektivplatten gewachsen sind, gepickt und von diesen 3 ml Schüttelkulturen (vgl. Kapitel 2.3.1.1) angelegt. Anschließend wurden die Plasmide der Bakterienkulturen isoliert (vgl. Kapitel 2.3.2.10). Die isolierten Plasmide wurden abschließend durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen PstI oder NcoI überprüft.

Das Plasmid pHD309-HYG-mCherry besitzt für das Restriktionsenzym PstI vier Schnittstellen, so dass bei einem Verdau vier DNA Fragmente entstehen, während beim religierten Plasmid pHD309-HYG nur drei DNA Fragmente entstehen, da dieses Plasmid nur zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym besitzt. Beim Verdau mit dem Restriktionsenzym NcoI besitzt das Enzym im vollständig ligierten Plasmid pHD309-HYG-mCherry zwei Schnittstellen, so dass beim Verdau zwei DNA Fragmente entstehen, während beim religierten Plasmid pHD309-HYG eine Schnittstelle existiert und somit ein DNA Fragment entsteht. Der Restriktionsverdau wurde als zweifacher Überverdau in einem Volumen von 20 μ l mit 500 ng Plasmid DNA pro Klon durchgeführt (vgl. Tabelle 48). Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Bestandteil	Menge
Plasmid DNA (Klon 1-3)	500ng (3 µl)
10x Puffer O	1x (2 µl)
PstI	4 U (0,4 µl)
H ₂ O dest.	Rest (14,6 µl)

Tabelle 48: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry PstI

Bestandteil	Menge
Plasmid DNA (Klon 1-3)	500ng (3 µl)
10x Puffer Tango	1x (2 µl)
NcoI	2 U (0,2 µl)
H ₂ O dest.	Rest (14,8 µl)

Tabelle 49: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry NcoI

2.3.2.10 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmiden aus Flüssigkulturen von Bakterien wurde je nach Größe der Bakterienkultur und somit je nach Menge der zu isolierenden Plasmide das QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Quiagen oder das Nucleobond® PC 100 Kit der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zuvor wurden die Bakterien bei 17.900 g und 4 °C aus den Flüssigkulturen geerntet. Die Elution des isolierten Plasmides wurde in 100 µl destillierten H₂O durchgeführt. Anschließend wurden die Plasmidkonzentration und die Reinheit der Probe photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.2.5).

2.3.2.11 Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten wurde von der Firma GATC Biotech in Konstanz unter Verwendung der Primer „M13“ und „M13 Reverse“ durchgeführt. Die Firma nutzte dazu die Methode der Kettenabbruch-Synthese mit fluoreszenzmarkierten terminierenden ddNTPs. Die DNA Proben wurden, wie in Kapitel 2.3.2.4 beschrieben, extrahiert, gereinigt und entsprechend den Vorgaben der Firma vorbereitet und versandt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden unter Verwendung des Programmes GATC Viewer ausgewertet und überprüft. Ein abschließendes Sequenzalignment erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Blast 2.

2.3.2.12 Restriktionsverdau

Für jeden Restriktionsverdau wurde eine 3 ml bzw. 50 ml Flüssigkultur angelegt, das entsprechende Plasmid isoliert sowie die DNA Konzentration und Reinheit der Probe photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.2.3-5). Die Masse der verdauten Plasmide lag zwischen 500 ng und 75 µg. Die verwendeten Enzyme und Puffer sind in den Tabellen 50 und 51 aufgelistet. Der Restriktionsverdau wurde als doppelter oder vierfacher Überverdau durchgeführt. Der Einsatz der Restriktionsenzyme wurde mit der Inkubationszeit, der Enzymkonzentration und enzymatischen Aktivität abgestimmt. Abschließend wurden die Reaktionsansätze mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Firma Fermentas bezogen.

Enzym	Konzentration
BamHI	10 U/µl
HindIII	10 U/µl
NcoI	10 U/µl
NotI	10 U/µl
PstI	10 U/µl

Tabelle 50: Verwendete Restriktionsenzyme

Puffer	Konzentration
BamHI Puffer	10x
Tango Puffer	10x
Puffer O	10x

Tabelle 51: Verwendete Puffer zum Restriktionsverdau

2.3.2.13 Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR

Das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-PUR besitzt eine Sequenz, die für eine Puromycinresistenz codiert. Diese Sequenz, die 609 bp umfasst, ist von Sequenzen, die den Restriktionsenzyme BamHI und HindIII als Schnittstellen dienen, flankiert. Daher kann die Sequenz mittels Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und das Plasmid geöffnet werden.

Für den Restriktionsverdau wurde eine 50 ml Flüssigkultur von pHD309-HYG-PUR in *E. coli* angelegt, das Plasmid isoliert und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Der Restriktionsverdau wurde in einem Volumen von 20-100 µl als doppelter Überverdau mit 1-75 µg Plasmid über Nacht bei 37 °C nach Tabelle 52 durchgeführt.

Bestandteil	Menge	Menge
pHD309-HYG-PUR	75 µg (16,8 µl)	1 µg (3,7 µl)
Puffer 10x BamHI	1x (10 µl)	1x (2 µl)
BamHI	30 U (3 µl)	2 U (0,2 µl)
HindIII	60 U (6 µl)	4 U (0,4 µl)
H ₂ O dest.	Rest (64,2 µl)	Rest (13,7 µl)

Tabelle 52: Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR

2.3.2.14 Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry

Für den Restriktionsverdau des vollständig ligierten Subklonierungsvektors pCR®2.1.-Topo®-mCherry wurde eine 3 ml Übernachtskultur von pCR®2.1.-Topo®-mCherry in *E. coli* angelegt, das Plasmid isoliert, die DNA Konzentration photometrisch bestimmt und die Sequenz des MCP-Gens mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut, um das MCP-Gen aus dem Subklonierungsplasmid zu schneiden. Der Restriktionsverdau wurde als doppelter Überverdau mit 500 ng Plasmid in einem Volumen von 30 µl, bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt.

Bestandteil	Menge
pCR®2.1.-Topo®-mCherry	500 ng (0,4 µl)
Puffer 10x BamHI	1x (3 µl)
BamHI	2 U (0,2 µl)
HindIII	2 U (0,2 µl)
H ₂ O dest.	Rest (26,2 µl)

Tabelle 53: Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry

2.3.2.15 Restriktionsverdau pHG309-HYG-mCherry

Das vollständig ligierte trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-mCherry musste vor der Elektroporation mittels Restriktionsverdau linearisiert werden. Dazu wurde eine 50 ml Flüssigkultur von pHD309-HYG-mCherry in *E. coli* angelegt, das Plasmid isoliert und die DNA Konzentration photometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym NotI. Der Restriktionsverdau wurde als doppelter Überverdau mit 100 µg Plasmid, in einem Volumen von 100 µl, bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 16 h durchgeführt. Abschließend wurde das Restriktionsenzym NotI 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert.

Bestandteil	Menge
pHD309-HYG-mCherry	100 µg (54,2 µl)
Puffer O	1x (10 µl)
NotI	10 U (1 µl)
H ₂ O dest.	Rest (34,8 µl)

Tabelle 54: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry

2.3.2.16 Ligation pHD309-HYG mCherry

Nachdem sowohl das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-PUR als auch der Subklonierungsvektor pCR®2.1.-Topo® -mCherry mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII vollständig verdaut waren, konnte das MCP-Gen und das geöffnete Expressionsplasmid pHD309-HYG aufgetrennt, isoliert und gereinigt werden. Nach photometrischer Bestimmung der DNA Konzentration wurden das Gen und das geöffnete Plasmid für eine Ligation verwendet.

Ziel der Ligation war es, das MCP-Gen (*Insert*) in das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG zu ligieren, um das Konstrukt pHD309-HYG-mCherry, das nach Linearisierung in das trypanosomale Genom eingebracht werden sollte, zu erhalten. Die Ligation wurde mehrfach, unter Verwendung verschiedener DNA Konzentrationen des geöffneten Plasmides pHD309-HYG (50 – 400 ng), verschiedener T4-Ligasen, Inkubationstemperaturen und Ligationszeiten durchgeführt (vgl. Tabelle 55). Um eine optimale Ligation zu erhalten, wurde mit einem Insert-Vektor-Verhältnis von 3:1 und 4:1 gearbeitet. Die benötigte Masse des *Inserts* ließ sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$m(\text{Insert in ng}) = 6 \times \frac{\text{Insert Länge in bp}}{\text{Vektorlänge in bp}} \times \text{Vektormasse in ng}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Insertmasse

Die verwendeten Ligasen und Puffer stammten ausschließlich von der Firma Fermentas. Die Ligationen wurden in einem Volumen von 10 µl durchgeführt, in einem Thermocycler inkubiert und unmittelbar zur Transformation verwendet oder für maximal 12 h bei 4 °C gelagert.

Ligationsansatz	DNA Menge des Vektors in [ng]	Insert-Vektor-Verhältnis	T4-Ligase Konzentration in [U/μl]	Ligaseaktivität in [U]	Ligationsdauer und Temperatur bzw. Zyklen
1	400	3:1	1	0,5	18h bei 22°C
2	400	3:1	1	0,5	1h bei 22°C
3	400	3:1	1	0,5	Zyklus für 4h: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 16°C 1h bei 4°C
4	50	3:1	1	0,5	2h bei 22,5°C
5	50	3:1	1	0,5	18h bei 16°C
6	400	4:1	1	2	Zyklus für 3h: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 16°C
7	300	4:1	1	1	Zyklus für 28h: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 16°C 5x Zyklus: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 12°C 1h bei 16°C 1h bei 4°C
8	300	4:1	1	3	Zyklus für 28h: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 16°C 5x Zyklus: 1h bei 25°C 1h bei 22,5°C 1h bei 16°C 1h bei 12°C 1h bei 4°C
9	50	1:1	4	4	12h bei 14°C

Tabelle 55: Ligationsbedingungen pHD309-HYG-mCherry

2.3.2.17 Herstellung von *E. coli* Stabilaten in Glycerin

Zur Langzeitlagerung von rekombinanten *E. coli* Stämmen, die das vollständig ligierte Subklonierungsplasmid pCR®2.1.-Topo®-mCherry oder das vollständig ligierte trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-mCherry besaßen, wurden Glycerinstocks angelegt. Zur Herstellung von Glycerinstocks wurde eine 3 ml Flüssigkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes angelegt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 225 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,8-1 erreicht war. Anschließend wurde ein 1 ml Glycerinstock, bestehend aus einer Endkonzentration von 15% Glycerin (50% *Stocksolution*) und der entsprechenden Bakterienkultur, hergestellt. Der Glycerinstock wurde durchmischt und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

2.3.2.18 Elektroporation

Zur Transfektion des linearisierten Plasmids pHD309-HYG-mCherry in *T. brucei* wurde das Verfahren der Elektroporation ausgewählt. Da das linearisierte Plasmid pHD309-HYG-mCherry homologe Sequenzen zur β -Tubulin-Fraktion des trypanosomalen Genoms aufweist, kann das linearisierte Plasmid nach Elektroporation über homologe Rekombination in das Genom von *T. brucei* integriert werden.

Zur Elektroporation wurden $2,5 \times 10^7$ Trypanosomen des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 verwendet. Diese Trypanosomen stammten aus Vollblutstabilaten. Die Stabilate wurden auf Eis transportiert und nach raschem Auftauen in warmem Wasser in 10 ml Cytomix (4 °C) aufgenommen und 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die trypanosomale Fraktion in 5 ml Cytomix resuspendiert und die Trypanosomenkonzentration mittels Auszählen bestimmt. Das Volumen, in dem sich $2,5 \times 10^7$ Trypanosomen befanden, wurde entnommen und erneut 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die trypanosomale Fraktion in 440 μ l Cytomix resuspendiert. Diese 440 μ l wurden in eine, bei 4 °C vorgekühlte, Elektroporationsküvette überführt und mit 10 μ g (in 10 μ l) des linearisierten Plasmids pHD309-HYG-mCherry gemischt. Abschließend erfolgte die Elektroporation in zwei Pulsen von je 1,4 kV und 25 Microfarad für 4 ms mit dem GenePulser Xcell. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Elektroporationsansatz in 36 ml vorgewärmtem HMI9-Medium für 22 h bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Dieser Schritt sollte es rekombinanten Trypanosomen ermöglichen, sich zu regenerieren, bevor ein Selektionsdruck mittels Hygromycin B durchgeführt wurde.

Elektroporationsansatz	1. Puls	2. Puls
440 µl Cytomix	1108 V für 4 ms	1094 V für 4 ms
10 µl pHD309-HYG-mCherry		

Tabelle 56: Elektroporation von AnTat 1.1 pHD309-HYG-mCherry

2.3.2.19 Selektion transgener Trypanosomen

Nach der Inkubation des Elektroporationsansatzes für 22 h in HMI9-Medium wurden 0,05 µl Hygromycin B pro ml Flüssigkultur, entsprechend 2,5 µg/ml Hygromycin B, zur Selektion rekombinanter Trypanosomen eingesetzt. Hygromycin B ist ein Antibiotikum, das zur Gruppe der Aminoglykoside gehört und die Proteinbiosynthese inhibiert, so dass nur rekombinante Trypanosomen, die den linearisierten Vektor pHD309-HYG-mCherry in ihr Genom integriert haben, auf Grund einer Hygromycin B Resistenz überleben können, während nicht resistente Stämme absterben.

Aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass eine Selektion mittels Hygromycin B einen Zeitraum von fünf Tage erfordert. Da Trypanosomen des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 keine fünf Tage in Flüssigkultur überleben, wurde die 36 ml Kultur, die den Elektroporationsansatz beinhaltete (vgl. Kapitel 2.3.1.4), auf semi-soliden HMI9-0,65% Agarose 24-Well Platten ausgebracht, für fünf Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und täglich phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert.

Nach fünf Tagen Inkubation wurden die rekombinanten Trypanosomen mit 200 µl HMI9-Medium von den Selektionsplatten ab gespült. Das trypanosomenhaltige Medium wurde in ein Eppendorf Cup transferiert, bei 15.000 g für 25 s zentrifugiert und anschließend der Überstand bis auf 100 µl HMI9-Medium verworfen. Das gebildete Pellet wurde in den restlichen 100 µl des Überstandes resuspendiert und zur intraperitonealen Infektion einer Maus verwendet.

2.3.2.20 Amplifikation und Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten AnTat 1.1 pHD309-HYG-mCherry

Zur Amplifikation und zur Herstellung von Vollblutstabilaten des rekombinanten Stammes AnTat 1.1 pHD-309-HYG-mCherry (kurz: AnTat 1.1 MCP) wurden zunächst, wie in Kapitel 2.3.2.19 beschrieben, rekombinante Trypanosomen nach Selektion von 24-Well Selektionsplatten mit HMI9-Medium ab gespült und diese zur intraperitonealen Infektion einer Maus verwendet (vgl. Kapitel. 2.3.4.1). 13 Tagen nach der Infektion konnte eine Parasitämie im Blut der Maus nachgewiesen und somit das Blut der Maus zur Herstellung von Stabilaten genutzt werden (vgl. Kapitel 2.3.4.4). Zur Herstellung von Stabilaten von AnTat 1.1 pHD-309-HYG-mCherry wurde das Blut mit Antikoagulanzen (CGA) und anschließend mit Einfrier-

medium (vgl. Kapitel 2.2.4.7.1) im Verhältnis 1:1 gemischt. Je 1 ml des Ansatzes wurde in einen sterilen CryoS–Stabilatbehälter abgefüllt und bei 4 °C auf Eis gelagert. Anschließend wurden alle Stabilate für 1 h bei -20 °C aufbewahrt, bevor sie für 12-14 h bei -70 °C und abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

2.3.3 Nachweis der genomischen Integration des MCP-Gens und Nachweis der Expression des monomeren Cherry Proteins in *T. brucei*

Der Nachweis der genomischen Integration des MCP-Gens wurde durch Analyse der genomischen DNA des rekombinanten Stammes AnTat 1.1 MCP mittels Polymerasekettenreaktion durchgeführt, während die Proteinexpression des monomeren Cherry Proteins einerseits mittels *Western blot* und andererseits durch Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert wurde.

2.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA und Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *T. brucei*, Stamm AnTat 1.1 MCP, wurde das *DNeasy® Blood & Tissue* Kit der Firma Quiagen verwendet. Zuvor wurde eine 50 ml Kultur des Stammes AnTat 1.1 MCP aus einem Stabilat angelegt, die zur Gewinnung der genomischen DNA verwendet wurde. Bei der Isolierung der genomischen DNA wurde nach Angabe und Anleitung der Firma Quiagen gearbeitet. Nach erfolgter Isolierung der genomischen DNA wurden die Reinheit und die Konzentration der Probe photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel. 2.3.2.5).

Um das MCP-Gen in der genomischen DNA nachzuweisen, wurde das Gen mittels PCR unter Verwendung der in Kapitel 2.3.2.1 beschriebenen Primern amplifiziert. Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 53,6 °C und unter den in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde die genomische DNA von *T. brucei*, Stamm AnTat 1.1, auf dieselbe Weise isoliert und analysiert. Abschließend wurde der Reaktions- sowie der Kontrollansatz auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.3.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Proteinexpression des monomeren Cherry Proteins in *T. brucei* und Kontrolle der Expressionsstabilität im Infektionsverlauf sowie in Gefrierschnitten

Zum Nachweis der Proteinexpression des monomeren Cherry Proteins und zum Nachweis der Stabilität der Proteinexpression wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP und AnTat 1.1 (Negativkontrolle) zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufes (3 Tage p.i. und 34 Tage p.i.) aus dem Blut von infizierten Ratten angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA von der Firma Olympus unter Verwendung der Filterwürfel 41027 CAL CRIM C130855 und BP 545 angefertigt. Besonders der Filterwürfel 41027 CAL CRIM C130855, der speziell für die Untersuchung des monomeren Cherry Proteins von der Firma Olympus hergestellt wurde, ermöglichte eine ideale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Proteins. Die Anregung des Proteins erfolgte bei einer Wellenlänge von 587 nm während die Emission bei 610 nm lag. Alle Aufnahmen wurden unter Verwendung der *Imaging Software Cell* mit einer Belichtungszeit von 500 ms digital aufgezeichnet.

Auf dieselbe Weise wurden sowohl verschiedene Fixierungsmöglichkeiten von AnTat 1.1 MCP (vgl. Kapitel 2.2.4.5) als auch Gefrierschnitte des Gehirns (vgl. Kapitel. 2.3.5) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Filterwürfel	Anwendung	Anregung	Emission
41027 CAL CRIM C130855	Monomeres Cherry Protein	587 nm	610 nm

Tabelle 57: Fluoreszenzmikroskopie mCherry Protein

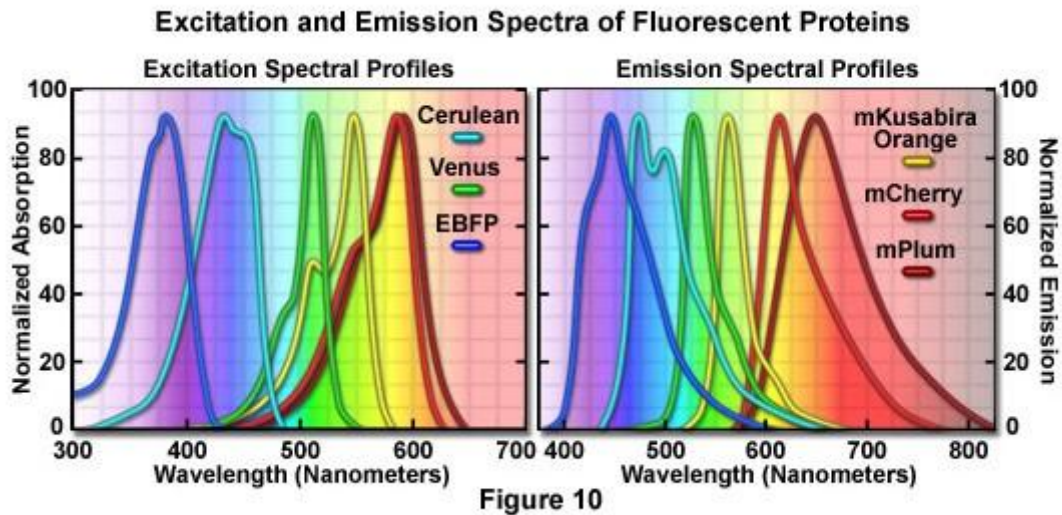


Abbildung 10: Anregungs- und Emissionsspektrum fluoreszierender Proteine

Quelle: (www.olympusfluoview.com)

2.3.3.3 Proteinbiochemie

Zum Nachweis der Expression des monomeren Cherry Proteins in *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP wurde das Protein aus Trypanosomen-Lysaten mittels *Western blot* nachgewiesen. Zunächst wurde aus einem Stabilat AnTat 1.1 MCP eine 50 ml Kultur angelegt (vgl. Kapitel 2.3.1.3) und der rekombinante Trypanosomenstamm für 24 h kultiviert. Auf dieselbe Weise wurde mit dem Kontrollstamm AnTat 1.1 verfahren. Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden sowohl mit dem Kontrollstamm als auch mit dem transgenen Stamm durchgeführt.

2.3.3.3.1 Lyse von Trypanosomen

Um das monomere Cherry Protein nachzuweisen, wurden die Trypanosomstämme lysiert. Dazu wurden die angelegten Kulturen ausgezählt, das Volumen, in dem sich 2×10^7 Trypanosomen befanden, entnommen und 5 min bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 20 μ l verworfen und das entstandene Pellet in 20 μ l HMI9-Medium resuspendiert. Die Lyse der Trypanosomen erfolgte durch Zugabe von 20 μ l Lysepuffers, der aus 10 mM Phosphatpuffer und 2x Proteaseinhibitor hergestellt wurde. Abschließend wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert und phasenkontrastmikroskopisch auf Lysierung kontrolliert.

Bestandteil	Menge
Phosphatpuffer	10 mM
Proteaseinhibitor (100x)	2x

Tabelle 58: Zusammensetzung Lysepuffer

2.3.3.3.2 Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen

Trypanosomenlysate wurden zur Trennung der löslichen, zytosolischen und nicht löslichen, membranständigen Proteine 15 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Überstand, der die lösliche, cytosolische Proteinfraction enthielt, wurde in ein Eppendorf-Cup transferiert, während das entstandene Pellet, das die membranständigen Proteine enthielt, in 20 µl Lysepuffer (vgl. Tabelle 60) mit 0,1% Triton, für 1 h auf Eis inkubiert wurde.

2.3.3.3.3 Gelherstellung

Zur SDS-PAGE wurden 12% SDS-Gele, wie in den Tabellen 59 und 60 aufgelistet, hergestellt und verwendet. Zuvor wurden alle erforderlichen Materialien, wie z.B. Glasplatten mit 70% Ethanol gereinigt. Die Dicke der hergestellten Gele betrug 0,75 mm. Bei der Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 200 µl destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (nach ca. 35 min) wurde das destillierte Wasser entfernt und das Sammelgel hergestellt. Die in den Tabelle 59 und 60 dargestellten Mengen ermöglichten eine Anfertigung von vier Gelen (8 x 10cm).

Bestandteil	Menge
Acrylamid/Bisacrylamid	9,12 ml
H ₂ O bidest.	5,08 ml
1 M Tris-HCl Puffer, pH: 8,8	8,60 ml
10% SDS in H ₂ O dest.	228 µl
10x Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O dest.	78 µl
TEMED	24 µl

Tabelle 59: Zusammensetzung 12% SDS Trenngel

Bestandteil	Menge
Acrylamid/Bisacrylamid	2,0 ml
H ₂ O bidest.	8,5 ml
1 M Tris-HCl Puffer, pH: 6,8	1,5 ml
10% SDS in H ₂ O dest.	120 µl
10x Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O dest.	45 µl
TEMED	9 µl

Tabelle 60: Zusammensetzung 12% SDS Sammelgel

2.3.3.3.4 SDS-PAGE und *Western blot*

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die zu analysierenden Proben so vorbereitet, dass 8 µl des experimentellen Lysates von AnTat 1.1 MCP sowie 8 µl des Kontrolllysates von AnTat 1.1 mit 5 µl nicht reduzierenden *Loading Buffer* versetzt und für 5 min bei 100 °C gekocht wurden. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und in die Geltaschen eines 12% SDS-Gels geladen, so dass jede Tasche mit 40 µg Protein beladen wurde. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *PageRuler™ Plus Prestained Protein* aufgetragen, um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Die Elektrophorese wurde mit 150 V für 45 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL Nitrozellulosemembran, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) bei 20 V und 40 mA für 30 min geblottet und die Membran über Nacht in 10% Milchpulver in 2x PBS geblockt.

2.3.3.3.5 Entwicklung von *Western blots*

Western blots wurden nach dem in Tabelle 61 dargestellten Protokoll entwickelt. Alle verwendeten Pufferlösungen, Antikörper und Entwicklungslösungen sind dieser Tabelle zu entnehmen. Die einzelnen Schritte wurden in einer Plastikschüssel bei Raumtemperatur und unter Schütteln (100 rpm) durchgeführt. Nach Entwicklung wurden die *Blots* auf Whatman Papier getrocknet, eingescannt, anschließend eingeschweißt und im Dunkeln gelagert.

Schritt	Substanz/Lösung	Inkubationszeit
Waschen	Waschpuffer	5 × 1 min
Primärer Antikörper	Polyklonaler DsRed Anti-körper (rabbit) in TBS (1:1000)	45 min
Waschen	Waschpuffer	5 × 1 min
Sekundärer Antikörper	Anti-rabbit IgG Alkalische Phosphatase in TBS 1:15000	45 min
Waschen	Waschpuffer	5 × 1 min
Entwicklung	BCIP 0,38 mM in 100% DMF, NBT 0,4 mM in 70% DMF in 50 ml AP-Puffer	Visuelle Kontrolle, entwickeln bis Bande erscheint
Stoppen	PBS	2 × 5 min

Tabelle 61: Entwicklung *Western blot*

2.3.4 Anzucht und Isolierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP

Die Anzucht und Isolierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP erfolgte im Tiermodell. Dazu wurden Mäuse und Ratten mit den entsprechenden Trypanosomen infiziert, die Parasitämie mittels Auszählen und Blutaussstrich kontrolliert, die Parasiten aus dem Blut des Versuchstieres durch Präparation gewonnen und anschließend mittels Ionenaustauschchromatographie von zellulären Blutbestandteilen gereinigt.

2.3.4.1 Infektion von Versuchstieren

Zur Infektion von Versuchstieren kamen Trypanosomenstabilate (AnTat 1.1 oder AnTat 1.1 MCP) zur Anwendung. Die Stabilate wurden in warmem Wasser aufgetaut, auf Eis gelagert und deren Trypanosomenkonzentration in einer Zählkammer (vgl. Kapitel 2.3.4.2.2) bestimmt. Falls es notwendig war, wurde die Trypanosomenkonzentration mit Antikoagulanzen (CGA) auf eine Zelldichte von 10^7 Trypanosomen verdünnt.

Zur Infektion eines Versuchstieres wurde das Versuchstier mit CO₂ narkotisiert. Dabei wurde eine Narkose nur bei Ratten durchgeführt, während Mäuse ohne Narkose infiziert wurden. Die Infektion erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion unter Verwendung einer 1 ml Spritze und einer G24 Nadel. Für Ratten wurde ein maximales Injektionsvolumen von 1 ml (= 10^7 Trypanosomen) und für Mäuse von 100 µl (= 10^6 Trypanosomen) verwendet. Um sicher zu stellen, dass eine intraperitoneale und keine intravasale Injektion erfolgte, wurde vor der Injektion eine Aspiration durchgeführt. Nach erfolgter Injektion wurde das Versuchstier bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose beobachtet.

2.3.4.2 Blutabnahme zur Bestimmung der Parasitämie

Zur Kontrolle einer Infektion und zur Bestimmung der Parasitämie während des Infektionsverlaufes wurde dem Versuchstier Blut abgenommen. Dazu wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene des Versuchstieres entnommen. Zur Entnahme des Blutes wurden etwa 0,5 mm der Schwanzspitze des Versuchstieres abgeschnitten. Anschließend wurde ein Tropfen Blut auf Parafilm aufgefangen, von dem 5 µl mit 495 µl CGA verdünnt wurden. Der Rest des Bluttröpfens wurde zur Herstellung eines Blutaussstriches verwendet.

2.3.4.2.1 Blutausstrich

Zur schnellen Kontrolle und Bestätigung einer Infektion wurde ein Blutausstrich angefertigt. Dazu wurde dem Versuchstier ein Blutropfen wie beschrieben entnommen (vgl. Kapitel 2.3.4.2) und auf einen Objektträger aufgetragen. Ein zweiter Objektträger wurde vorsichtig senkrecht am Blutropfen andockt. Anschließend wurde der zweite Objektträger in einem Ausstrichwinkel von 15-40° zum ersten Objektträger ausgestrichen, so dass ein dünner Ausstrich des Blutes entstand. Dieser Ausstrich wurde mit einem Deckglas versehen und phasenkontrastmikroskopisch auf Trypanosomen untersucht.

Falls sich keine Trypanosomen phasenkontrastmikroskopisch nachweisen ließen, wurde der Blutausstrich Giemsa (vgl. Kapitel 2.3.8.1) gefärbt.

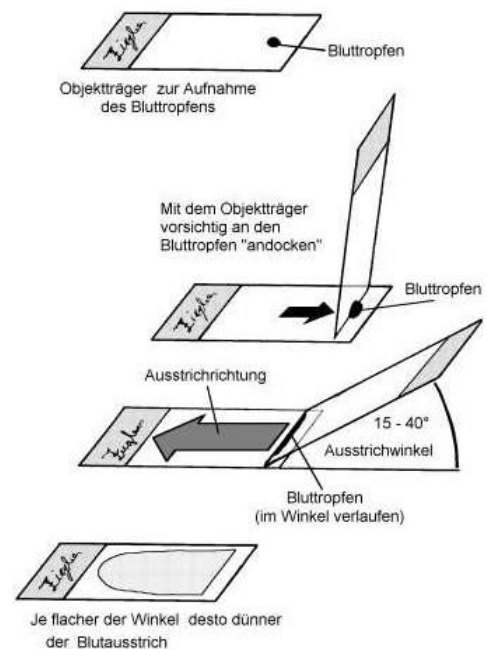


Abbildung 11: Herstellung eines Blutausstriches

2.3.4.2.2 Auszählen mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Parasitämie wurde eine 1:100 Verdünnung aus Blut und CGA (vgl. Kapitel 2.3.4.2) unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,2 mm) ausgezählt. Je 3 µl der Verdünnung wurden pro Zählfeld aufgetragen. Anschließend wurde die Trypanosomenzahl phasenkontrastmikroskopisch ausgezählt. Jede Verdünnung wurde mindestens dreimal ausgezählt. Bei abweichenden Zählergebnissen wurden weitere Zählungen durchgeführt und ein Mittelwert gebildet.

Aus der gezählten Trypanosomenanzahl ließ sich unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammerfaktors die Trypanosomenkonzentration bzw. Parasitämie unter Verwendung der in Formel 2 dargestellten Formel berechnen. Auf dieselbe Weise wurden Kulturen und Stabilate von *T. brucei* ausgezählt.

$$c(\text{Trypanosomen}) \left[\frac{\text{Tryp}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Mittelwert (Anzahl Trypanosomen pro Großquadrat)}}{4} \times 50.000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung der Trypanosomenkonzentration

2.3.4.3 Präparation von Versuchstieren zur Blutentnahme

Um das Blut eines Versuchstieres zu gewinnen, wurde das Versuchstier (3-4 Tage p.l.) zunächst in 100% CO₂ getötet. Anschließend wurde das Versuchstier unter sterilen Bedingungen präpariert. Dazu wurden das Fell und die Haut des Thorax und des Abdomen mit Sterilium® desinfiziert und die Haut des Tieres in diesem Bereich durch vom Processus xiphoideus ausgehende, bis zur vorderen Axillarlinie verlaufende Hautschnitte mit einer Schere eröffnet.

Der *Processus xiphoideus* und die darüber liegenden Muskeln wurden mit einer chirurgischen Pinzette gefasst. Anschließend wurde die Thoraxhöhle entlang des Sternums mit einer Schere eröffnet. Das Antikoagulant CGA wurde in die geöffnete Thoraxhöhle appliziert, um eine vorzeitige Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Anschließend wurde die *Vena cava inferior* mit einer chirurgischen Pinzette fixiert und mit einer Schere durchtrennt. Das austretende, sich in der Thoraxhöhle sammelnde Blut wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette aufgenommen und in 15 ml Falkons, die mit 1 ml CGA (Antikoagulant) gefüllt waren, gesammelt. Anschließend wurde der linke Ventrikel mit einer 5 ml Spritze unter Verwendung einer G23 Nadel punktiert und das Gefäßsystem mit 5 ml CGA gespült.

Das ausgetretene, mit CGA vermischte Blut wurde erneut mit einer sterilen Pasteur-Pipette in einem 15 ml Falcon, der mit 1 ml CGA gefüllt war, gesammelt. Anschließend wurde das gewonnene CGA-Vollblut-Gemisch auf Eis bei 4 °C gelagert und für die Isolierung von Trypanosomen oder zur Herstellung von Stabilaten verwendet (vgl. Kapitel 2.3.2.20).

2.3.4.4 Isolierung von Trypanosomen aus Vollblut

Zur Isolierung von Trypanosomen aus dem Vollblut eines Versuchstiers wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie bei pH 8,0 durchgeführt. Auf Grund der unterschiedlichen äußeren Ladungen von Trypanosomen, deren VSG-Moleküle bei pH 8,0 ungeladen sind und der bei diesem pH-Wert negativ geladenen Blutzellen konnte eine Auftrennung erfolgen. Die Anionenaustausch-Chromatographie erfolgte je nach Verwendung von Trypanosomen unter sterilen oder nicht sterilen Bedingungen.

Zur sterilen Auftrennung wurden vier Filterpapiere und 120 ml DEAE-Sephacel autoklaviert. Anschließend wurde eine Trennsäule unter Verwendung autoklavierter Filterpapiere (4,5 cm Durchmesser) als Bodenfilter mit 120 ml DEAE-Sephacel gepackt. Das Säulenmaterial wurde durch ein autoklaviertes Filterpapier abgedeckt. Anschließend wurde die komplette Säule mit 300 ml kaltem Separationbuffer (4 °C) äquilibriert, so dass eine Anionenaustausch-Chromatographie durchführbar war.

Zur Isolierung von Trypanosomen wurde das CGA-Vollblut-Gemisch (vgl. Kapitel 2.3.4.3) für 10 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Plasmaanteil des Blutes wurde verworfen,

während der *buffy coat*, in dem sich Trypanosomen befanden, mit einer Pasteur-Pipette in 2 ml Separationspuffer transferiert und suspensiert wurde. Die Suspension wurde auf das Säulenmaterial aufgetragen. Durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum und gleichzeitigem Spülen der Säule mit 100 ml Separationspuffer ließen sich Trypanosomen als milchig-trübe Suspension von den zellulären Blutbestandteilen trennen.

Diese milchige, trübe Trypanosomensuspension wurde 5 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich Trypanosomen im Pellet, so dass der Überstand verworfen wurde und das Trypanosomenpellet im gewünschten Kultivierungsmedium und Volumen aufgenommen, ausgezählt und verwendet werden konnte.

2.3.5 Lokalisierung von *T. brucei* in Gefrierschnitten von Rattengehirnen

Zur Lokalisierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP wurden Gefrierschnitten von drei Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.l.) angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Gehirn über das Gefäßsystem perfundiert, fixiert und anschließend entnommen. Die Vorgehensweisen bei der Präparation, Perfusion, Fixierung und Entnahme des Gehirns sind in den folgenden Kapiteln näher beschrieben, während die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Gefrierschnitten bereits in Kapitel 2.3.3.2 erläutert wurde. Als Negativkontrolle wurde ein Gehirn einer nicht infizierten Ratte auf dieselbe Weise untersucht. Als Positivkontrolle dienten fixierte (2% Glutaraldehyd) Trypanosomen des Stammes AnTat 1.1 MCP, die auf Gefrierschnitte eines nicht infizierten Gehirnes pipettiert wurden.

2.3.5.1 Perfusion, Fixierung und Entnahme von Gehirnen

Zur Perfusion, Fixierung und Entnahme von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium wurden die Versuchstiere mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylaxine (125 µl/100 mg) narkotisiert und analgesiert.

Im narkotisierten und analgesiarten Zustand wurde die Thoraxhöhle der Versuchstiere eröffnet und die Vena cava inferior durchtrennt, um einen Austritt des Blutes aus dem intravasalen Raum zu ermöglichen (vgl. Kapitel 2.3.4.3).

Anschließend wurde der linke Ventrikel mit einer zuvor abgestumpften G24 Nadel punktiert, über die mit einer 30 ml Spritze 20 ml Citrat-Glukose-Antikoagulanzlösung appliziert wurden, um eine intravasale Gerinnung zu verhindern und das Gefäßsystem zu perfundieren. Die Perfusion des Gefäßsystems erfolgte langsam, mit einer Geschwindigkeit von 3-4 ml CGA pro Minute. Um autolytischen Prozessen des Gehirns entgegenzuwirken, wurde das Gehirn unmittelbar nach der Perfusion auf dieselbe Weise mit 20 ml 2% Glutaraldehyd fixiert.

Nach vollständiger Fixierung erfolgte die Entnahme des Gehirns. Zur Entnahme des Gehirns wurde das Versuchstier dekapitiert und anschließend der knöcherne Schädel im Bereich des *Foramen magnum* mit einer Schere eröffnet. Unter Verwendung einer chirurgischen Pinzette wurde der Schädel (insbesondere das Schädeldach) vorsichtig aufgebrochen, angehoben und entfernt. Nach sorgfältiger und vorsichtiger Entfernung der Hirnhäute mit einer Pinzette wurden die Hirnnerven mit einem Spatel durchtrennt und das Gehirn entnommen. Abschließend wurde das isolierte Gehirn in einer Stickstoffatmosphäre eingefroren.

2.3.5.2 Einfrieren von Gehirnen

Entnommene Rattengehirne wurden in einer aus Aluminiumfolie gebauten Box in NEG 50 eingebettet und in einem Plastikbecher, der mit 20 ml Hexan gefüllt wurde, in einer Stickstoffatmosphäre über 30 min eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Gehirne bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.3.5.3 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten des Gehirns wurden, unter Verwendung eines Cryostaten, bei einer Temperatur von -25 °C Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden auf Polysine®-Slides übertragen und bei -25 °C bis zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung gelagert.

2.3.6 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems

Zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Gehirnbereichen in Kooperation mit Professor Wolburg aus dem Institut für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen angefertigt.

Dabei erfolgte die Infektion der Versuchstiere, die Kontrolle des Infektionsverlaufs, die Entnahme, Perfusion und Fixierung von Gehirnen in unserer Arbeitsgruppe, während die Aufarbeitung und Vorbereitung von Gewebeproben sowie die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Institut der Allgemeinen Pathologie durchgeführt wurden. Insgesamt wurden fünf Rattengehirne zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems sowie das Gehirn einer nicht infizierten Ratte als Negativkontrolle verwendet.

2.3.6.1 Entnahme, Perfusion, Fixierungen und Vorbereitung von Gehirnen für elektronenmikroskopische Aufnahmen

Gehirne von infizierten Ratten im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.l.) wurden, wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben, perfundiert (Fixativ oder physiologische Salz) und entnommen. Zur Fixierung der Gehirne wurde eine Lösung aus 4% Glutaraldehyd und 10% Formalin (4% PFA) verwendet. Die Gehirne wurden nach der Entnahme für 12 h bei 4 °C in einer Lösung aus 4% Glutaraldehyd und 10% Formalin gelagert, anschließend für 24 h bei 4 °C in Cacodylat-Puffer aufbewahrt und schließlich zum Institut für Allgemeine Pathologie transportiert.

2.3.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Gehirnbereichen wurden nach Fixierung, Gehirnentnahme und Vorbereitung der Proben in Kooperation mit Professor Wolburg angefertigt.

Dabei wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen im Bereich der Blut-Hirn-Schranke, des *Plexus choroideus* der Seitenventrikel, des *Corpus striatum*, des *Cortex* und des *Cerebellum* hergestellt.

2.3.7 Isolierung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Zur Isolierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems wurde das Gehirn von vier Ratten im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.l.) entnommen. Die Besonderheiten der Gehirnentnahme und die Vorgehensweise zur Isolierung von Trypanosomen aus dem neuronalen Gewebe sind im folgenden Kapitel beschrieben. Als Negativkontrolle wurde versucht Trypanosomen aus drei Gehirnen von Ratten (2-3 Tage p.l.) vergleichbar zu isolieren.

2.3.7.1 Perfusion, Entnahme und Vorbereitung von Gehirnen für Isolierungsexperimente

Das Gehirn von Ratten im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tag p.l.) wurde, wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben, perfundiert und entnommen. Bei der Präparation des Gehirns wurde das Gehirn jedoch nicht fixiert, um eine Isolierung von vitalen Trypanosomen aus dem Gewebe des ZNS zu ermöglichen. Unmittelbar nach der Entnahme des Gehirnes, wurde das Gehirn, wie in Kapitel 2.3.1.5 beschrieben, in vier Stücke gegliedert und in HMI9-Medium inkubiert. Nach 2h - 24h Inkubation in Kulturmedium wurden isolierte Trypanosomen phasenkontrastmikroskopisch betrachtet. Alternativ wurden sie in 10% Formalin fixiert und für verschiedene Färbungen verwendet (vgl. Kapitel 2.3.8.2).

2.3.8 Färbemethoden

Zur Identifikation und Charakterisierung von *T. brucei* wurden verschiedene Färbemethoden durchgeführt. Eine Darstellung von Trypanosomen in Blutausstrichen erfolgte mittels Giemsa Färbung, während für die Charakterisierung von isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems eine Bisbenzimidfärbung durchgeführt wurde, um die Lage von Kern und Kinetosom zueinander zu beschreiben und zu beurteilen.

2.3.8.1 Giemsa Färbung

Die Giemsa Färbung ist eine Färbetechnik die dazu dient, Blutausstriche und Gewebsschnitte zu färben, so dass unterschiedliche Zelltypen dargestellt werden können [Hewitt, 1937]. Mittels Giemsa Färbung lassen sich Protozoen, wie Trypanosomen, in Blutausstrichen leicht nachweisen. Durch die Färbetechnik färben sich Zellkerne durch Komplexbildung des Farbstoffes mit der DNA rot, während das Cytoplasma blau gefärbt erscheint. Parasiten färben sich jedoch leuchtend rot.

Zur Herstellung eines Giemsa gefärbten Blutausstriches oder Gewebsschnittes wurde der Blutausstrich auf einem Objektträger mit Methanol fixiert. Nachdem das Methanol verdunstet war, wurde der Ausstrich mit einem Gemisch aus Giemsa-Weise-Puffer-Lösung (Verhältnis 1:10) bedeckt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Blutausstrich mit abgekochtem, destilliertem Wasser gespült, bis sich keine Farbwolken mehr von Objektträger ablösen. Auf diese Weise wurde überflüssiger Farbstoff entfernt. Der gefärbte Blutausstrich wurde abschließend lichtmikroskopisch untersucht.

2.3.8.2 Bisbenzimidfärbung isolierter Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Bisbenzimid ist ein organischer, fluoreszierender Farbstoff, der sich zur Färbung der DNA eignet. Als interkalierende Substanz lagert sich Bisbenzimid zwischen dem Basenpaar Adenin und Thymin ein. Adenin-Thymin haltige DNA Bereiche werden auf diese Weise angefärbt und können fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden.

Diese Färbetechnik eignet sich besonders zum Nachweis von Kinetoplastidae wie z.B. Trypanosomen, da bei dieser Färbetechnik nicht nur der *Nucleus* sondern auch die mtDNA des Kinetoplasten angefärbt wird.

Zur Bisbenzimidfärbung wurden 10^5 - 10^6 Trypanosomen (AnTat 1.1), die aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems isoliert und für 2 h in HMI9-Medium inkubiert wurden (vgl. Kapitel 2.3.7.1), für 10 min in 200 μ l 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 s bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml PBS resuspendiert. Danach wurde der Ansatz erneut für 20 s bei 15.000 g zentrifugiert, der

Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml einer 1:1000 Verdünnung von Bisbenzimid in PBS resuspendiert. Da Bisbenzimid lichtinstabil ist, wurden ab diesem Zeitpunkt alle Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Nach einer 30 min Inkubation wurde der Ansatz erneut bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1,5 ml PBS gewaschen, um das überflüssige Bisbenzimid zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Die Bisbenzimid gefärbten Trypanosomen wurden abschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht und die Lage von Kern und Kinetosom zueinander beschrieben. Für eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer Bisbenzimidfärbung von isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems wurde der Filterwürfel UG1 verwendet.

Filterwürfel	Anwendung	Anregung	Emmision
UG1	Bisbenzimid-Färbung	346 nm	460 nm

Tabelle 62: Fluoreszenzmikroskopie Bisbenzimid

3. Ergebnisse

Die stark limitierten Möglichkeiten in der Diagnostik und Behandlung der humanen afrikanischen Trypanosomiasis im sekundären Krankheitsstadium stellen ein bislang nicht gelöstes Problem dar, so dass Patienten in diesem Krankheitsstadium nach wie vor mit schmerzhaften, diagnostischen Verfahren untersucht und mit nebenwirkungsreichen Medikamenten behandelt werden müssen. Eine Ursache für diese Situation liegt darin, dass das zweite Krankheitsstadium bislang nur wenig erforscht wurde und geringe Erkenntnisse im Hinblick auf die Pathogenese des sekundären Krankheitsstadiums und den Parasit selbst bestehen. Bisher ist nicht geklärt, in welchem Stadium des Lebenszyklus sich Trypanosomen im neuronalen Umfeld befinden, ob sie morphologische und/oder biochemische Besonderheiten besitzen und wie sie in das zentrale Nervensystem eindringen. Ziel der Promotionsarbeit sollte es daher sein, rot fluoreszierende, MCP exprimierende Trypanosomen herzustellen und eine Lokalisierung und morphologische Charakterisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems zu ermöglichen.

Dazu sollten rekombinante, konstitutiv MCP exprimierende Trypanosomen durch gentechnische Verfahren hergestellt und deren Proteinexpression und Proteinexpressionsstabilität mittels Fluoreszenzmikroskopie und *Western blot* nachgewiesen werden.

Die Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems sollte mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse von Gefrierschnitten von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.l.) und anschließender Elektronenmikroskopie erfolgen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen sollten im Bereich der Blut-Hirnschranke, des *Plexus choroideus*, des *Corpus striatum*, des *Cerebellum* und des *Kortex* in Kooperation mit Herrn Professor Wolburg durchgeführt werden.

Durch die Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des ZNS mittels Elektronenmikroskopie sollte einerseits die Pathogenese des sekundären Krankheitsstadiums näher beschrieben und andererseits eine morphologische Beschreibung von *T. brucei* im neuronalen Umfeld ermöglicht werden. Abschließend sollten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems isolieren werden, um diese mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie morphologisch zu charakterisieren.

3.1 Herstellung von rot fluoreszierenden, MCP exprimierenden Trypanosomen

Da bislang Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems mittels lichtmikroskopischen Methoden und histopathologischen Färbetechniken [Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009] nicht eindeutig lokalisiert und morphologisch charakterisiert werden konnten, wurde in dieser Promotionsarbeit ein Gen, das für ein rot fluoreszierendes Protein codiert (monomeres Cherry Protein), in das Genom des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 von *T. brucei* kloniert. Diese Markierung sollte eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems ermöglichen. Die Klonierung des MCP-Gens erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion, Subklonierung und finaler Klonierung in das trypanosomale Expressionsplasmid, das nach Linearisierung mittels Elektroporation und anschließender homologer Rekombination in das trypanosomale Genom integriert wurde. Rekombinante Trypanosomen wurden auf semi-soliden HMI9-0,65% Agarose 24-Well Platten mittels Hygromycin B selektiert und *in vivo* amplifiziert.

3.1.1 Amplifikation des MCP-Gens aus pAAV-MCS-mCherry mittels Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation des MCP-Gens (711 bp) aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (vgl. Kapitel 2.3.2.2). Alle hergestellten Reaktionsansätze wurden anschließend auf einem 1% Agarosegel mittels Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.3.2.3) aufgetrennt. In allen Reaktionsansätzen konnte das MCP-Gen trotz unterschiedlicher Annealingtemperaturen aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry amplifiziert werden (vgl. Abbildung 12). Zur Durchführung weiterführender Experimente wurde das amplifizierte, modifizierte MCP-Gen (untere Bande: 723 bp) aus dem Agarosegel von Reaktionsansatz Nummer drei ausgewählt, mittels Gelextraktion (vgl. Kapitel 2.3.2.4) isoliert, gereinigt und anschließend die DNA Konzentration sowie die Proteinverunreinigung der Probe photometrisch (vgl. Kapitel 2.3.2.5) bestimmt.

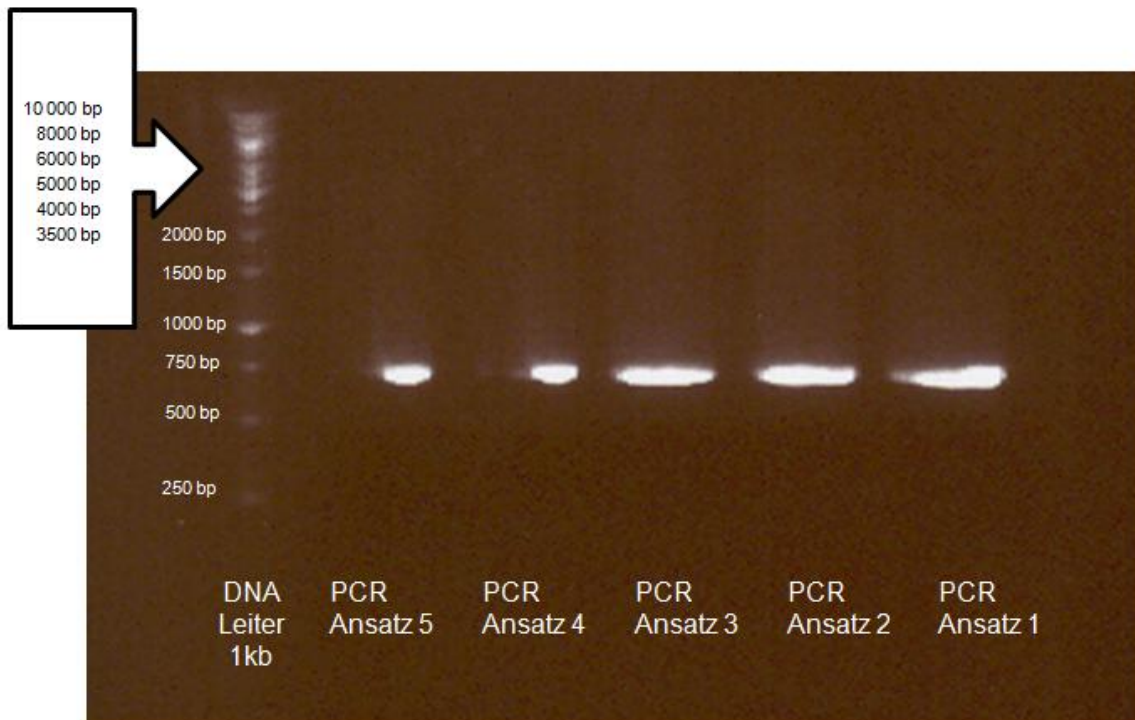


Abbildung 12: Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation des MCP-Gens

In allen durchgeführten Reaktionsansätzen konnte das MCP-Gen (711 bp) aus dem Plasmid pAAV-MCS-mCherry (5355 bp) mittels Polymerasekettenreaktion modifiziert amplifiziert (723 bp) werden.

3.1.2 Restriktionsverdau pDH309-HYG-PUR

Um das MCP-Gen in das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-PUR zu klonieren, musste das Plasmid mittels Restriktionsverdau geöffnet werden. Da dieses Expressionsplasmid ein Puromycinresistenz codierendes Gen besitzt, das zwischen Sequenzen liegt, die für die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII Schnittstellen darstellen, konnte das Puromycinresistenz codierende Gen mittels Restriktionsverdau entfernt werden (vgl. Kapitel 2.3.2.13). Anschließend wurde der Ansatz auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.3.2.3).

Abbildung 12 verdeutlicht, dass durch Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen das Puromycinresistenz codierende Gen (untere Bande: 609 bp) aus dem trypanosomalen Expressionsplasmid pHD309-HYG-PUR (6145 bp) herausgeschnitten und somit der geöffnete Vektor pHD309-HYG (obere Bande: 5536 bp) erhalten werden konnte.



Abbildung 13: Restriktionsverdau pHD309-HYG-PUR

Das Plasmid pHD309-HYG-PUR wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut, um das Puromycinresistenz codierende Gen (untere Bande: 609bp) aus dem Plasmid pHD309-HYG-PUR (6145 bp) zu entfernen und das geöffnete Plasmid pHD309-HYG (obere Bande: 5536bp) zu erhalten.

Anschließend wurde die Bande, die das geöffnete Plasmid pHD309-HYG darstellte, mittels Gelextraktion (vgl. Kapitel 2.3.2.4) isoliert und gereinigt.

Da die Banden des nicht verdauten Plasmids pHD309-HYG-PUR (6145 bp) und des verdauten Plasmids pHD309-HYG (5536 bp) nahezu auf selber Höhe liegen, war bei der Gelextraktion des verdauten Plasmids nicht auszuschließen, dass Reste des nicht verdauten Plasmids mit extrahiert wurden. Dies hatte jedoch für den experimentellen Ansatz, aufgrund der erheblich größeren Mengen an verdauten Plasmid (vgl. Kapitel 3.1.6) keine Konsequenzen.

Abschließend wurde die DNA Konzentration der Probe photometrisch bestimmt und die Probe für weitere Experimente verwendet.

3.1.3 Subklonierung, Transformation in *E. coli* und Kontrolle der Rekombinanten

Das gereinigte PCR-Produkt (MCP-Gen; 723 bp) konnte aufgrund eines Adenosin-Überhangs (3'-dA) am 3' Ende nicht direkt in das geöffnete, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG kloniert werden. Um den Adenosin-Überhang (3'-dA) am 3' Ende zu entfernen, erfolgte eine Subklonierung mittels *Topo@TA Cloning* (vgl. Kapitel 2.3.2.6) und anschließender Transformation in *E. coli* (vgl. Kapitel 2.3.2.7). Dabei wurde der Transformationsansatz, wie in Kapitel 2.3.2.7 beschrieben, auf LB-Selektivplatten ausgebracht und über Nacht inkubiert. Auf diese Weise wurden sechs Kolonien auf den LB-Selektivplatten detektiert. Diese Kolonien wurden nummeriert und mittels Blau-Weiß-Selektion auf Rekombinate kontrolliert, wobei sich herausstellte, dass alle Kolonien rekombinant waren. Von den Kolonien 1-6 wurden 3 ml Flüssigkultur angelegt (vgl. Kapitel 2.3.1.1) und das entsprechende Plasmid isoliert (vgl. Kapitel 2.3.2.10). Anschließend wurde aus den isolierten Plasmiden mittels Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII das MCP-Gen ausgeschnitten, der Reaktionsansatz auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 14).



Abbildung 14: Kontrolle der Subklonierung

Die Abbildung zeigt, dass das MCP-Gen (obere Bande 723 bp) aus dem Subklonierungsplasmid pCR@2.1.-Topo@mCherry mittels Restriktionsverdau und unter Erhalt von DNA Fragmenten des Subklonierungsplasmids pCR@2.1.-Topo@ (obere Bande 3875 bp; nicht sichtbare Banden: 43 bp und 18 bp) aus allen Kolonien herausgeschnitten werden konnte.

Die Auftrennung des Restriktionsverdau mittels Agarosegelelektrophorese zeigte, dass alle Kolonien das Plasmid pCR@2.1.-Topo@mCherry aufgenommen hatten und somit zur Isolierung des MCP-Gens (723 bp) geeignet waren.

Abschließend wurde von Kolonie 1 eine 50 ml Flüssigkultur (vgl. Kapitel 2.3.1.1) angelegt, das Plasmid isoliert (vgl. Kapitel 2.3.2.10), die DNA Konzentration sowie die Reinheit der Probe photometrisch ermittelt und die Sequenz des MCP-Gens im Plasmid pCR@2.1.-Topo@mCherry mittels Sequenzierung analysiert.

3.1.4 Sequenzierung des monomeren Cherry Protein codierenden Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry

Das gereinigte Plasmid pCR®2.1.-Topo®-mCherry von Kolonie Nummer 1 wurde der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) zur Sequenzierung geschickt. Dabei wurde die Probe, wie in Kapitel 2.3.2.11 beschrieben, vorbereitet, transportiert und analysiert. Die Durchführung der Sequenzierung der eingeschickten DNA Probe erfolgte durch die Firma GATC unter Verwendung der Primer „M13“ und „M13 Reverse“.

Das Sequenzierungsergebnis wurde mit Hilfe des Programmes GATC-Viewer kontrolliert und anschließend für ein Sequenzalignment verwendet, in dem die Sequenz des nativen MCP-Gens mit der Sequenz des MCP-Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry verglichen wurde. Das abschließende Sequenzalignment erfolgte unter Verwendung des Programmes Blast2.

```

Klon 1
>lcl|57449
Length=723

Score = 1330 bits (720), Expect = 0.0
Identities = 722/723 (99%), Gaps = 0/723 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  43  AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGC 102
      |||
Sbjct  1    AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGC 60

Query  103  TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTAACCGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC 162
      |||
Sbjct  61    TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTAACCGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC 120

Query  163  GAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGCCCC 222
      |||
Sbjct  121  GAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGCCCC 180

Query  223  CTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTG 282
      |||
Sbjct  181  CTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTG 240

Query  283  AAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGG 342
      |||
Sbjct  241  AAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGG 300

Query  343  GAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG 402
      |||
Sbjct  301  GAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTG 360

Query  403  CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGC 462
      |||
Sbjct  361  CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGC 420

Query  463  CCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAG 522
      |||
Sbjct  421  CCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAG 480

Query  523  GACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTAC 582
      |||
Sbjct  481  GACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTAC 540

Query  583  GACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGACAGCTGCCCGGCGCCTAC 642
      |||
Sbjct  541  GACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGACAGCTGCCCGGCGCCTAC 600

Query  643  AACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG 702
      |||
Sbjct  601  AACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG 660

Query  703  TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGA 762
      |||
Sbjct  661  TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGA 720

Query  763  TCC 765
      |||
Sbjct  721  TCC 723

```

Abbildung 15: Ergebnis des Sequenzalignment des MCP-Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry von Klon 1

Das Sequenzalignment zeigt, dass die Sequenz des MCP-Gens im Subklonierungsplasmid pCR®2.1.-Topo®-Cherry zu 99% mit der nativen Sequenz des MCP-Gens übereinstimmte. Ein einziger Basenaustausch, der jedoch zu keinem Aminosäureaustausch führte, zeigte sich in Position Nummer 87.

Das in Abbildung 15 dargestellte Sequenzalignment zeigte, dass die Sequenz des MCP-Gens in pCR®2.1.-Topo®-mCherry zu 99% mit der nativen Sequenz des MCP-Gens übereinstimmte. Im Vergleich zum nativen Gen bestand lediglich ein einziger Basenaustausch in Position 87. Dieser Basenaustausch (Adenin gegen Guanin) führte jedoch zu keinem Aminosäureaustausch, so dass das Plasmid pCR®2.1.-Topo®-mCherry zur Isolierung des MCP-Gens und somit für weitere Experimente verwendet werden konnte.

3.1.5 Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry

Um das MCP-Gen aus dem Subklonierungsplasmid von Kolonie 1 zu isolieren, wurde ein Restriktionsverdau des Plasmids mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII durchgeführt (vgl. Kapitel 2.3.2.14). Anschließend wurde der Restriktionsverdau auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 16). Das MCP-Gen wurde mittels Gelextraktion isoliert, gereinigt und die DNA Konzentration der Probe photometrisch bestimmt.

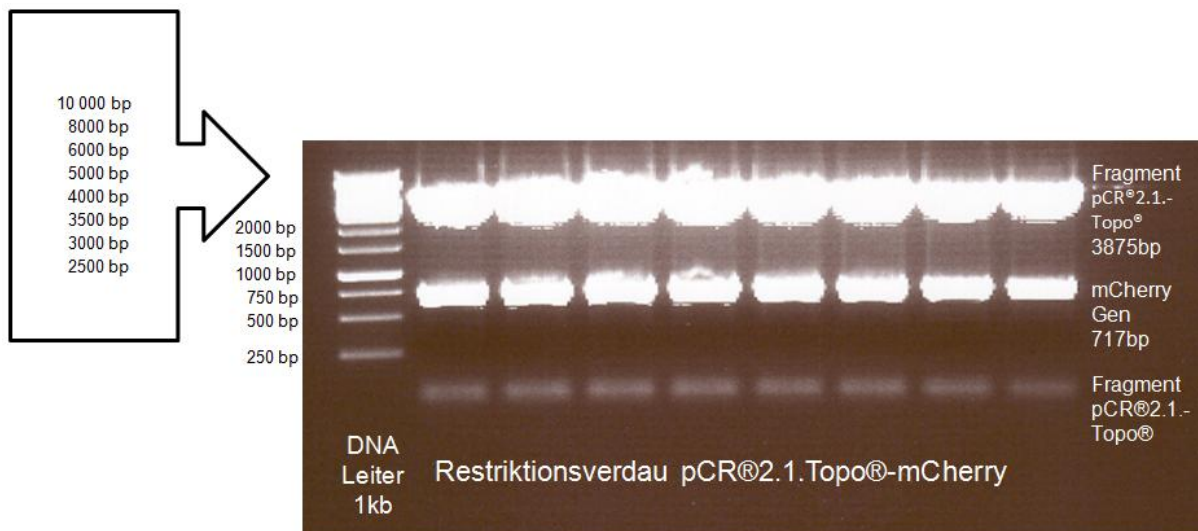


Abbildung 16: Restriktionsverdau pCR®2.1.-Topo®-mCherry

Mittels Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII konnte aus dem Subklonierungsplasmid pCR®2.1.-Topo®-mCherry das MCP-Gen (mittlere Bande: 723bp) isoliert werden. Außerdem entstanden drei weitere DNA Fragmente, die sich aus dem Plasmid pCR®2.1.-Topo® ableiteten. Sichtbar sind zwei der drei DNA Fragmente (obere Bande: 3875 bp, untere Bande 43 bp); das dritte Fragment auf Höhe von 18 bp ist nicht abgebildet.

Abbildung 16 zeigt, dass das MCP-Gen (mittlere Bande: 723bp) mittels Restriktionsverdau aus dem Subklonierungsvektor pCR®2.1.-Topo®-mCherry isoliert werden konnte. Das auf diese Weise isolierte MCP-Gen konnte direkt zur Ligation in das geöffnete, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG verwendet werden.

3.1.6 Kontrolle des Restriktionsverbaus von pHD309-HYG-PUR

Um zu überprüfen, ob der Restriktionsverdau von pHD309-HYG-PUR (vgl. Kapitel 3.1.2) vollständig war und das geöffnete Plasmid pHD309-HYG rein isoliert werden konnte, wurden 500 ng der isolierten DNA Probe auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 17).

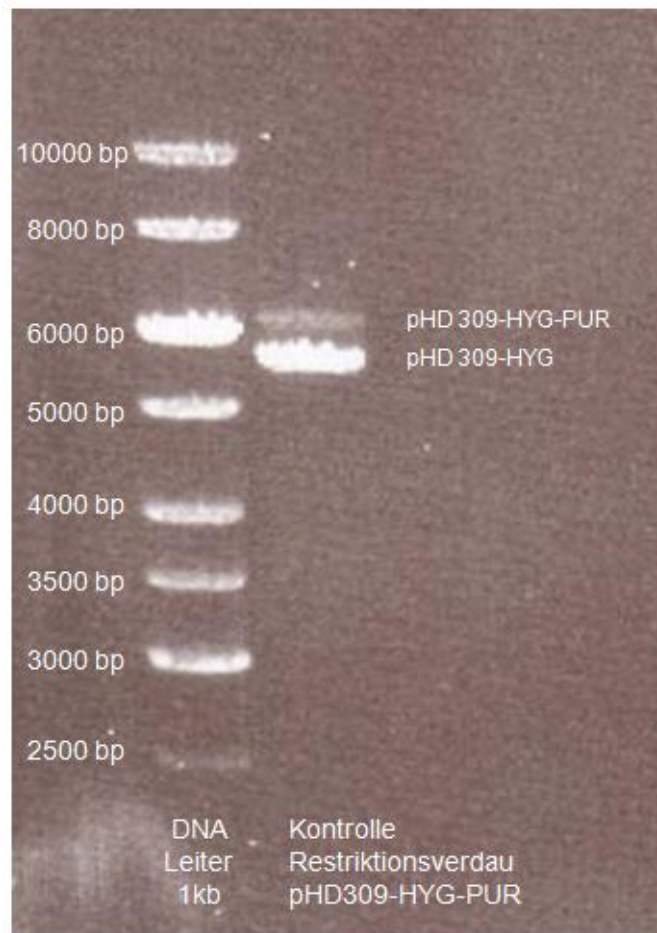


Abbildung 17: Kontrolle des Restriktionsverbaus pHD309-HYG-PUR

Die Abbildung verdeutlicht, dass die isolierte DNA Probe einerseits das vollständig verdaute Plasmid pHD309-HYG (untere Bande, 5536 bp) und andererseits das nicht vollständig verdaute, einfach geschnittene Plasmid pHD309-HYG-PUR (obere Bande, 6145 bp) enthielt.

Abbildung 17 veranschaulicht, dass in der isolierten DNA Probe aus dem ursprünglichen Restriktionsverdau von pHD309-HYG-PUR sowohl das vollständig verdaute Plasmid pHD309-HYG als auch das nicht vollständig verdaute, einfach geschnittene Plasmid pHD309-HYG-PUR enthalten war. Da der Anteil des vollständig verdauten Plasmids (pHD309-HYG) jedoch erheblich größer war als der Anteil des nicht vollständig verdauten, einfach geschnittenen Plasmids, wurde die isolierte DNA zur Ligation verwendet. Die dadurch bei der Ligation in das trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG bedingte, reduzierte Ligationseffizienz wurde in Kauf genommen.

3.1.7 Ligation des MCP-Gens in pHD309-HYG, Transformation in *E. coli* und Kontrolle der Rekombinaten

Um das MCP-Gen in das trypanosomale Genom zu klonieren, musste es zunächst in das geöffnete, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG ligiert werden. Die Ligation erfolgte, wie in Kapitel 2.3.2.16 beschrieben, unter Verwendung unterschiedlicher Ligasekonzentrationen, Vektor-Insert Verhältnissen, Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und unterschiedlicher Massen an Plasmid DNA. Alle Ligationsansätze wurden unmittelbar zur Transformation in chemisch kompetente *E. coli* verwendet (vgl. Kapitel 2.3.2.7).

Nur bei einer Ligation (Ligationsansatz Nummer 9) und deren anschließender Transformation konnten drei Kolonien erhalten werden (vgl. Kapitel 2.3.2.16). Diese Kolonien wurden gepickt und zur Herstellung von 3 ml Kulturen verwendet (vgl. Kapitel 2.3.1.1). Anschließend wurde eine Plasmidisolierung aus je 1,5 ml der Kulturen durchgeführt und mittels Restriktionsverdau, der einerseits mit PstI und andererseits mit NcoI durchgeführt wurde, überprüft, ob das Plasmid pHD309-HYG-mCherry aufgenommen worden war (vgl. Kapitel 2.3.2.9). Der Restriktionsverdau wurde auf einem ein 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 18).

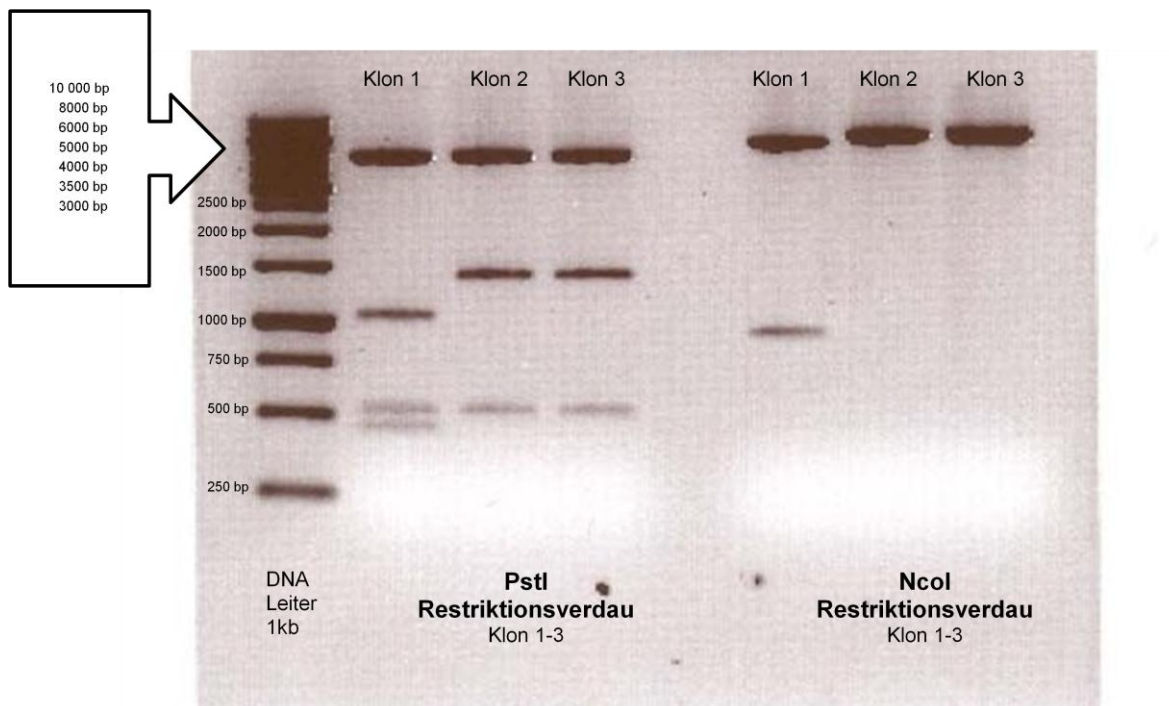


Abbildung 18: Restriktionsverdau pHD309-HYG-mCherry

Das Plasmid pHD309-HYG-mCherry wurde beim Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym PstI in vier Banden geschnitten (463 bp; 521 bp; 1038 bp; 4256 bp), während bei dessen Restriktionsverdau mit NcoI nur zwei Banden (5537 bp, 921 bp) entstanden. Bei einem Restriktionsverdau des religierten Plasmids pHD309-HYG-PUR mit PstI entstanden drei Banden (521 bp; 1383 bp; 4247 bp), während bei einem Restriktionsverdau mit NcoI nur eine Bande (6145 bp) entstand. Die Abbildung zeigt, dass nur Klon 1 das Plasmid pHD309-HYG-mCherry aufgenommen hatte, während in Klon 2 und 3 das religierte Plasmid pHD309-HYG-PUR vorhanden war.

Da das ligierte, zirkuläre, trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-mCherry (6259 bp) für das Restriktionsenzym PstI vier Schnittstellen enthielt, entstanden bei dessen Verdau vier Banden (463 bp; 521 bp; 1038 bp; 4256 bp), während beim Verdau des religierten, zirkulären Expressionsplasmids pHD309-HYG-PUR mit PstI aufgrund von drei Schnittstellen nur drei Banden (521 bp; 1383 bp; 4247 bp) entstanden.

Beim Restriktionsverdau von pHD309-HYG-mCherry (zirkulär) mit NcoI entstanden auf Grund von zwei Schnittstellen zwei Banden (5537 bp, 921 bp), während beim Verdau des religierten, zirkulären Expressionsplasmides pHD309-HYG-PUR mit NcoI nur eine Schnittstellen vorlag und somit nur eine Bande entstehen konnte (6145 bp).

Abbildung 18 zeigt, dass in nur einer Kolonie (Klon 1) das Plasmid pHD309-HYG-mCherry vorhanden war. Die beiden anderen Kolonien (Klon 2 und Klon 3) hatten das religierte Plasmid pHD309-HYG-PUR aufgenommen.

3.1.8 Linearisierung von pHD309-HYG-mCherry

Um eine Integration des MCP-Gens in das Genom der Trypanosomen zu ermöglichen, musste das Plasmid pHD309-HYG-mCherry amplifiziert werden. Hierzu wurde eine 50 ml Flüssigkultur von Klon 1 hergestellt. Das daraus isolierte trypanosomale Expressionsplasmid pHD309-HYG-mCherry wurde mit NotI linearisiert (vgl. Kapitel 2.3.2.15). NotI besitzt in pHD309-HYG-mCherry in einem Sequenzbereich, der homolog zu einer definierten Sequenz des trypanosomalen Genoms ist (β -Tubulin Fraktion), eine Schnittstelle. Zwar können zur Elektroporation sowohl das zirkuläre als auch das linearisierte Plasmid eingesetzt werden, jedoch begünstigt die Verwendung von linearisierter DNA höhere Transformationsraten [Sambrook und Russell, 2000]. Auf diese Weise wurde durch die Linearisierung von pHD309-HYG-mCherry eine verbesserte Ausgangssituation für die homologe Rekombination und Integration des MCP-Gens in das Genom von *T. brucei*, im Bereich der β -Tubulin codierenden Sequenzen, geschaffen. Das linearisierte Plasmid pHD309-HYG-mCherry (6259 bp) wurde unmittelbar zur Elektroporation eingesetzt.

3.1.9 Elektroporation, Selektion und *in vivo* Amplifikation transgener Trypanosomen

Die Transfektion des linearisierten Plasmids pHD309-HYG-mCherry in *T. brucei* erfolgte mittels Elektroporation (vgl. Kapitel 2.3.2.18). Anschließend wurde der Elektroporationsansatz, wie in Kapitel 2.3.2.19 beschrieben, in eine 36 ml Flüssigkultur (HMI9-Medium) überführt. Diese Kultur wurde nach einer Regenerations- bzw. Kultivierungsdauer von 22 h zur Selektion rekombinanter Trypanosomen mit Hygromycin B ergänzt und auf 24-Well-Platten ausgebracht (vgl. Kapitel 2.3.2.19). Bei täglicher, phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle zeigte sich, dass nicht rekombinante Trypanosomen nach zwei bis drei Tagen ausselektiert wurden, während rekombinante Trypanosomen überlebten. Nach vier Tagen

waren die rekombinanten Parasiten als vereinzelt lebende Trypanosomen sichtbar. Am fünften Tag der Selektion wurden diese mit HMI9-Medium von den Well-Platten ab gespült (vgl. Kapitel 2.3.2.19) und zur *in vivo* Amplifikation in einer Maus verwendet (vgl. Kapitel 2.3.4.1). Bei der ersten Kontrolle der Parasitämie mittels Auszählen und Blutaussstrich nach drei Tagen konnten keine Trypanosomen im Blut nachgewiesen werden. Erst 16 Tage nach der Infektion ließ sich eine Parasitämie durch Auszählen und Anfertigung eines Blutaussstriches feststellen.

Der hergestellte Blutaussstrich wurde unmittelbar zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Trypanosomen und somit zur Kontrolle der Proteinexpression des monomeren Cherry Proteins verwendet (vgl. Abbildung 19).

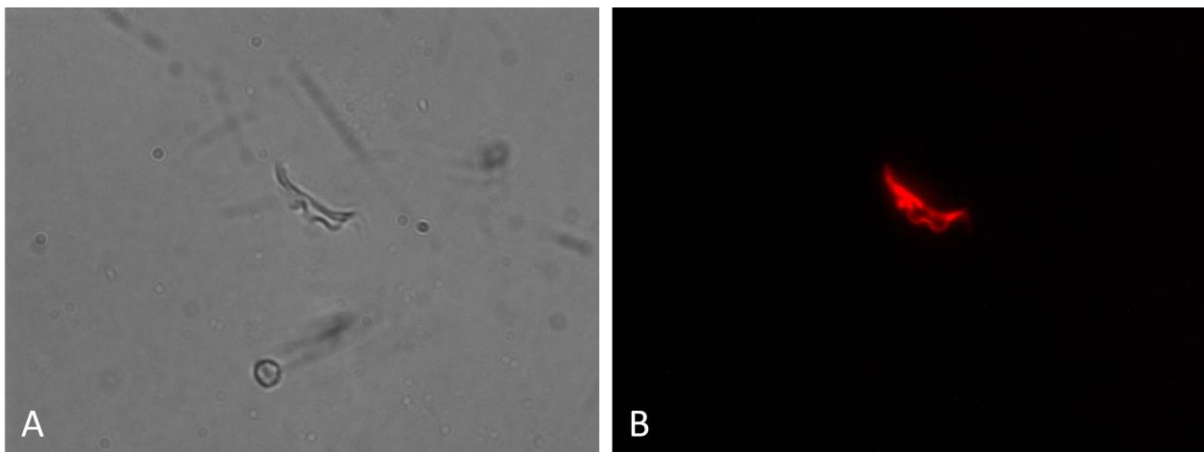


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle AnTat 1.1 MCP

Abbildung 19 zeigt eine phasenkontrast- (A) und fluoreszenzmikroskopische (B) Aufnahme eines Blutaussstriches. Der Blutaussstrich enthielt rekombinante Trypanosomen, die das monomere Cherry Protein exprimierten.

Abbildung 19 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des untersuchten Blutaussstriches. Die Abbildung zeigt, dass sich rekombinante Trypanosomen, die das monomere Cherry Protein exprimierten, abbilden ließen. Der Nachweis dieser rot fluoreszierenden Trypanosomen zeigte, dass die Elektroporation des linearisierten Plasmids pHD309-HYG-mCherry und die homologe Rekombination des MCP-Gens in das trypanosomale Genom sowie die Selektion und *in vivo* Amplifikation rekombinanter Trypanosomen (*T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP) erfolgreich durchgeführt worden war.

3.2 Kontrolle der genomischen Integration und Proteinexpression

Zur Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens und der Expression des monomeren Cherry Proteins wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zur Kontrolle der genomischen Integration wurde das MCP-Gen mittels Polymerasekettenreaktion im Genom des Trypanosomenstammes AnTat 1.1 MCP nachgewiesen, während die Kontrolle der Proteinexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie und *Western blot* erfolgte.

3.2.1 Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens in AnTat 1.1 MCP

Zum Nachweis der durch homologe Rekombination erfolgten Integration des MCP-Gens in das trypanosomale Genom von *T. brucei* (Stamm AnTat 1.1 MCP) wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Zuvor wurde die genomische DNA von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 (Negativkontrolle) und von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP isoliert, gereinigt und die Konzentration der genomischen DNA mittels Photometrie bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.3.1). Die Konzentrationen der verwendeten, genomischen DNA Proben sind in Tabelle 63 dargestellt.

Probe	DNA Konzentration [ng/μl]
gDNA AnTat 1.1 (negativ Kontrolle)	65
gDNA AnTat 1.1 MCP	80
gDNA AnTat 1.1 MCP	102

Tabelle 63: Konzentrationen von genomischen DNA Proben

Die PCR zum Nachweis des MCP-Gens wurde, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Abschließend wurden die Reaktionsansätze auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt (vgl. Abbildung 20).

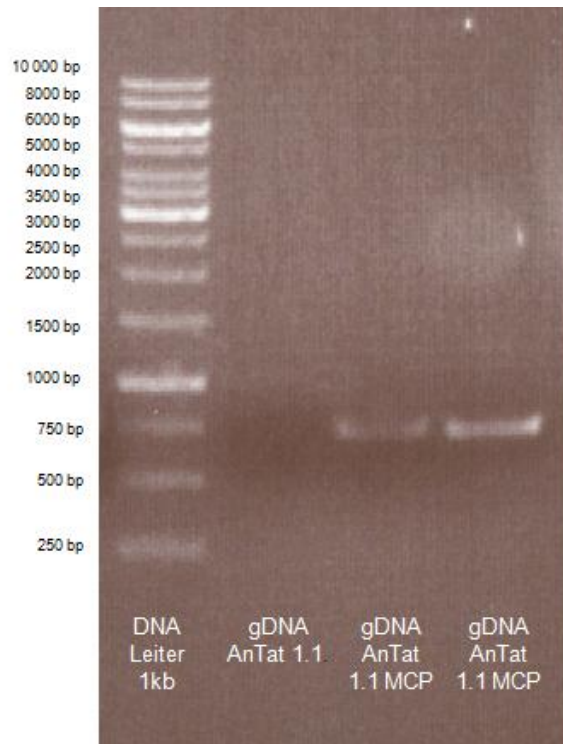


Abbildung 20: PCR-Kontrolle der genomischen Integration des MCP-Gens

Abbildung 20 zeigt, dass das MCP-Gen nur aus der genomischen DNA von AnTat 1.1 MCP mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Bande: 723bp), während kein Nachweis des Gens in der genomischen DNA der Negativkontrolle (AnTat 1.1) möglich war.

Abbildung 20 zeigt, dass das MCP-Gen nur aus der genomischen DNA von AnTat 1.1 MCP mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Bande: 723bp), während der Nachweis des Gens in der genomischen DNA der Negativkontrolle (AnTat 1.1) nicht möglich war. Dieses Ergebnis verifiziert die genomische Integration des MCP-Gens in AnTat 1.1 MCP.

3.2.2 Kontrolle der Proteinexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob die genomische Integration des MCP-Gens auch zu einer Expression des monomeren Cherry Proteins führte, wurden die rekombinanten Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (vgl. Kapitel 2.3.3.2). Als Negativkontrolle wurde der native Trypanosomenstamm AnTat 1.1 verwendet und auf dieselbe Weise fluoreszenzmikroskopisch analysiert (vgl. Abbildung 21 A-D).

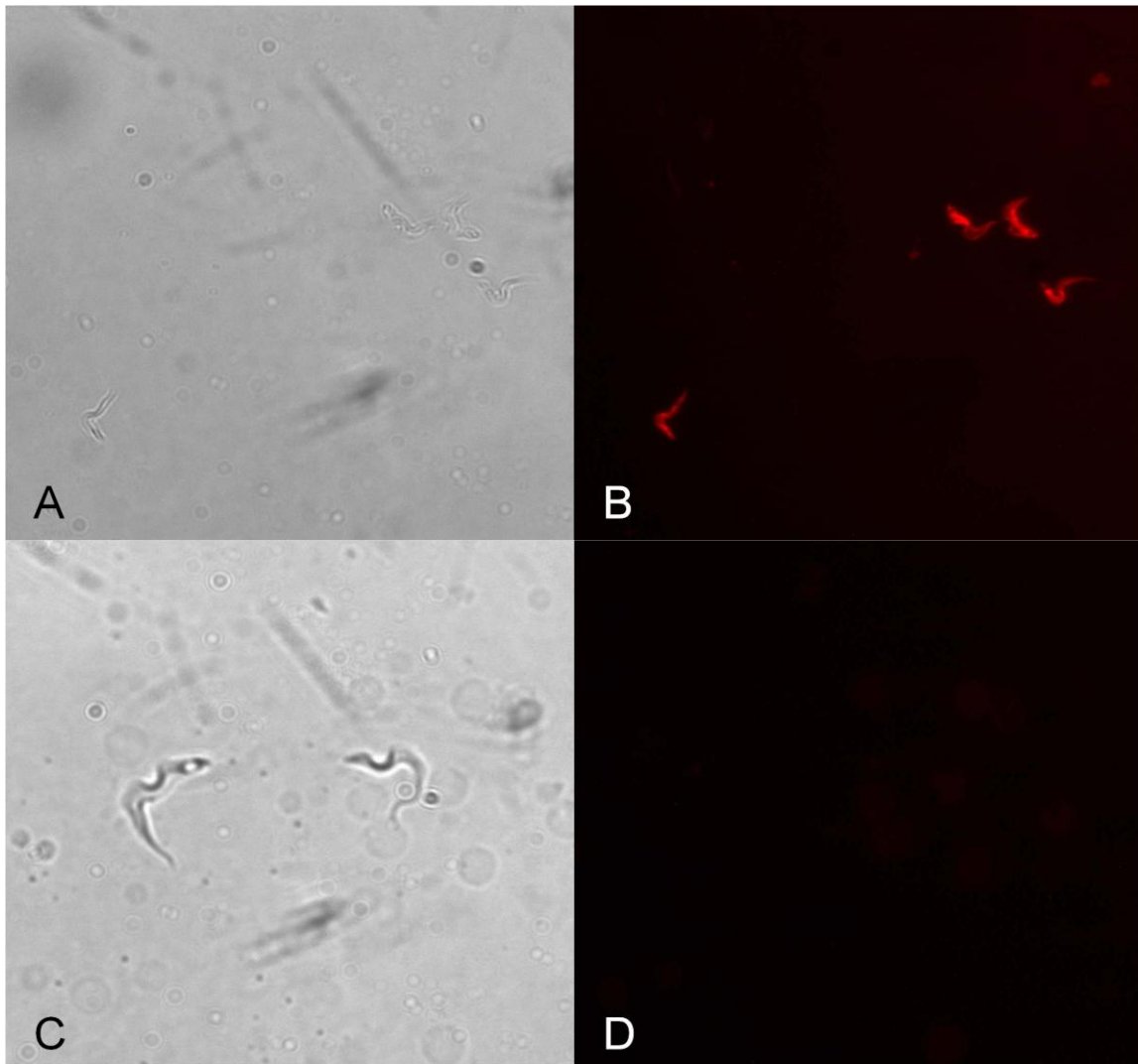


Abbildung 21: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von AnTat 1.1 MCP und AnTat 1.1

Abbildung 21 stellt phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des rekombinanten Trypanosomenstammes AnTat 1.1 MCP (A-B) und des nativen Stammes AnTat 1.1 (C-D) gegenüber. Eine Expression des monomeren Cherry Proteins konnte nur bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des rekombinanten Stammes AnTat 1.1 MCP nachgewiesen werden (B).

Die in Abbildung 21 A-D dargestellten phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Stämme AnTat 1.1 und AnTat 1.1 MCP zeigen, dass der rekombinante Stamm AnTat 1.1 MCP das monomere Cherry Protein exprimiert und somit bei einer Anregung von 585 nm im langwelligen Lichtbereich rot fluoreszierte (B), während bei der Negativkontrolle (AnTat 1.1) keine Fluoreszenz nachweisbar war (D). Abbildung 22 verdeutlicht zudem, dass die Expression des monomeren Cherry Proteins auch über einen Zeitraum von 34 Tagen *in vivo* Kultivierung von AnTat 1.1 MCP im Blutausschlag fluoreszenzmikroskopisch konstant nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 2.3.3.2).

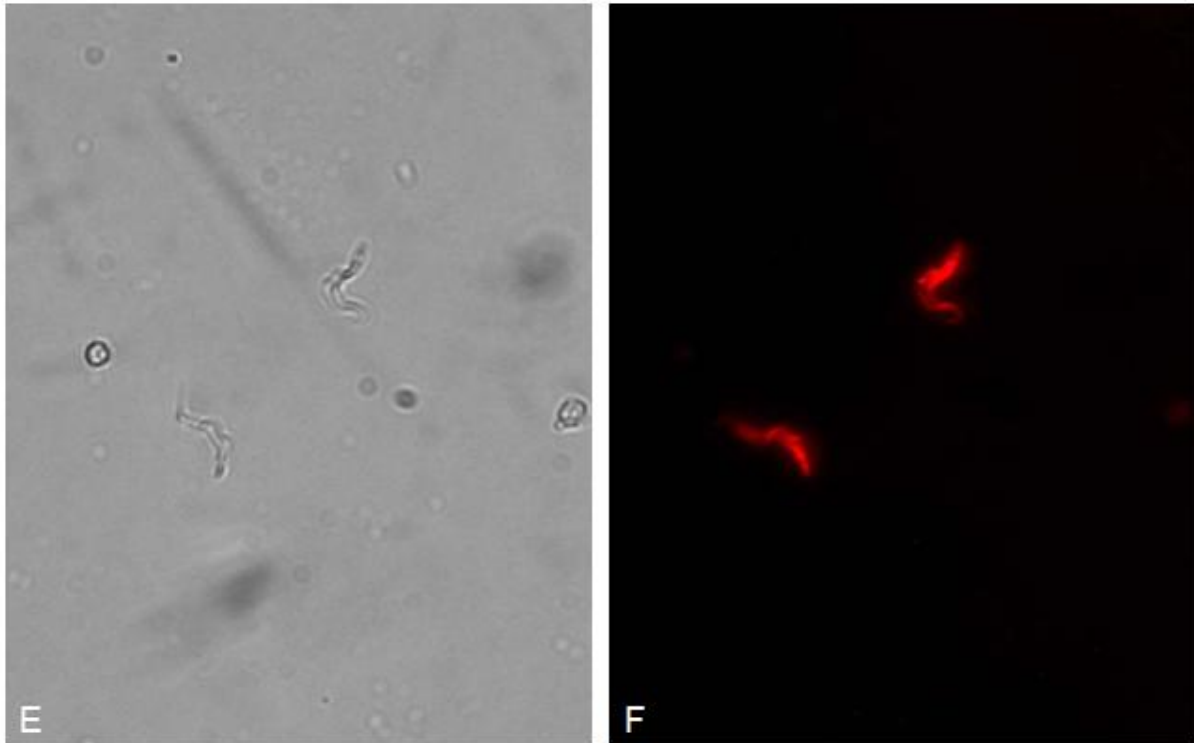


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopie von AnTat 1.1. MCP nach 34 Tage *in vivo* Kultivierung.

Abbildung 22 zeigt eine phasenkontrast- (E) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (F) von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 MCP nach 34 Tagen *in vivo* Kultivierung. Die Expression des monomeren Cherry Proteins war über einen Zeitraum von 34 Tagen konstant nachweisbar.

3.2.3 Kontrolle der Proteinexpression mittels *Western blot*

Parallel zur Kontrolle der Proteinexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie ließ sich die Expression des monomeren Cherry Proteins mittels *Western blot* nachgewiesen. Hierzu wurde eine SDS-PAGE und ein *Western blot* sowohl mit rekombinanten Trypanosomen des Stammes AnTat 1.1 MCP als auch mit Trypanosomen des nativen Stammes AnTat 1.1 (Negativkontrolle) durchgeführt (vgl. Kapitel 2.3.3.3).

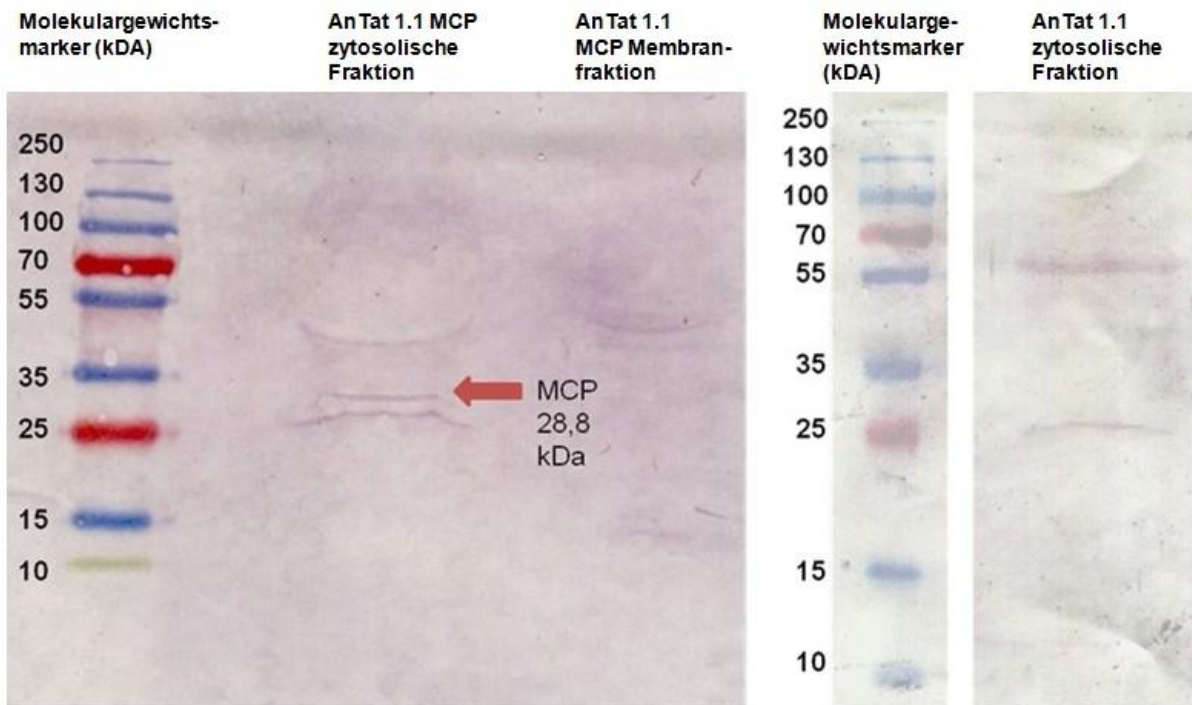


Abbildung 23: Western blot monomeres Cherry Protein

Abbildung 23 zeigt, dass sich das monomere Cherry Protein mittels *Western blot* nur in der zytosolischen Fraktion des rekombinanten Stammes AnTat 1.1 MCP (Bande bei 29 kDa) und nicht in der zytosolischen Fraktion des Kontrollstammes AnTat 1.1 nachgewiesen ließ. Andere Banden, die sowohl in der zytosolischen Fraktion von AnTat 1.1 MCP als auch von AnTat 1.1 nachgewiesen werden konnten, entstanden durch eine unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers an konstitutiv exprimierte Proteine.

Abbildung 23 verdeutlicht, dass die Expression des monomeren Cherry Proteins (28,8k Da) nur in der zytosolischen Fraktion des rekombinanten Stammes AnTat 1.1 MCP nachgeweisbar war, während in der zytosolischen Fraktion des Kontrollstammes AnTat 1.1 keine Expression des MCPs detektiert werden konnte. Hierbei ließ sich die Expression des monomeren Cherry Proteins als schmale Bande (mittlere Bande in Abbildung 23), bei einem Molekulargewicht von ca. 39 kDa (Literaturwert 38,8 kDa) nachweisen. Durch Vergleich der zytosolisch aufgetrennten Proteine des rekombinanten Stammes und des Kontrollstammes zeigte sich, dass sowohl die Bande unterhalb (ca. 26 kDa) als auch die Bande oberhalb (ca. 50 kDa) des monomeren Cherry Proteins in beiden Proben konstant detektierbar war. Somit mussten diese Banden durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers (Anti DsRed) an konstitutiv exprimierte Proteine entstanden sein.

3.3 Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems

Um markierte Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems zu lokalisieren, wurden fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Bereichen des ZNS im sekundären Krankheitsstadium angefertigt.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierung der Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) im Gewebe des ZNS wurde zunächst eine Fixierungsmethode entwickelt, um eine Maskierung der Fluoreszenz des monomeren Cherry Proteins zu verhindern. Anschließend wurden Gefrierschnitte von Gehirnen infizierter Ratten (AnTat 1.1 MCP) hergestellt und zur Lokalisierung von *T. brucei* fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Parallel dazu erfolgte eine elektronenmikroskopische Lokalisierung und morphologische Beschreibung von Trypanosomen im Gewebe des ZNS in Kooperation mit Herrn Professor Wolburg.

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von *T. brucei* AnTat 1.1 MCP in Gefrierschnitten von Rattenhirnen

Zur Lokalisierung von Trypanosomen (Stamm AnTat 1.1 MCP) in Gefrierschnitten von Rattenhirnen musste eine Fixierungsmethode entwickelt werden, bei der die Fluoreszenz des monomeren Cherry Proteins nicht maskiert bzw. gequencht wurde.

Zur Entwicklung einer geeigneten Methode wurden verschiedene Fixierungslösungen (vgl. Kapitel 2.2.4.5) verwendet.

Durch fluoreszenzmikroskopische Analyse unterschiedlicher Fixierungsmethoden von *T. brucei* (AnTat 1.1 MCP) zeigte sich, dass zunächst bei routinemäßiger Fixierung mit Paraformaldehyd eine Maskierung der Fluoreszenz des monomeren Cherry Proteins auftrat und somit keine Fluoreszenz detektierbar war. Wurde anstelle von Paraformaldehyd Glutaraldehyd als Fixierungslösung verwendet, konnte eine Maskierung des monomeren Cherry Proteins verhindert und somit eine Fluoreszenz fixierter Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) aufrecht erhalten werden (vgl. Abbildung 24). Diese Fluoreszenz war in einer 2% Lösung von Glutaraldehyd besonders ausgeprägt, so dass sich diese Lösung zur Fixierung und Analyse von Rattenhirnen im sekundären Krankheitsstadium eignete.

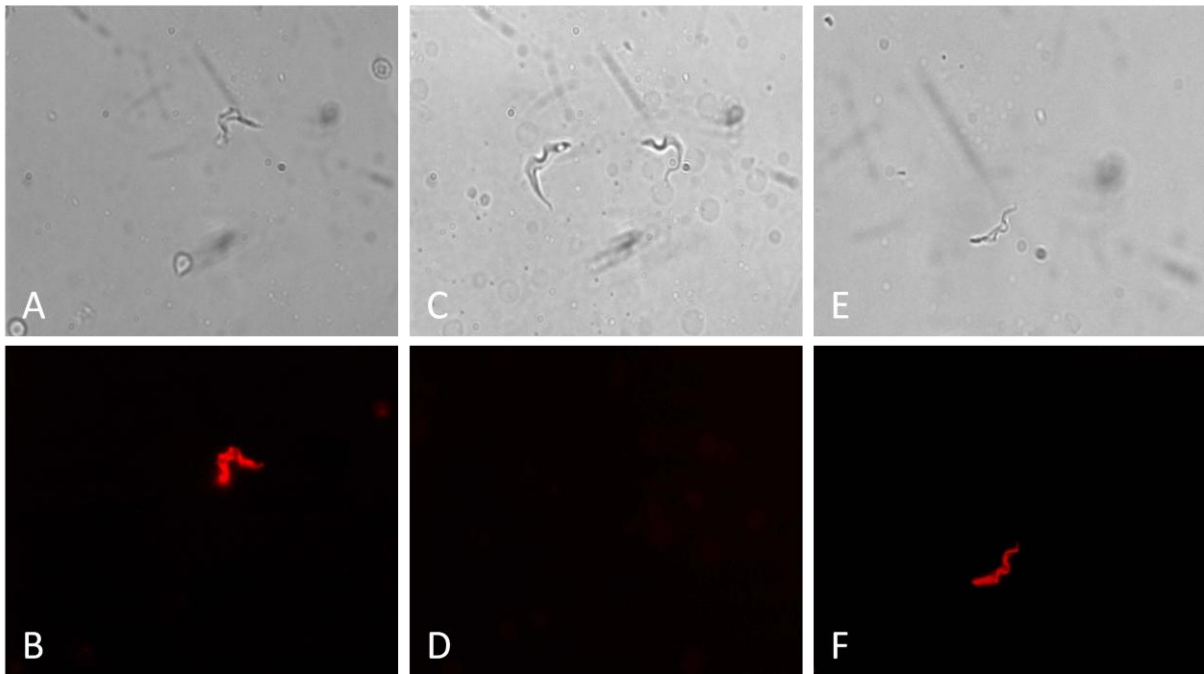


Abbildung 24: Fixierungsmethoden AnTat 1.1 MCP

Abbildung 24 zeigt licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AnTat 1.1 MCP bei unterschiedlichen Fixierungsmethoden. Während in A und B der nicht fixierte Stamm AnTat 1.1 MCP dargestellt ist, sind in C und D Aufnahmen von AnTat 1.1 MCP in 5% PFA und in E und F Aufnahmen von AnTat 1.1 MCP in 2% Glutaraldehyd dargestellt. Es wird deutlich, dass bei Fixierung mit Paraformaldehyd die Fluoreszenz des monomeren Cherry Protein maskiert (D) wurde, während sie bei Fixierung in Glutaraldehyd aufrecht erhalten werden konnte (F).

Zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems wurden von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium Gefrierschnitte angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Gehirn entnommen, eingefroren und anschließend zur Herstellung von 10 µm dicken Gefrierschnitten verwendet (vgl. Kapitel 2.3.5).

In allen fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Gefrierschnitten von Rattenhirnen ließen sich keine Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems feststellen. Jedoch zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in allen analysierten Gefrierschnitten eine stark ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz, deren Intensivität im Bereich des *Plexus choroideus* des lateralen Ventrikels, im Vergleich zu anderen Gehirnbereichen, sogar noch gesteigert war.

Um zu kontrollieren, ob die Hintergrundfluoreszenz die Fluoreszenz des Stammes AnTat 1.1 MCP überlagerte, wurden in 2% Glutaraldehyd fixierte Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) auf einen Gefrierschnitt ausgebracht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

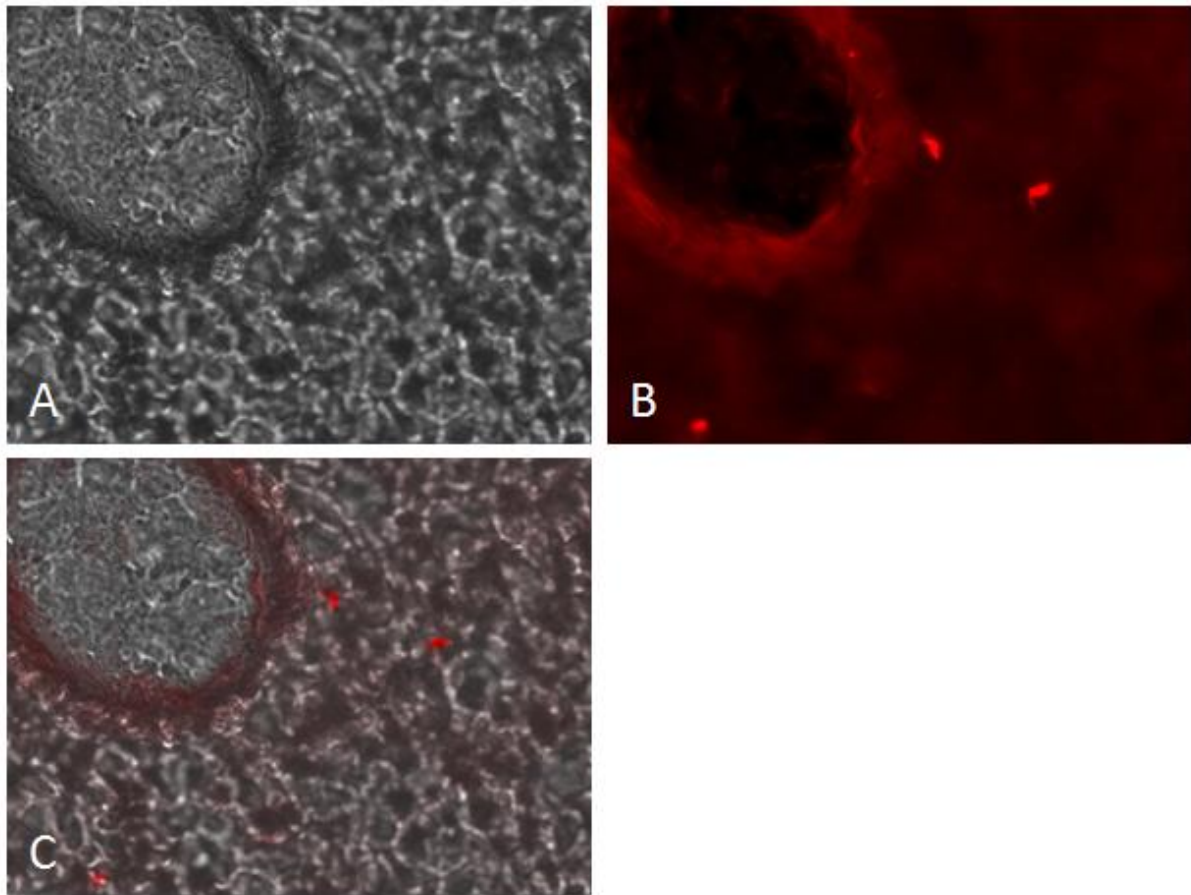


Abbildung 25: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* auf Gewebe des zentralen Nervensystems.

Abbildung 25 zeigt eine phasenkontrast- (A) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (B) sowie ein Overlay beider Aufnahmen (C) von in 2% Glutaraldehyd fixierten Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP), die auf einem Gefrierschnitt des Gehirns ausgebracht wurden. Aus der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (B) ist zu erkennen, dass sich die Fluoreszenz von AnTat 1.1 MCP deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abgrenzte.

Abbildung 25 verdeutlicht, dass sich die Fluoreszenz von in 2% Glutaraldehyd fixierter Trypanosomen (AnTat 1.1 MCP) in nativen Proben mit einer Schichtdicke von 10 µm deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abgrenzte. Eine Reduzierung der Schichtdicke konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden.

3.3.2 Elektronenmikroskopische Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems

Zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung von *T. brucei* Stamm AnTat 1.1 im Gewebe des zentralen Nervensystems wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gehirnen infizierter Ratten im sekundären Krankheitsstadium (22 und 34 Tage p.i.) angefertigt. Die dazu notwendige Entnahme und Vorbereitung der Gehirne wurde, wie in Kapitel 2.3.6.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Gehirnbereiche (vgl. Kapitel 2.3.6.2) in Kooperation mit Herrn Professor

Wolburg angefertigt. Um mehr über die Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums und über die Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems zu erfahren, umfassten die elektronenmikroskopisch analysierten Bereiche einerseits mögliche Eintrittspforten, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke und den fluoreszenzmikroskopisch nicht eindeutig beschreibbaren *Plexus choroideus* des Seitenventrikels sowie andererseits vermutete Lokalisationsorte von *T. brucei*, wie das *Corpus striatum*, den *Kortex* und das *Cerebellum*.

Auffallend war, dass *T. brucei* in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (22-34 Tage p.l.) nur im Bereich des *Plexus choroideus* des Seitenventrikels lokalisiert werden konnte, während sich keine Trypanosomen im neuronalen Gewebe oder im Bereich der Blut-Hirn-Schranke nachweisen ließen. Im Bereich des *Plexus choroideus*, der sich aus einem Kapillargeflecht mit fenestriertem Endothel, einem Stroma, und einer einzelligen Schicht aus Plexusepithel, die am apikalen Pool über *tight junctions* verbunden ist und somit die Blut-Liquor-Schranke ausbildet, zusammensetzt, wurden konstant Trypanosomen sowohl im intravasalen Raum (vgl. Abbildung 30) als aber auch vor allem im extravasalen Raum nachgewiesen. Besonders im extra-

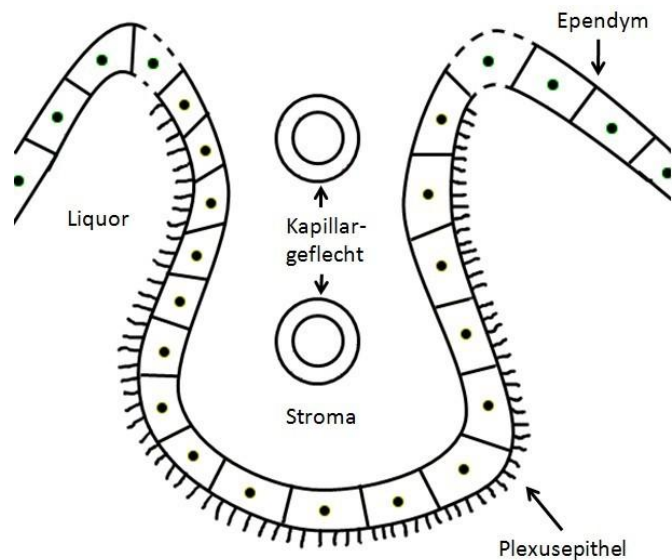


Abbildung 26: Schematischer Aufbau des Plexus choroideus

vasalen Raum konnten Trypanosomen einerseits zahlreich im Stroma des *Plexus choroideus* (vgl. Abbildung 28, 31 und 32) und andererseits im Lumen des Seitenventrikels (vgl. Abbildung 29) lokalisiert werden. Abbildung 27 zeigt eine Übersichtsaufnahme des *Plexus choroideus*, in der zahlreiche Trypanosomen im Stroma lokalisiert sind, während in den darauf folgenden Abbildungen 28-32 Trypanosomen im intravasalen Raum des *Plexus choroideus* und extravasal im *Liquor cerebrospinalis* abgebildet sind. Bei einer genaueren Untersuchung der im Stroma lokalisierten Trypanosomen zeigte sich, dass einige Trypanosomen einen deutlich sichtbaren VSG-Oberflächenmantel aufwiesen, während sich dieser bei anderen Trypanosomen eindeutig nicht nachweisen ließ. Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* konnten auf der apikalen Seite des Plexusepithels, in der Nähe von ependymalen Zellen (wie z.B. Kolmer Zellen) lokalisiert werden. Teilweise zeigten diese Trypanosomen deutliches *blebbing*, das auf apoptotische Prozesse hinweisen könnte.

Die drei unterschiedlichen, elektronenmikroskopisch festgestellten Lokalisationsorte von *T. brucei* im Bereich des *Plexus choroideus* legten die Vermutung nahe, dass Trypanosomen

vom intravalsalen Raum des Kapillargeflechtes in das Stroma des *Plexus choroideus* migrieren und von dort auf nicht geklärte Weise (trans- oder parazellulär) über das Plexus-epithel in den Seitenventrikel eindringen könnten.

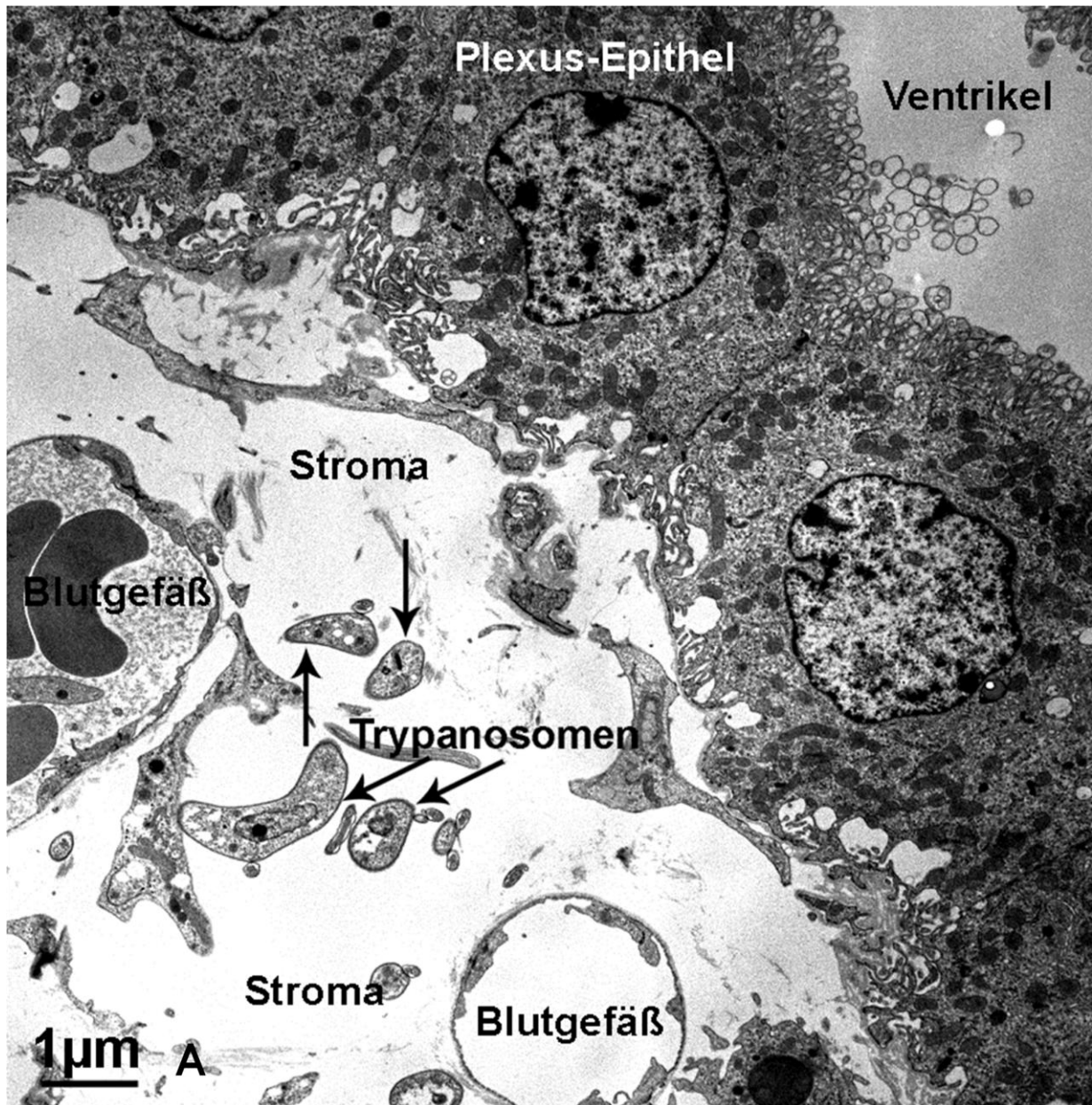


Abbildung 27: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus*

Abbildung 27 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus*. Die Trypanosomen müssen aus den fenestrierten Blutgefäßen in das Stroma des *Plexus choroideus* eingedrungen sein.

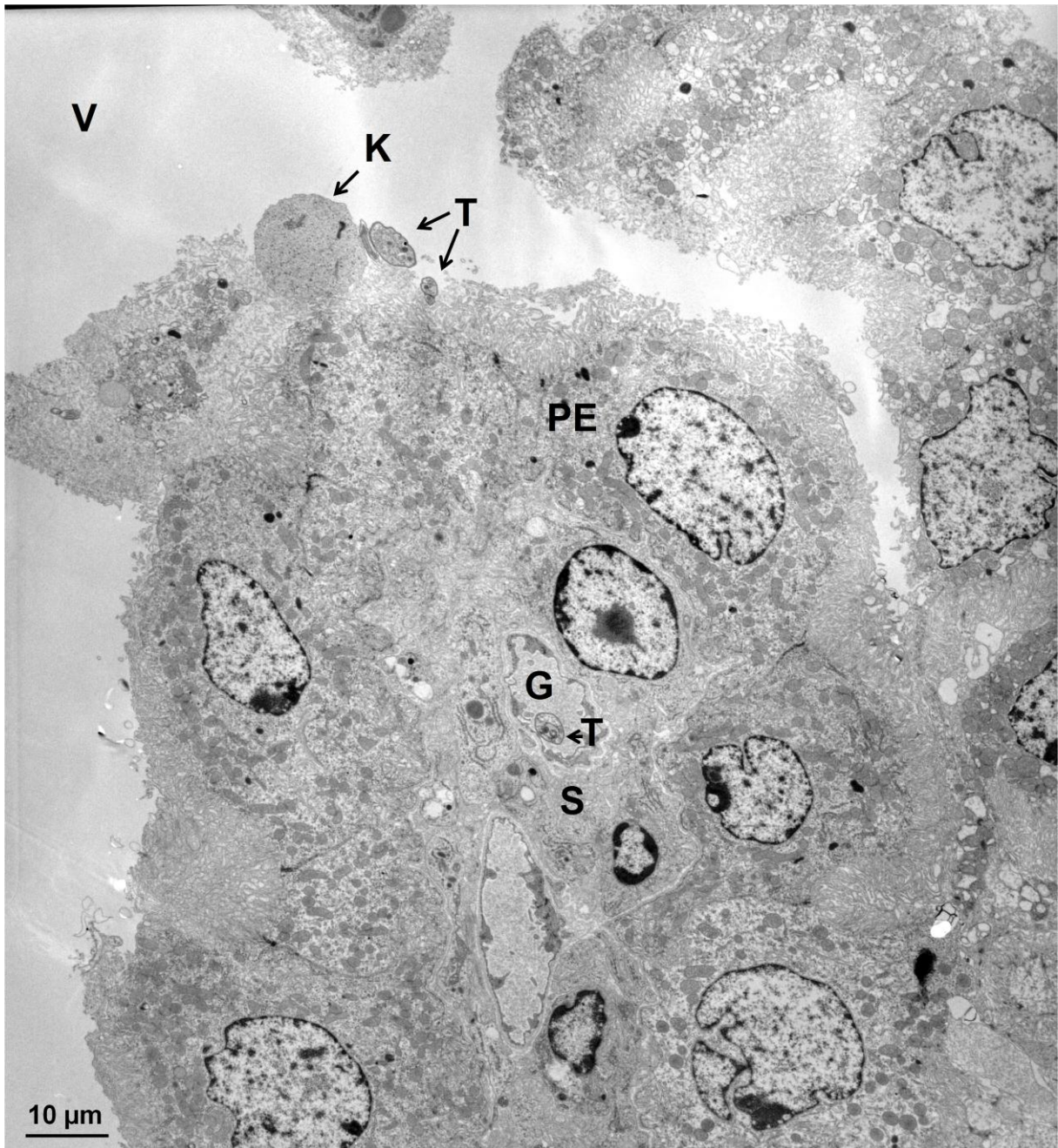


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von *T. brucei* im *Plexus chorioideus* und im *Liquor cerebrospinalis*

Abbildung 28 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* (T) im fenestrierten Kapillargeflecht (G) des *Plexus chorioideus*. Ebenso sind das Stroma (S) des *Plexus chorioideus* und das Plexusepithel (PE) abgebildet. Im Lumen des Ventrikels befinden sich im *Liquor cerebrospinalis* zwei Trypanosomen (T) in der Nähe einer ependymalen Zelle (Kolmer Zelle (K)). Vergrößerung 2000x.

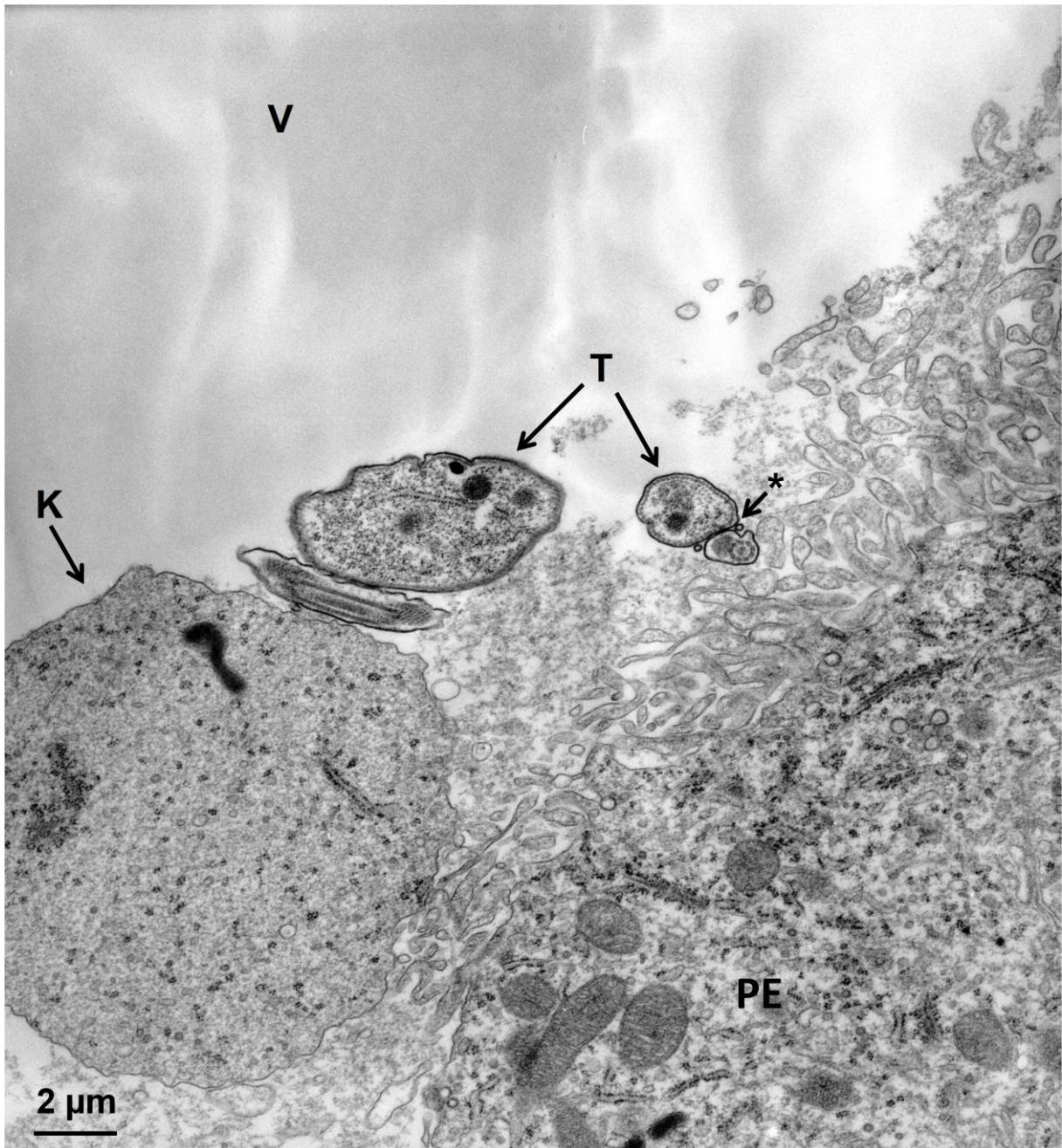


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* im *Liquor cerebrospinalis*

Abbildung 29 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* (T) im *Liquor cerebrospinalis* des Seitenventrikels (V). *T. brucei* konnte apikal des Plexusepithels (PE) in enger Beziehung zu einer Kolmer-Zelle (K) lokalisiert werden. Ein Trypanosom (T) zeigte dabei ein *blebbing* der Membran auf (*). Die Aufnahme stellt eine Vergrößerung aus Abbildung 28 dar. Vergrößerung 10.000x.

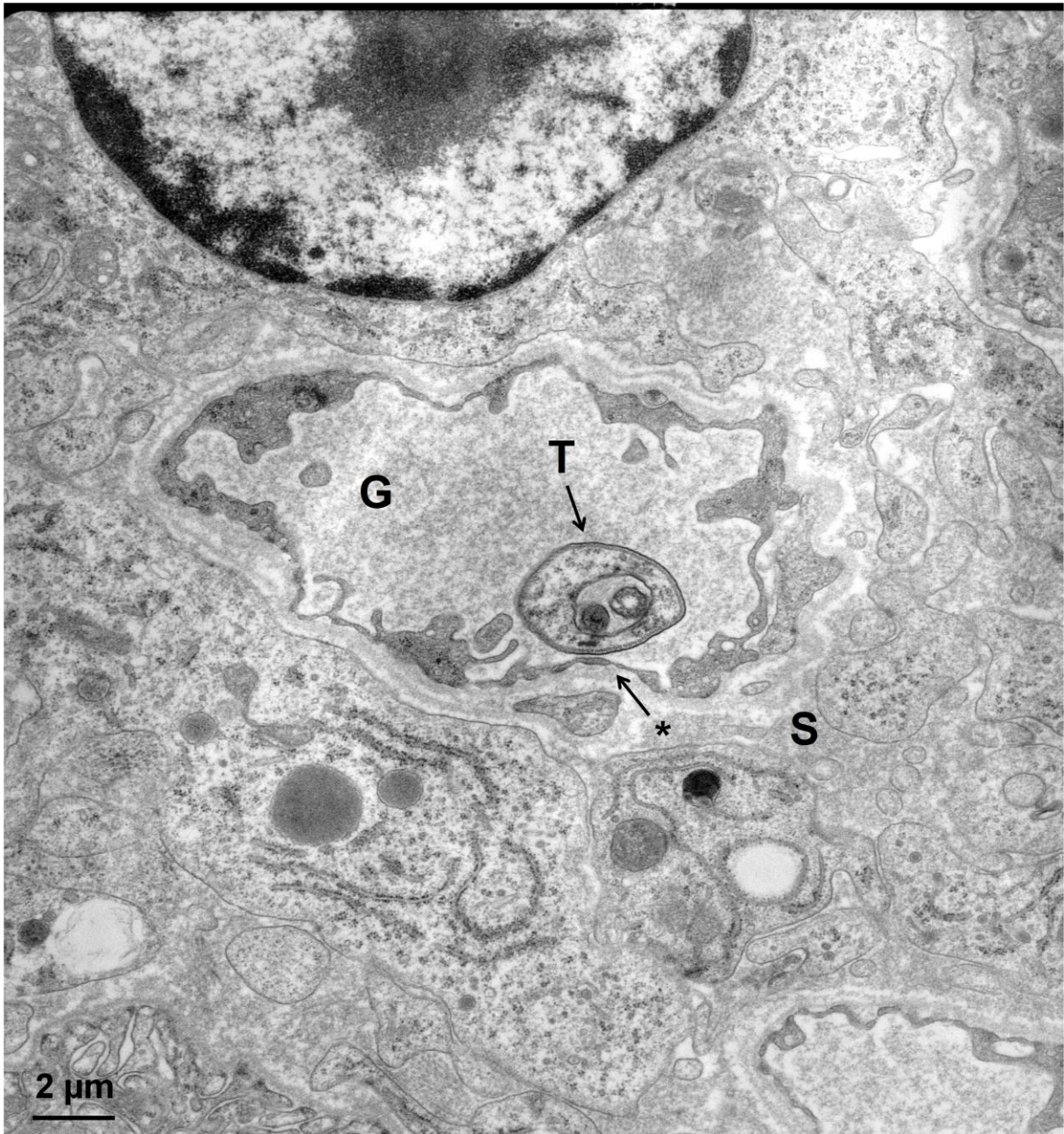


Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines intravasal lokalisierten Trypanosoms im Kapillargefecht des *Plexus choroideus*

Abbildung 30 zeigt *T. brucei* (T) im intravasalen Raum des Kapillargefelchts (G) des *Plexus choroideus*. Das fenestrierte Endothel (*) ermöglicht den Trypanosomen die Migration in das Stroma (S) des *Plexus choroideus*. Die Aufnahme stellt eine Vergrößerung aus Abbildung 28 dar. Vergrößerung 10.000x.

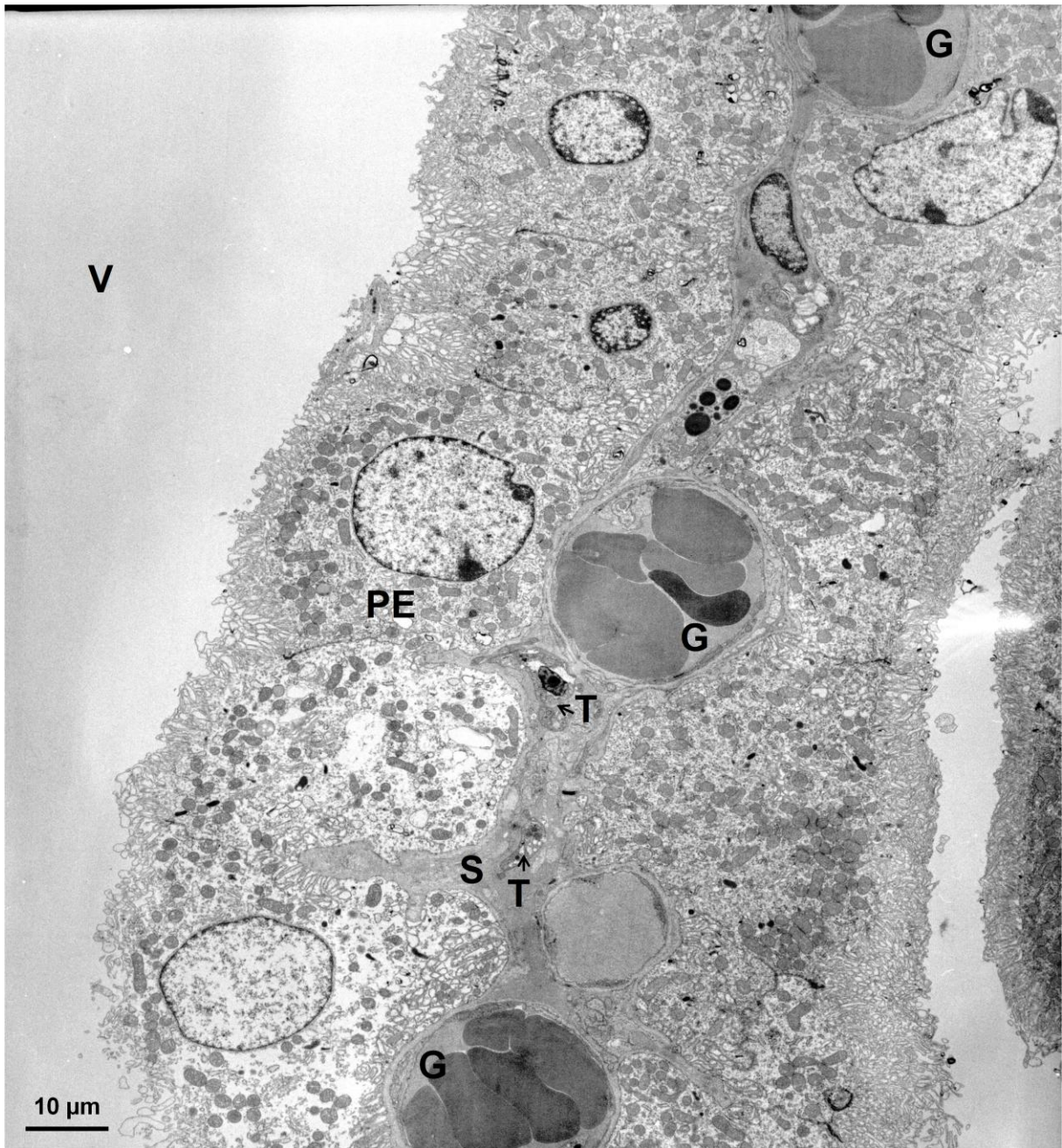


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus*

Abbildung 31 stellt eine elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus* dar. *T. brucei* (T) konnte nahe fenestrierter Gefäße (G) im Stroma (S) sowie basolateral des Plexus-epithels lokalisiert werden. Vergrößerung 2000x.



Abbildung 32: *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus*

Abbildung 32 stellt eine vergrößerte Aufnahme eines im Stroma des *Plexus choroideus* liegenden Trypanosoms (T) aus Abbildung 30 dar. Die Abbildung zeigt die räumliche Nähe des Trypanosoms zum fenestrierten Endothel (*) eines Gefäßes und legt die Vermutung nahe, dass das Trypanosom von dort in das Stroma des *Plexus choroideus* migriert ist. Zudem sind *Nucleus* (N) und *Flagellum* (F) des Trypanosoms deutlich zu erkennen. Vergrößerung 10 000x.

3.4 Isolierung und Reaktivierung von *T. brucei* aus Gewebe des zentralen Nervensystems

Zur Isolierung von *T. brucei* aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems wurde Ratten, die sich im sekundären Krankheitsstadium befanden (34-35 Tag p.I. mit AnTat 1.1), das Gehirn im perfundierten und unfixierten Zustand entnommen. Anschließend wurde das Gehirn, wie in Kapitel 2.3.1.5 beschrieben, zerkleinert und in HMI9-Medium kultiviert.

Als Kontrolle wurde das Gehirn von Ratten, die sich im ersten Krankheitsstadium befanden (3 Tage p.I. mit AnTat 1.1), verwendet.

Sowohl der Isolierungsansatz der Kontrolle als auch der experimentelle Ansatz wurden nach 2 h Inkubation in HMI9-Medium abzentrifugiert und anschließend phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

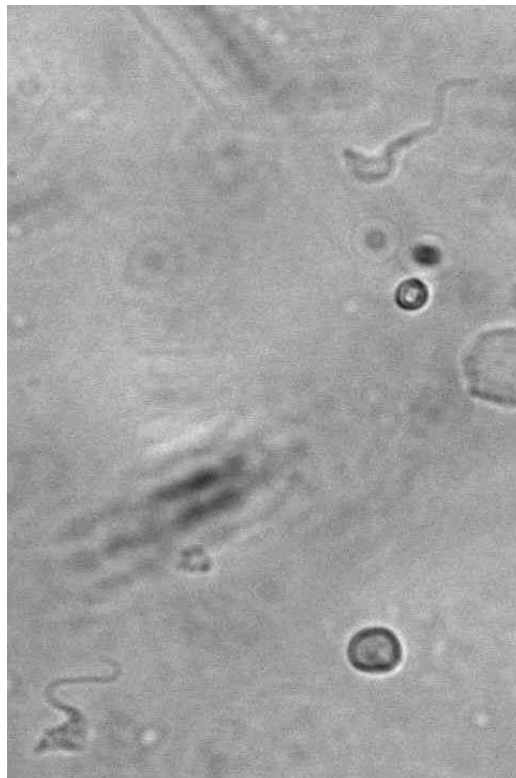


Abbildung 33: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme isolierter Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems.

Abbildung 32 zeigt zwei Trypanosomen, die nach 34 Tagen Infektion aus dem Gehirn einer Ratte isoliert wurden.

Bei der phasenkontrastmikroskopischen Untersuchung konnten Trypanosomen nur im experimentellen Isolierungsansatz nachgewiesen werden, während sich keine Trypanosomen im Kontrollexperiment detektieren ließen.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass keine Trypanosomen bei der Präparation oder bei der Entnahme des Gehirns aus dem intravasalen Raum in das Kulturmedium gelangten und

somit „rekultiviert“ wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass isolierte Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems stammen mussten.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es auf diese Weise erstmals, Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems zu isolieren. Abbildung 33 zeigt eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von isolierten Trypanosomen. Eine morphologische Beschreibung der isolierten Trypanosomen folgt in Kapitel 3.5.

3.5 Morphologische Beschreibung von isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Isolierte Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems wurden verwendet, um eine primäre morphologische Charakterisierung durchzuführen. Zur primären morphologischen Beschreibung der Trypanosomen wurden sowohl phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen als auch eine Färbung mit Bisbenzimid durchgeführt. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden in welchem Stadium des komplexen Lebenszyklus sich Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems befinden.

3.5.1 Morphologische Beschreibung von *T.brucei* aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems mittels Phasenkontrastmikroskopie

Durch phasenkontrastmikroskopische Untersuchung isolierter Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems konnten diese morphologisch näher beschrieben werden.

Phasenkontrastmikroskopisch ließen sich drei verschiedene Populationen von *T. brucei* nach Isolierung aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems unterscheiden und nachweisen (vgl. Abbildung 34 A). Eine Population bzw. Form der isolierten Trypanosomen entsprach bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung der bereits bekannten *slender* Form von *T. brucei* (vgl. Abbildung 34 B), während eine andere Form als dick, klein, kurz und Flagellum tragend beschrieben werden und somit der bekannten *stumpy* Form von *T. brucei* zugeordnet werden konnte (vgl. Abbildung 34 A). Neben diesen bereits bekannten Trypanosomenformen bzw. Trypanosomenpopulationen war jedoch auch eine erheblich verlängerte, ein langes Flagellum tragende Trypanosomenform, die sich durch einen besonders langen und schmalen Zellkörper auszeichnete, nachweisbar (vgl. Abbildung 34 C).

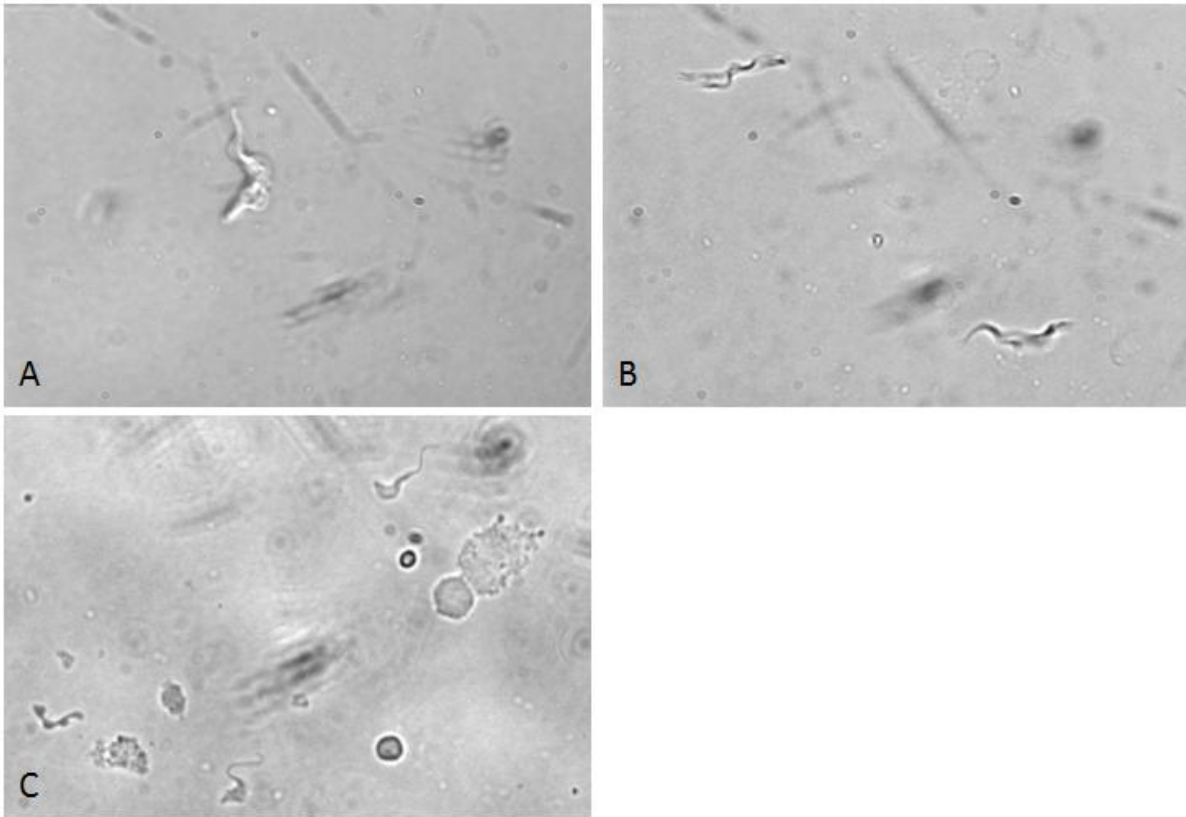


Abbildung 34: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen nach Isolierung aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Abbildung 34 zeigt die drei verschiedenen, Populationen bzw. Formen von *T. brucei* nach Isolierung aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems. Es konnten sowohl die bereits bekannten *stumpy* (A) und *slender* Formen (B) von *T. brucei* als auch eine bislang nicht bekannte Form nachgewiesen werden. Diese bislang nicht beschriebene Form besaß einen besonders langen und schmalen Zellkörper (C) und wurde als verlängert und ein langes Flagellum tragend beschrieben.

3.5.2 Bisbenzimidfärbung von *T. brucei* aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Durch eine Färbung mit Bisbenzimid konnte bei isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems die Lage von *Nucleus* und Kinetosom zueinander in Relation gesetzt und somit das Stadium des Lebenszyklus, in dem sich *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems befindet, näher charakterisiert werden. Dabei wurden alle drei phasenkontrastmikroskopisch beschriebenen Trypanosomenformen (vgl. Kapitel 3.5.1) untersucht.

In der Färbung mit Bisbenzimid zeigte sich, dass alle beschriebenen Trypanosomenformen, die aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems isoliert werden konnten, eine trypomastigote Differenzierung auswiesen. In den Abbildungen 35, 36 und 37 sind die einzelnen Formen von *T. brucei*, die aus dem Gewebe des ZNS isoliert werden konnten, phasenkontrast- sowie fluoreszenzmikroskopisch, nach Färbung mit Bisbenzimid dargestellt.

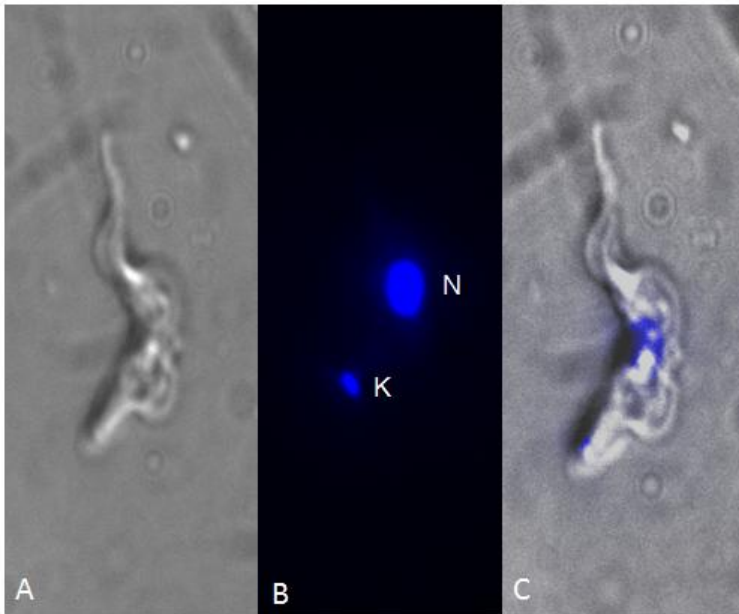


Abbildung 35: Bisbenzimidfärbung eines isolierten Trypanosoms mit *stumpy* Form

Abbildung 35 zeigt eine phasenkontrastmikroskopische (A) und Bisbenzimid gefärbte Abbildung (B) eines isolierten Trypanosoms mit *stumpy* Form sowie ein Overlay beider Abbildungen (C). Durch die Lage von Kern zu Kinetosom (B-C) wird deutlich, dass es sich um eine trypomastigote Form handelt. Vergrößerung 400x.



Abbildung 36: Bisbenzimidfärbung eines isolierten Trypanosoms mit *slender* Form

Abbildung 36 zeigt eine phasenkontrastmikroskopische (D) und Bisbenzimid gefärbte Abbildung (E) eines isolierten Trypanosoms mit *slender* Form sowie ein Overlay beider Abbildungen (F). Durch die Lage von Kern zu Kinetosom (E-F) wird deutlich, dass es sich um eine trypomastigote Form handelt.

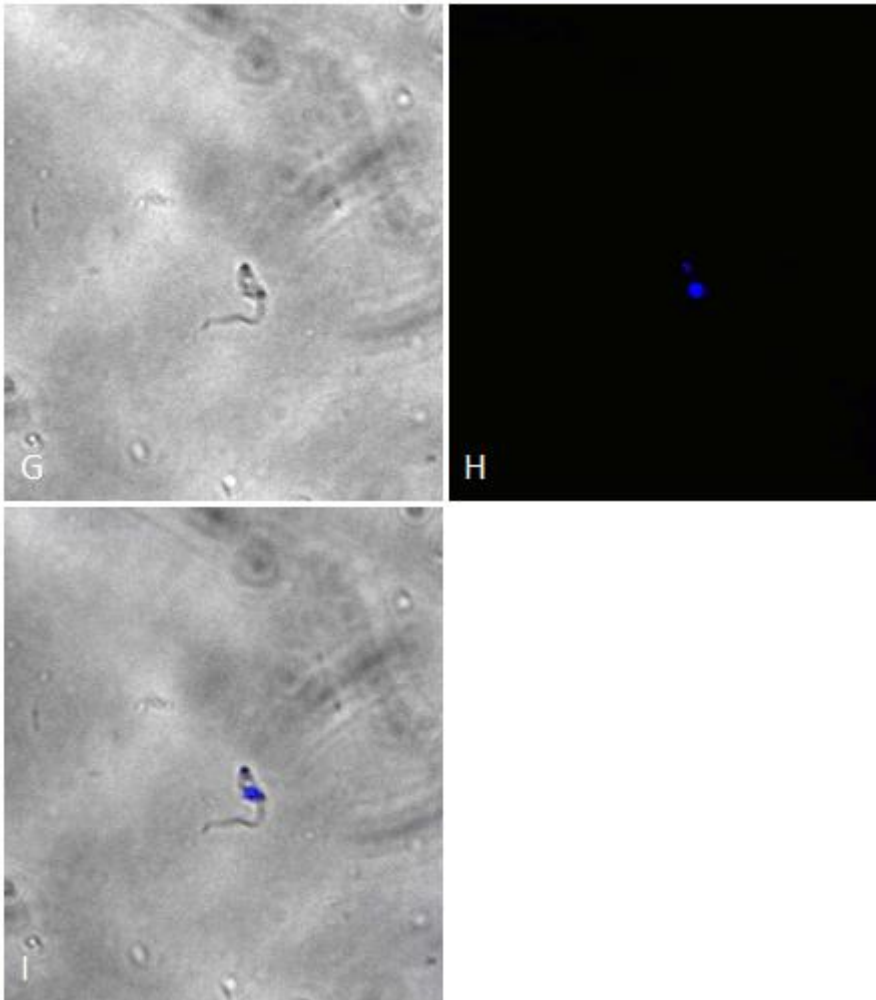


Abbildung 37: Bisbenzimidfärbung isolierter Trypanosomen mit langem Flagellum und verlängertem, schlankem Zellkörper

Abbildung 37 zeigt eine phasenkontrastmikroskopische (G) und Bisbenzimid gefärbte Abbildung (H) eines isolierten Trypanosoms mit langem Flagellum und verlängertem, schlanken Zellkörper sowie ein Overlay beider Abbildungen (I). Durch die Lage von Kern zu Kinetosom (H-I) wird deutlich, dass es sich um eine trypomastigote Form handelt.

3.5.3. Elektronenmikroskopische Beschreibung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems

Anhand der in Kooperation mit Professor Wolburg hergestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *T. brucei* im Stroma des *Plexus choroideus* (vgl. Kapitel 3.3.2) konnte eine erste Beschreibung von *T. brucei* im neuronalen Umfeld erfolgen.

Alle elektronenmikroskopisch dargestellten Trypanosomen wiesen im Stroma des *Plexus choroideus* zahlreiche Ribosomen sowie ein Flagellum mit 9+2 Struktur auf (vgl. Abbildung 32). Viele der dargestellten Trypanosomen besaßen einen deutlich erkennbaren Oberflächenmantel aus VSG, während dieser bei einzelnen Trypanosomen eindeutig nicht nachweisbar war (vgl. Abbildungen 27, 29 und 32).

4. Diskussion

4.1 Herstellung von rot fluoreszierenden, monomeren Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen und Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems

Die Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems spielt sowohl für das Verständnis der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums der Schlafkrankheit als auch für dessen Behandlung eine zentrale Rolle. Obwohl seit 1906 verschiedene Hypothesen über die Entstehung und Entwicklung des meningoenzephalitischen Stadiums formuliert und diskutiert wurden [Mott, 1906; Schmidt, 1983; Lonsdale-Eccles und Grab, 2002; Mhlanga et al, 1997; Kritensson et al, 2009], bestehen weiterhin ungelöste Fragen und nicht geklärte Aspekte. So ist bislang nicht abschließend geklärt, auf welche Weise Trypanosomen in das zentrale Nervensystem eindringen und in welchem Stadium des Lebenszyklus sich diese im neuronalen Umfeld befinden. Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Trypanosomen über die Blut-Hirn-Schranke [Lonsdale-Eccles und Grab, 2002; Mhlanga et al, 2001; Lambert et al, 1981; Masocha et al, 2004] in das ZNS eindringen, während andere die Invasion des ZNS eher über eine Besiedlung der zirkumventrikulären Organe [Mhlanga et al, 1997], des *Plexus choroideus* und des *Liquor cerebrospinalis* [Poltera et al, 1980; Schmidt, 1983] nahe legen.

Bisherige Versuche Trypanosomen anhand von phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen und histopathologischen Färbemethoden, wie z.B. durch Hämatoxylin-Eosin Färbungen im Gewebe des zentralen Nervensystems nachzuweisen, führten zu keiner eindeutigen Darstellung und Lokalisierung [Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009]. Erst durch diverse Experimente, die mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz durchgeführt wurden, ließen sich erste Lokalisationsorte von Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems, wie z.B. im Bereich des Kleinhirns, des *Corpus striatum*, des *Kortex*, des Hirnstamms und des *Plexus choroideus* ausfindig machen [Masocha et al, 2004; Mulenga et al, 2001; Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009]. In einigen experimentellen Arbeiten erfolgte die Lokalisierung von Trypanosomen (*T. brucei* des pleomorphen Stammes AnTat 1.1) jedoch mit Antikörpern (Anti-VSG) gegen Oberflächenproteine (VSG), die normalerweise einer Variation und somit Veränderung der Epitope unterliegen, so dass diese Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und zu bewerten sind. Da vergleichbare Lokalisationsorte von *Trypanosoma evansi* im meningoenzephalitischen Stadium bei Pferden beschrieben wurden [Rodrigues et al, 2009], kann jedoch eine ähnliche Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des ZNS vermutet werden. Trotz der Beschreibung erster Lokalisationsorte von

Trypanosomen im neuronalen Umfeld gelang es jedoch bislang nicht diese morphologisch eindeutig zu beschreiben.

Um einerseits eine morphologische Beschreibung und andererseits eine genaue Lokalisierung von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit das monomere Cherry Protein codierende Gen (MCP-Gen) in das trypanosomale Genom des pleomorphen Stammes AnTat 1.1 kloniert (vgl. Kapitel 3.2.1).

Auf diese Weise konnten Trypanosomen, die durch ein konstitutiv exprimiertes, fluoreszierendes Protein, dessen Expression mittels *Western blot* und Fluoreszenzmikroskopie überprüft wurde (vgl. Kapitel 3.2.2-3), markiert werden. Durch eine *in vivo* Amplifikation von markierten Trypanosomen über einen Zeitraum von 34 Tagen konnte nachgewiesen werden, dass die Fluoreszenz des Proteins konstitutiv aufrecht erhalten wurde, so dass sich markierte Trypanosomen zur Analyse einer Gehirninfection und Detektion im neuronalen Umfeld verwenden ließen (vgl. Kapitel 3.2.2).

Bei der Analyse von Gefrierschnitten infizierter Rattengehirne im sekundären Krankheitsstadium waren jedoch keine markierten Trypanosomen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar, obwohl dies zu vergleichbaren Zeitpunkten mittels indirekter Immunfluoreszenz von anderen Autoren beschrieben wurde [Masocha et al, 2004; Mulenga et al, 2001; Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009]. Fluoreszenzmikroskopisch auffällig erschien jedoch eine stark ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz sowie eine sich von der Hintergrundfluoreszenz abhebende, deutlich verstärkte, diffuse und wolkige Fluoreszenz im Bereich des *Plexus choroideus*.

Da eine solch starke und ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz nicht von anderen Autoren, die auf diesem Gebiet arbeiten, explizit beschrieben wurde [Masocha et al, 2004; Mulenga et al, 2001; Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009], war zu vermuten, dass diese Hintergrundfluoreszenz möglicherweise die Fluoreszenz der markierten Trypanosomen überlagerte. Eine solche Hintergrundfluoreszenz kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass eine stark ausgeprägte intrinsische Autofluoreszenz des zu analysierenden Gewebes eine ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz erzeugt, die zur Überlagerung der zu analysierenden Strukturen führt [Bachong et al, 2001]. Andererseits kann eine verstärkte Hintergrundfluoreszenz aber auch durch die Herstellung von Gewebsschnitten erzeugt werden [Bachong et al, 2001]. Bei einem Vergleich der eingesetzten Schichtdicken der hergestellten Gefrierschnitte (10 µm) mit den verwendeten Schichtdicken anderer Autoren (4-8 µm), die eine Detektion mittels indirekter Immunfluoreszenz durchführten [Poltera et al, 1981], zeigte sich, dass andere Autoren dazu neigten eine geringere Schichtdicke zu verwenden. Möglicherweise könnte eine reduzierte Schichtdicke die Hintergrundfluoreszenz abschwächen und somit einer Überlagerung der Fluoreszenzen entgegen wirken. Leider war es aus technischen Gründen

nicht möglich die eingesetzte Schichtdicke von 10 µm zu reduzieren. Einen erheblichen Einfluss auf die ausgebildete Hintergrundfluoreszenz kann auch das verwendete Fixativ haben, das sowohl die Fluoreszenz verstärken als auch reduzieren kann [Baschong et al, 2001]. Fixierungsversuche mit unterschiedlichen Fixativen zeigten, dass die Hintergrundfluoreszenz bei der Verwendung von 10% Formalin schwächer ausgeprägt war als bei der Verwendung von 2% Glutaraldehyd oder einer Kombination aus 10% Formalin und 4% Glutaraldehyd. Jedoch konnte die stark ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz trotz Verwendung von 10% Formalin, die auch von zahlreichen anderen Autoren als Standardfixierung eingesetzt wurde [Rodrigues et al, 2009], nicht signifikant reduziert werden, so dass eine Überlagerung der Fluoreszenz mit jener der markierten Trypanosomen nicht auszuschließen war. Die Fixierungslösung kann aber nicht nur Einfluss auf die Hintergrund- und Autofluoreszenz des Gewebes nehmen, sondern auch direkt das zu untersuchende und fluoreszierende Protein beeinflussen [Shu et al, 2006]. Dabei spielen sowohl der pH-Wert als auch das verwendete Fixativ eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung und Stärke der Fluoreszenz [Shu et al, 2006].

Durchgeführte Experimente mit unterschiedlichen Fixierungen von markierten Trypanosomen zeigten, dass eine Maskierung der Fluoreszenz des monomeren Cherry Proteins (MCP) auftreten konnte. So wurde die Fluoreszenz des MCPs konstant bei der Verwendung von Paraformaldehyd maskiert bzw. gequencht, während sie bei Verwendung von Glutaraldehyd aufrecht erhalten werden konnte (vgl. Kapitel 3.3.1). Ebenso zeigte sich in Experimenten, die mit einer Variation des pH-Wertes durchgeführt wurden, dass die Fluoreszenz des MCPs im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich (pH 7,4-7,7) am stärksten ausgeprägt war. Um eine Maskierung des nachzuweisenden Proteins zu verhindern und gleichzeitig eine möglichst schwache Hintergrundfluoreszenz zu erhalten, musste ein Kompromiss aus dem verwendeten Fixativ und der daraus resultierenden Hintergrundfluoreszenz geschlossen werden. Deshalb wurde für die Fixierung von Gewebsschnitten infizierter Rattenhirne eine 2%ige Glutaraldehydlösung verwendet. Auf diese Weise konnte die Fluoreszenz des MCPs aufrecht erhalten werden, wobei allerdings auch die Hintergrundfluoreszenz verstärkt wurde. Möglicherweise ließe sich die unerwünschte Hintergrundfluoreszenz jedoch durch die Verwendung von Natriumborhydrid reduzieren, da dies experimentell zur Abschwächung von Autofluoreszenzen von in Glutaraldehyd fixiertem Gewebe geführt hat [Baschong et al, 2001]. Zwar waren MCP markierte Trypanosomen, die in 2% Glutaraldehyd fixiert und auf entsprechend fixierten Gefrierschnitten von Rattenhirnen aufgetragen wurden, von der Hintergrundfluoreszenz des Gewebes abgegrenzbar, jedoch ist dabei zu berücksichtigen, dass sich diese Trypanosomen nur auf der Oberfläche des Gewebeschnittes und nicht in der Tiefe des Gewebes befanden. Daher ließ sich ihre

Lokalisation und Fluoreszenz einfacher nachgewiesen, als jene von im Gewebe lokalisierten Trypanosomen, die möglicherweise überlagert wurde.

Natürlich muss auch daran gedacht werden, dass unter Umständen Fehler bei der Herstellung von Gefrierschnitten aufgetreten sind. So könnte es beim Einfrieren der Gehirne (vgl. Kapitel 2.3.5.2), z.B. durch die Bildung von Eiskristallen zu einer Zerstörung der Trypanosomen (bzw. ihrer Zellmembran) gekommen sein, so dass das MCP im Gewebe des zentralen Nervensystems sich diffus um die ursprünglich besiedelten Regionen verteilte. Diese Möglichkeit würde, insofern sich Trypanosomen im Bereich des *Plexus choroideus* befanden, die beobachtete, verstärkte, diffuse und wolkige Fluoreszenz im Bereich des *Plexus choroideus* erklären. Jedoch ist diese Möglichkeit relativ unwahrscheinlich, da das Einfrieren der Gehirne im fixierten Zustand erfolgte, so dass eine Zerstörung der trypanosomalen Membranen und ein „Auslaufen“ der Trypanosomen nahezu ausgeschlossen werden kann. Gegen die Zerstörung der trypanosomalen Strukturen spricht auch, dass andere Autoren bei der Herstellung von Gefrierschnitten auf dieselbe oder vergleichbare Weise vorgehen [Masocha et al, 2004; Poltera et al, 1980].

Auf Grund des natürlichen Infektionsverlaufes ist zu berücksichtigen, dass sich zum Zeitpunkt der Analyse der Gehirnschnitte (22-34 Tage p.l.) noch keine oder nur wenige Trypanosomen im Bereich des Parenchyms des ZNS befanden. Experimente von Schmidt und Bafort zeigten bereits 1985, dass sich *Trypanosoma brucei rhodesiense* erst nach bis zu 42 bis 56 Tagen im Parenchym des ZNS von Wühlmäusen (*Microtus montanus*) während einer medikamentösen Behandlung ansiedelte. Zu früheren Zeitpunkten konnten Trypanosomen jedoch bereits bei verschiedenen Tierarten (Maus, Wühlmaus (*Microtus montanus*), Grünmeerkatze (*Cercopithecus aethiops*), Pferd) im Bereich des *Plexus choroideus* lokalisiert werden [Poltera et al, 1980; Schmidt und Bafort, 1985; Schmidt, 1983; Bafort und Schmidt, 1987, Rodrigues et al, 2009], so dass in den hergestellten Gefrierschnitten Trypanosomen im Bereich des *Plexus choroideus* nachweisbar sein sollten. Da in diesem Bereich jedoch nur eine verstärkte, diffuse Fluoreszenz nachweisbar war, ist es am wahrscheinlichsten, dass die Fluoreszenz der möglicherweise dort lokalisierten und markierten Trypanosomen durch die stark ausgeprägte Hintergrund- und Autofluoreszenz des Hirngewebes, die eventuell im Bereich des *Plexus choroideus*, auch aufgrund des dort lokalisierten Kapillargeflechts, stärker ausgeprägt war, überlagert wurde.

Um diese Hypothese zu überprüfen und um *T. brucei* im Gewebe des ZNS zu lokalisieren und morphologisch zu beschreiben, lag der Entschluss nahe, insbesondere den Bereich des *Plexus choroideus* und andere Gehirnbereiche mit einer alternativen Methode - der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), genauer zu untersuchen.

Da es bislang nur wenige Versuche gab, Trypanosomen transmissionselektronenmikroskopisch im Bereich des ZNS darzustellen [Ormerod und Hussein, 1986; Poltera et al,

1980], bot die Elektronenmikroskopie einerseits die Chance *T. brucei* eindeutig im Gewebe des ZNS zu lokalisieren und morphologisch detailliert zu beschreiben. Andererseits eröffnete sie aber auch die Möglichkeit bereits bestehenden Hypothesen von Schmidt, Ormerod und Hussein sowie von Poltera zu überprüfen und das vorhandene Wissen über den Parasiten selbst und über die Pathogenese zu erweitern. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ausgewählten Bereichen von Rattengehirnen im sekundären Krankheitsstadium (22-34 Tage p.l.) wurden dazu in Kooperation mit Professor Wolburg angefertigt. Zu den untersuchten Gehirnbereichen gehörten das *Corpus striatum*, das *Cerebellum*, der *Kortex*, der *Plexus choroideus* sowie Bereiche um die Blut-Hirn-Schranke, da in diesen Bereichen bereits von anderen Autoren Trypanosomen vermutet und immunhistologisch beschrieben wurden [Masocha et al, 2004; Mulenga et al, 2001; Tuntasuvan et al, 2000; Rodrigues et al, 2009].

In den angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten Trypanosomen lediglich im Bereich des *Plexus choroideus* lokalisiert werden, während sich im Parenchym des ZNS (*Corpus striatum*, *Cerebellum* und *Kortex*) und im neuronalen Gewebe um die Blut-Hirn-Schranke keine Parasiten nachweisen ließen.

Dieses Ergebnis passt gut zu den Ergebnissen von Masocha et al (2004) und Poltera et al (1980), in denen Trypanosomen primär im Bereich des *Plexus choroideus* und der zirkumventrikulären Organe festgestellt werden konnten, bevor sie zu einem späteren Zeitpunkt in der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums im Parenchym des ZNS perivaskulär nahe der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen wurden. Jedoch legen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu Masochas Ergebnissen nicht die Vermutung nahe, dass Trypanosomen primär die Blut-Hirn-Schranke zur Invasion des ZNS überwinden.

Vielmehr lassen die angefertigten transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen auf Grund des isolierten Befalls des *Plexus choroideus* vermuten, dass Trypanosomen in der Initialphase des meningoenzephalitischen Stadiums, die wir in unseren Versuchen wahrscheinlich darstellen konnten, nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, sondern zunächst den *Plexus choroideus* besiedeln. Dies würde zum einen eine Hypothese von Schmidt aus dem Jahr 1983 bekräftigen, der den *Plexus choroideus* als Ausgangspunkt für die Entwicklung des meningoenzephalitischen Stadiums vorschlug, aber dies experimentell nicht eindeutig darstellen konnte [Schmidt, 1983] und zum anderen die Ergebnisse von Ormerod und Hussein (1986) sowie von Poltera et al (1980) bestätigen und erweitern (vgl. Kapitel 4.2).

Es muss jedoch bedacht werden, dass durch die angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur ein kleiner und ausgewählter Ausschnitt aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems untersucht werden konnte. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass einzelne Trypanosomen bereits in anderen, nicht untersuchten Gebieten und Arealen, wie z.B. den Virchow Robin Räumen oder den septalen Kerngebieten lokalisiert sein könnten.

Ein Austritt von Trypanosomen durch die Blut-Hirn-Schranke zum Zeitpunkt der Untersuchung erscheint jedoch nahezu ausgeschlossen, da dies in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar gewesen wäre. Eine Besiedlung der perivaskulären Räume durch *T. brucei* zu späteren Infektionszeitpunkten, wie von Poltera et al 1980 beschrieben, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Beschreibung des Infektionsverlaufs anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Durch den Vergleich transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen von verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems (24 Tage p.i. und 34 Tage p.i.) konnte ein früher Abschnitt der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums beschrieben und rekonstruiert werden. Wie von Schmidt (1983) vermutet und von Poltera et al (1980) histopathologisch beschrieben, waren in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen 22 Tage nach Infektion konstant zahlreiche Trypanosomen im Bereich des *Plexus choroideus* nachweisbar, während dies im Bereich der Blut-Hirn-Schranke zu diesem Infektionszeitpunkt nicht möglich war. Im Bereich des *Plexus choroideus* ließen sich, wie von Schmidt (1983) und Poltera et al (1980) vermutet, zahlreiche Trypanosomen im intravasalen Raum der fenestrierten Kapillaren, im Stroma (*Interstitium*) des Plexus choroideus basolateral des Plexusepithels und im Liquor cerebrospinalis apikal des Plexusepithels lokalisieren. Alle nachgewiesenen Trypanosomen waren extrazellulär lokalisiert, so dass frühere Beschreibungen einer amastigoten Form [Ormerod und Venkatesan, 1971] sowie von intrazellulären trypomastigoten Formen im Bereich des Plexusepithels [Ormerod und Hussein, 1986] nicht festgestellt werden konnten. Neben den zahlreich im Stroma des *Plexus choroideus* lokalisierten Trypanosomen ließen sich dort keine inflammatorischen Zellen wie Plasmazellen, Makrophagen oder Mott-Zellen, wie dies von Poltera et al (1980) zu späteren Infektionszeitpunkten beschrieben wurde, nachweisen. Jedoch zeigte sich, wie bei Poltera et al (1980), eine interstitielle Ödembildung, die zu einer Ausweitung des sonst schmalen Stromas des *Plexus choroideus* führte [Poltera et al, 1980]. Apikal des Plexusepithels waren Kolmer Zellen, die von Monozyten abstammen [Engelhardt et al, 2001], nachweisbar. Dies könnte auf eine beginnende inflammatorische Reaktion im Bereich des *Plexus choroideus*, die sich zu einem späteren Infektionszeitpunkten manifestiert und bereits von Poltera et al (1980) im Mausmodell beschrieben wurde, hinweisen.

Neben den im Interstitium lokalisierten Trypanosomen waren einzelne Trypanosomen in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen gelegentlich im *Liquor cerebrospinalis* und somit im Lumen des Seitenventrikels detektierbar. Da sich der Übertritt bzw. Eintritt der

Trypanosomen in das Stroma des *Plexus choroideus* nicht direkt durch den Nachweis einer Migration über das Endothel der fenestrierten Kapillaren im *Plexus choroideus* aufzeigen ließ, könnten Trypanosomen auch an anderen Regionen außerhalb des untersuchten Bereiches aus dem intravasalen Raum ausgetreten und in das Stroma des *Plexus choroideus* eingewandert sein. Jedoch legte der Nachweis von Trypanosomen in den fenestrierten Kapillaren des *Plexus choroideus* und in dessen Stroma die Vermutung nahe, dass Trypanosomen im Bereich des *Plexus choroideus* den intravasalen Raum über das dort lokalisierte und fenestrierte Kapillargeflecht verlassen, in das Stroma des *Plexus choroideus* eindringen und von dort aktiv oder passiv entweder trans- oder parazellulär über das Plexusepithel in den *Liquor cerebrospinalis* wandern [Engelhardt und Wolburg, 2004]. Somit könnte der *Plexus choroideus* nicht nur eine zentrale Rolle bei der Entstehung zahlreicher anderer Infektionen und inflammatorischer Reaktionen [Engelhardt et al, 2001], sondern auch eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums der humanen afrikanischen Trypanosomiasis spielen. Der *Plexus choroideus* scheint als primäre Zwischenstation auf dem Weg zur Entwicklung des meningoenzephalitischen Stadiums besonders geeignet, da Trypanosomen auf Grund des fenestrierten Endothels des Kapillargeflechts und der sich daraus ergebenden erhöhten Permeabilität [Goodwin, 1971] relativ einfach in das Stroma eindringen können und dort ein ideales Milieu mit ausreichend Nährstoffen zum Überleben vorfinden könnten.

Zudem werden durch die sekretorische Funktion des Plexusepithels [Davson und Segal, 1970] zahlreiche antioxidative Substanzen aus dem Blut über das Stroma des *Plexus choroideus* in den *Liquor cerebrospinalis* transportiert [Spector and Eells, 1984], so dass im *Plexus choroideus* selbst hohe Konzentrationen dieser Substanzen vorliegen [Lönnrot et al, 1996]. Dies könnte auch für Trypanosomen im Stroma des *Plexus choroideus* eine Art protektiven Vorteil darstellen.

Da das Stroma des *Plexus choroideus* nur einen kleinen und begrenzten Raum darstellt, können sich dort Trypanosomen nicht unendlich ansammeln bzw. uneingeschränkt vermehren. Möglicherweise proliferieren dort zunächst Blutstromformen von Trypanosomen, die schließlich ihre Zelldichte zur dauerhaften Besiedlung regulieren. Dies könnte über eine Differenzierung zu *stumpy* Formen erfolgen, wie es für Blutstromform-Trypanosomen *in vitro* von Figarella et al, 2005 beschrieben wurde. Vermutlich gelangt das dabei sezernierte PGD₂ in den *Liquor cerebrospinalis* und führt an hypothalamische Kerngebieten zu Alternationen des Schlaf-Wach-Rhythmus [Figarella et al, 2005]. Alternativ könnte es auch zu einer fluktuierenden Besiedlung des *Plexus choroideus* kommen, bei der die Trypanosomen durch immunologische Faktoren reduziert werden, so dass ihre Zahl ähnlich wie bei der Parasitämie wellenartig verläuft [Sanderson et al, 2008]. Dies würde erklären, weshalb im Bereich des *Plexus choroideus* Trypanosomen lokalisiert werden konnten, die einen

eindeutig nachweisbaren Oberflächenmantel aus VSG aufwiesen, während dieser bei anderen Trypanosomen eindeutig nicht nachweisbar war. Möglicherweise gehören Trypanosomen ohne Oberflächenmantel einer älteren Trypanosomenpopulation, die nicht mehr überlebensfähig ist, an, wohingegen die Trypanosomen mit Oberflächenmantel bereits eine neue Population darstellen, die den *Plexus choroideus* besiedelt.

Ebenso ist es durchaus denkbar, dass *T. brucei* im Bereich des *Interstitiums* des *Plexus choroideus* morphologische (vgl. Kapitel 3.5.1) und/oder biochemische Veränderungen vollzieht und sich an das Milieu des ZNS anpasst. Dies könnte einzelnen, angepassten Trypanosomen eine Migration über das Plexusepithel in den *Liquor cerebrospinalis* und von dort aus in andere Hirnregionen ermöglichen. Vermutlich migrieren aber auch nicht angepasste Trypanosomen über das Plexusepithel in den *Liquor cerebrospinalis*. Jedoch ist aus Experimenten an nicht abgestillten Mäusen, denen Blutstromformen von Trypanosomen ungezielt mittels mechanischer Läsion in das ZNS injiziert wurden, bekannt, dass die Blutstromformen von *T. brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems kein geeignetes Milieu zum längerfristigen Überleben vorfinden [Baford et al, 1987] und degenerieren. In diesem Zusammenhang blieb jedoch ungeklärt, ob dies nur für bestimmte Blutstromformen oder für alle Blutstromformen von *T. brucei* zutrifft. So muss vermutet werden, dass eine Anpassung von *T. brucei* an das Milieu des ZNS die Grundlage für ein langfristiges Überleben und somit auch für eine Migration über den *Liquor cerebrospinalis* darstellt.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Rattenhirnen, 34 Tage nach Infektion, ließen sich Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* apikal des Plexusepithels, in räumlicher Nähe zu Epiplexus-Zellen (Kolmer Zellen), nachweisen (Abbildung 29). Dabei zeigte ein Trypanosom Anzeichen für apoptotische Prozesse in Form eines *blebbings* der Zellmembran auf, während dies bei einem anderen Trypanosom nicht festzustellen war. Möglicherweise stellen die beiden in Abbildung 29 aufgezeigten Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* angepasste und nicht angepasste Formen dar. Jedoch kann dies nur als Vermutung aufgefasst werden, da zum Nachweis einer Anpassung an das Milieu des *Liquor cerebrospinalis* und des ZNS weitere morphologische und vor allem biochemische Untersuchungen durchgeführt werden müssten. Jedenfalls würde der Nachweis von Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* den Trypanosomen, wie von Schmidt bereits 1983 vermutet, die Möglichkeit eröffnen über den *Liquor cerebrospinalis* in andere Gebiete, wie z.B. in die nahe gelegenen Virchow-Robin Räume, einzudringen und schließlich zu einer Invasion des Gehirnparenchyms zu führen [Schmidt, 1983]. Ähnliche Wege wurden auch von anderen Autoren vorgeschlagen [Poltera et al, 1980; Ormerod und Hussein, 1986]. Bisher ließ sich diese Migration der Trypanosomen aus dem intravasalen Raum der fenestrierten Kapillaren des *Plexus choroideus* über das Plexusstroma und Epithel in den *Liquor cerebrospinalis* sowie ihre weitere Ausbreitung nicht eindeutig oder nur teilweise [Poltera et

al, 1980] nachweisen. Daher könnten die angefertigten transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen den primären Abschnitt der frühen Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums darstellen und bestätigen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zu späteren Infektionszeitpunkten, zur vollständigen Darstellung der Pathogenese, v.a. sekundärer Abschnitte, wurden in dieser Arbeit nicht angefertigt, um zu verhindern, dass Versuchstiere Krankheitssymptome entwickelten. Deshalb wurde für diese Abschnitte der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums die von Schmidt 1983 vorgeschlagene Arbeitshypothese übernommen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Ergebnisse lassen vermuten, dass Trypanosomen primär den Weg über die Blut-Liquor-Schranke und somit über den *Plexus choroideus* und den *Liquor cerebrospinalis* zur Invasion des zentralen Nervensystems nutzen und nicht vorrangig die Blut-Hirn-Schranke, wie bislang angenommen, präferieren [Grab et al, 2009; Mulenga et al, 2001]. In allen elektronenmikroskopischen Aufnahmen entlang der Blut-Hirn-Schranke zwischen dem 24. und 34. Tag nach Infektion konnten keine Trypanosomen im extravasalen Raum festgestellt werden, während dies im *Plexus choroideus* der Fall war. Ebenso zeigten sich keine zerebralen Läsionen, wie von Kager et al (2009) und Braakman et al (2006) zu späteren Infektionszeitpunkten beschrieben, oder perivaskuläre, entzündliche Infiltrate [Masocha, 2004]. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion Trypanosomen über die Blut-Hirn-Schranke in das Parenchym des zentralen Nervensystems eindringen und dort entzündliche Infiltrate und zerebrale Läsionen hervorrufen.

Die Ergebnisse stellen vielmehr einen frühen Weg der Entwicklung des meningoenzephalitischen Stadiums durch *T. brucei* dar und unterstützen die von Schmidt 1983 vorgeschlagene Hypothese der Teilung der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums in drei Phasen [Schmidt, 1983]:

- 1) Invasion des *Plexus choroideus* und des *Liquor cerebrospinalis*
- 2) Besiedlung der Virchow Robin Räume
- 3) Invasion des Parenchyms des zentralen Nervensystems

Schmidt konnte 1983 diese Hypothese aufgrund von phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen von Gehirnschnitten und auf Grund von histopathologischen und ersten elektronenmikroskopischen Vorarbeiten anderer Wissenschaftler [Poltera et al, 1980; Ormerod und Hussein, 1986] bilden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verstärken diese Annahme durch den transmissionselektronenmikroskopischen Nachweis von *T. brucei* in entsprechenden Regionen zu entsprechenden Infektionszeiten.

Möglicherweise sollte der Hypothese jedoch mindestens eine weitere Phase hinzugefügt oder die Hypothese durch eine Phase erweitert werden. Dieser Vorschlag könnte einerseits von Ergebnissen von Bafort et al aus dem Jahr 1987, in denen die Evidenz erbracht wurde, dass die Blutstromformen von *T. brucei* nicht dauerhaft im Gewebe des zentralen Nervensystems überleben können [Bafort et al, 1987] und andererseits durch eine mögliche Isolierung einer bislang morphologisch nicht beschriebenen Trypanosomenform (vgl. Kapitel 3.5) aus dem Gewebe des ZNS unterstützt werden. Beide Erkenntnisse könnten darauf hinweisen, dass eine bislang nicht beschriebene, morphologisch und auch biochemisch angepasste Form und somit ein neues Stadium im Lebenszyklus von *T. brucei* existiert. Eine solche Form spielt möglicherweise für die Verbreitung der Trypanosomen eine evolutionär wichtige Rolle. Durch eine Invasion des zentralen Nervensystems mittels einer angepassten Form könnte der Wirt über die Hemmung von Schutzreflexen und die Erzeugung eines apatischen, schläfrigen Zustandes [Cook und Zumla, 2003] für den Vektor, sprich für Glossinen und deren Bisse, leichter empfänglich werden, so dass der Parasit leichter vom Wirt auf den Vektor übertragen werden könnte. Dies würde jedoch voraussetzen, dass Trypanosomen aus dem Gewebe des Gehirns auch retrograd ins Blut des Wirtes migrieren, um selbst von der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Übertragung zu profitieren. Ein solcher *relapse* wurde bereits in zahlreichen Fällen von Krankheitswiederauftreten nach medikamentöser Behandlung festgestellt [Jennings et al, 1979; Robays et al, 2008] und in Verbindung mit einer Besiedlung des ZNS und des Hodens gebracht [Jennings et al, 1979; Claes et al, 2009]. Ebenso sollten retrograd ins Blut migrierende Trypanosomen eine Differenzierungsfähigkeit zu *slender* und *stumpy* Formen aufweisen, um die natürliche Infektion aufrecht zu erhalten. Es ist zu vermuten, dass eine solche, an das Gewebe des ZNS angepasste Trypanosomenform, sich bereits früh im Umfeld des *Plexus choroideus* ausbildet und somit die Invasion des *Plexus choroideus* den eigentlichen Ausgangspunkt für die Entwicklung des meningoenzephalitischen Stadiums darstellt [Schmidt, 1983; Poltera et al, 1980]. Möglicherweise spielen dabei bislang unbekannte Faktoren, die entweder vom Plexusepithel oder vom Parasit selbst [Poltera et al, 1980] sezerniert werden, eine wichtige Rolle. Es ist aber auch durchaus möglich, dass die Adaptation an das Gewebe des ZNS ebenso in anderen Bereichen stattfinden könnte. Der *Plexus choroideus* scheint jedoch, auf Grund der bereits beschriebenen Eigenschaften, ein geeignetes Umfeld für eine solche Anpassung darzustellen.

Daher liegt es abschließend nahe, durch eine Verknüpfung der bisherigen Erkenntnisse [Schmidt, 1983; Poltera et al, 1980; Ormerod und Hussein, 1986; Bafort et al, 1987; Jennings et al, 1979] und der Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, die Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums wie folgt zu gliedern:

1. Invasion des *Plexus choroideus*
 - A) Besiedlung des Stroma über das fenestrierte Endothel des Kapillargeflecht
 - B) Anpassung/Differenzierung (morphologische und/oder biochemische Anpassungen)
 - C) Migration über das Plexusepithel in den *Liquor cerebrospinalis* (trans- oder parazellulär)
2. Ausbreitung über den *Liquor cerebrospinalis* mit Besiedlung der Virchow Robin Räume
3. Invasion des Parenchyms des zentralen Nervensystems

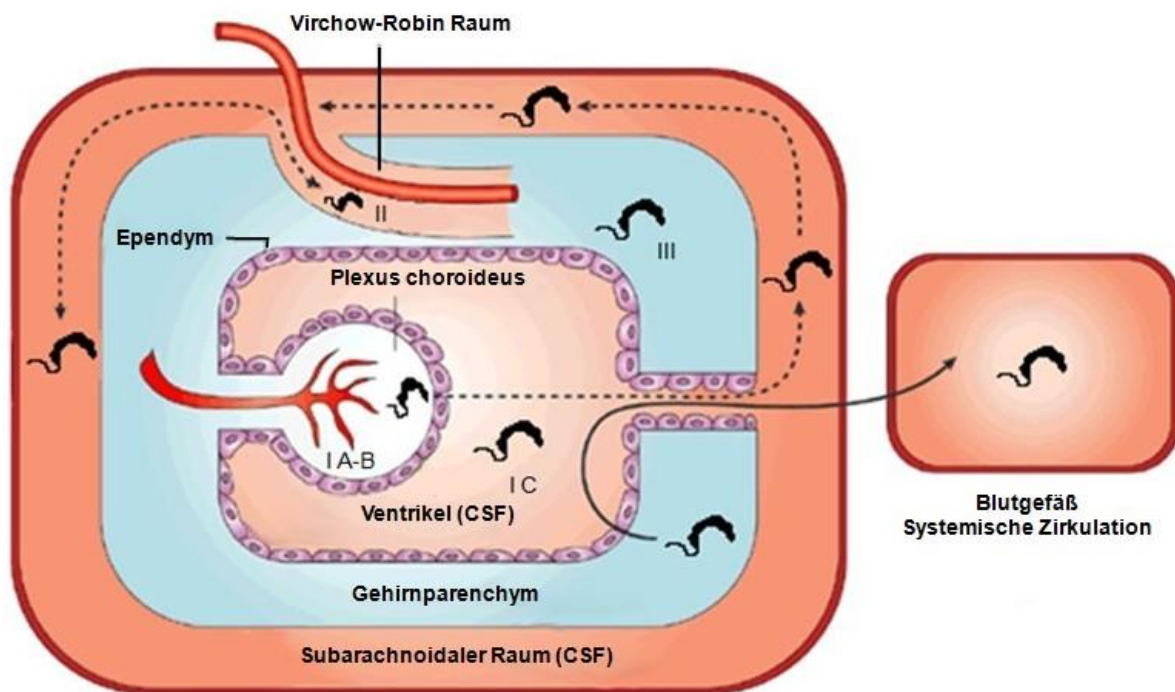


Abbildung 38: Schema der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums

Die Abbildung zeigt einen schematischen, möglichen Ablauf der Pathogenese des meningoenzephalitischen Stadiums. Zunächst gelangen Trypanosomen aus dem intravasalen Raum in das Stroma des *Plexus choroideus* (IA); dort proliferieren sie und regulieren ihre Zelldichte. Unter den Trypanosomen bilden sich möglicherweise morphologisch und/oder biochemisch veränderte Trypanosomenformen aus, die an den *Liquor cerebrospinalis* oder das Gewebe des zentralen Nervensystems angepasst sind (IB). Diese Formen sowie unangepasste Formen verlassen den *Plexus choroideus* para- oder transzellulär (IC). Während die unangepassten Formen degenerieren, dringen die angepassten *Gehirn-Formen* über den *Liquor cerebrospinalis* in die Virchow Robin Räume (II), von wo aus sie in das Gewebe des zentralen Nervensystems eindringen können (III).

Modifizierte Abb. nach Nature Reviews Immunology, 2003 (Ransohoff RM, Kivisäkk P und Grahame Kidd G).

4.3 Isolierung von *T. brucei* aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Um eine morphologische Charakterisierung von Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems zu ermöglichen, mussten diese aus dem ZNS isoliert werden. Da bislang keine Methode zur Isolierung von Trypanosomen aus dem ZNS beschrieben worden ist, musste zunächst eine geeignete Methode entwickelt werden.

In dieser Arbeit gelang es, *T. brucei* aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems in Flüssigkultur zu isolieren (vgl. Kapitel 3.5) und morphologisch zu beschreiben. Bei der Isolierung konnte eine Kontamination von Trypanosomen aus dem intravasalen Raum und nicht neuronalen Gewebe ausgeschlossen werden, weil in sämtlichen Negativkontrollen (vgl. Kapitel 3.4) keine Trypanosomen nachgeweisbar waren. Da isolierte Trypanosomen (AnTat 1.1) in flüssigem HMI9-Medium nicht proliferierten, wurde bislang noch kein Kultivierungssystem entwickelt, um eine weitere biochemische Analyse dieser Trypanosomen zu ermöglichen. Für eine weiterführende Kultivierung wäre möglicherweise ein Kultivierungssystem, das semi-solide Medien, wie z.B. auf HMI9-0,65% Agaroseplatten [Vasella und Boshart 1996; Carruthers und Cross, 1992] verwendet oder eine Kultivierung auf Astrozyten, Fibroblasten, Neuronen oder Ependymzellen geeignet.

4.4 Morphologische Beschreibung von isolierten Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems

Isolierte Trypanosomen aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems wurden für eine morphologische Untersuchung und Beschreibung mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Zudem wurde die Morphologie von *T. brucei* anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen im Bereich des *Plexus choroideus* beschrieben.

Wie im Ergebnisteil (vgl. Kapitel 3.5) bereits dargestellt, konnten isolierte Trypanosomen nach phasenkontrastmikroskopischer Untersuchung in drei Populationen eingeteilt werden. Eine Trypanosomenpopulation wurde als klein, kurz und dick und eine andere als lang und schlank gekennzeichnet. Beide Populationen erinnerten stark an die normalerweise im Blut vorkommenden *stumpy* und *slender* Formen. Daher musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Populationen um *stumpy* und *slender* Blutstromformen von *T. brucei* handelte, die möglicherweise aus dem Stroma des *Plexus choroideus* isoliert wurden, unter dessen Einfluss sie sich eventuell verändert hätten (vgl. Kapitel 4.3). Da es wahrscheinlich ist, dass Blutstromformen von Trypanosomen aufgrund der erhöhten Permeabilität des fenestrierten Endothels [Goodwin, 1971] und dem daraus resultierenden Milieu im Stroma

des *Plexus choroideus* überleben können, ist anzunehmen, dass sowohl *slender* als auch *stumpy* Formen im Stroma des *Plexus choroideus* vorkommen.

Neben diesen beiden Trypanosomenformen, die wahrscheinlich dauerhaft oder fluktuierend [Sanderson et al, 2008] das Stroma des *Plexus choroideus* im sekundären Krankheitsstadium besiedeln, konnte eine weitere, verlängerte, ein langes Flagellum tragende Trypanosomenform mit einem langen und schmalen Zellkörper aufgefunden werden (vgl. Abbildung 34 C). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Form um eine neue Trypanosomenpopulation, die speziell an das ZNS angepasst ist. Auf Grund fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nach einer Färbung mit Bisbenzimid konnten diese, möglicherweise angepassten Trypanosomen als trypomastigot charakterisiert werden.

Die morphologische Beschreibung dieser Trypanosomenform weist Parallelen zu früheren Experimenten auf, in denen von Poltera et al (1980) und von Schmidt und Bafort (1987) in phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen teilweise verlängerte, schlanke, Flagellum tragende Trypanosomen im Gewebe des zentralen Nervensystems vermutet wurden. Möglicherweise könnte das lange Flagellum der Trypanosomen einerseits für einen Zell-Zell-Kontakt zu Zellen des zentralen Nervensystems, vergleichbar mit einem Zell-Zell-Kontakt von epimastigoten Formen zu Epithelien in den Speicheldrüsen [Tetley und Vickerman, 1985] dienen, andererseits könnte das lange Flagellum aber auch zu einer gesteigerten Mobilität [Ralston, et al 2009] und zusammen mit dem schmalen und langen Zellkörper zu einer schnelleren Fortbewegung der Trypanosomen im *Liquor cerebrospinalis* beitragen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass zwar alle isolierten Trypanosomenformen aus dem Gewebe des ZNS in der Initialphase des meningoenzephalitischen Stadiums das Stroma des *Plexus choroideus* besiedeln und wenige anschließend über das Plexusepithel in den *Liquor cerebrospinalis* gelangen [Poltera et al, 1980]. Jedoch dringt wahrscheinlich nur eine angepasste Form über den *Liquor cerebrospinalis* und die Virchow Robin Räume in das Parenchym des zentralen Nervensystems ein, während unangepasste Formen im *Liquor cerebrospinalis* degenerieren.

Nahezu alle erzielten Ergebnisse und viele frühere Experimente [Bafard et al, 1985, Poltera, 1980, Jennings et al, 1979] weisen daher darauf hin, dass eine bislang nicht beschriebene, speziell an das Gehirn adaptierte Trypanosomenform bzw. Population existieren könnte. Es ist denkbar, dass diese Form sowohl eine morphologische als auch biochemische Adaption an das Gewebe des zentralen Nervensystems vollzogen hat. Daher würde es nahe liegen, diese Form als *Gehirn-Form* zu bezeichnen. Möglicherweise stellt die experimentell nachgewiesene, ein langes Flagellum tragende, trypomastigot differenzierte Trypanosomenform mit einem langen und schmalen Zellkörper eine solche *Gehirn-Form* und somit ein neues Stadium im Lebenszyklus von *T. brucei* dar.

Durch ihre Isolierung aus dem Gewebe des zentralen Nervensystems konnte zum einen eine erste morphologische Beschreibung durchgeführt und zum anderen ein Zugang für weitere biochemische und morphologische Untersuchungen eröffnet werden.

Eine abschließende morphologische und biochemische Analyse dieser Form, die zu neuen therapeutischen Ansatzmöglichkeiten im meningoenzephalitischen Stadium führen könnte, bleibt Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

5. Literaturverzeichnis

Bafort JM, Schmidt H: *Experimental chronic Trypanosoma brucei rhodesiense infection in microtus montanus*. The American journal of tropical medicine and hygiene 1983; 32:968-75.

Bafort JM, Schmidt H, Molyneux DH: *Development of Trypanosoma brucei in suckling mouse brain following intracerebral injection*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1987; 81:487-90.

Baschong W, Suetterlin R, Laeng RH: *Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM)*. The journal of histochemistry and cytochemistry 2001; 49:1565-72.

Binford C, Connor DH: *Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases- An Atlas*. Armed Forces Institute of Pathology. 1976: Washington.

Braakman HM, van de Molengraft FJ, Hubert WW, Boerman DH: *Lethal African trypanosomiasis in a traveler: MRI and neuropathology*. Neurology 2006; 66:1094-6.

Broadhead R, Dawe HR, Farr H, Griffiths S, Hart SR, Portman N, Shaw MK, Ginger ML, Gaskell SJ, McKean PG, Gull K: *Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome*. Nature 2006; 440:224-7.

Bruzzo R, Dubois-Dalcq M, Grau GE, Griffin DE, Kristensson K: *Infectious Diseases of the Nervous System and Their Impact in Developing Countries*. PLoS Pathogens 2009; 5:e1000199.

Camargo EP: *Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit*. Advances in Parasitology 1999; 42:29-112.

Carruthers VB, Cross GA: *High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form Trypanosoma brucei on agarose plates*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1992; 89(18):8818-21.

Cecchi G, Paone M, Franco JR, Fèvre EM, Diarra A, Ruiz JA, Mattioli RC, Simarro PP: *Towards the Atlas of human African trypanosomiasis*. International Journal of Health Geographics 2009; 8:15.

Chen J, Rauch CA, White JH, Englund PT, Cozzarelli NR: *The topology of the kinetoplast DNA network*. Cell 1995; 80:61-69.

Claes F, Vodnala SK, van Reet N, Boucher N, Lunden-Miguel H, Baltz T, Goddeeris BM, Büscher P, Rottenberg ME: *Bioluminescent imaging of Trypanosoma brucei shows preferential testis dissemination which may hamper drug efficacy in sleeping sickness*. PLoS neglected tropical diseases 2009; 3:e486.

Cook GC, Zumla AI: *Manson's Tropical Diseases: Expert Consult*. Saunders; 2003: London.

Cross, GA: *Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei.* Parasitology 1975; 71(3): 393-417.

Cross, GA: *Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly.* Bioessays 1996; 18(4): 283-91.

Davson H, Segal MB: *The effect of some inhibitors and accelerators of sodium transport on the turnover of ²²Na in the cerebrospinal fluid and the brain.* The Journal of physiology 1970; 209: 131-153.

Dönges, J: *Parasitologie: mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen.* 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag; 1988: Stuttgart.

Duszenko M: *Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit.* Biologie in unserer Zeit 1998; 2:72-81.

Engelhardt B, Wolburg H: *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?.* European journal of immunology 2004; 34:2955-63.

Engelhardt B, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H: *Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation.* Microscopy research and technique 2001; 52(1):112-29.

Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, Madeo F, Wesselborg S, Duszenko M: *Prostaglandin D2 induces programmed cell death in Trypanosoma brucei bloodstream form.* Cell Death and Differentiation 2005; 12:335-346.

Galvao-Castro B, Hochmann A, Lambert PH: *The role of the host immune response in the development of tissue lesions associated with African trypanosomiasis in mice.* Clinical and experimental immunology 1978; 33: 12-24.

Goodwin LG: *Pathological effects of Trypanosoma brucei on small blood vessels in rabbit ear chambers.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1971; 65:82-8.

Grab DJ, Gracia-Gracia JC, Nikolskaia OV, Kim YV, Brown A, Pardo CA, Zhang Y, Becker KG, Wilson BA, de A. Lima APC, Scharfstein J, Dumler JS: *Protease Activated Receptor Signaling is Required for African Trypanosome Traversal of Human Brain Microvascular Endothelial Cells.* PLoS neglected tropical diseases 2009; 3:e479.

Guerrant, RL: *Essentials of Tropical Infectious Diseases.* Churchill Livingstone. 2001: New York.

Hemphill A, Lawson D, Seebeck T: *The cytoskeletal architecture of Trypanosoma brucei.* The Journal of parasitology 1991; 77:603-12.

Hewitt R: *Giemsa preparation for staining blood films.* Science 1937; 86(2241):548.

Hof H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*; Thieme Verlag. 2009: Stuttgart.

Ilemobade AA: *Tsetse and trypanosomosis in Africa: the challenges, the opportunities.* Onderstepoort journal of veterinary research 2009; 76(1):35-40.

Jennings FW, Whitelaw DD, Holmes PH, Chizyuka HG, Urquhart GM: *The brain as a source of relapsing Trypanosoma brucei infection in mice after chemotherapy.* International journal of parasitology 1979; 9:381-4.

Kager PA, Schipper HG, Stam J, Majoie CB: *Case Report: Magnetic Resonance Imaging Findings in Human African Trypanosomiasis: A Four-Year Follow-up Study in a Patient and Review of the Literature.* The American journal of tropical medicine and hygiene 2009; 80(6):947-52.

Kayser FH, Böttger EC, Zonkernagel RM, Eckert J, Deplazes P: *Medizinische Mikrobiologie.* Thieme Verlag, 2005: Stuttgart.

Kibona SN, Matemba L, Kaboya JS, Lubega GW: *Drug-resistance of Trypanosoma b. rhodesiense isolates from Tanzania.* Tropical medicine and international health 2006; 11(2):144-55.

Kristensson K, Nygard M, Bertini G, Bentivoglio M: *African trypanosome infections of the nervous system: Parasite entry and effects on sleep and synaptic functions.* Progress in neurobiology 2009; Epub ahead of print.

Lambert PH, Berney M, Kazyumba G: *Immune Complexes in Serum and in Cerebrospinal Fluid in African Trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis.* The journal of clinical investigation 1981; 67:77-85.

Landfear SM, Ignatushchenko M: *The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids.* Molecular and biochemical parasitology 2001; 115:1-17.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG: *A newly revised classification of the protozoa.* The Journal of protozoology 1980; 27:37-58.

Lönnrot K, Metsä-Ketelä T, Molnár G, Ahonen JP, Latvala M, Peltola J, Pietilä T, Alho H: *The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity.* Free radical biology & medicine 1996; 21(2):211-7.

Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ: *Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier.* Trends in Parasitology 2002; 18:17-9.

Lundkvist GB, Sellix MT, Nygard M, Davis E, Straume M, Kristensson K, Block GD: *Clock gene expression during chronic inflammation induced by infection with Trypanosoma brucei brucei in rats.* Journal of biological rhythms 2010; 25(2):92-102.

Masocha W, Robertson B, Rottenberg ME, Mhlanga J, Sorokin L, Kristensson K: *Cerebral vessel laminins and IFN- γ define Trypanosoma brucei brucei penetration of the blood-brain barrier.* The Journal of clinical investigation 2004; 114:689-94.

Mehlhorn H, Piekarski G: *Grundriß der Parasitenkunde.* Spektrum Akademischer Verlag. 2002: Heidelberg.

Mhlanga JD, Bentivoglio M, Kristensson K: *Neurobiology of cerebral malaria and African sleeping sickness.* Brain research bulletin 1997; 44:579-89.

Mott FW: *Histological observations on sleeping sickness and other trypanosome infections.* Reports of Sleeping Sickness Commission 1906; No.VII,5.

Mulenga C, Mhlanga JD, Kristensson K, Robertson B: *Trypanosoma brucei brucei crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model.* Neuropathology and applied neurobiology 2001; 27:77-85.

Na-Bangchang K, Doua F, Konsil J, Hanpitakpong W, Kamanikom B, Kuzoe F: *The pharmacokinetics of eflornithine (alpha-difluoromethylornithine) in patients with late-stage T.b. gambiense sleeping sickness.* European journal of clinical pharmacology 2004; 60:269-78.

Nikolskaia OV, de A. Lima APC, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Fukuma T, Scharfstein J, Grab DJ: *Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease.* The Journal of clinical investigation 2006; 116:2739-47.

Ormerod WE, Hussein MS: *The ventricular ependyma of mice infected with Trypanosoma brucei.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1986; 80:626-33.

Ormerod WE, Venkatesan S: *An amastigote phase of the sleeping sickness trypanosome.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1971; 65:736-41.

Peters W, Gilles HM: Tropical medicine and parasitology. Mosby-Wolfe. 1995: Barcelona.

Philip KA, Dascombe MJ, Fraser PA, Pentreath VW: *Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis.* Annals of tropical medicine and parasitology 1994; 88:607-16.

Poltera AA, Hochmann A, Lambert PH: *Trypanosoma brucei brucei: the response to Melarsoprol in mice with cerebral trypanosomiasis. An immunopathological study.* Clinical and experimental immunology 1981; 46:363-74.

Poltera AA, Hochmann A, Rudin W, Lambert PH: *Trypanosoma brucei brucei: a model for cerebral trypanosomiasis in mice- an immunological, histological and electronmicroscopic study.* Clinical and experimental immunology 1980; 40:496-507.

Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V: *Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial.* Lancet 2009; 374: 56-64.

Priotto G, Kasparian S, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Karunakara U: *Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy for Second-Stage Trypanosoma brucei gambiense Sleeping Sickness: A Randomized Clinical Trial in Congo.* Clinical infectious diseases 2007; 45(11):1435-42.

Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL: *The Trypanosoma brucei flagellum: moving parasites in new directions.* Annual review of microbiology 2009; 63:335-62.

Robays J, Nyamowala G, Sese C, Betu Ku Mesu Kande V, Lutumba P, Van der Veken W, Boelaert M: *High failure rates of melarsoprol for sleeping sickness, Democratic Republic of Congo.* Emerging infectious diseases 2008; 14(6):966-7.

Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CS: *Neuropathology of naturally occurring Trypanosoma evansi Infection of Horses.* Veterinary pathology 2009; 46(2):251-8.

Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2000: New York.

Sanderson L, Dogruel M, Rodgers J, De Koning HP, Thomas SA: *Pentamidine Movement across the Murine Blood-Brain and Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers: Effect of Trypanosome Infection, Combination Therapy, P-Glycoprotein, and Multidrug Resistance-Associated Protein.* The journal of pharmacology and experimental therapeutics 2009; 329(3):967-77.

Sanderson L, Dogruel M, Rodgers J, Bradley B, Thomas SA: *The blood-brain barrier significantly limits eflornithine entry into Trypanosoma brucei brucei infected mouse brain.* Journal of Neurochemistry 2008; 107(4):1136-46.

Schmidt H, Bafort JM: *African trypanosomiasis: Treatment-induced invasion of brain and encephalitis.* The American journal of tropical medicine and hygiene 1985; 34:64-8.

Schmidt H, Bafort JM: *African trypanosomiasis: haematogenic brain parasitism early in experimental infection through bypassing the blood-brain barrier, with considerations on brain trypanosomiasis in man.* Parasitology research 1987; 73:15-21.

Schmidt H: *The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in trypanosoma rhodesiense infected vervet monkeys.* Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology 1983; 399:333-43.

Sternberg JM: *Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response.* Parasite Immunology 2004; 26:469-476.

Schultzberg M, Ambatsis M, Samuelsson EB, Maehlen J, Kristensson K: *Spread of Trypanosoma brucei to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia.* Journal of neuroscience research 1988; 21:56-61.

Shu X, Shaner NC, Yarbrough A, Tsien RY, Remington SJ: *Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits.* American Chemical Society 2006; 45:9639-47.

Spector R, Eells J: *Deoxynucleoside and vitamin transport into the central nervous system.* Federation Proceedings 1984; 43:196-200.

Tetley L, Vickerman K: *Differentiation in Trypanosoma brucei: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat.* Journal of cell science 1985; 74:1-19.

Tuntasuvan D, Mimapan S, Sarataphan N, Trongwongsa L, Intraraksa R, Luckins AG: *Detection of Trypanosoma evansi in brains of the naturally infected hog deer by streptavidin-biotin immunohistochemistry.* Veterinary Parasitology 2000; 87(2-3):223-30.

Tuntasuvan D, Sarataphan N, Nishikawa H: *Cerebral trypanosomiasis in native cattle.* Veterinary Parasitology 1997; 73:357-63.

Vasella E, Boshart M: *High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic Trypanosoma brucei strains in axenic culture.* Molecular and biochemical parasitology 1996; 82(1):91-105.

Watanabe S, Iwamoto M, Suzuki S, Fuchimoto D, Honma D, Nagai T, Hashimoto M, Yazaki S, Sato M, Onishi A: *A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin.* Biology of reproduction 2005; 72(2):309-15.

Wolburg H, Paulus W: *Choroid plexus: biology and pathology.* Acta neuropathology 2010; 119:75-88.

World Health Organization: *A new form of human trypanosomiasis in India. Description of the first humane case in the world caused by Trypanosoma evansi.* Weekly Epidemiological Record 2005; 18;80(7):62-3.

World Health Organization: *Fact sheet N°259.* 2006.

World Health Organization: *Fact sheet N°259.* 2010.

Yun O, Priotto G, Tong J, Flevaud L, Chappuis F: *NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for Trypanosoma brucei gambiense Sleeping Sickness.* PLoS neglected tropical diseases. 2010; 4(5):e720.

Zaman Y: *Atlas of medical parasitology: an atlas of important protozoa, helminths and arthropods.* ADIS Press Australasia Pty Ltd. 1979: Australien.