

Analyse der Gehirninfection bei Schlafkrankheit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Claudia Frey

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Morphologie.....	2
1.1.3 Lebenszyklus.....	4
1.1.4 Bedeutung von <i>Trypanosoma brucei</i> für den Menschen	5
1.1.5 Biochemische und genetische Besonderheiten.....	6
1.2 Medizinische Bedeutung der Gattung <i>Trypanosoma brucei</i>	13
1.2.1 Entdeckung und Geschichte der Schlafkrankheit.....	13
1.2.2 Epidemiologie.....	15
1.2.3 Krankheitsverlauf.....	17
1.2.4 Diagnostik.....	19
1.2.5 Therapie	22
1.2.6 Prophylaxe und Kontrolle	25
1.3 Gehirninfection.....	26
1.3.1 Neuropathogenese.....	26
1.3.2 Eintritt ins Gehirn: Blut-Hirn-Schranke vs. Blut-Liquor-Schranke.....	28
1.3.3 Lokalisation der Trypanosomen im Gehirn	33
1.3.4 Zirkadiane Rhythmusveränderungen.....	34
1.3.5 Zytokinbeteiligung.....	35
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	36
2. MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1 Material	37
2.1.1 Verwendete Organismen.....	37
2.1.2 Chemikalien.....	38

2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.4 Chirurgische Instrumente	41
2.1.5 Kits	41
2.1.6 Primer.....	42
2.1.7 Laborgeräte	42
2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen	44
2.1.9 Software und Datenbanken	51
2.1.10 Liquor.....	52
2.2 Methoden.....	52
2.2.1 Kultivierung von Trypanosomen	52
2.2.2 Färbemethoden	55
2.2.3 Methode zur Isolierung von Gehirntrypanosomen aus Ratten.....	56
2.2.4 Methode zur Gehirnentnahme aus Ratten für TEM-Aufnahmen	56
2.2.5 Rasterelektronenmikroskopie	57
2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie.....	57
2.2.7 RTq-PCR: Gehirnkartierung	58
2.2.8 Quantum dots.....	60
2.2.9 Statistik.....	60
3. ERGEBNISSE.....	61
3.1 Isolierung von Trypanosomen aus dem Gehirn	61
3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Trypanosomen aus dem Gehirn	62
3.2.1 Lichtmikroskopische Bilder von Trypanosomen aus dem Gehirn	62
3.2.2 DAPI-Färbung.....	63
3.2.3 Quantitative Erfassung verschiedener Trypanosomenformen (LM).....	64
3.3 Rasterelektronenmikroskopie der Trypanosomen (Gehirn)	65
3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Trypanosomen (Gehirn). 65	
3.3.2 Quantitative Erfassung verschiedener Trypanosomenformen (REM)..	67

3.4 Transmissionselektronenmikroskopische Bilder	69
3.4.1 TEM-Bilder: isolierte Trypanosomen aus dem Gehirn von Ratten.....	69
3.4.2 TEM-Bilder: Gewebeschnitte aus Rattengehirnen.....	69
3.5 Kartierung eines Rattengehirns entsprechend der Trypanosomendichte	75
3.6 Kultivierung von AnTat 1.1 in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF).....	79
3.7 Vorversuche: Quantum dots und Trypanosomen.....	81
4. DISKUSSION	84
4.1 Verwendetes Modell zur Darstellung der Hirninfektion	84
4.2 Weg der Trypanosomen ins Gehirn	84
4.3 Verlauf der Hirninfektion	90
4.4 Morphologie und Besonderheiten der Gehirntrypanosomen.....	91
4.5 Hirninjektion mit fluoreszierenden Trypanosomen	92
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. LITERATURVERZEICHNIS	96
7. VERÖFFENTLICHUNGEN.....	106

Abkürzungsverzeichnis

AnTat	<i>Antwerpen Trypanozoon antigenic type</i>
BDMA	Benzyldimethylamin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BMEC	<i>Brain microendothelial cell</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CATT	<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
CVO	<i>Circumventricular Organs</i>
CXCL	<i>CXC motif ligand 1</i>
DALY	<i>disability adjusted life years</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DB 289	2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleat
DDSA	<i>DodecenyI-succinic-anhydrid</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DFMO	Difluoromethylornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ES	<i>Expression site</i>
ESAG	<i>Expression site associated genes</i>
FBS	Fötales bovines Serum
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HAT	Humane afrikanische Trypanosomiasis
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HMI-9	<i>Hirumi's modified Iscove's medium</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
KDNA	Kinetoplasten-DNA

LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
med-RNA	<i>Miniexon derived RNA</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MNA	Methylnadicanhydrid
n/a	<i>not available</i>
NECT	<i>Nifurtimox Eflornithin Combination Therapy</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGD	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTRE	<i>Post-treatment reactive encephalitis</i>
RN	<i>Rattus norvegicus</i>
RTq-PCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i>
T. b.	<i>Trypanosoma brucei</i>
tbAOX	Trypanosomenspezifische alternative Oxidase
TDB	<i>Trypanosoma dilution buffer</i>
TLTF	<i>Trypanosome-derived lymphocyte triggering factor</i>
UAc	Uranylacetat
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
YLD	<i>Years lived with disability</i>
YLL	<i>Years of life lost</i>

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 *Trypanosoma brucei*

1.1.1 Taxonomie

Trypanosomen sind eukaryontische Parasiten, die zu den *Euglenozoa* gehören (siehe Abbildung 1). Der Stamm der *Euglenozoa* umfasst geißeltragenden Protozoen, die allesamt weltweit verbreitet sind. Taxonomisch gehören die Trypanosomen zu der Ordnung der *Kinetoplastida*. Die Organismen dieser Ordnung haben die gemeinsame Besonderheit von ringförmiger DNA innerhalb eines singulären Mitochondriums, dem sogenannten Kinetoplast [1]. Die weitere systematische Einordnung der Kinetoplasten basiert auf morphologischen Charakteristika und Eigenheiten ihres Lebenszyklus. Sie untergliedern sich in die Familie der *Trypanosomatidae* und der Familie der *Bodonidae*. Während die phylogenetisch eng mit den *Trypanosomatidae* verwandten *Bodonidae* zwei Flagellen besitzen, sind *Trypanosomatidae* Monoflagellaten, die sich auch in der Organisation ihrer Kinetoplasten von den *Bodonidae* unterscheiden. Ihr Kinetoplast setzt sich aus vielen einzelnen *Minicircles* und einigen *Maxicircles* zusammen [2].

Die *Trypanosomatidae* leben im Unterschied zu den *Bodonidae* ausschließlich parasitär in Vertebraten und Intervertebraten [3]. Die sich aus den *Trypanosomatidae* ableitenden Gattungen werden anhand morphologischer Kriterien, wie beispielsweise der relativen Position von Kern, Kinetoplast und gesamter Körperform differenziert. Intervertebraten können für die verschiedenen Gattungen entweder Wirt (*Crithidia*, *Leptomonas*) oder Vektor (*Trypanosoma*, *Leishmania*) sein [3]. Die Gattung der *Trypanosoma* wird in zwei große Gruppen unterteilt: Die Sektion der *Stercoraria*, die sich im Insektendarm vermehrt und durch infektiösen Kot verbreitet wird, sowie die Gruppe der *Salivaria*, die beim Biss eines blutsaugenden Insekts übertragen wird [4]. Medizinisch bedeutendster Vertreter der *Stercoraria* ist die Art *Trypanosoma cruzi*, der Erreger der Chagas Krankheit. Im Fokus dieser Doktorarbeit steht jedoch *Trypanosoma brucei* (T. b.) mit Unterarten, die den *Salivaria* zugehörig sind. *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei gambiense*

1. Einleitung

sind ursächlich für die Schlafkrankheit. *T. b. rhodesiense* und der nicht humanpathogene Erreger *T. b. brucei* sind genetisch sehr ähnlich, während sich *T. b. gambiense* genetisch deutlich von den beiden anderen Unterarten unterscheidet.

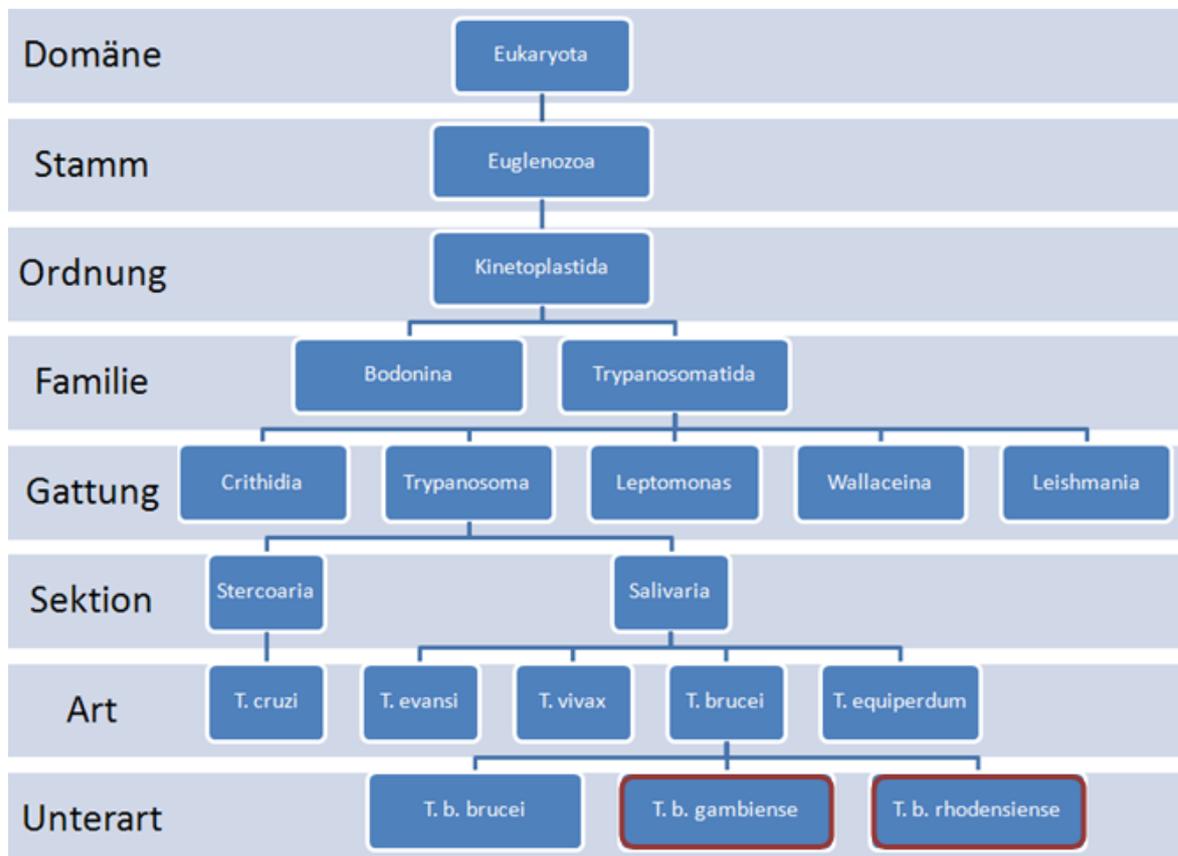


Abbildung 1: phylogenetischer Stammbaum der *Trypanosoma brucei*

1.1.2 Morphologie

Afrikanische Trypanosomen besitzen einen spindelförmigen Zellkörper und werden 18-20 µm lang und etwa 3 µm breit [5]. Nach dieser typischen Form benannte der ungarische Arzt David Gruby 1843 die Gattung *Trypanosoma*: griechisch *trypano* = Bohrer und *soma* = Körper. Während ihres Lebenszyklus verändern sich die Trypanosomen nicht nur stoffwechselphysiologisch, sondern auch morphologisch. Hierbei variiert beispielsweise die Lage des Zellkerns im Verhältnis zur Geißel. Trypanosomen haben eine Zuggeißel, deren freies Ende das Flagellum die Vorderseite des Parasiten bildet. Epimastigote Formen in der

1. Einleitung

Fliege haben den Ursprung der Geißel in der Zellmitte vor dem Nucleus. Bei den trypomastigoten Formen entspringt die Geißel am Zellende hinter dem Kern (siehe Abbildung 2).

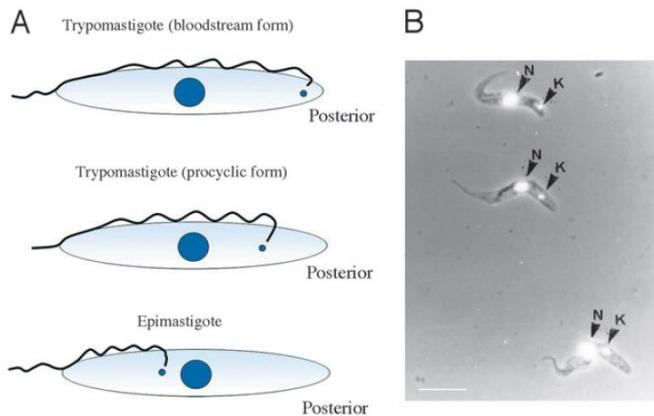


Abbildung 2: Zelluläre Formen von *Trypanosoma brucei* [6]. Schematisch wird in Abbildung 2 (A) die veränderte Position des Geißelursprungs/Kinetoplasts in Bezug auf den Kern im Verlauf des Lebenszyklus dargestellt. Im Phasenkontrastbild (B) sind DAPI gefärbte Trypanosomen zu sehen, die sich gerade von der Blutform in die prozyklische Formen differenzieren [6].

Die Geißel ist mit der Zelloberfläche über desmosomenartige Strukturen (*Macula adherentes*) verbunden, so dass sich lichtmikroskopisch das Bild einer undulierenden Membran zeigt.

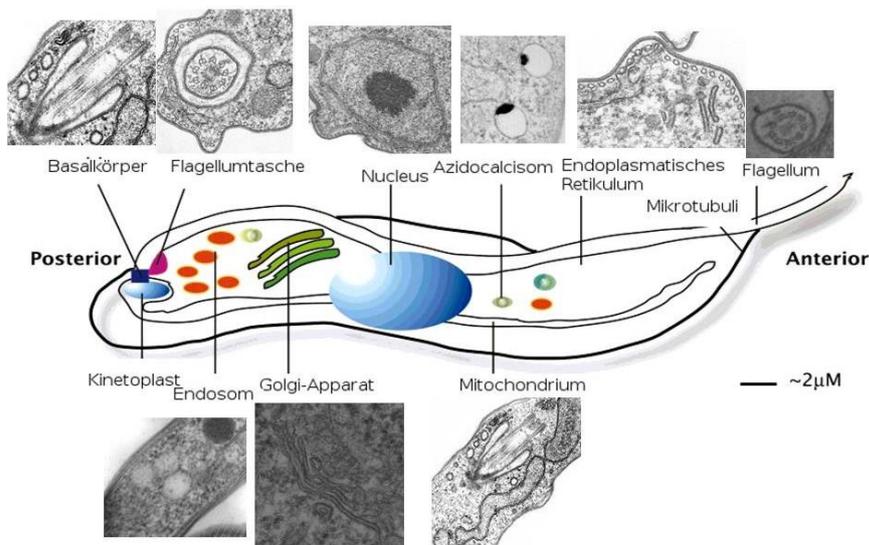


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Trypanosoms (Skizze nach Field et al. [5], EM-Bilder Labor Duszenko). Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung der wichtigsten Organellen und deren intrazelluläre Lokalisation. Beispielhaft sind transmissionselektronenmikroskopische Bilder zu den schematisch gezeichneten Organellen zu sehen.

1. Einleitung

einen VSG (*variant surface glycoprotein*)-Mantel, der die Population vor dem Immunsystem schützt. Stoffwechselphysiologisch sind die Blutformen auf die Glycolyse angewiesen. In der Wachstumsphase der Parasitämie überwiegt die proliferative *slender* Form, während sich am Parasitämiepeak ein Teil der Parasiten in die teilungsinaktive *short stumpy* Form umwandelt [9]. Die *stumpy* Form ist durch einen partiell ausgebildeten Citratzyklus an die Tsetse-Fliege präadaptiert und wird entweder bei der Blutmahlzeit von der nächsten Fliege aufgenommen oder geht in Apoptose [10]. Neben der Präadaption an die Fliege dient die Umwandlung von der *slender* in die *stumpy* Form auch der Reduktion der Parasitendichte und verlängert so das Überleben des Wirts [6]. Gelangt die *stumpy* Form in ein kropfähnliches Organ der Tsetse-Fliege (*Proboscis*), wird der VSG-Mantel durch einen Oberflächenmantel aus Procyclin ersetzt und der Energiestoffwechsel erfolgt hauptsächlich über die Atmungskette. Diese sogenannte prozyklische Form teilt sich und wandert schließlich in die Speicheldrüse der Fliege, wo sie zur epimastigoten Form transformiert. Über das Flagellum an der Speicheldrüsenwand angeheftet, teilen sich die Trypanosomen bevor sie ins letzte Fliegenstadium eintreten. Die nun folgende infektiöse, metazyklische Form ist durch einen VSG-Mantel präadaptiert an den Blutkreislauf eines neuen Wirts. Der gesamte Entwicklungszyklus in der Fliege dauert 25-50 Tage und der Vektor bleibt lebenslang infiziert [11].

1.1.4 Bedeutung von *Trypanosoma brucei* für den Menschen

Drei Unterarten der Gattung *Trypanosoma brucei* haben eine Bedeutung für den Menschen: *T. b. rhodesiense* und *gambiense* als Erreger der Schlafkrankheit und *T. b. brucei* (Wirtstiere: Rinder, Schweine, Ziegen und Schafe) als Auslöser der Naganaseuche. Die Unterart *T. b. brucei* ist nicht humanpathogen, da Menschen durch ein Protein der HDL-Fraktion geschützt sind. Dennoch verursacht dieser Parasit einen volkswirtschaftlichen Schaden von 1,5 Milliarden US-Dollar pro Jahr [12]. Auch die Depopulation fruchtbarer Landstriche, die von der Tsetse-Fliege besiedelt sind, ist dem wirtschaftlichen Aufschwung Afrikas im Wege [13].

1. Einleitung

1.1.5 Biochemische und genetische Besonderheiten

1.1.5.1 Energiestoffwechsel (Glycosom)

Die Glycolyse, die bei allen anderen Zellen im Cytosol abläuft, ist in Kinetoplastiden in einem spezialisierten Organell, den sogenannten Glycosomen, lokalisiert. Es ist ein peroxisomen-ähnliches Organell, das auch einige Stoffwechselwege enthält, die normalerweise in Peroxisomen lokalisiert sind. Ferner ist die Morphologie der Glycosomen den Peroxisomen ähnlich. Elektronenmikroskopisch handelt es sich um kleine elektronendichte Vesikel, die von einer einfachen Membran umgeben sind. Die Blattform von *Trypanosoma brucei* ist essentiell auf den Energiegewinn durch die Glycolyse angewiesen. Die Bedeutung der Glycolyse für diese Organismen wird dadurch verdeutlicht, dass die Glycosomen 4,3% des gesamten Zellvolumens bei *Trypanosoma brucei* ausmachen und es pro Zelle ungefähr 230 Glycosomen gibt [14, 15]. Im Glycosom sind neun Enzyme der Glycolyse (von der Hexokinase bis zur Phosphoglyceratkinase) lokalisiert. Die frühere Hypothese, dass die Kompartimentierung eine höhere Effizienz der Glycolyse gewährleistet, wurde in computerbasierten Experimenten weitgehend revidiert. Stattdessen ist die Kompartimentierung wahrscheinlich notwendig, um Enzyme und Metaboliten des Cytosols und des Glycosoms strikt zu trennen [16-18].

1.1.5.2 Trypanothion

Der Redoxmetabolismus, der die Trypanosomen vor reaktiven Sauerstoffspezies schützt, unterscheidet sich von den Mechanismen anderer eukaryontischer Zellen. Trypanosomen besitzen keine Katalase und keine Glutathionperoxidase. Oxidative Entgleisung wird durch ein glutathionähnliches Molekül verhindert: das Trypanothion. Beim Trypanothion sind zwei Glutathiontripeptide über ein Spermidin verbunden. Der Redoxmechanismus verläuft ebenfalls durch Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke [19]. Die Tryparedoxinperoxidase detoxifiziert Peroxide und wird durch Tryparedoxin

1. Einleitung

regeneriert. Das Trypanothion reduziert das oxidierte Tryparedoxin und wird selbst unter NADPH-Verbrauch durch die Trypanothionreduktase wieder regeneriert (siehe Abbildung 5) [20].

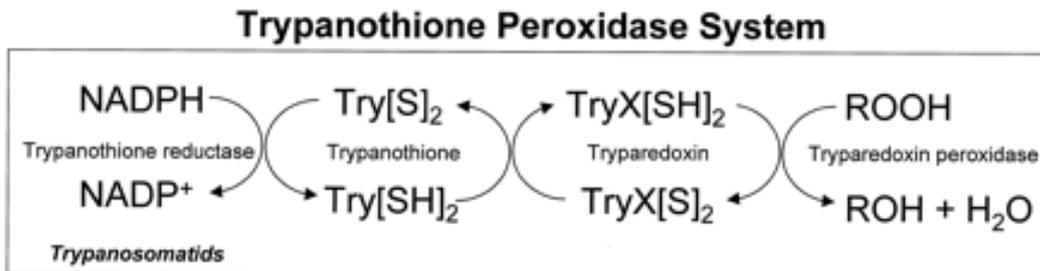


Abbildung 5: Schema des Trypanothion-Reduktase-Systems [21]

1.1.5.3 VSG-Antigenvariation

Antigenvariation bei Trypanosomen wurde erstmals 1905 von Franke beschrieben. Aufgrund seiner Beobachtung, dass im Blut von Infizierten zeitgleich Trypanosomen und trypanosomenspezifische Antikörper vorliegen, schlussfolgerte er, dass Trypanosomen einen Mechanismus besitzen müssen, mit dessen Hilfe sie der Opsonierung entgehen. Fünf Jahre später beschrieben Ross und Thomson die typisch wellenförmig verlaufende Parasitämie (siehe Abbildung 6) [22]. Auf ihr Diagramm beziehen sich noch heute die meisten Lehrbücher.

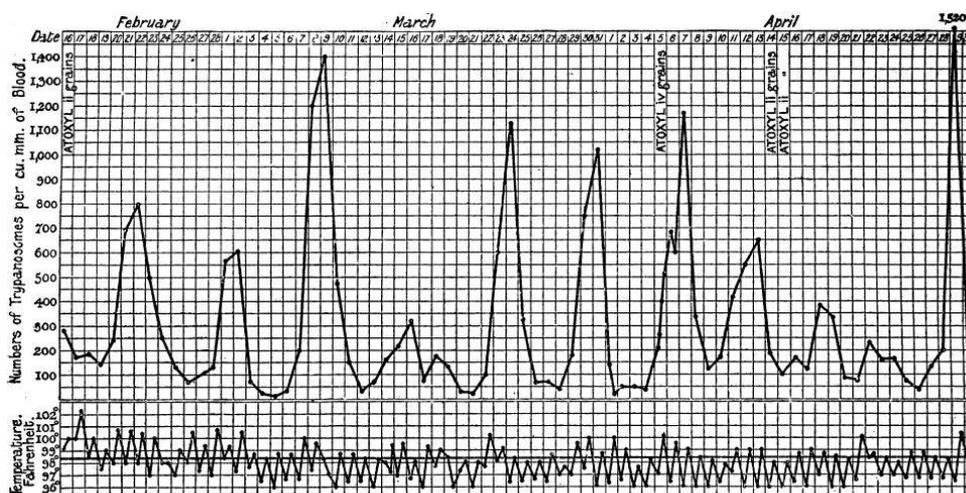


Abbildung 6: Parasitendichte im Blut (Mensch) [22]

1. Einleitung

Vickerman entdeckte 1970, dass es sich bei diesem Mechanismus um einen Proteinmantel mit variantem Antigen handelt [23]. Charakterisiert wurde das variante Protein dann 1975 von Cross [24].

Antigene Variation wird nicht nur von Trypanosomen, sondern auch von anderen Protisten, Viren und Bakterien genutzt, um dem Immunsystem zu entkommen. Dennoch ist das Ausmaß der Antigenvariation bei Trypanosomen einzigartig. Bei Trypanosomen ist das variante Antigen das stark immunogene *variant surface glycoprotein* (VSG).

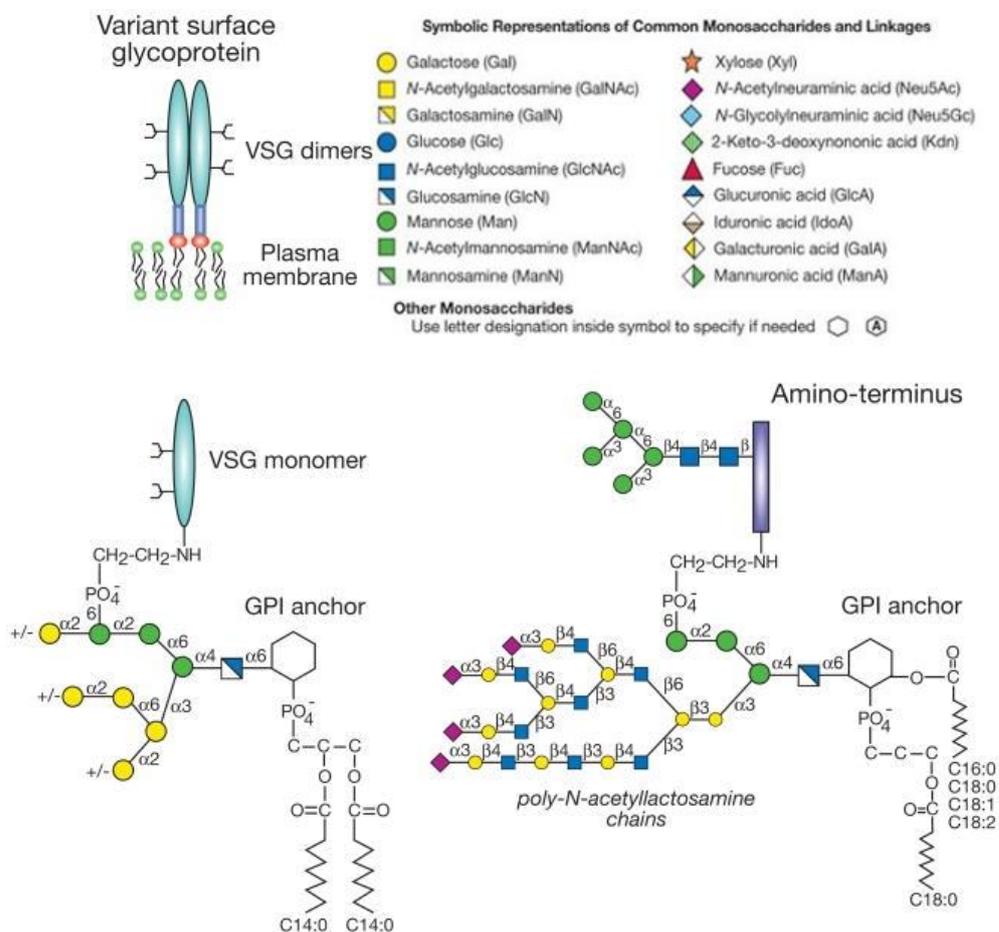


Abbildung 7: VSG Molekülaufbau modifiziert nach Varki et al. [25]

VSG ist ein Homodimer aus zwei Proteinen mit je 55 kDa Masse. Das variable n-terminale Ende ist für das Immunsystem zugänglich und besteht aus 300-350 Aminosäuren, wohingegen das aus 100 Aminosäuren bestehende

1. Einleitung

c-terminale Ende konserviert ist. Das c-terminale Ende ist an einen GPI-Anker gebunden, der das gesamte Molekül in der Membran verankert (siehe Abbildung 7).

Circa 10^7 VSG-Moleküle bedecken die gesamte Oberfläche eines Trypanosoms und schützen so die invarianten Antigene der Zellmembran vor Antikörpererkennung [26]. Beim Biss der Fliege gelangt eine Trypanosomenpopulation mit etwa 20 verschiedenen VSG-Varianten ins Blut. Aus dieser Population wachsen klonal Parasiten mit einheitlichem VSG hoch [27]. Gegen VSG können nach 5-10 Tagen IgM-Antikörper gebildet werden, aber bis dahin haben einige Parasiten ihren Proteinmantel bereits wieder gewechselt. Dieser repetitive Vorgang aus Dezimierung der antikörpermarkierten Parasiten durch Makrophagen und erneutem klonalen Hochwachsen der Parasiten mit neuem VSG-Mantel, ergeben zusammen mit der Dichteregulation der Parasiten den klinischen Effekt einer wellenförmigen Parasitämie (siehe Abbildung 6). VSG-*switching* gewährleistet eine persistente Infektion und ein permanentes Entkommen vor dem Immunsystem. VSG verhindert zudem die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs. Die Antigenvariation ist unabhängig von der Immunantwort des Wirts und ein zufälliger Prozess, der durchschnittlich bei einem von 20 000 Trypanosomen pro Generation auftritt [26]. Im Trypanosomengenom existiert ein großes Archiv an VSG-Genen: Ein VSG-Gen in der *expression site* (ES), mehrere stille VSG-Gene ohne Promotor und viele inkomplette Pseudogene. Die Parasiten haben rund 1600 VSG-Varianten zur Verfügung [28]. Die gerade exprimierte VSG-Variante ist in einer sogenannten aktiven ES lokalisiert. Die ES ist eine polycistronische Transkriptionseinheit, die neben dem am Telomer gelegenen VSG-Gen auch andere *expression site associated genes* (ESAG) enthält. Zur Antigenvariation stehen Trypanosomen transkriptive und rekombinante Mechanismen zur Verfügung:

1. Genkonversion

Ein stilles VSG-Gen wird kopiert, in die aktive ES transferiert und ersetzt dort das gerade exprimierte VSG.

1. Einleitung

2. Reziproker VSG Austausch am Telomerende

Ein eher seltenes Ereignis, bei dem die Chromosomenenden ausgetauscht werden (*cross over*) [29].

3. Kombination von Pseudogenen

Aus Pseudogenen werden intakte VSG-Gene mosaikartig zusammengesetzt [30]. Die große Anzahl der Pseudogene lässt Rückschlüsse auf deren Bedeutung für die Antigenvariation zu [31].

Alternativ zur Rekombination ermöglichen circa 15 ES im Trypanosomengenom transkriptionales *switching*. Für die Antigenvariation erscheint dieser Mechanismus im Hinblick auf die Vielzahl von Möglichkeiten, die die Rekombination bietet, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die unterschiedlichen ES ermöglichen es jedoch, verschiedene ESAGs zu aktivieren. Dies könnte die Adaption an den Wirt erleichtern. So können z.B. je nach Wirt verschiedene Transferrinrezeptoren exprimiert werden [32]. Ob verschiedene Transferrinrezeptoren für die Anpassung an verschiedene Wirte tatsächlich notwendig sind, wird noch diskutiert [33]. Denkbar wäre auch, dass die verschiedenen ES als Ersatz fungieren, falls beispielsweise ein falsch zusammengesetztes Pseudogen in die aktive ES transferiert wird. Diese molekularen Vorgänge des Antigen-*switching* laufen nicht zufällig ab, sondern folgen im Infektionsverlauf einer gewissen Hierarchie (siehe Abbildung 8).

Beobachtungsstudien lassen vermuten, dass die Transkription als VSG-*switching* Methode am Anfang der Infektion steht, wohingegen die Rekombination während des gesamten Infektionsverlaufs zu beobachten ist. Auch die Lokalisation der aktiven VSG-Gene verändert sich im Laufe der Infektion. Werden zunächst vor allem stille Gene der Telomerregion aktiviert, die über ihre homologen *Flanks* in die aktive ES übertragen werden, so dominiert im späteren Infektionsverlauf die Rekombination von subtelomeren, intakten VSG-Genen. Erst spät im Infektionsgeschehen werden zunehmend auch Pseudogene in die aktive ES transferiert; hierfür wird die Homologie der *open reading frames* genutzt [34].

1. Einleitung

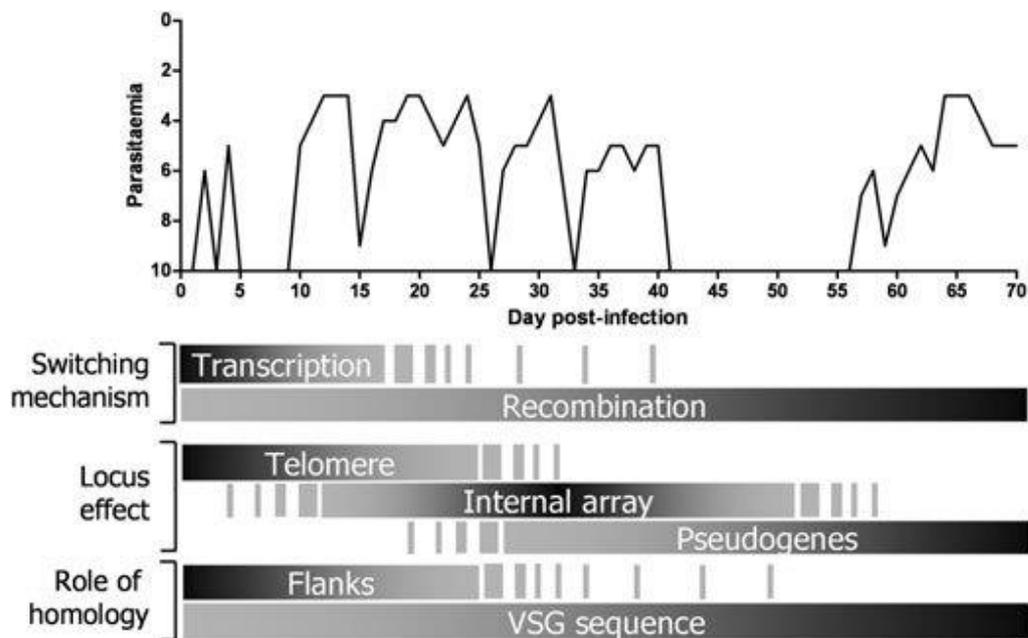


Abbildung 8: Hierarchie der Antigenvariation [34]. In Abbildung 8 ist die wellenförmige Parasitämie einer Kuh über einen Zeitraum von 70 Tage in Beziehung zu den Antigenvariationsmechanismen gesetzt.

Welcher Mechanismus genau die Antigenvariation initiiert, ist derzeit noch Gegenstand des Forschungsinteresses. Anzunehmen ist, dass Doppelstrangbrüche eine Rolle spielen. Boothroyd et al. konnten zeigen, dass sich durch die Induktion von Doppelstrangbrüchen bei *T. brucei* die *switching*-Rate um das 250fache steigern ließ [35].

1.1.5.4 Diskontinuierliche Transkription und *RNA-editing*

Die VSG-Gene von Trypanosomen sind polycistronisch organisiert. Bei der Transkription werden die einzelnen mRNA-Moleküle aus der prä-mRNA geschnitten und dann durch *trans-splicing* weiter prozessiert. Im Gegensatz zum *cis-splicing*, das in fast allen eukaryontischen Zellen dazu dient, zwei Exons nach dem Entfernen des Introns wieder miteinander zu verbinden, handelt es sich beim *trans-splicing* um einen Vorgang, bei dem zwei Exons von unterschiedlichen RNAs verknüpft werden. Bei Trypanosomen wird die geschnittene mRNA mit der med-RNA (*miniexon-derived RNA*) verbunden. Die med-RNA stammt von sogenannten Miniexongenen, die als *Cluster* im

1. Einleitung

Trypanosomengenom vorliegen. Dieser posttranskriptionelle Prozess findet sich v.a. bei Kinetoplastiden und Nematoden, konnte aber auch beim Menschen nachgewiesen werden [36].

RNA-*editing* ist eine weitere molekularbiologische Besonderheit der Trypanosomen (siehe Abbildung 9). Dieser Prozess findet nur im Mitochondrium der Protozoen statt und ist für die Parasiten essentiell. Das mitochondriale Genom besteht aus 20-50 *maxicircles* und mehrere tausend *minicircles*, die ineinander verschlungen sind und zusammen als Kinetoplasten-DNA (kDNA) bezeichnet werden. Posttranskriptional werden die mitochondrial codierten Proteine mithilfe von *guide*-RNA modifiziert. Die Enzyme sind auf den *maxicircles* codiert, während die *guide*-RNA auf den *minicircles* lokalisiert ist.

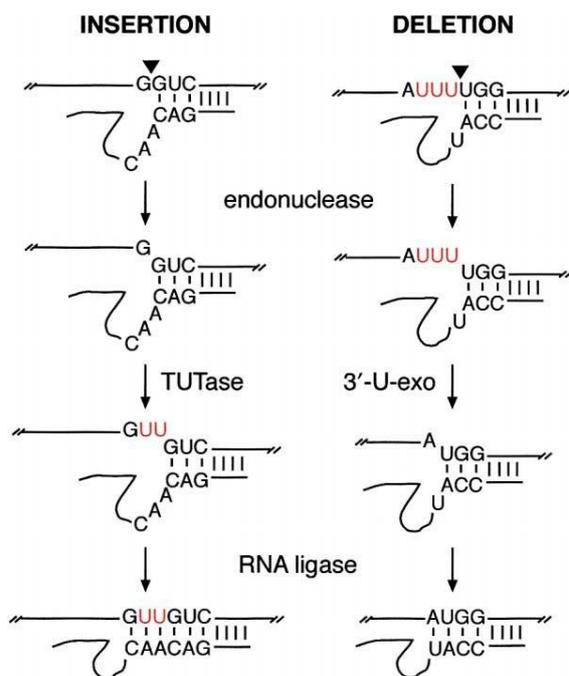


Abbildung 9: Enzymkaskade des RNA-editings: In Abbildung 9 wird modellhaft die enzymatische Kaskade des RNA-editings gezeigt. Zunächst wird zwischen der *guide*-RNA und der mRNA ein Anker-Komplex aus 10-15 Basenpaaren gebildet. Dieser doppelsträngige Komplex wird dann von einer Endonuclease erkannt, die am 3' Ende des ersten ungepaarten Basenpaares die mRNA schneidet. Anschließend können Uridylreste entweder mithilfe der *terminal uridylyl transferase* (TUTase) eingefügt werden oder eine Uridylspezifische Exonuclease schneidet sie aus der mRNA aus. Abschließend verbindet eine RNA-Ligase die beiden Enden der mRNA [37].

1. Einleitung

1.2 Medizinische Bedeutung der Gattung *Trypanosoma brucei*

Nur zwei der *Brucei*-Unterarten sind humanpathogen: *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense*. Diese Parasiten sind ursächlich für die Schlafkrankheit, die auch humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT) genannt wird. Die Schlafkrankheit zeigt je nach Erreger zwei unterschiedliche klinische Phänotypen. Die Infektion mit *T. b. gambiense* verläuft chronisch und es kann Monate bis Jahre dauern, bis sich ausgeprägte Symptome entwickeln. Die anfangs fehlenden beziehungsweise schwachen Symptome erschweren es, die Erkrankung rechtzeitig zu erkennen. Meist ist bei Diagnosestellung die Krankheit schon sehr weit fortgeschritten, das ZNS betroffen und eine kurative Therapie selten erfolgreich. Vektor dieser Trypanosomenunterart ist *Glossina palpalis* (auch *Glossina fuscipes*), deren Habitat Flüsse mit baumreichen Ufern sind. Hauptwirt von *T. b. gambiense* ist der Mensch, jedoch können auch Nutz- und Haustiere als Nebenwirte dienen (siehe Abbildung 10). *T. b. rhodesiense*-Infektionen verlaufen hingegen akut und mit stärker ausgeprägter Symptomatik. Hauptsächlich sind Wildtiere in der Savanne mit *T. b. rhodesiense* infiziert. Der Mensch überlebt eine Infektion mit dieser Unterart nur wenige Wochen bis Monate. Übertragen wird die rhodesische Form der Schlafkrankheit über die Tsetse-Fliege *Glossina morsitans* [38].

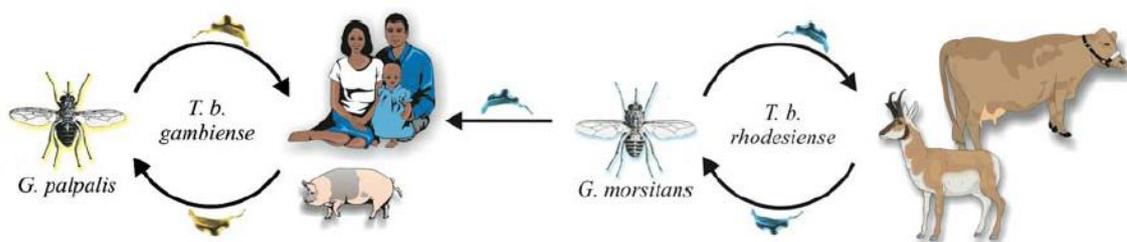


Abbildung 10: Transmission und Wirte von *T. brucei* [39]

1.2.1 Entdeckung und Geschichte der Schlafkrankheit

Phylogenetische Analysen zeigen, dass sich die *Salivaria* vor rund 300 Millionen Jahren entwickelten [40, 41]. Erstmals erwähnt wird eine naganaähnliche Erkrankung in einem Papyrus aus dem alten Ägypten im

1. Einleitung

2. Jahrhundert vor Christus. Ein arabisches Geschichtsbuch aus dem Jahre 1372 beschreibt die HAT als Todesursache des Sultans Mansa Djata aus Mali [42, 43]. In Europa war die Schlafkrankheit bis zur Erforschung des afrikanischen Kontinents unbekannt. „*The navy surgeon*“ von 1742, ein Buch von John Atkins, schildert die neurologischen Symptome der Schlafkrankheit. Anfang des 19. Jahrhunderts stellte Winterbottom den Zusammenhang zwischen geschwollener Nackenlymphknoten und der Schlafkrankheit her und erfasste damit erstmals auch Symptome der ersten Phase dieser Krankheit. Dieses typische Symptom wird in der Literatur immer noch als *Winterbottom's sign* bezeichnet. Noch ohne die Parasiten mit der Schlafkrankheit in Verbindung zu bringen entdeckte David Gruby Trypanosomen im Blut von Fröschen und gab ihnen auch ihren Namen. Erst Aldo Castellani konnte Trypanosomen im *cerebrospinal fluid* (CSF) nachweisen und vermutete einen Zusammenhang mit der Schlafkrankheit. Ein Jahr vorher wiesen Ford und Dutton, zwei englische Ärzte, *T. b. gambiense* im Blut von Menschen nach. Einige Jahre später konnten Stephens und Fantham zeigen, dass *T. b. rhodesiense* der Erreger der akuten Form der Schlafkrankheit ist. Eine wichtige Rolle in der Geschichte der HAT spielte Sir David Bruce, ein schottischer Armeearzt, dem es unter anderem 1895 gelang, Trypanosomen als Verursacher der Naganaseuche auszumachen. Darüber hinaus lieferte er einen wesentlichen Beitrag zur Erforschung des Lebenszyklus der Parasiten und konnte erstmals zeigen, dass Tsetse-Fliegen die Krankheit übertragen. Ihm zu Ehren bekam die *Brucei*-Familie ihren Namen. Glaubte Koch noch an eine mechanische Übertragung, konnte F. K. Kleine zeigen, dass es sich um eine zyklische Übertragung handelt.

In der Zeit, als Castellani Trypanosomen als Schlafkrankheitserreger identifizierte, fanden Laveran und Mesnil heraus, dass Natriumarsenat bei Trypanosomeninfektionen in Nagern eine therapeutische Wirkung hat. Das erste kommerziell erhältliche Medikament (Suramin) entwickelte daraufhin Paul Ehrlich 1916. Auf Suramin folgten in den 30er und 40er Jahren Pentamidin und das arsenhaltige Melarsoprol. Das weniger toxische Eflornithin gegen *T. b. gambiense* wurde ab 1992 eingesetzt. All diese Medikamente sind noch heute in Gebrauch [43, 44].

1. Einleitung

Seit dem 19. Jahrhundert gab es mehrere große Epidemien, die erste 1896 bis 1906 mit circa 300 000-500 000 Toten. Zwischen 1920 und 1940 wütete die zweite Epidemie derart, dass sich die Kolonialmächte gezwungen sahen prophylaktische Maßnahmen zu ergreifen. Chemotherapie der Tiere, Hygienemaßnahmen und eine bessere medizinische Versorgung führten daraufhin zu einem fast vollständigen Verschwinden der Schlafkrankheit in den 1960ern und die Krankheit geriet beinahe in Vergessenheit. Durch die chaotischen Zustände in Afrika als Folge der Loslösung von den Kolonialmächten, kehrte die HAT jedoch mit voller Wucht zurück und erreichte 1990 ihren Höhepunkt. Die WHO intervenierte daraufhin mit nationalen Kontrollprogrammen. Seitdem befindet sich die Schlafkrankheit wieder auf dem Rückzug [40, 45].

1.2.2 Epidemiologie

Die Schlafkrankheit tritt nur in Afrika auf und hier vor allem im sogenannten Tsetse-Gürtel, der südlich der Sahara liegt und Habitat der Tsetse-Fliegen ist (siehe Abbildung 11).

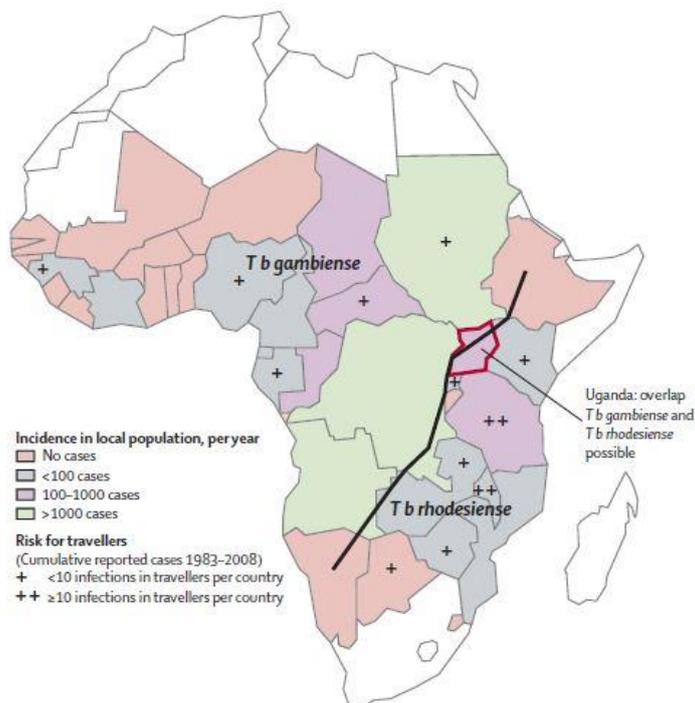


Abbildung 11: Geografische Verteilung der HAT [45]

1. Einleitung

Von der humanen afrikanischen Trypanosomiasis sind 36 afrikanische Länder betroffen. In 24 Ländern im Westen und in Zentralafrika herrschen *Gambiense*-Infektionen vor, während in 13 Ländern Süd- und Ostafrikas fast ausschließlich *T. b. rhodesiense* verbreitet ist.

Die Schlafkrankheit ist insbesondere ein Problem der armen, ländlichen Bevölkerung Afrikas. Politische Instabilität und Bürgerkriege führen zu Völkervertreibung in Gebiete, die vorher aufgrund von großen Tsetse-Fliegenpopulationen gemieden wurden. Die geografische Ausdehnung dieser Gebiete verändert sich fortwährend und wird wesentlich durch den Klimawandel beeinflusst.

Die Inzidenz der gemeldeten Fälle liegt derzeit erstmals seit 50 Jahren unter 10 000 Fällen pro Jahr, geschätzt werden jedoch etwa 30 000 Fälle/Jahr (Stand WHO, 2009). Im Zeitraum von 1999 bis 2008 sank die Zahl der *gambiense*-Infektionen um 68% und die Zahl der *rhodesiense*-Erkrankungen um 58%. Diese positive Entwicklung ist dem neuen WHO Kontrollprogramm zu verdanken. Eine *T. b. gambiense*-Infektion führt durchschnittlich nach drei Jahren zum Tod, eine Infektion mit *T. b. rhodesiense* endet im Mittel schon nach sechs Monaten tödlich. 95% der gemeldeten Fälle sind mit *T. b. gambiense* assoziiert und nur 5% mit *T. b. rhodesiense*. Lokale Brennpunkte der Schlafkrankheit sind vor allem Kongo, Angola und Zentralafrika, die 2008/2009 als einzige afrikanische Länder noch über 1000 neue Fälle pro Jahr meldeten. Besonders im Kongo ist die Situation prekär. 70% aller statistisch erfassten Fälle in den letzten 10 Jahren wurden dort gemeldet [12]. Welche Bedeutung eine Krankheit für eine Gesellschaft hat und welche Beeinträchtigungen sie für das alltägliche Leben mit sich bringt, lässt sich durch DALY (= *disability adjusted life years*) erfassen. Ein DALY entspricht einem verlorenen Lebensjahr und setzt sich aus der Summe von YLL (= *years of life lost*) und YLD (= *years lived with disability*) zusammen. So wird nicht nur die Lebensverkürzung einer Krankheit miteinbezogen, sondern auch die Lebensjahre mit einer Behinderung gewichtet [46]. 2001 rangierte die Schlafkrankheit mit 1,59 Millionen DALYs deutlich vor der Chagaskrankheit (680 000 DALYs) aber weit hinter Malaria (40 Milliarden DALYs) [13].

1. Einleitung

Die Schlafkrankheit wird hauptsächlich durch *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* verursacht. Jedoch gibt es einen Fallbericht aus Indien, der eine Infektion eines Bauerns mit *T. evansi* beschreibt. Der Patient litt unter rezidivierenden Fieberschüben über fünf Monate, die mit Suramin erfolgreich behandelt werden konnten. Übertragen wurden die Parasiten wahrscheinlich durch das Blut eines infizierten Tieres [47].

1.2.3 Krankheitsverlauf

Die Schlafkrankheit wird meist über einen biologischen Vektor, die Tsetse-Fliege, übertragen. Selten, aber möglich ist die Infektion im Laboralltag und die Übertragung einer infizierten Mutter auf ihr Kind [11]. Obwohl die Trypanosomen die Plazentaschranke nicht passieren können, kann die Übertragung durch Verletzungen während der Geburt erfolgen. Die Erkrankung lässt sich in zwei Stadien einteilen:

1. Hämatolymphatisches Stadium:

Als lokale Reaktion auf die replizierenden Trypanosomen im Subkutangewebe, deren metabolischen Abfall und den vermehrten Zelldebris kann sich nach 2-5 Tagen ein schmerzloser weicher Schanker an der Einstichstelle bilden. Diesen sogenannten Trypanosomenschanker findet man selten bei *T. b. gambiense*, aber in bis zu 50% der Infektionen mit *T. b. rhodesiense*.



Abbildung 12: *Winterbottom's sign* [48]

1. Einleitung

Die Krankheitssymptome dieses Stadiums sind insbesondere bei *T. b. gambiense* sehr unspezifisch und ähneln einer Grippe. Teilweise vorhanden und typisch für die Schlafkrankheit ist das Winterbottomsches Zeichen (geschwollene Nackenlymphknoten, siehe Abbildung 12).

Eine Infektion mit *T. b. rhodesiense* zeigt im Gegensatz dazu häufig schon im Frühstadium schwerwiegende Symptome, wie Pankarditis, Perikarderguss und Lungenödeme und kann bereits im ersten Stadium zum Tod führen [11, 48].

2. Meningoenzephalisches Stadium:

Parasiten im Liquor sind kennzeichnend für das zweite Stadium der Schlafkrankheit. Bei *T. b. rhodesiense* kann dieses Stadium schon nach wenigen Wochen eintreten, bei einer Erkrankung mit *T. b. gambiense* meist erst nach mehreren Monaten bis Jahren. Charakteristische Symptome sind Verhaltensänderungen, Verwirrung, Enzephalopathie, Koordinationsstörungen (ataktische Dyskinesie), parkinsonähnlicher Tremor, Gewichtsverlust, Sensibilitätsstörungen, endokrine Abnormalitäten und veränderter Schlaf-Wach-Rhythmus bis hin zum Koma. Unbehandelt ist die Schlafkrankheit stets tödlich [48].

Histopathologisch repräsentativ für die Schlafkrankheit ist eine Entzündung der weißen Hirnsubstanz (Leukenzephalitis) mit Demyelinisierung. Charakteristisch ist zudem eine Invasion von Leukozyten und Plasmazellen um Hirngefäße, sogenanntes perivaskuläres *cuffing* (siehe Abbildung 13) [11, 48].

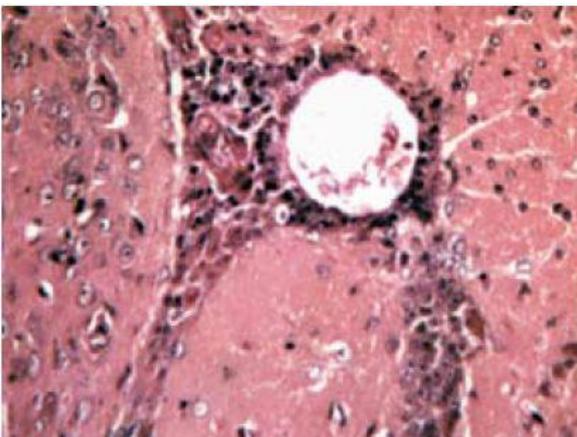


Abbildung 13: perivaskuläres *cuffing* [11]

1. Einleitung

1.2.4 Diagnostik

Eine frühe Diagnose ist entscheidend vor allem im Hinblick auf den ansonsten zwingend tödlichen Ausgang der Schlafkrankheit. Auf dem Weg vom Labor in die praktische und feldtaugliche Diagnostik erschweren jedoch viele Hindernisse einen Durchbruch in der Entwicklung neuer diagnostischer Mittel. Die diagnostische Vorgehensweise lässt sich in drei Schritte gliedern:

1. Screening:

Eine geeignete Screening Methode gibt es derzeit nur für Infektionen mit *T. b. gambiense* [49]. Zunächst wird auf typische klinische Symptome geachtet. Diese sind jedoch zu unspezifisch für eine definitive Diagnose und können nur Hinweise auf eine mögliche Erkrankung liefern. Aufschlussreicher ist der *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT), der 1978 von Magnus et. al. [50] entwickelt wurde. Der CATT ist gut im Feld einsetzbar und leicht zu handhaben. Nachteilig sind jedoch die niedrige Sensitivität (87-98%) und Spezifität (74-95%) [51]. Die mangelnde Spezifität ist unter anderem bedingt durch Kreuzreaktivitäten mit nicht humanpathogenen Trypanosomenarten (*T. congolense*, *T. b. brucei*) und anderen Erkrankungen. Der Test bedarf deshalb einer Diagnosebestätigung, bevor man mit einer nebenwirkungsreichen Therapie beginnt [49].

2. Diagnosebestätigung:

Methode der Wahl ist eine mikroskopische Analyse der Körperflüssigkeiten. Goldstandard ist die Untersuchung des Giemsa gefärbten „dicken Tropfens“, der eine 10-20fache Anreicherung der Erreger im Vergleich zum normalen Blutaussstrich ermöglicht. Liegt die Detektionsgrenze eines normalen Blutaussstrichs bei 10 000 Parasiten/ml, so gelingt es mithilfe des „dicken Tropfens“ 5 000 Parasiten/ml nachzuweisen. Trotzdem können circa 30% der Schlafkranken mit konventionellen Mikroskopietechniken aufgrund einer niedriger bzw. fluktuierender Parasitämie nicht diagnostiziert werden. Eine Optimierungsmaßnahme ist die Konzentrierung der Trypanosomen durch Mikrohämatokritzentrifugation, Minianionenaustauschsäule und quantitative

1. Einleitung

buffy coat Analyse. So können Detektionsgrenzen von bis zu 100 Parasiten/ml erreicht werden [52, 53].

3. Staging:

Im meningoenzephalischen Stadium muss laut WHO eins der folgenden Kriterien erfüllt sein: Parasiten sind im Liquor zu finden, die Leukozyten im Liquor sind erhöht (> 5 Zellen/ μ l) oder die CSF Proteinkonzentration liegt über 25 mg/dl [48, 49]. Das Staging ist wichtig, da sich die Therapie je nach Stadium fundamental unterscheidet. Nur deshalb wird eine risikobehaftete Lumbalpunktion und die damit einhergehende Infektionsgefahr in Kauf genommen.

Mögliche Differenzialdiagnosen der Schlafkrankheit sind Syphilis, Leishmaniose, Malaria, HIV, Tuberkulose, Toxoplasmose, Typhus und Lymphome [11, 54]. Derzeit lassen die Sensitivität und die Spezifität der diagnostischen Mittel sehr zu wünschen übrig. Es besteht ein großer Bedarf an neuer Diagnostik. Hierfür lassen sich in der Literatur einige vielversprechende Ansätze finden. In Erprobung sind im Moment unter anderem trypanosomenspezifische Nanopartikel, die an die konservierte VSG-Region binden [52]. Dies geht mit einer deutlich erhöhten Spezifität einher. Auch auf molekularbiologischer Ebene sind Fortschritte zu verzeichnen. Die Identifizierung trypanosomentypischer Genzielsequenzen wie 18srRNA, ESAG und SRA ermöglichen den Einsatz von molekularen Sonden, PCR und *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Besonders erfolgsversprechend erscheint die LAMP, die der PCR in vieler Hinsicht überlegen ist. Mithilfe der LAMP lässt sich 1 fg DNA nachweisen und ihre Sensitivität ist circa 100fach höher als die einer herkömmlichen PCR. Ein weiterer Vorteil ist die bessere Feldkompatibilität durch die einfachere und unkompliziertere Methodik. Auch verschiedene Biomarker werden derzeit auf ihre Tauglichkeit geprüft. So sollen beispielsweise verschiedene Zytokine und Chemokine im Liquor das Staging erleichtern. Jedoch erhöhen auch andere Erkrankungen (AIDS) die Zytokine und Chemokine im Liquor, so dass die Suche nach einem wirklich spezifischen

1. Einleitung

Biomarker noch nicht beendet ist [52]. Der diagnostische Einsatz des MRTs ist vor allem gewinnbringend für die Differenzierung zwischen einer Trypanosomen-induzierten Enzephalitis und der *post-treatment reactive encephalitis* (PTRE) nach Behandlung mit Melarsoprol und spielt bei der Erstdiagnostik der HAT keine Rolle. Erste Untersuchung der Schlafkrankheit mittels MRT wurden 1989 von Spinazzola im *Lancet* publiziert (siehe Abbildung 14) [55].

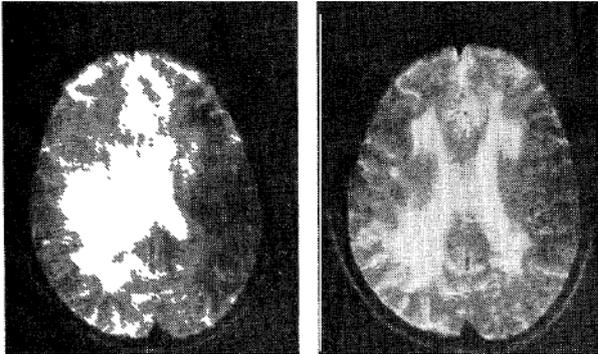


Abbildung 14: T2 gewichtete MRT-Bilder eines HAT-Patienten; links: vor der Therapie mit DFMO, rechts: ein halbes Jahr später, nach der Behandlung mit DFMO [55].

Bei der Trypanosomen-induzierten Enzephalitis sind in der T2-Gewichtung bilateral hyperintense Abnormalitäten der weißen Substanz zu sehen. Häufig ist zusätzlich eine Vergrößerung der Ventrikelräume zu erkennen. Bei der PTRE zeigt sich hingegen ein völlig anderes Bild mit diffuser hämorrhagischer Enzephalitis und zerebralem Ödem. Die Hämorrhagie stellt sich als hypointenses Areal in T2-Bildern dar und ist somit leicht von einer Trypanosomen-induzierten Enzephalitis abzugrenzen. Für die Therapie hat diese Diskriminierung weitreichende Konsequenzen, da bei einer PTRE die Melarsoprolbehandlung sofort durch eine Hochdosistherapie mit Kortikosteroiden ersetzt werden muss. Zur definitiven Diagnose einer Trypanosomen-induzierten Enzephalitis eignet sich das MRT allerdings nicht, da die oben beschriebenen Läsionen recht unspezifisch sind und auch einer anderen Ursache (zerebrale Gliomatosis, Leukenzephalitis, Lymphom, Tuberkulose, etc.) zugrunde liegen können und eine flächendeckende Diagnostik mittels MRT in Afrika nicht vorstellbar ist [56, 57].

1. Einleitung

1.2.5 Therapie

Alle derzeit verfügbaren Therapien sind auf die eine oder andere Weise unbefriedigend: hohe Toxizität, Resistenzbildung, komplizierte Therapieschemata und schlechte Effizienz sind die Probleme der aktuellen Behandlungsmöglichkeiten der HAT. Für die Pharmaindustrie ist die Entwicklung neuer Medikamente für die Schlafkrankheit nicht lohnend. Folglich sind drei der fünf zugelassenen Medikamente über 60 Jahre alt und die beiden neueren Medikamente (Eflornithin und Nifurtimox) waren zunächst für andere Erkrankungen entwickelt worden. Dies spiegelt den Status der Schlafkrankheit als *neglected disease* wieder [58]. Gegenwärtig sind fünf Medikamente zur Behandlung der Schlafkrankheit zugelassen (siehe Tabelle 1) [59].

Tabelle 1: Medikamente gegen HAT

Medikament	Stadium	Parasitenart	Wirkungsweise	Nebenwirkungen
Pentamidin i.m. (Pentamidine [®] , Lomidine [®])	Blutstadium	<i>T. b. gambiense</i>	Unbekannter Wirkmechanismus Wirkungsort Mitochondrium?!	Hypotension Nierenversagen Diabetes mellitus
Suramin i.v. (Germanin [®])	Blutstadium	<i>T. b. rhodesiense</i>	Vielfältige Enzyminhibition	Hypotension Nierenversagen Leberversagen Agranulozytose
Eflornithin i.v. (DFMO) (Ornidyl [®])	Gehirnstadium	<i>T. b. gambiense</i>	Hemmt Ornithin-decarboxylase bzw. die Synthese von Trypanothion	Durchfall Thrombozytopenie Leukopenie Krampfanfälle
Nifurtimox p.o. (Lampit [®])	Gehirnstadium	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	Erzeugt oxidativen Stress	GIT-Beschwerden CNS-Dysfunktion Gewichtsverlust
Melarsoprol i.v. (Arsobal [®] , Mel B [®])	Gehirnstadium	<i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	Hemmt die Glycolyse und den Trypanothionstoffwechsel	Herzinsuffizienz Thrombophlebie Arthralgie Neuropathie Leberversagen GIT-Beschwerden Enzephalitis

1. Einleitung

Weniger als 1% aller neuen Medikamente in den letzten 25 Jahren wurde gegen tropische Parasitenkrankheiten (mit Ausnahme von Malaria) entwickelt. Die Entwicklung des ersten Medikaments gegen die Schlafkrankheit geht auf Paul Ehrlich zurück, der die trypanozide Wirkung von manchen Farbstoffen (Trypanrot) entdeckte. Bayer entwickelte den Farbstoff weiter und schuf so 1921 das erste gut wirksame Medikament Suramin. Suramin besitzt vielfältige Wirkmechanismen, hat jedoch nur eine geringe tatsächliche Parasitentoxizität. Es ist unter physiologischen Bedingungen negativ geladen und somit nicht membrangängig. Deshalb muss es parenteral appliziert werden. 20 Jahre später wurde ein weiteres *first stage* Medikament entdeckt. Pentamidin wird im Gegensatz zu Suramin nicht bei *T. b. rhodesiense*, sondern bei einer Infektion mit *T. b. gambiense* eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus von Pentamidin ist noch unklar, doch sind aufgrund seiner positiven Ladungen Interaktionen mit der DNA oder RNA anzunehmen. Man vermutet eine Hemmung der mitochondrialen Topoisomerase [60, 61]. Pentamidin gelangt über einen P2 Nukleosidtransporter ins Zellinnere der Trypanosomen und akkumuliert dort [62].

Das erste *second stage* Medikament wurde 1949 zugelassen. Das arsenhaltige Melarsoprol ist lipophil und insofern Blut-Hirn-Schranken gängig. Das lipophile Medikament muss in Propylenglykol gelöst und intravenös appliziert werden. Das Lösungsmittel ist stark reizend für das Gewebe und die Injektion dadurch sehr schmerzhaft [63]. Ein komplexes Therapiekonzept erschwert die Behandlung zusätzlich. Bis vor kurzem war ein 26-tägiges Applikationsschema üblich, das jedoch nur auf dem *trial and error* Prinzip basierte. Neue Studien schlagen jetzt eine Behandlungsdauer von 10 Tagen vor [64]. Die Nebenwirkungen, die mit einer Melarsoproltherapie einhergehen, sind schwerwiegend. In 3-10% der Fälle kommt es zu einer tödlichen Enzephalopathie [48]. Bedenklich ist die Resistenzentwicklung gegen Melarsoprol, die mit steigender Tendenz momentan bei etwa 30% liegt. Eine erste Weiterentwicklung bei der Behandlung des 2. Stadiums war Eflornithin in den 1980er Jahren [60]. Eflornithin ist weit weniger toxisch als Melarsoprol. Allerdings wirkt dieses Medikament nur gegen *T. b. gambiense* und ist aufgrund

1. Einleitung

des komplizierten Behandlungsschemas extrem schwer zu handhaben. Da Eflornithin die BHS nur sehr schlecht überwindet, sind außerordentlich hohe Dosen (400mg/kg pro Tag) notwendig. Viermal am Tag muss Eflornithin über zwei Stunden infundiert werden. Die Behandlungsdauer beträgt zwischen 7 und 14 Tagen [60, 61]. Das neueste Medikament Nifurtimox hat dagegen den Vorteil, dass es oral verabreicht werden kann. Nifurtimox wird schon seit 1967 bei der Chagas-Krankheit eingesetzt und hat zusätzlich eine gute Effizienz bei der Schlafkrankheit gezeigt. Eine Monotherapie wird dennoch nur bei Melarsoprolresistenz angewendet, denn die Gefahr eines Krankheitsrezidivs ist mit circa 36% sehr hoch [65]. Dennoch wurde die *Nifurtimox Eflornithin Combination Therapy* (NECT) im April 2009 in die *Essential Medicine List* des WHO aufgenommen. Klinische Studien von 2003 bis 2008 zeigen, dass eine Kombination von Nifurtimox und Eflornithin sowohl die Länge als auch die Kosten einer Behandlung deutlich reduzieren [12]. Im Vergleich zu einer Eflornithinmonotherapie treten bei einer NECT nicht nur deutlich weniger Nebenwirkungen auf, auch die Therapiekosten können von durchschnittlich 107€ pro Patient (Monotherapie) auf 39€ (NECT) reduziert werden [66, 67]. NECT ist der einzige wirkliche Fortschritt der HAT-Behandlung in den letzten 25 Jahren.

Die Hoffnung auf neue, revolutionäre Medikamente ist augenblicklich gering. Die Entwicklung von DB 289 (2,5-bis[4-(N-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleat), eine dem Pentamidin verwandte Substanz, ist kürzlich in der Phase III der klinischen Entwicklung aufgrund von Lebertoxizität gestoppt worden. Man hatte gehofft mit dem oral applizierbaren DB 289 Pentamidin ersetzen zu können. Die Effizienz gegen HAT ist gut, die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe beträgt allerdings nur 10-20% [49, 61, 68].

Erfolgsversprechender ist Fexinidazol. Diese Substanz kann in beiden Stadien der HAT angewendet werden und weist eine wesentlich kürzere Behandlungsdauer sowie eine verringerte Toxizität auf. Darüber hinaus ist der Gebrauch einfach, weil Fexinidol oral gegeben werden kann. Es befindet sich derzeit in Phase I der klinischen Studie [59].

1. Einleitung

1.2.6 Prophylaxe und Kontrolle

Durch die Schwierigkeiten der Behandlung der HAT und dem enormen wirtschaftlichen Schaden durch Nagana-infizierte Nutztiere gewinnt die Vektorkontrolle, als Versuch die Trypanosomiasen in den Griff zu bekommen, an Bedeutung. Im 20. Jahrhundert konnten mit der Rodung von ganzen Landstrichen und der Massenschlachtung von Wildtieren gute Ergebnisse erzielt werden [48]. Solche Methoden sind heutzutage jedoch ethisch nicht mehr opportun. Die synthetischen Insektizide eröffneten in den 1940er Jahren ganz neue Möglichkeiten im Kampf gegen die Tsetse-Fliegen, deren Habitat sich auf einer Fläche von zehn Millionen Quadratkilometern erstreckt. Durch kontrolliertes Besprühen des Bodens kombiniert mit einer Aerosolsprüh-Technik mithilfe von Flugzeugen gelang eine starke Dezimierung der Tsetse-Fliegenpopulation. Probleme dieser Methode sind die Umweltverschmutzung und die Auswirkungen auf andere Tierarten, sowie die Anreicherung der Umweltgifte in der Nahrungskette. Aus diesem Grund haben Fliegenfallen die Insektizide in den letzten zwei Jahrzehnten weitgehend ersetzt [49]. Sie sind umweltfreundlich, einfach im Gebrauch und zudem kostengünstig. Eine Weiterentwicklung sind die sogenannten *live baits*. Hier wird das Nutzvieh als lebende Fliegenfalle genutzt, indem es mit Insektiziden behandelt wird. Die Effizienz der *live baits* ist unstrittig, jedoch liegen die Kosten weitaus höher, als es sich ein durchschnittlich verdienender afrikanischer Bauer leisten kann. Relativ neu ist die Vektorkontrolle mit sterilen Männchen. Diese Methode wirkt selektiv auf Tsetse-Fliegen, es gibt keine Resistenzbildung und sie ist sehr umweltschonend [48, 69]. Geeignet ist die *Sterile Insect Technique* (SIT) jedoch nur in Kombination mit anderen Kontrollmaßnahmen. Voraussetzung für den Erfolg sind lokal begrenzte Fliegenpopulationen, so dass schon vor dem Einsatz der sterilen Männchen die Tsetse-Fliegenpopulation entsprechend dezimiert sein muss. Darüber hinaus ist die SIT extrem teuer [70]. Für alle prophylaktischen Techniken ist es notwendig, die Schlafkrankheit und die Nagana genau zu kartieren, um die Methoden gezielt einsetzen zu können [71]. In der Landwirtschaft werden häufig Trypanozide wie Dimiazene, Isometamidium und Homidium als prophylaktische und therapeutische

1. Einleitung

Medikamente für das Nutzvieh verwendet. Doch durch zu niedrige Dosierung und falsche Anwendung sind viele Trypanozide durch Resistenzbildung unwirksam geworden.

Das Arsenal an vielversprechenden Maßnahmen zur vollständigen Tsetse-Fliegengeneradikation ist groß. Doch die Umsetzung im strukturschwachen Afrika bleibt schwierig. Ökonomisch lohnend wäre ein Tsetse-Fliegen freies Afrika gleichwohl. Die Kosten für eine umfassende Eliminierung würden sich in etwa auf 1,5 Milliarden US-Dollar belaufen, der Benefit aus der Landwirtschaft um 4,5 Milliarden US-Dollar steigen. Ganz zu schweigen von der geminderten Schlafkrankenzinzidenz [70].

1.3 Gehirninfection

Die Infektion mit *T. b. gambiense* zeigt eine ausgeprägtere ZNS-Beteiligung als die akute rhodesische Form der Schlafkrankheit [72]. Häufig kommt es nach einer mehrjährigen Phase der Aparasitämie im Blut zu einem Rückfall. Auslöser scheinen Trypanosomen zu sein, die sich im ZNS verstecken und geschützt vor den Wirkungen der nicht BHS-gängigen Medikamente eine erneute Parasitämie etablieren. Dies konnte auch im Tiermodell bestätigt werden [73].

1.3.1 Neuropathogenese

Die extrazellulären Trypanosomen schädigen das Nervengewebe hauptsächlich durch die Sekretion diverser Faktoren wie beispielsweise TLTF (*trypanosome-derived lymphocyte triggering factor*) und durch die gegen die Parasiten gerichtete Immunreaktion des Wirts. *In vitro* Versuche mit zentralnervösen Kulturen bestätigten, dass Trypanosomen alleine keine Auswirkung auf Struktur und Funktion des Gehirngewebes haben [74]. Eine Schlüsselrolle in der Neuropathogenese spielt IFN- γ (siehe Abbildung 15). Es vermittelt bidirektionale Signale, indem es einerseits Makrophagen aktiviert und andererseits eine proliferationsfördernde Wirkung auf Trypanosomen hat. Trypanosomen induzieren ihrerseits die Freisetzung von IFN- γ aus Immunzellen durch die Sekretion von TLTF [54, 75]. Einen wesentlichen Anteil

1. Einleitung

an der Neuropathogenese der Trypanosomiasen soll das Neuropeptid Substanz P haben. Im Mausmodell zeigt sich nach der Gabe von spezifischen Substanz P Rezeptorantagonisten ein deutlicher Rückgang der ZNS-Entzündung [76]. Zur neuronalen Schädigung könnte auch eine direkte Aktivierung der Astrozyten durch Trypanosomen beitragen. Durch Chemokinproduktion und Aktivierung des Immunsystems würde das Gehirn zusätzlich Schaden nehmen (siehe Abbildung 15).

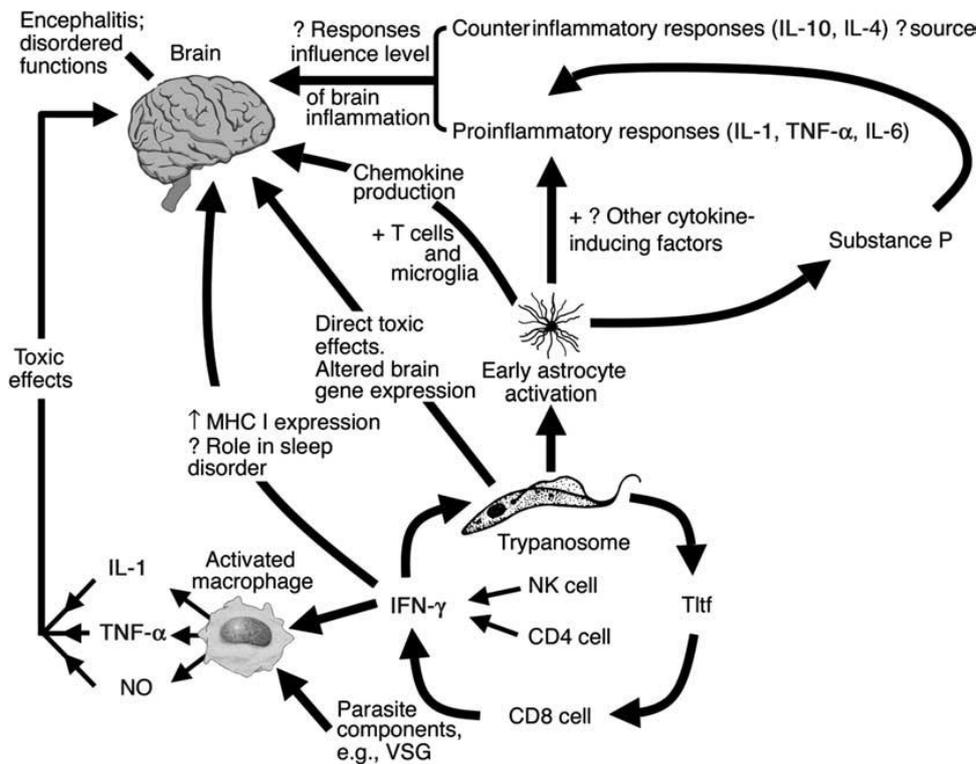


Abbildung 15: Mögliches Modell der Neuropathogenese [54]

Seit vielen Jahren wird zudem eine autoinflammatorische Genese der neurologischen Symptome diskutiert. Im Liquor von Schlafkranken finden sich Antikörper gegen Galactocerebroside und Neurofilamente, die eine Demyelinisierung zur Folge haben könnten [65]. Inwieweit zirkulierende Immunkomplexe eine Rolle bei der Pathogenese spielen, ist noch nicht abschließend geklärt. Die typischen klinischen Symptome des meningoenzephalischen Stadiums sind mit IgM im CSF assoziiert. Dies könnte ein Hinweis auf eine intrazerebrale Synthese von IgM sein. Darüber hinaus sind

1. Einleitung

Immunkomplexe in der Basalmembran der Blut-Liquor-Schranke (BLS) zu finden [77, 78].

1.3.2 Eintritt ins Gehirn: Blut-Hirn-Schranke vs. Blut-Liquor-Schranke

Lange galt das Gehirn als immunprivilegiertes Organ. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: Allografte überleben im Gehirn wesentlich länger als in anderen Organen; es gibt keine lymphatischen Gefäße im Gehirn; Schutz vor Pathogenen und Toxinen wird durch die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke gewährleistet. Einen ersten Hinweis auf dieses Schrankenkonzept lieferte 1885 ein Experiment von Paul Ehrlich. Er gab einen Farbstoff in die allgemeine Blutzirkulation und bemerkte, dass das Gehirn und der CSF ausgespart blieben. Goldman ergänzte 1913 dieses Experiment durch Einfärben des CSF, woraufhin das Gehirn und der Liquor eingefärbt wurden, die allgemeine Zirkulation jedoch nicht [79]. Die BHS ist äußerst dicht und lässt nur kleine lipophile Moleküle passieren (z. B. O₂ und CO₂). Kapillarendothelzellen, deren Basalmembran, Perizyten und Astrozyten versperren gemeinsam als BHS den Zugang zum Gehirn (siehe Abbildung 16 A). Die physikalische Barriere wird hauptsächlich durch die *tight junctions* der Kapillarendothelzellen gebildet. Diese sehr selektive Blockade wird von den Perizyten und der Basalmembran unterstützt. Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus Laminin, Kollagen IV, Proteoglykanen und Nidogen. Eine Destruktion der Basalmembran führt auch immer zu einer Störung der BHS-Integrität. Die Astrozyten bilden eine metabolische Barriere und beeinflussen die Transportprozesse über die BHS. Darüber hinaus sind sie für die Organisation und Strukturierung der Gefäßwand verantwortlich. Insgesamt bedecken die Astrozyten 99% der abluminalen Seite des Kapillarendothels [80].

1. Einleitung

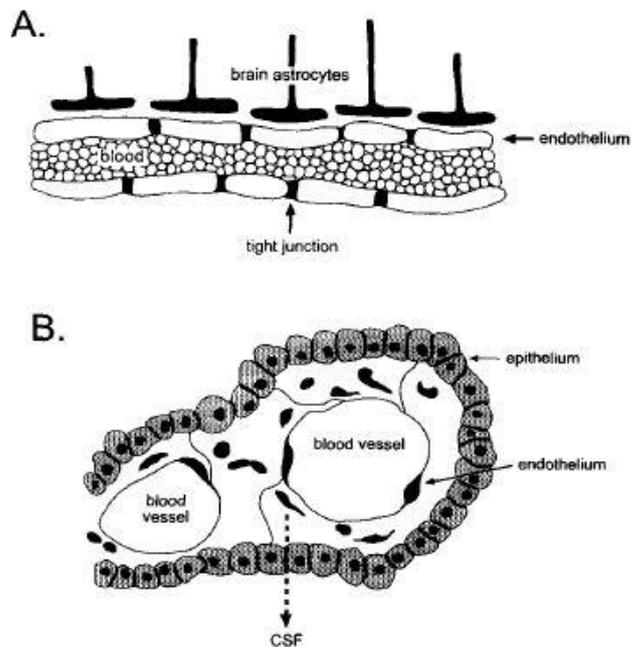


Abbildung 16: Aufbau der BHS (A) und der BLS (B) [81]

Um über die BHS ins ZNS zu gelangen gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Wege: transzellulär, parazellulär oder in einem sogenannten „trojanischen Pferd“. So verschafft sich beispielsweise *Toxoplasma gondii* versteckt in Mikrogliazellen Zugang zum Gehirn, während *Plasmodium falciparum* durch das Aufbrechen von *tight junctions* parazellulär ins Gehirn gelangt [82].

Alternativ ist eine Route über die BLS möglich. Diese setzt sich aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der Basalmembran und dem Plexusepithel zusammen (siehe Abbildung 16 B). Überwinden Krankheitserreger die BLS, gelangen sie zunächst in den Liquor und von dort entweder direkt über die Ventrikependymzellen oder über den Subarachnoidalraum und die Virchow-Robin-Räume in den Schutz des immunprivilegierten Hirnparenchyms [72]. Der Weg über das Ventrikependym wird durch *leaky tight junctions* erleichtert [79, 83].

1. Einleitung

Wie die Trypanosomen aus dem Blut ins Gehirn gelangen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Mehrere Routen sind prinzipiell möglich [65]:

1. BHS: transzellulär
2. BHS: parazellulär
3. BHS: mit/in Leukozyten
4. BLS über das Choroid Plexus-Epithel

Ohne klare Evidenzen, aber mit einigen Anhaltspunkten, wird die Überwindung der BHS derzeit von der Mehrzahl der Veröffentlichungen für wahrscheinlicher gehalten. Die BHS hat eine 5000x größere Fläche als die BLS [84]. Da bisher im frühen Gehirn stadium keine Degradation der *tight junctions* nachweisbar war, ist eine parazelluläre Passage der BHS zur Gehirninvasion unwahrscheinlich. Ferner gibt es keine Korrelation zwischen der BHS Permeabilität und der Anzahl der Trypanosomen im Gehirn, wie das der Fall wäre, wenn die Parasiten einen *break down* der BHS auslösen würden. Wenn die Parasiten über die BHS ins Gehirn invadieren ist anzunehmen, dass es sich eher um einen aktiven Prozess, als um eine passive Diffusion nach Zerstörung der *tight junction* handelt [85]. Im Endstadium der Krankheit sind jedoch Ödeme im Gehirn zu beobachten, die für einen späten Zusammenbruch der BHS sprechen. Trypanosomen besitzen durchaus das Arsenal an Molekülen, die in der Lage sind die *tight junctions* und die Basalmembran zu zerstören: saure Phosphatasen, Brucipain (eine Cysteinprotease) und die Oligopeptidase B bieten die Möglichkeit zur Gewebeinvasion. Auch Immunkomplexablagerungen könnten für die späte Öffnung der *tight junctions* verantwortlich sein [83]. An welcher Stelle die Basalmembran für Trypanosomen durchlässig ist, bestimmt die Lamininzusammensetzung. Ähnlich wie Leukozyten können Trypanosomen Laminin $\alpha 4$ überwinden, nicht aber Laminin $\alpha 5$ [86]. Erleichtert wird die Überquerung der BHS möglicherweise durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) im Laufe einer Infektion. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten mit *T. b. gambiense* konnte gezeigt werden, dass Trypanosomen Faktoren sezernieren, die Endothelzellen aktivieren [87]. So

1. Einleitung

könnten der transzelluläre Weg und später die parazelluläre Diffusion ins Gehirn synergistisch zusammenspielen [82].

Möglich ist jedoch auch die Überquerung der BHS in bzw. zusammen mit Leukozyten. Minocyclin, ein Medikament das bekanntermaßen die Passage von Leukozyten über die BHS verhindert, inhibiert auch den Übertritt von Trypanosomen ins Gehirn [87].

Seit mehreren Jahren werden zunehmend *in vitro* Modelle der BHS für solche Fragestellungen verwendet. Auf einem kollagenbeschichteten *transwell*-System werden humane *brain microendothelial cells* (BMECs) kultiviert, die eine BHS simulieren (siehe Abbildung 17).

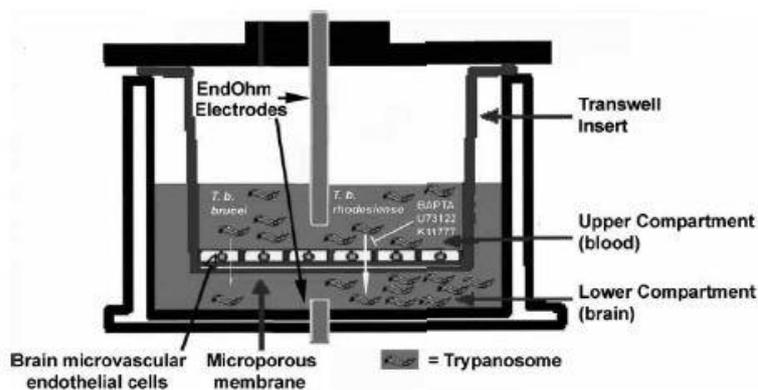


Abbildung 17: *in vitro* Modell der BHS [87]

Versuche mit *T. b. gambiense* zeigen, dass diese die artifizielle BHS wesentlich schneller und zahlreicher überwinden als *T. b. brucei* und eine deutliche Abnahme des transendothelialen Widerstands verursachen. Prozyklischen Formen können die BMECs nicht passieren und sind auch nicht in der Lage am Kapillarendothel zu adhären [84, 87]. Anhand dieser Versuche wurde eine Hypothese der molekularen Mechanismen der BHS-Überwindung entwickelt (siehe Abbildung 18). Man nimmt an, dass die bereits erwähnte Cysteinprotease (Brucipain) einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) aktiviert, der über die Phospholipase C (PLC) die intrazelluläre Calciumkonzentration stark erhöht. Dadurch werden die Proteinkinase C (PKC) und die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) aktiviert. In der Folge kommt es zu

1. Einleitung

zytoskelettalen Veränderungen, die zur Öffnung der *tight junctions* (TJ) und der *adherens junctions* (AJ) führen. Eine Rolle könnte zudem die Aktivierung der GTPase RhoA spielen, die Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett hat [88].

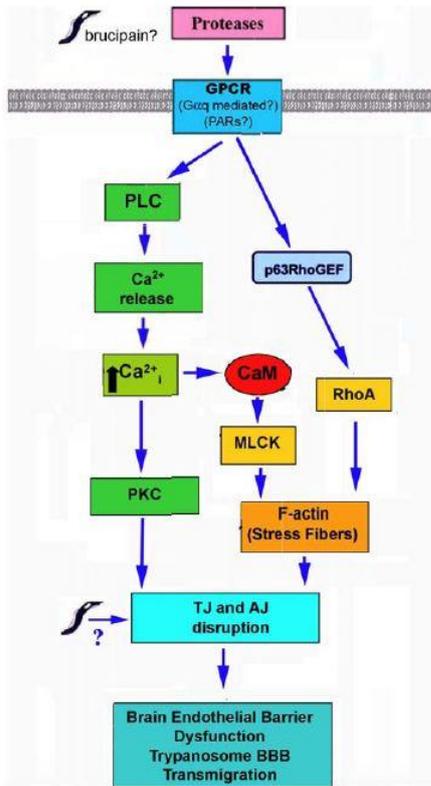


Abbildung 18: Molekularer Mechanismus des BHS-Überquerung [88]

Die BHS steht derzeit im Fokus der Forschung. Bisher konnte jedoch noch kein vollständig überzeugendes Konzept der Gehirninvansion bewiesen werden. Dass Trypanosomen gar nicht über die BHS, sondern über die BLS ins Gehirn gelangen, ist ebenfalls durchaus denkbar. Dafür spricht, dass Trypanosomen bereits sehr früh in den zirkumventrikulären Organen (CVO) und insbesondere im Choroid Plexus akkumulieren. Dieser weist einen deutlich niedrigeren elektrischen Widerstand auf als die BHS, was eine Passage über die BLS vereinfachen würde [81]. Der Weg über die BLS könnte auch die Präsenz von Trypanosomen im Liquor erklären.

Es lässt sich jedoch keine Parasitenakkumulation um die Ventrikel beobachten, wie das vielleicht zu erwarten wäre, wenn sie über die Ventrikependymzellen

1. Einleitung

ins Gehirnparenchym gelangen würden [86]. Dies macht den Weg über den Subarachnoidalraum und die Virchow-Robin-Räume wahrscheinlicher.

1.3.3 Lokalisation der Trypanosomen im Gehirn

Die Präsenz von Parasiten im menschlichen Gehirn wurde nur sehr selten nachgewiesen. Das Problem ist, dass ein *in situ* Nachweis nur dann gelingt, wenn das Gehirn spätestens vier bis fünf Stunden nach dem Tod fixiert wird. Da dies in Afrika nur schwer zu verwirklichen ist, muss die Forschung auf Tiermodelle zurückgreifen [84, 87]. Die neuropathologischen Daten haben sich als kohärent erwiesen und Tiermodelle erscheinen deshalb für die Untersuchung des meningoenzephalischen Stadiums der Schlafkrankheit als geeignet [76].

Schultzberg et al. konnte 1988 die Verteilung der Trypanosomen im ZNS histochemisch darstellen [89]. In der frühen Phase der Infektion beschränken sich die Parasiten hauptsächlich auf Areale ohne BHS, d.h. den Choroid Plexus und die CVO. Diese Organe stehen in enger Beziehung zu den Gehirnarealen, die verantwortlich für die frühen neurologischen Symptome sind. Der frühe Befall der Epiphyse spiegelt sich beispielsweise in Störungen der zirkadianen Rhythmik wieder [89]. Erst im späten Stadium der HAT kommt es zum Befall des Gehirnparenchyms und des Rückenmarks [76].

Der Choroid Plexus ist auch bei anderen Erkrankungen mit ZNS-Beteiligung häufig an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Vor allem bei Autoimmunerkrankungen (systemischer Lupus erythematodes), Viruserkrankungen (CMV-Enzephalopathie bei AIDS), *Toxoplasma gondii*-Infektionen, Morbus Alzheimer und Multipler Sklerose ist der Choroid Plexus in die Pathogenese der Erkrankung involviert [78, 79]. Darüber hinaus hat er auch eine immense Bedeutung bei der Immunabwehr. Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalitis werden die Adhäsionsmoleküle für Immunzellen ICAM-1 und VCAM-1 im Choroid Plexus hochreguliert. Bei der Multiplen Sklerose gelangen die Lymphozyten über den Choroid Plexus ins Hirnparenchym. Außerdem sind die vier Choroid Plexus an günstigen Stellen des Ventrikelsystems gelegen, so dass die hier adhärennten Immunzellen viele

1. Einleitung

Pathogene abfangen können. Der Choroid Plexus dient jedoch nicht nur der Adhärenz von Immunzellen, sondern auch als Eintrittspforte ins Gehirn. Die Plexusepithelzellen sind sogar in der Lage selbst Antigene über MHC-Moleküle zu präsentieren. Bei vielen entzündlichen Gehirnerkrankungen und vermutlich auch bei Trypanosomen-Infektionen spielen Zytokine eine Hauptrolle in der Neuropathogenese. Der Choroid Plexus kommt als mögliche Zytokinquelle in Betracht, da die Epithelzellen in der Lage sind IL-1 und IL-6 und auf LPS-Stimuli auch TNF- α zu produzieren, die mitverantwortlich für die Inflammation des Hirngewebes sind [79, 90].

Insbesondere der Choroid Plexus zeigt im Verlauf der Schlafkrankheit charakteristische Veränderungen. Bei Experimenten mit Ziegen beobachtete man zunächst eine Hyperämie, gefolgt von Ödemen, Plasmazellakkumulation und Lymphozytenansammlungen im Stroma. In sehr weit fortgeschrittenem Stadium war lichtmikroskopisch eine Degeneration des Plexusepithels zu sehen, dessen *tight junctions* durch die Separation der Epithelzellen geöffnet wurden [83].

1.3.4 Zirkadiane Rhythmusveränderungen

Der Name Schlafkrankheit deutet schon auf eine veränderte zirkadiane Rhythmik als eines der hervorstechendsten Symptome dieser Erkrankung hin. Wider Erwarten schlafen die Patienten nicht etwa länger, sondern sogar eher kürzer als gesunde Menschen. Der Name hat dennoch eine gewisse Berechtigung, da sich der Schlaf-Wach-Rhythmus im Laufe der Erkrankung stark verändert und die Patienten meist am Tag schlafen und nachts wach sind. Es entwickeln sich sogenannte polyphasische Schlaf-Wach-Muster, die ähnlich der Narkolepsie durch eine exzessive Tagesmüdigkeit und einer Schlafragmentierung gekennzeichnet sind [39, 91]. Die molekularen Mechanismen dieser Veränderungen sind noch nicht vollständig verstanden. Bei Patienten wurden hormonelle Veränderungen v.a. des *Growth Hormone*-, des Cortisol- und des Prolaktinspiegels beobachtet. Auffällig ist eine veränderte Plasmareninaktivität, deren Bedeutung noch unklar ist. Melatonin, der typische Marker der zirkadianen Kontrolle, ist jedoch erstaunlicherweise unverändert.

1. Einleitung

Dreh- und Angelpunkt der Schlafinduktion im Gesunden ist der *Nucleus suprachiasmaticus* im ventralen *Hypothalamus*. Über den retinohypothalamischen Trakt werden photooptische Signale mithilfe von Glutamin an den *N. suprachiasmaticus*, den biologischen Haupttaktgeber, weitergeleitet. Diese Phototransduktionskaskade führt zur Induktion von *c-fos*, einem nukleären Phosphoprotein. Experimente in Ratten zeigen, dass *c-fos* nach einer Infektion mit *T. b. brucei* deutlich erniedrigt und der Glutamatrezeptor herunterreguliert ist [91]. Derartige Veränderungen sind wahrscheinlich Auswirkungen verschiedener Zytokine, insbesondere von IFN- γ , die bei der Infektion mit Trypanosomen vermehrt ausgeschüttet werden.

1.3.5 Zytokinbeteiligung

Höchstwahrscheinlich spielt IFN- γ eine zentrale Rolle bei der Immunantwort des Wirts auf Trypanosomen. IFN- γ induziert unter anderem die Freisetzung von TNF- α , verschiedenen Interleukinen, Prostaglandinen und NO (*nitric oxide*) aus aktivierten Makrophagen. Das proinflammatorische Zytokin IFN- γ aktiviert außerdem Astrozyten und verstärkt deren Proliferation [75]. In IFN- γ *knock out* Mäusen ist kein BHS/BLS-Überwindung zu beobachten [92]. Ferner konnte gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von IL-12, dem Hauptinduktor von IFN- γ , eine reduzierte Penetration der Trypanosomen ins Gehirn erfolgt [86]. Dies illustriert die paradoxe Rolle von IFN- γ , das einerseits die Makrophagen zur Trypanosomenbeseitigung aktiviert, aber andererseits den Eintritt für die Parasiten ins Gehirn erleichtert [86]. Neuropathogenetisch könnte IFN- γ als Immunantwort auf die vornehmlich in den CVO lokalisierten Trypanosomen gebildet werden und von dort über den Ventrikel in das Gehirnparenchym gelangen. Dort führt IFN- γ zur Hochregulation von CXCL 10 (früher auch IP-10) auf perivaskulären Astrozyten und erleichtert so die Passage von T-Zellen und Trypanosomen ins Gehirn. Diese Hypothese wurde in CXCL 10 defizienten Mäusen mit deutlich verminderter BHS Überwindung der Trypanosomen und T-Zellen bekräftigt [39].

TNF- α wesentlich an der Eliminierung der Parasiten aus dem Blut beteiligt [65]. In Experimenten mit Mäusen korrelieren die ZNS-Level von IFN- γ und TNF- α

1. Einleitung

mit der Schwere der neuroinflammatorischen Reaktion. Neben $\text{IL-1}\beta$ hat auch $\text{TNF-}\alpha$ einen Einfluss auf das Schlafverhalten [39, 76].

NO , dessen Bildung über diverse Zytokine induziert wird, führt in *in vitro* Experimenten zu einem *break down* der BHS. Neben der Zytokininduktion hat NO zytotoxische Effekte auf Astrozyten und Neurone und führt zu einer verstärkten Synthese von Prostaglandinen (PGD) [65].

Prostaglandine sind für diurnalen Somnolenz der HAT verantwortlich [39].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Gehirninfection der Trypanosomen bereits vor über 100 Jahren erstmals beschrieben wurde, ist dieses Stadium bisher nur rudimentär verstanden. Für den Krankheitsverlauf spielt dieses Stadium jedoch eine entscheidende Rolle. Sind die Parasiten erst über die BLS- bzw. BHS-Schranke gelangt, gibt es kaum Hoffnung auf Heilung. Das Gehirn gilt als Quelle für einen *Relapse* der Infektion [73, 84], selbst wenn die Trypanosomen im Blut medikamentös erfolgreich eliminiert wurden.

Umso wichtiger ist es, das Gehirnstadium genauer zu untersuchen. Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit den folgenden drei Aspekten:

1. Wie gelangen die Trypanosomen ins Gehirn?
2. Charakterisierung von Trypanosomen aus dem Gehirn
3. Verteilung der Trypanosomen im Gehirn

Im Fokus dieser Doktorarbeit steht die Frage, ob Trypanosomen über die BHS oder die BLS ins Gehirn gelangen. Dazu wird das Frühstadium der Schlafkrankheit bei Ratten untersucht. Darüber hinaus ist die Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Trypanosomen aus dem Gehirn und deren Charakterisierung Thema der Dissertation. Die Verteilung der Trypanosomen im Gehirn soll Aufschluss darüber geben, ob es einen Lokaltropismus gibt und wie sich diese Präferenzen mit dem klinischen Verlauf der Hirninfection in Einklang bringen lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Organismen

2.1.1.1 Trypanosomenstämme

Verwendet wurde ausschließlich der nicht humanpathogene *Trypanosoma brucei brucei*-Erreger.

AnTat 1.1	Pleomorpher Stamm	Christine Clayton; Heidelberg
-----------	-------------------	-------------------------------

Bei der Blutform unterscheidet man monomorphe und pleomorphe Stämme. Monomorphe Trypanosomenstämme entstehen durch die kontinuierliche Kultivierung im Blut von Säugetieren. Dadurch passen sich die Zellen an den Wirt an und können nicht mehr in die *stumpy* Form differenzieren. Somit verlieren sie auch die Fähigkeit, im Insektenwirt zu überleben. Die monomorphen Stämme werden häufig im Labor eingesetzt, da sie wesentlich einfacher zu kultivieren sind [93]. Der hier verwendete pleomorphe Stamm eignet sich hingegen besser, um einen natürlichen Infektionsverlauf zu untersuchen.

2.1.1.2 Andere Organismen

MEF	Fibroblasten	Aus <i>Microtus montanus</i>
-----	--------------	------------------------------

2.1.1.3 Versuchstiere

Tierart	Stamm	Züchter
Ratte	Wistar Han TM	Harlan; Horst (NL)

2. Material und Methoden

Die Tierversuche wurden mit Ratten des Stammes Wistar Han™ durchgeführt. Die Tiere wurden im Tierhaltungsraum des Interfakultären Instituts für Biochemie gehalten und bekamen sniff R7M-H Alleinfutter für Ratten und Mäuse (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

2.1.2 Chemikalien

Alle Aminosäuren wurden von der Firma Sigma Aldrich in München bezogen.

2.1.2.1 Laborchemikalien

Chemikalien	Hersteller
2'Desoxythymidin	Sigma Aldrich; München
Adenosin	Sigma Aldrich; München
Agos 100 (Epoxidharz)	Agar Scientific; Stansted (UK)
AmpuWa Wasser (RNAse frei)	Fresenius Kabi; Bad Homburg
<i>Antibiotic antimycotic solution 100x</i>	Sigma Aldrich; München
Bathocuproindisulfonat 1000x	Sigma Aldrich; München
BDMA	Agar Scientific; Stansted (UK)
Bisbenzimid	Sigma Aldrich; München
Bleicitrat	Serva; Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA; Pasching (A)
Calciumdichlorid	Merck; Darmstadt
Chymostatin	Roche; Basel (CH)
DDSA	Agar Scientific; Stansted (UK)
DEAE-Sephacel	Sigma Aldrich; München
D-Glucose	Merck; Darmstadt
DMSO	Roth; Karlsruhe
Essigsäure	Roth; Karlsruhe
Ethanol 100% p.a.	VWR International; Darmstadt
Formalin (10%)	Sigma Aldrich; München

2. Material und Methoden

Fötales Kälberserum (30min; 56°C)	PAA; Pasching (A)
Giemsa-Lösung	Sigma Aldrich; München
Glutaraldehyd (25%)	Sigma Aldrich; München
Glycerin (100%)	Roth; Karlsruhe
HEPES	Roth; Karlsruhe
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>	Sigma Aldrich; München
Kaliumchlorid	Roth; Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck; Darmstadt
Ketamin	Sigma Aldrich; München
Leupeptin	Roche; Basel (CH)
Magnesiumchlorid	Merck; Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck; Darmstadt
MEM Aminosäurelösung (100x)	Sigma Aldrich; München
MEM Vitaminlösung (100x)	Sigma Aldrich; München
Methanol 100% p.a.	Sigma Aldrich; München
MNA	Agar Scientific; Stansted (UK)
Myristinsäure	Sigma Aldrich; München
NaCl 0,9% (250 ml)	Fresenius Kabi; Bad Homburg
Natriumcacodylat	Serva; Heidelberg
Natriumchlorid	Roth; Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck; Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck; Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem; Darmstadt
Osmiumtetroxid	Plano; Marburg
PBS-Tabletten	Invitrogen; Karlsruhe
PEG 1550	Serva; Heidelberg
Penicillin-Streptomycin-Mix (100x)	Sigma Aldrich; München
Pepstatin	Roche; Basel (CH)
Phenolrot	Sigma Aldrich; München
Propylenoxid	Sigma Aldrich; München

2. Material und Methoden

Proteinkinase K	Roth; Karlsruhe
Pyruvat (1000x)	Sigma Aldrich; München
Quecksilberchlorid	Sigma Aldrich; München
Saccharose	Serva; Heidelberg
Salzsäure (HCl)	VWR; Radnor (USA)
Serum Plus™	SAFC Bioscience; Andover (UK)
Thymidin	Sigma Aldrich; München
Trinatriumcitrat	Roth; Karlsruhe
Trypsin	Sigma Aldrich; München
Uranylacetat	Serva; Heidelberg
Xylazin	Sigma Aldrich; München

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Beem®-Cups	Plano; Wetzlar
6, 12 und 24 Well-Platten	Greiner; Frickenhausen
Spritzenvorsatzsterilfilter	Nalge; Hereford (UK)
Eppendorf-Cup	Eppendorf AG; Hamburg
Kupfernetzchen (400 mesh)	Plano; Marburg
Zellkulturflaschen mit Sterilfilter	Greiner; Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner; Frickenhausen
Petrischalen	Greiner; Frickenhausen
Pasteurpipetten (steril)	Greiner; Frickenhausen
Parafilm	Peching; Menasha (USA)
Rundfilter (verschiedene Größen)	Machery-Nagel; Düren
Sterile Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Greiner; Frickenhausen
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser; Braunschweig
Kyroröhrchen	Greiner; Frickenhausen
Polysine® Slides	Menzel-Gläser; Braunschweig
Skalpell, steril	Braun; Melsungen

2. Material und Methoden

Sterilium	Bode Chemie; Hamburg
Meliseptol [®] rapid	Braun; Melsungen
Bechergläser	Schott Duran; Wertheim
Chemikalienflaschen	Brand; Wertheim
Erlenmeyerkolben	Schott Duran; Wertheim
Glocken-Sterilfilter	Microgon; Laguna Hills (USA)
Messzylinder (verschiedene Größen)	Brand; Wertheim
Light Cycler [®] 480 multiwell plate 96	Roche; Basel (CH)
Butterfly [®] -19	Braun; Melsungen
Dreiwegehahn (Discofix [®] C3)	Braun; Melsungen
Inject-F [®] (1 ml)	Braun; Melsungen
Inject [®] Solo (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun; Melsungen
Infusionsverlängerung	Oriplast; Neunkirchen
Omnifix 50 ml	Braun; Melsungen
BD Microlance [™]	Becton; New Jersey (USA)
Filter Unit (150 ml)	Thermo Fisher; Waltham (USA)
Maxima [®] SYBR-Green (2x)	Fermentas; Vilnius (USA)

2.1.4 Chirurgische Instrumente

Instrumente	Hersteller
Chirurgische Schere	Fine Science Tools; Heidelberg
Chirurgische/Anatomische Pinzette	Fine Science Tools; Heidelberg
Klemme	Fine Science Tools; Heidelberg
Spatel	Roth; Karlsruhe

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
DNeasy blood & tissue kit	Qiagen; Hilden
Qtracker [®] 605 Cell Labeling Kit	Invitrogen; Karlsruhe

2. Material und Methoden

2.1.6 Primer

Der GAP-DH Primer wurde von der Firma biomol aus Hamburg, der tbAOX Primer von der Firma Invitrogen aus Karlsruhe bezogen. Alle Primer wurden zunächst als 100 μ M Stammlösung angesetzt. Bei der RTq-PCR wurden die Primer dann 0,3 μ M eingesetzt.

2.1.6.1 GAP-DH

Primer	Sequenz	T _m [°C]
GAP-DH_se	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	58
GAP-DH_as	5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'	58

2.1.6.2 Trypanosomenspezifische alternative Oxidase (tbAOX)

Primer	Sequenz	T _m [°C]
tbAOX_se	5'-AAACGGCCTCGTTGATACAC-3'	60
tbAOX_as	5'-TGCTGAGGTTCCAGTACACG-3'	60

2.1.7 Laborgeräte

2.1.7.1 Allgemein

Laborgeräte	Hersteller
Autoklav Dampfsterilisator LLS	Münchner Mechanik; Stadler
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus; Osterode
Neubauer-Zählkammer (20 μ m tief)	Brand; Wertheim
Mikroliterpipetten	neoLab; Heidelberg
pH-Meter 539	Bachhofer; Reutlingen
Filtrationsapparatur 1225	Millipore; Bedford (USA)
Heizblock	neoLab; Heidelberg

2. Material und Methoden

Vortex-Genie	Bender&Hobein; Zürich (CH)
Vortex-2-Genie	Knick; Freiburg
Ultramikrotom OM U3 C	Reichert; Wien (A)
Spektrophotometer (Ultraspec 300)	Amersham; Buckinghamshire (UK)
Light Cycler [®] 480	Roche; Basel (CH)
Grobwaage PJ 3000	Mettler Toledo; Giessen
Feinwaage	Ohaus; Giessen
Magnetrührer (MR 2002/3001K)	Heidolph; Schwabach

2.1.7.2 Mikroskope

Mikroskope	Hersteller
Invertmikroskop Zeiss ID 02	Zeiss; Oberkochen
LM Axiostar Plus	Zeiss; Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA	Olympus; Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop EM10	Zeiss; Oberkochen
Axiovert 200M	Zeiss; Oberkochen
Cellobserver Z1	Zeiss; Oberkochen
REM: Evo LS10	Zeiss; Oberkochen

2.1.7.3 Sterilbänke

Laborgeräte	Hersteller
Sterilbank LaminAir HLB 2448 GS	Brand; Wertheim
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher; Waltham (USA)
Sterilbank Ceag Shirp	Envirko; Bork

2. Material und Methoden

2.1.7.4 Zentrifugen

Laborgeräte	Hersteller
Kühlzentrifuge Sigma 302K	Sigma Aldrich; München
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher; Waltham (USA)
Microfuge E™	Beckmann; München
SpeedVac Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Minizentrifuge (C1301B)	OpticsPlanet; Northbrook (USA)

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Zum Lösen wurde destilliertes Wasser verwendet. Andere Lösungsmittel sind explizit aufgeführt. Die angegebenen molaren Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration.

2.1.8.1 Medien

Sämtliche Medien und Medienzusätze wurden entweder autoklaviert oder steril filtriert.

Grundmedium, pH = 7,4

Dieses *minimal essential medium* (MEM) wurde hergestellt gemäß dem Standardprotokoll [94] modifiziert nach Duszenko [90, 95].

CaCl ₂ x 2 H ₂ O*	265 mg/l	1,8 mM
KCl	400 mg/l	5,4 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O*	200 mg/l	0,8 mM
NaCl	6800 mg/l	116 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140 mg/l	1 mM
HEPES	7140 mg/l	30 mM

2. Material und Methoden

*Magnesiumsulfat und Calciumchlorid mussten extra gelöst werden.

Salze und HEPES wurden auf pH = 7,4 titriert.

L-Arginin/HCl	126 mg/l	0,6 mM
L-Histidin/HCl x H ₂ O	42 mg/l	0,2 mM
L-Isoleucin	52 mg/l	0,4 mM
L-Leucin	52 mg/l	0,5 mM
L-Lysin (-20°C)	73 mg/l	0,5 mM
L-Methionin	60 mg/l	0,4 mM
L-Phenylalanin	100 mg/l	0,6 mM
L-Threonin	48 mg/l	0,4 mM
L-Tryptophan	100 mg/l	0,5 mM
L-Tyrosin	100 mg/l	0,55 mM
L-Valin	46 mg/l	0,4 mM
L- Ornithin/HCl	50 mg/l	0,3 mM
L-Adenosin (4°C)	12 mg/l	0,045 mM
MEM (nicht essentielle Aminosäurelösung)	10 ml/l	
MEM Vitaminlösung	10 ml/l	
Phenolrot	10 mg/l	0,03 mM

Das so hergestellte Grundmedium wurde anschließend steril filtriert und war dann bei 4°C bis zu sechs Monate haltbar.

2. Material und Methoden

Kulturmedium für Blutform-Trypanosomen, pH = 7,4

Um das Blutform-Kulturmedium herzustellen wurden folgende Stammlösungen und Glucose dem Grundmedium zugesetzt:

D-Glucose		5940 mg/l	32,9 mM
NaHCO ₃ (33,3x)	30 ml/l	75 mg/ml	26,2 mM
L-Glutamin 100x	10 ml/l	29,2 mg/ml	2 mM
L-Cystein 100x	10 ml/l	3,03 mg/ml	0,25 mM
Thymidin 100x	10 ml/l	0,39 mg/ml	0,016 mM
Hypoxanthin 100x*	10 ml/l	1,36 mg/ml	0,1 mM
Bathocuproindisulfonat 1000x**	1 ml/l	5,65 mg/ml	0,016 mM
Myristinsäure, gekoppelt an BSA 50x***	20 ml/l	24 mg/ml	0,1 mM
Penicillin/Streptomycin****	5 ml/l		
Grundmedium	ad 850 ml		

* Lösungsmittel: 0,1M NaOH; gegebenenfalls im Ultraschallbad gelöst

** Lösungsmittel: ddH₂O + wenige Tropfen 0,5M Salzsäure

*** Herstellung der Myristinsäurelösung:

24 mg Myristinsäure in 100 µl Ethanol p.a.

1g fettfreies BSA in 20 ml ddH₂O

Nach und nach wurde die Myristinlösung in die BSA-Lösung überführt.

**** *Antibiotic antimycotic solution* 100x (10 000 Units/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B); 1:200 verdünnt

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und steril filtriert. Danach wurde steriles fötales Kälberserum dazugegeben.

FBS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C) 150 ml/l

Das Blutformmedium war bei 4°C etwa sechs Wochen haltbar.

2. Material und Methoden

HMI-9 Kulturmedium für Blutform-Trypanosomen

Dieses Wachstumsmedium ist durch die Zugabe von Serum Plus™ besonders geeignet zur Kultivierung einer geringen Trypanosomendichte.

IMDM	17,7 g/l
NaHCO ₃	3,02 g/l
dH ₂ O	ad 1l

Der pH-Wert wurde mit 1M HCl /NaOH auf 7,1-7,4 eingestellt.

IMDM Grundmedium	890 ml	
Hypoxanthin 100x*	11 ml	13,6 mg/ml
L-Cystein 100x	11 ml	18,2 mg/ml
Pyruvat 1000x	1,11ml	110 mg/ml
Thymidin 1000x	1,11 ml	39 mg/ml
Bathocuproindisulfonat 1000x**	1,11 ml	28,2 mg/ml
2-Mercaptoethanol	15,5 µl	
Penicillin/Streptomycin 100x***	11 ml	5 mg/ml

* Lösungsmittel: 0,1M NaOH, gegebenenfalls im Ultraschallbad gelöst

** Lösungsmittel: ddH₂O + wenige Tropfen 0,5M Salzsäure

*** 10 000 Units/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B

Der pH-Wert wurde erneut kontrolliert und gegebenenfalls auf 7,4 eingestellt und das Medium anschließend steril filtriert.

FBS (hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C)	110 ml
Serum Plus™ (nicht erhitzt)	110 ml

Bei 4°C war das HMI-9 Medium mindestens sechs Wochen haltbar.

2. Material und Methoden

Einfriermedium

TDB	77 ml
87% (v/v) Glycerol	23 ml

Das Einfriermedium wurde nach der Herstellung steril filtriert.

Separationspuffer, pH = 8,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	10,15 g/l	57 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,41 g/l	3 mM
NaCl	2,57 g/l	44 mM
D-Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	9,91 g/l	55 mM

Regenerationspuffer, pH = 3,0

NaCl	292,5g
ddH ₂ O	ad 5l

2.1.8.2 Puffer und Lösungen

Trypanosome dilution buffer (TDB), pH = 7,7

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	4,3 g/l	18 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,12 g/l	2 mM
KCl	0,37 g/l	5 mM
NaCl	4,67 g/l	80 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/l	1 mM
D-Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	3,96 g/l	20 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Citrat-Glucose-Antikoagulans (CGA), pH = 7,7

$\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	100 mM
D-Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	40 mM

2. Material und Methoden

2x Phosphate buffered saline (PBS), pH = 7,4

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	20 mM
KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4 mM
KCl	5,4 mM
NaCl	274 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Oder eine PBS-Tablette auf 500ml destilliertes Wasser.

Weise-Puffer, pH = 7,2

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	8,61 g/l	67 mM
KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,25 g/l	6,6 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Giemsa-Gebrauchslösung

Giemsa-Stammlösung in Weise-Puffer	80 µl/ml
------------------------------------	----------

Die Giemsa-Gebrauchslösung musste immer frisch angesetzt werden.

Bisbenzimidlösung

Bisbenzimid-Stammlösung in dH ₂ O	1 mg/ml
--	---------

Die Bisbenzimidstammlösung war im Dunkeln bei 4°C einen Monat haltbar.
Als Färbelösung wurde die Stammlösung vor Gebrauch 1:500 verdünnt.

Proteaseinhibitorlösung (1000x)

Pepstatin	0,70 mg
Chymostatin	0,60 mg
Leupeptin	0,42 mg
DMSO	ad 1 ml

2. Material und Methoden

Fixierlösung

Glutaraldehyd	4%
Formalinlösung	4%
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.1.8.2.1 Puffer und Lösungen für REM und TEM

2x Cacodylatpuffer, pH = 7,4

Na-Cacodylat x 3 H ₂ O	2,14g
Saccharose	4g
ddH ₂ O	ad 50 ml

Fixierlösung (2% Glutaraldehyd in 2x Cacodylatpuffer) für eine Probe

Glutaraldehyd (8%)	250 µl
1x Cacodylatpuffer	750 µl

Kontrastierung (Osmiumtetroxid)

Stammlösung OsO ₄ (3%) in dH ₂ O	0,25g in 8,18 ml
--	------------------

Die Stammlösung war bei RT mehrere Monate haltbar. Für die Kontrastierung musste aus der Stammlösung eine 1,5%ige OsO₄ Lösung frisch hergestellt werden. Hierfür wurde die Stammlösung 1:1 mit 2x Cacodylatpuffer verdünnt.

Kontrastierung (Uranylacetat)

Stammlösung UAc (5%) in dH ₂ O	50 mg/ml
UAc (0,5%) in dH ₂ O	5 mg/ml

Uranylacetatlösung musste zwei Tage vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert werden. Im Dunkeln und bei RT aufbewahrt konnte die Uranylacetatlösung ungefähr drei Wochen verwendet werden.

2. Material und Methoden

TEM-Kontrastierung (Bleicitrat)

Bleicitrat in dH ₂ O	1 mg/ml
5M NaOH	10 µl/ml

Bleicitratlösung vortexen und steril filtrieren.

TEM-Eponharzeinbettung für 3 Proben

Agos 100 (Epoxidharz)	2,00g
DDSA (Härter)	1,00g
MNA (Härter)	1,08g
BDMA (Beschleuniger)	0.04g

2.1.9 Software und Datenbanken

Software:

Axiovision 4.7.2	Zeiss; Oberkochen
Cell F-View Soft Imaging System	Olympus; Hamburg
Endnote X3	Thomas Reuters; New York (USA)
GIMP 2.4.6	General Public license (GPL)
Light Cycler [®] 480 (Version 1.5.0)	Roche; Basel (CH)
Microsoft Access 2007	Microsoft; Unterschleißheim
Microsoft Office 2007/2010	Microsoft; Unterschleißheim
SPSS 19 Inc.	IBM; Armonk (USA)

Datenbanken:

Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Medline-OvidSP	http://ovidsp.ovid.com/

2. Material und Methoden

2.1.10 Liquor

Der Rattenliquor wurde uns durch Dr. Iglauer vom Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde Tübingen zur Verfügung gestellt. Die relativ große Menge Liquor konnte abgenommen werden, da die Ratte an einem Hydrocephalus erkrankt war. Den humanen Liquor aus überschüssigem Patientenmaterial erhielten wir aus dem Universitätsklinikum Tübingen.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Trypanosomen

Alle Arbeitsschritte im Umgang mit den Parasiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.1.1 Trypanosomendichtebestimmung

Um die Trypanosomenanzahl pro ml bestimmen zu können wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zwischen Deckglas und Objektträger der Kammer wurde 3 µl der Zellsuspension aufgetragen und anschließend unter dem Mikroskop bei 40x Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurden nur Trypanosomen berücksichtigt, die sich innerhalb der 64 Quadrate der Kammer befanden. Die Summe dieser Trypanosomen wurden dann mit dem Kammerfaktor 50 000 multipliziert, um die Trypanosomenanzahl der Zellsuspension pro ml zu errechnen.

2.2.1.2 Stabilatherstellung

AnTat 1.1

Um eine Charge an Stabilaten anzufertigen, musste zunächst eine Ratte mit einem Stabilat infiziert werden. Dafür wurde ein Stabilat aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und hiervon jeweils 1000 µl (entsprechen $5 \cdot 10^7$ Trypanosomen) einer mittels CO₂ betäubten Ratte injiziert. Die Einstichstellen waren intraperitoneal in

2. Material und Methoden

beiden unteren Quadranten des Bauches lokalisiert. Der Verlauf der Parasitämie konnte durch Blutentnahme überprüft werden, indem der Ratte aus der Schwanzvene 5 µl Blut entnommen und in 495 µl CGA resuspendiert wurde. Danach ließ sich die Trypanosomenanzahl pro ml mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmen. Nach ungefähr vier Tagen war der erste Peak der Parasitämie erreicht und die Trypanosomendichte betrug zwischen 10^7 und 10^8 Trypanosomen pro ml und die Ratte wurde präpariert. Wurde dieser Zeitpunkt verpasst, musste mit der Präparation bis zum nächsten Peak nach ungefähr 10-12 Tagen abgewartet werden (siehe Abbildung 19).

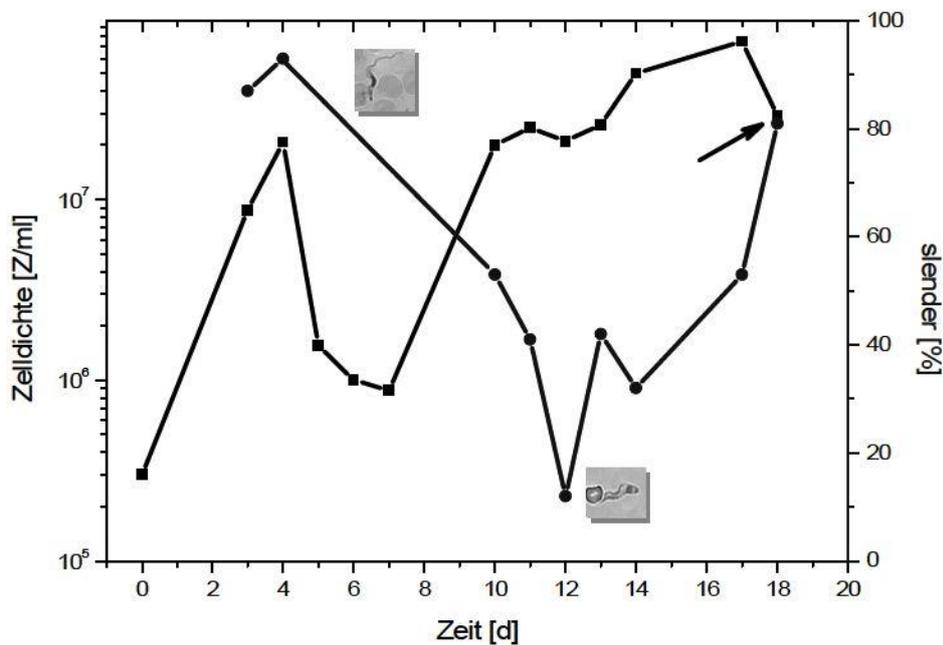


Abbildung 19: Trypanosomendichte (AnTat 1.1) im Infektionsverlauf (■) und Anteil der *slender* Population (●) [96]

Bei optimaler Trypanosomenanzahl wurde die Ratte mit CO₂ getötet, desinfiziert und der Thorax mit einer chirurgischen Schere eröffnet. In den Bauchraum wurde ca. 1 ml CGA gespritzt und anschließend die *Vena cava* durchtrennt. Das Blut der infizierten Ratte konnte mit einer sterilen Pasteurpipette entnommen und in ein vorbereitetes 15 ml Falcon mit 1 ml CGA pipettiert werden. Durch das Spülen des Gefäßsystems mit 10 ml CGA war es möglich die Ausbeute zu erhöhen. Das gewonnene Blut wurde in Eis gekühlt.

2. Material und Methoden

Abzentrifugiert wurde die Blutsuspension für 10 min bei 4°C mit 3000 rpm. Der nun sichtbare sogenannte *buffy coat*, der die Trypanosomen beinhaltet, konnte mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen werden und über einer DEAE-Säule aufgereinigt werden. Die mit Separationspuffer ausgewaschenen Trypanosomen wurden erneut 5 min bei 4°C mit 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Trypanosomen in Blutformmedium entsprechend ihrer Zelldichte wieder aufgenommen. Dann wurde 1:1 Einfriermedium zugesetzt, um eine endgültige Zellzahl von ungefähr $5 \cdot 10^8$ Trypanosomen/ml zu erreichen. Unter ständiger Kühlung auf Eis wurde die Zellsuspension auf 1 ml Aliquots aufgeteilt und anschließend für zwei Stunden bei -20°C gelagert. Über Nacht wurden die Stabilate bei -70°C aufbewahrt, bevor sie endgültig bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten. Um sterile Stabilate für die Kulturführung zu erhalten, musste das DEAE vorher autoklaviert und der Separationspuffer steril filtriert werden. Die Säule wurde mitsamt Filterpapier zunächst mit Ethanol desinfiziert und dann mit sterilem Medium ausgewaschen. Die Tierpräparation und die Aufreinigung wurden unter der Sterilbank durchgeführt werden.

2.2.1.3 Kultivierung von Trypanosomen in Liquor

Stabilate mit AnTat 1.1 wurden in einer 96-well-Platte in 100 µl Kulturen mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Trypanosomen pro ml angelegt. Parallel wurden jeweils drei Ansätze mit verschiedenen Medien gemacht. Die gleiche Ansatzreihe wurde auch mit humanem Liquor in 48-well-Platten mit 500 µl Kulturen durchgeführt:

1. Liquor (*Rattus norvegicus*/human)
2. Liquor und HMI-9 im Verhältnis 1:1
3. HMI-9 (Kontrolle)

Die Zellzahl wurde stündlich mit der Neubauer-Zählkammer kontrolliert.

2. Material und Methoden

2.2.2 Färbemethoden

2.2.2.1 Bisbenzimid-Färbung

Bisbenzimid ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der an AT-reiche Regionen der DNA bindet und sich gut dafür eignet Kinetoplasten-DNA und Kern-DNA von Trypanosomen anzufärben. Der Objektträger wurde 10 min im Dunkeln in Bisbenzimidlösung getaucht und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

2.2.2.2 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist besonders geeignet, um Parasitenstadien im Blutausstrich zu beurteilen. Diese Färbemethode färbt DNA purpurrot, Cytoplasma blau und Protozoenkerne leuchtend rot. Der Blutausstrich wurde hergestellt, indem ein Blutstropfen auf einem Objektträger mithilfe eines geschliffenen Deckgläschen dünn ausgestrichen und luftgetrocknet wurde. Der Ausstrich wurde 3-5 min mit Methanol fixiert und danach erneut luftgetrocknet. Die für die Färbung verwendete, frisch angesetzte Giemsa-Gebrauchslösung benötigte 25-30 min Inkubationszeit, bevor sie mit dH₂O abgewaschen werden konnte. Zur Beurteilung und Auszählung des Verhältnisses von *stumpy* und *slender* Formen wurde das Lichtmikroskop in 40x Vergrößerung verwendet.

2.2.2.3 DAPI-Färbung

DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindol) ist ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff, der an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Die DAPI-Färbelösung (1 µg/ml in dH₂O) wurde auf den Objektträger mit den Zellen getropft und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit PBS gewaschen, getrocknet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.2.3 Methode zur Isolierung von Gehirntrypanosomen aus Ratten

Ratten der Rasse Wistar wurden am Tag 0 intraperitoneal mit ungefähr $5 \cdot 10^7$ Trypanosomen aus einem frisch aufgetauten Stabilat infiziert. Die Ratten standen unter täglicher Beobachtung und ihr Gewicht wurde alle zwei Tage kontrolliert. Nach definierten Zeitabständen wurden die Ratten mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert, der Thorax eröffnet und ein paar Tropfen CGA in den Bauchraum gegeben, um eine Blutgerinnung zu verhindern. Danach wurde die *Vena cava* durchtrennt, das Herz punktiert, mit 20 ml CGA und 20 ml NaCl gespült und das Gehirn frei präpariert und entnommen. Für eine große Trypanosomenausbeute war es besonders wichtig, das entnommene Gehirn mit einem Skalpell in kleine Stücke zu zerteilen und sofort in eine 25 ml Kulturflasche mit vorgewärmtem HMI-9 Medium zu überführen. Dann wurde die Kulturflasche aufrecht stehend für eine Stunde im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) inkubiert. Nach der einstündigen Inkubationszeit konnte die 25 ml Kultur in ein 50 ml Falcon gefüllt werden, wobei die Gehirnteile mithilfe einer Säule mit Rundfilter zurückgehalten wurden. Die anschließende zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 rpm ermöglichte es, die Zellen vom HMI-9 Medium zu trennen und für die nachfolgenden Experimente in isotonischem Puffer aufzunehmen und auszuzählen. Sollte die gesamte Präparation für die Rekultivierungsexperimente steril ablaufen, wurden alle verwendeten chirurgischen Instrumente und die Ratte mit Ethanol desinfiziert und die Hirnentnahme unter der Sterilbank durchzuführen. Außerdem wurde ein steriles Skalpell verwendet werden und die Säule mit Rundfilter vorher mit Ethanol desinfiziert und in sterilem HMI-9 Medium gewaschen.

2.2.4 Methode zur Gehirnentnahme aus Ratten für TEM-Aufnahmen

Für die Gewebeschnitte wurden die Ratten zunächst genauso präpariert wie für die Isolierung der Trypanosomen aus dem Gehirn (siehe 2.2.3, Seite 56). Nach dem durchtrennen der *Vena cava* wurde das Herz allerdings mit einem Butterfly punktiert, der über einen Plastikschlauch mit einer 50 ml Spritze verbunden war.

2. Material und Methoden

Anschließend wurde der Blutkreislauf der Ratte zunächst mit 50 ml CGA und dann mit 100 ml einer Mischung aus Paraformaldehyd (4%) und Glutaraldehyd (4%) gespült. Falls die 100 ml Fixierungsmittel nicht genügten um die Ratte zu fixieren wurden nochmals mit 50 ml des Fixativs nachgespült. Danach wurde das Gehirn entnommen und über Nacht in 4% Paraformaldehyd/Glutaraldehyd bei 4°C gelagert und dann in Cacodylatpuffer (1x) überführt. Die weitere Probenaufbereitung für das EM übernahm das kooperierende Institut für Pathologie unter der Leitung von Professor Dr. Hartwig Wolburg.

2.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) wurde eingesetzt, um Aufschluss über die Morphologie der aus dem Gehirn gewonnenen Trypanosomen zu erhalten. Hierfür wurden die Zellen 10 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert und anschließend dreimal mit TDB oder PBS gewaschen. Zentrifugiert wurde ab dem 1. Waschschrift in der Tischzentrifuge bei 13.000g für 20s bei RT. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, in Eppendorfgläsern mit 1 ml Flüssigkeit durchgeführt. Die gewaschenen Zellen wurden eine Stunde bei 4°C in 0,5 ml 2% Glutaraldehyd fixiert. Danach wurde die Fixierlösung durch viermaliges Waschen in Cacodylatpuffer entfernt. Die nun folgende Kontrastierung in 0,7 ml Osmiumtetroxidlösung wurde nach 15 min bei 4°C ebenfalls einmal in Cacodylatpuffer und dreimal in dH₂O gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte mit 0,5 ml Uranylacetat für 1h bei RT, danach wurde die Probe einmal mit dH₂O gewaschen. Die Entwässerung erfolgte für jeweils 5 min zunächst in 50% und dann in 70% EtOH. Die weitere Probenaufbereitung übernahm die Abteilung Evolutionsbiologie der Intervertebraten des Instituts für Evolutionsbiologie und Ökologie, dessen REM unser Labor auch nutzen durfte.

2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Einbettung entspricht der Probenaufbereitung für das REM. Nach dem Entwässerungsschritt in 70% EtOH wurde die Alkoholreihe in 95% EtOH

2. Material und Methoden

(1x5 min) und in 100% EtOH für (3x je 5 min) fortgesetzt und anschließend durch Propylenoxid (3x5 min) ersetzt wurde. Bei allen Entwässerungsschritten verlängerte sich die Zentrifugationszeit um 1 min. Die Einbettung in 0,5 ml 50% Eponharz in Propylenoxid musste für 1h bei RT inkubieren und danach 4 min abzentrifugiert werden. Die Probe wurde in 0,2 ml reinem Eponharz aufgenommen und in Beem[®]-Cups überführt. Nach einstündiger Inkubationszeit bei RT wurden die Zellen 16 min zentrifugiert, bevor die Probe 12h bei 45°C und 24h bei 60°C polymerisiert wurde. Die ausgehärtete Probe wurde in Trapezform getrimmt und mit dem Ultramikrotom geschnitten. Die Ultradünnschnitte wurden mit Kupfernetzchen (Grids) gefischt. Mit den Schnitten nach unten wurden die Grids für 1h bei RT auf einen 50 µl Uranylacetattropfen (5%) gelegt und anschließend in dH₂O gewaschen. Bevor die Schnitte ins TEM eingeschleust werden konnten, wurden die Grids 45s in Bleicitratlösung gedippt, erneut gewaschen und getrocknet. Für die Auswertung der Proben wurde ein TEM der Firma Zeiss verwendet.

2.2.7 RTq-PCR: Gehirnkartierung

Das Rattengehirn wurde gemäß (2.2.3, Seite 56) am 23. Tag p.i. entnommen. Das rechte Großhirn wurde mit einem Skalpell in 20 und das Kleinhirn in vier etwa gleiche große Teile zerschnitten (siehe Abbildung 20 (A) und (B)).

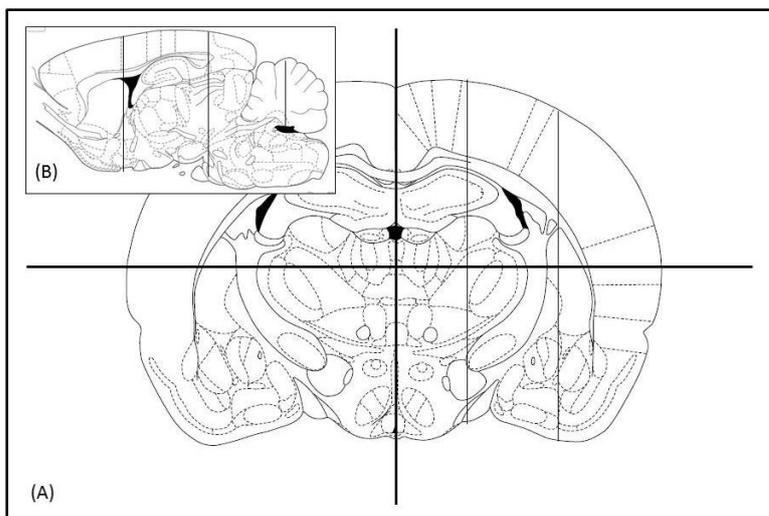


Abbildung 20: koronare (B), sagittale und horizontale Schnittführung (A) [97]

2. Material und Methoden

Das linke Großhirn wurde in drei gleich große Teile zerschnitten (siehe Abbildung 20 (B)). Anschließend konnte die DNA mithilfe des *DNA Blood and tissue kit* aus dem Gewebe extrahiert werden. Dabei wurde das Gehirngewebe zunächst mit Proteinkinase K lysiert und die DNA durch Bindung an selektive Membranen aufgereinigt. Die nun folgende RTq-PCR wurde in zwei Ansätzen durchgeführt:

1. GAP-DH Primer: Bestimmung der Gesamt-DNA Menge

2. tbAOX Primer: Bestimmung der Trypanosomen-DNA

Die einzelnen Ansätze wurden wie in Tabelle 2 beschrieben pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierschema der RTq-PCR

Maxima [®] SYBR-Green (2x)	12,5 µl
Forward Primer (sense)	0,3 µM (0,05-0,9 µM)
Reverse Primer (antisense)	0,3 µM (0,05-0,9 µM)
Template DNA	≤100 ng
AmpuWa	ad 25 µl
Gesamtvolumen: 25 µl	

Für die RTq-PCR verwendeten wir nachfolgendes Programm:

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15s	} 55 Zyklen
59°C	1 min 10s	

Fluoreszenzmessung: Quantifizierung der DNA

95°C	1s
40°C	1 min
95°C	continuous 0,11°C/s
40°C	30s

Um eine Eichkurve für die Berechnung der Trypanosomen-DNA zu erstellen, isolierten wir DNA aus Trypanosomen (*DNA Blood and tissue kit*) und ließen definierte Standardwerte (1 ng, 1000 ng, 10 000 ng Trypanosomen-DNA; photometrisch bestimmt) in der RTq-PCR mitlaufen.

2. Material und Methoden

2.2.8 Quantum dots

Mithilfe des *Cell labeling Kits QTracker* von Invitrogen können fluoreszierende Nanokristalle in lebende Zellen eingebracht werden. Diese haben eine stabile, intensive Fluoreszenz, die sich über mehrere Zellgenerationen hält.

Anregung: $\lambda=300-565$ nm

Emission: $\lambda=605$ nm

Für die Versuche wurden 5 μ l Qtracker[®] Component A und 5 μ l Component B in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt und 5 min inkubiert. Dann wurde 200 μ l des entsprechenden Mediums zugegeben und 30s gevortext. Anschließend wurden 200 μ l der Zellsuspension hinzugefügt und bei 37°C im Brutschrank für mindestens eine Stunde inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden nach der Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.2.9 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 19 für Windows durchgeführt. Die Daten wurden mithilfe des T-Tests auf Signifikanz untersucht. Als signifikant unterschiedlich wurden Daten angesehen, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p<0,05$) hatten. Irrtumswahrscheinlichkeiten unter 1% ($p<0,01$) wurden mit ** im Diagramm gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von Trypanosomen aus dem Gehirn

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen (siehe 2.2.3, Seite 56) nicht durch Trypanosomen aus den Blutgefäßen kontaminiert waren. Hierfür wurden jeweils zu einem frühen Zeitpunkt (vier Tage p.i.; Tabelle 3) und zu mehreren späten Zeitpunkten (>20 Tage; Tabelle 4 und Abbildung 21) Trypanosomen aus dem Gehirn rekultiviert und quantifiziert.

Tabelle 3: Negativkontrolle nach vier Tagen

Infektionsdauer	Titer im Blut [1/ml]	Absolute Ausbeute (Gehirn)
4 Tage	$1,25 \cdot 10^7$	$<1 \cdot 10^4$

Eine Zellzahl $<1 \cdot 10^4$ ist mit der Neubauerzählkammer nicht zählbar.

Tabelle 4: Quantifizierung der Ausbeute an Trypanosomen aus dem Gehirn

Infektionsdauer	Titer im Blut [1/ml]	Absolute Ausbeute (Gehirn)
25 Tage	$2,20 \cdot 10^8$	$2,50 \cdot 10^5$
29 Tage	n/a	$3,25 \cdot 10^5$
29 Tage	n/a	$6,00 \cdot 10^5$
30 Tage	$1,44 \cdot 10^8$	$5,60 \cdot 10^4$
30 Tage	$2,50 \cdot 10^8$	$3,40 \cdot 10^5$
30 Tage	$5,00 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^6$
30 Tage	$8,25 \cdot 10^7$	$7,50 \cdot 10^5$
32 Tage	n/a	$3,40 \cdot 10^5$
35 Tage	n/a	$7,50 \cdot 10^5$
36 Tage	$1,75 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^5$

3. Ergebnisse

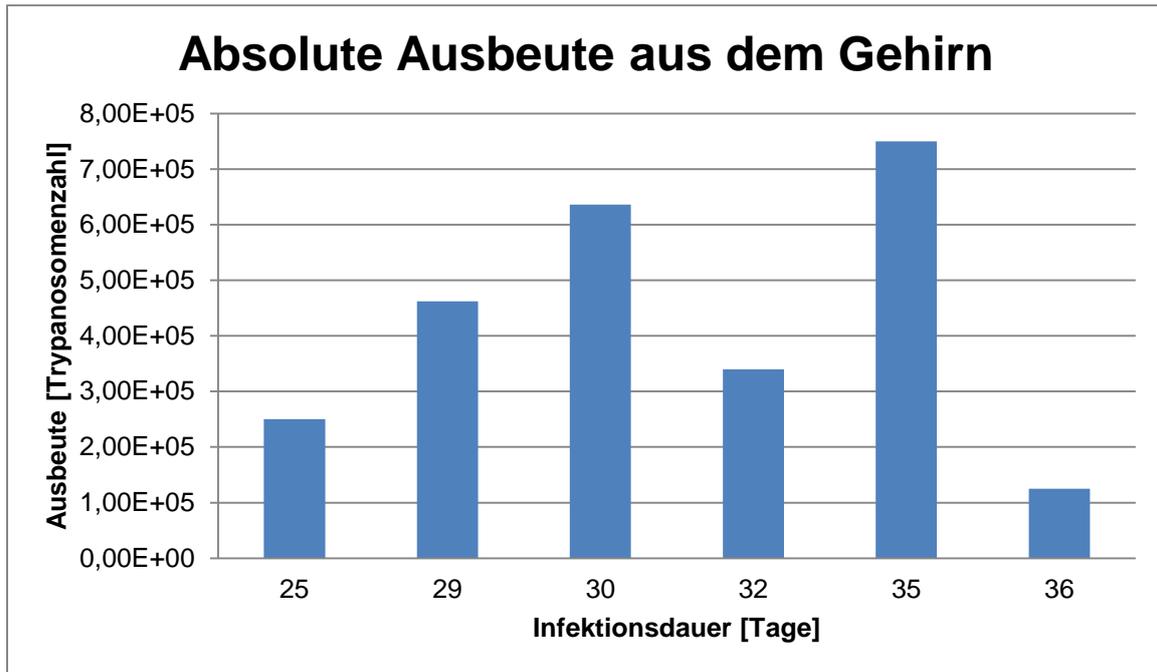


Abbildung 21: Diagramm der absoluten Ausbeute aus dem Gehirn (siehe Tabelle 4). Abbildung 21 zeigt wie viele Trypanosomen aus dem Gehirn von Ratten nach einer bestimmten Infektionsdauer isoliert werden konnten.

3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Trypanosomen aus dem Gehirn

Im Folgenden wird der Begriff „Blutform“ verwendet, um die Morphologie der Trypanosomen in der Frühphase der Infektion im Blut (<10d) zu bezeichnen.

3.2.1 Lichtmikroskopische Bilder von Trypanosomen aus dem Gehirn

Die aus dem Gehirn gewonnenen Trypanosomen zeigen morphologische Besonderheiten und unterscheiden sich von der Blutform im Frühstadium der Erkrankung. Die reisolierten Trypanosomen aus dem Gehirn sind deutlich schmaler und länger als normale *slender* und *stumpy* Formen, die im Blut in der frühen Phase der Infektion beobachtet wurden (siehe Abbildung 22).

3. Ergebnisse

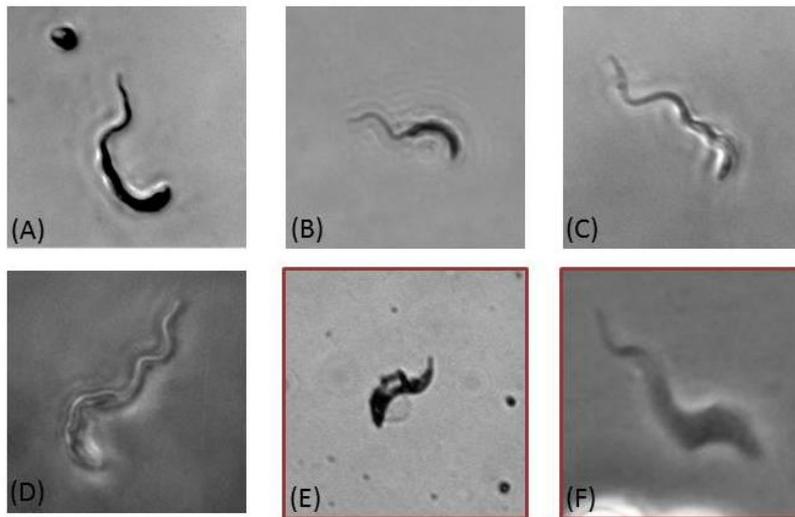


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Bilder von Trypanosomen aus dem Gehirn (A-D) und Trypanosomen aus dem Blut (E; F)

3.2.2 DAPI-Färbung

Etwaige Unterschiede in der Kern- und Kinetoplastenlokalisierung wurde mittels DAPI-Färbung untersucht. Trypanosomen wurden 32 Tage p.i. aus dem Gehirn einer Ratte isoliert. Die DAPI-Färbung zeigt die Kern- und die Kinetoplasten-DNA. Im Vergleich zur Blutform (*data not shown*) lässt sich kein Unterschied der DNA-Lokalisation feststellen.

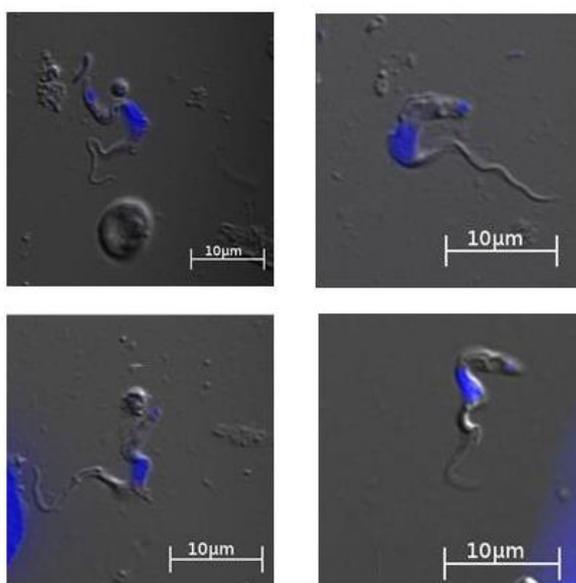


Abbildung 23: DAPI-Färbung von Trypanosomen aus dem Gehirn

3. Ergebnisse

3.2.3 Quantitative Erfassung verschiedener Trypanosomenformen (LM)

100 Trypanosomen aus dem Blut im Frühstadium und 100 Trypanosomen aus dem Gehirn wurden anhand ihrer Morphologie entweder als *long slender*, *short stumpy* Form oder als Blutformtrypanosom kategorisiert (siehe Abbildung 25). Der Zuordnung lagen folgende Beispielbilder (siehe Abbildung 24) zugrunde.

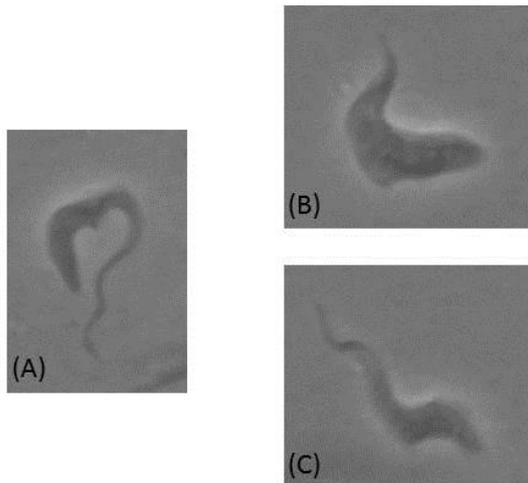


Abbildung 24: lichtmikroskopische Beispielbilder zur morphologischen Kategorisierung von Trypanosomen (A) *long slender*; Blutform: (B) *stumpy* Form und (C) *slender* Form

Für die Auszählung nach morphologischen Kriterien wurden Trypanosomen aus dem Blut einer vier Tage infizierten Ratte und aus den Gehirnen von einer 29 Tage und einer 35 Tage infizierten Ratte gewonnen (siehe Abbildung 25). Bei der vier Tage infizierten Ratte fanden sich kaum Trypanosomen im Blut, die der *long slender* Form ähneln. Der Mehrzahl der Zellen (85%) ließen sich morphologisch den Blutformen zuordnen. Nach 29 Tagen Infektion zeigten die aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen hingegen schon fast 50% der Zellen eine ähnliche Morphologie wie Abbildung 24 (A), nur 40% der Zellen ähneln noch den typischen Blutformen (siehe Abbildung 24 (B)). Dieser Trend setzte sich fort, betrachtet man das Ergebnis der Auszählung der Trypanosomen aus dem Gehirn einer für 35 Tage infizierten Ratte. Hier sind bereits 50% der Zellen eindeutig als Hirnformen erkennbar und nur noch knapp über 30% der

3. Ergebnisse

Trypanosomen zeigen eine Blutformmorphologie. Der Anteil an *long slender* Formen scheint mit der Dauer der Infektion zuzunehmen.

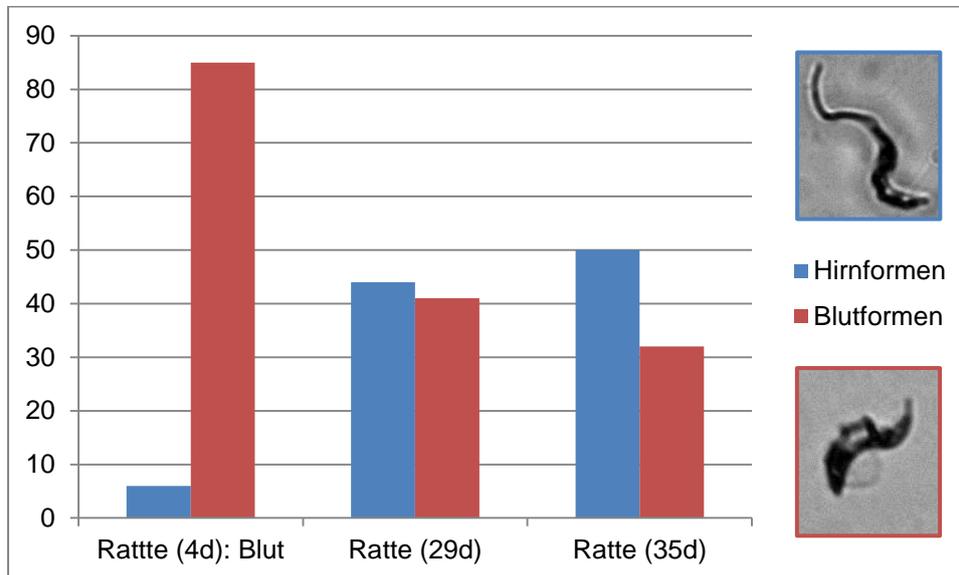


Abbildung 25: Morphologische Kategorisierung von jeweils 100 Trypanosomen aus dem Blut und aus dem Gehirn von Ratten

3.3 Rasterelektronenmikroskopie der Trypanosomen (Gehirn)

3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Trypanosomen (Gehirn)

Die aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen (25, 30 und 35 p.i.) wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Vergleichend wurden REM-Aufnahmen von Trypanosomen gemacht, die nach vier Tagen aus dem Blut gewonnen worden waren.

3. Ergebnisse

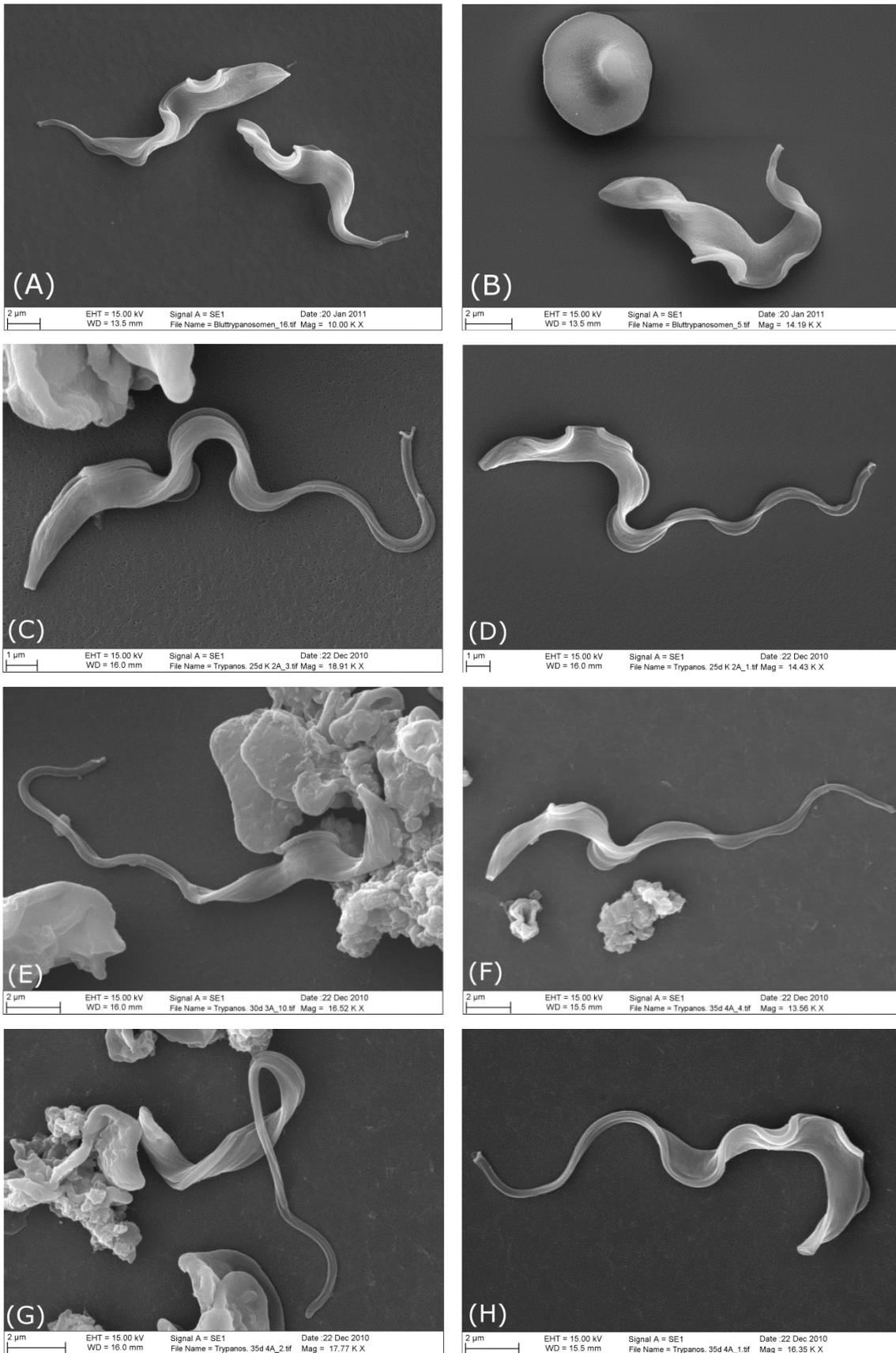


Abbildung 26: REM-Bilder Blutformen 4d (A; B) und *long slender* Formen (C, D 25d; E 30d; F-H 35d)

3. Ergebnisse

Die *long slender* Formen (siehe Abbildung 26 C-H) unterscheiden sich deutlich von den Blutformen (siehe Abbildung 26 A, B). Die aus dem Gehirn isolierten Parasiten haben eine deutlich längere Geißel und einen schlankeren Zelleib.

3.3.2 Quantitative Erfassung verschiedener Trypanosomenformen (REM)

100 Trypanosomen aus dem Blut und 100 Trypanosomen aus dem Gehirn wurden diesmal nicht anhand ihrer Morphologie (siehe 3.2.3, Seite 64), sondern durch die Geißellänge charakterisiert. Hierfür wurden jeweils 100 REM-Bilder von zufällig ausgewählten Trypanosomen gemacht, die aus Rattengehirnen nach 35 Tagen p.i. isoliert wurden. Nochmals 100 REM-Bilder wurden als Vergleich von Trypanosomen gemacht, die nach vier Tagen aus dem Blut gewonnen wurden. Die Geißel wurde mithilfe der Software Cell F vermessen (siehe Abbildung 27).

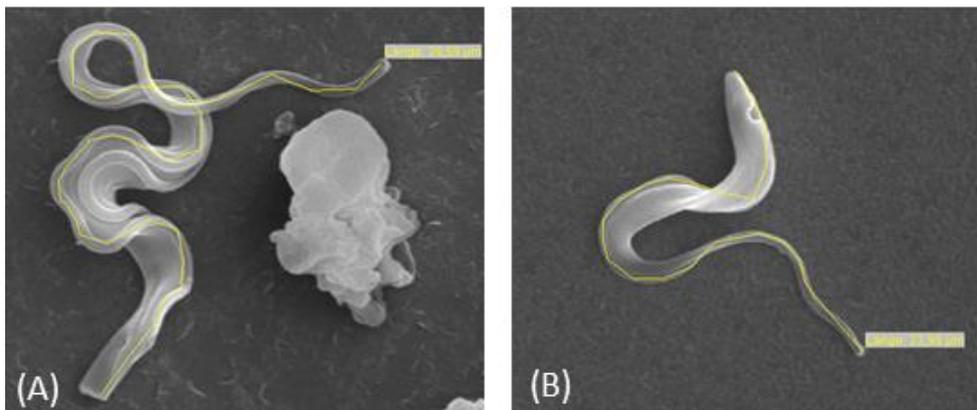


Abbildung 27: Ausmessung der Trypanosomen entlang der Geißel

3. Ergebnisse

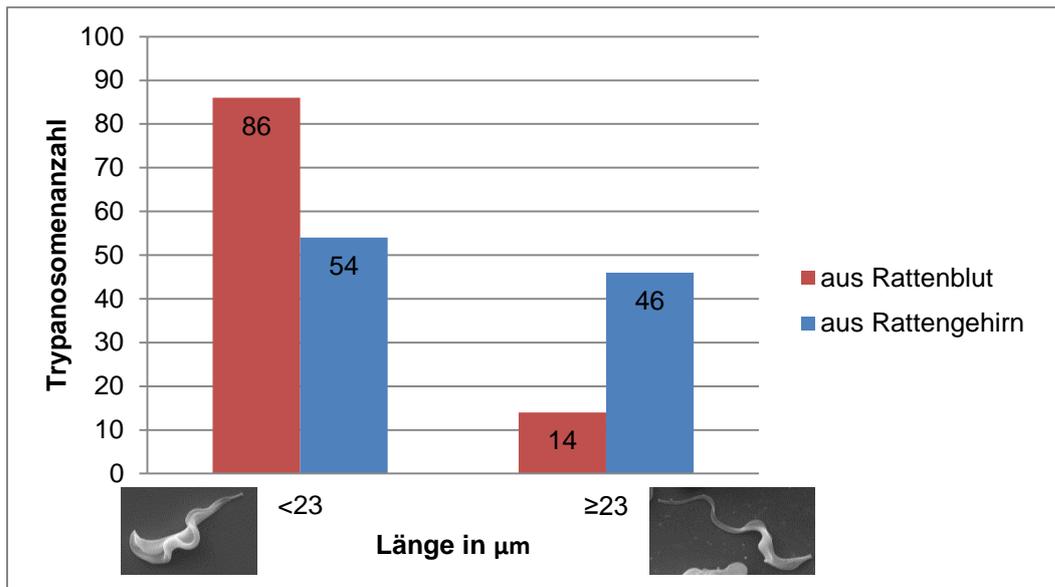


Abbildung 28: Messung der Geißellänge von 100 Trypanosomen aus dem Blut und 100 Trypanosomen aus dem Gehirn. Abbildung 28 zeigt den Unterschied der Geißellänge zwischen Blut- und long slender Formen.

In Abbildung 28 ist der Unterschied der Geißellänge grafisch dargestellt. Wesentlich mehr Trypanosomen, die aus dem Gehirn isoliert wurden besitzen eine Geißellänge über 23 µm. Die statistische Auswertung mit SPSS zeigt, dass auch die durchschnittliche Geißellänge der aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen signifikant länger ist.

Abbildung 28: Messung der Geißellänge von 100 Trypanosomen aus dem Blut und 100 Trypanosomen aus dem Gehirn. Die Tabelle 5 zeigt die genaue Auswertung mithilfe des unabhängigen t-Tests.

Tabelle 5: T-Test

	Anzahl N	Mittelwert Geißellänge [µm]	Standardfehler des Mittelwerts	Standardabweichung
Blut	100	21,1417	0,2195497	2,1954973
Gehirn	100	22,6631	0,4208737	4,2087369

	Signifikanz	durchschnittliche Differenz [µm]
Geißellänge (Blut vs. Gehirn)	0,002	-1,5214

3. Ergebnisse

3.4 Transmissionselektronenmikroskopische Bilder

3.4.1 TEM-Bilder: isolierte Trypanosomen aus dem Gehirn von Ratten

Die TEM-Bilder der isolierten Gehirntrypanosomen zeigten keine Besonderheit der Zellorganellstruktur und einen intakten VSG-Oberflächenmantel (*data not shown*).

3.4.2 TEM-Bilder: Gewebeschnitte aus Rattengehirnen

Die Gehirnschnitte wurden von Ratten angefertigt, die zwischen 22 und 34 Tagen infiziert waren.

Abbildung 29 zeigt den Aufbau eines gesunden Choroid Plexus.

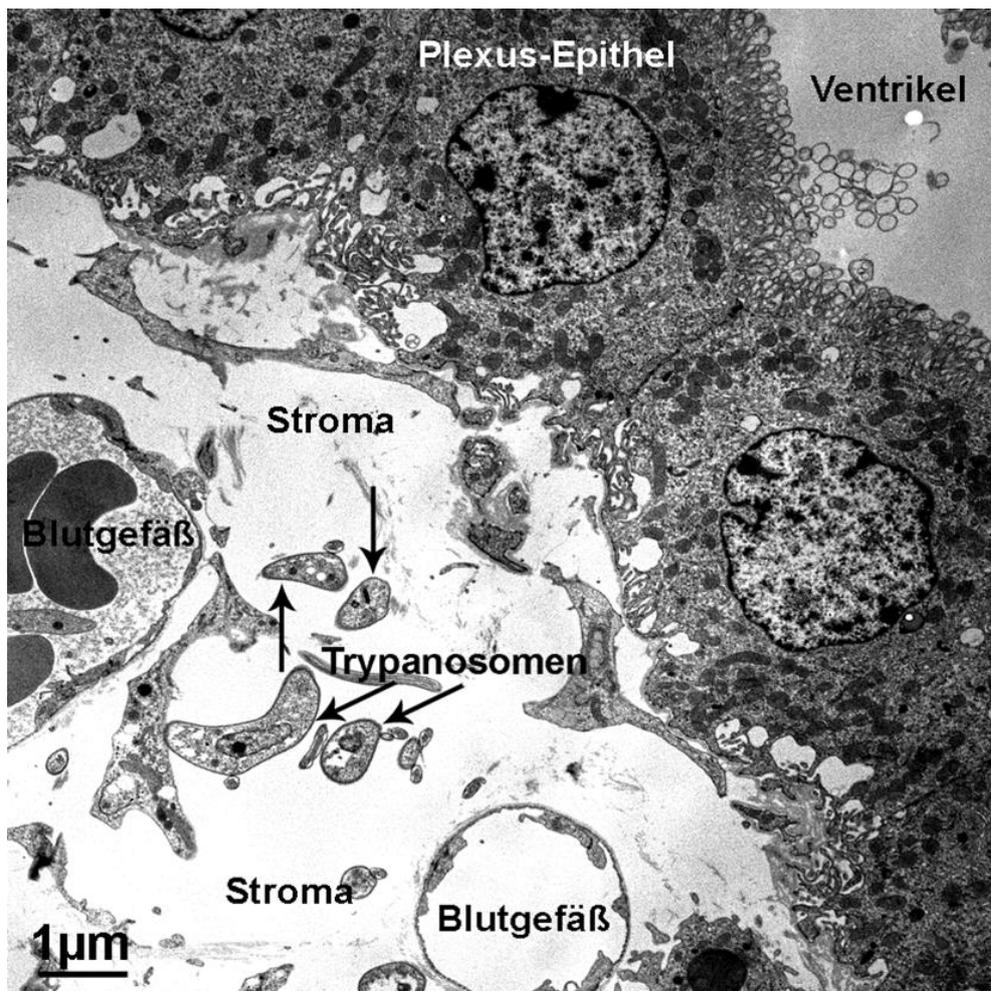


Abbildung 29: Choroid Plexus mit Trypanosomen im Stroma

3. Ergebnisse

Die Blutgefäße sind fenestriert. Das einschichtig kuboidale Plexusepithel trennt bindegewebiges Stroma von liquorgefüllten Ventrikelraum. Gesäumt werden die Epithelzellen durch Mikrovilli verschiedener Größe. In der Nähe des Blutgefäßes sieht man mehrere Trypanosomen im Stroma liegen. Gut erkennbar ist die Geißel mit der 9x2+2 Struktur der Mikrotubuli, der Nucleus mit einem deutlichen Nucleolus und der dunkle Saum aus VSG-Molekülen.

Trypanosomen waren nicht nur im Stroma des Plexus zu finden, sondern auch innerhalb der fenestrierten Plexusgefäße und im Ventrikelraum (siehe Abbildung 30). Die zwei Trypanosomen im Liquorraum sehen nicht degeneriert aus und haben einen intakten Oberflächenmantel. Ventrikelseitig ist eine Kolmerzelle (auch Epiplexuszelle) zu sehen. Dieser Zelltyp ist monozytenähnlich und wandert vom Blut durch das Stroma in den Ventrikel ein.

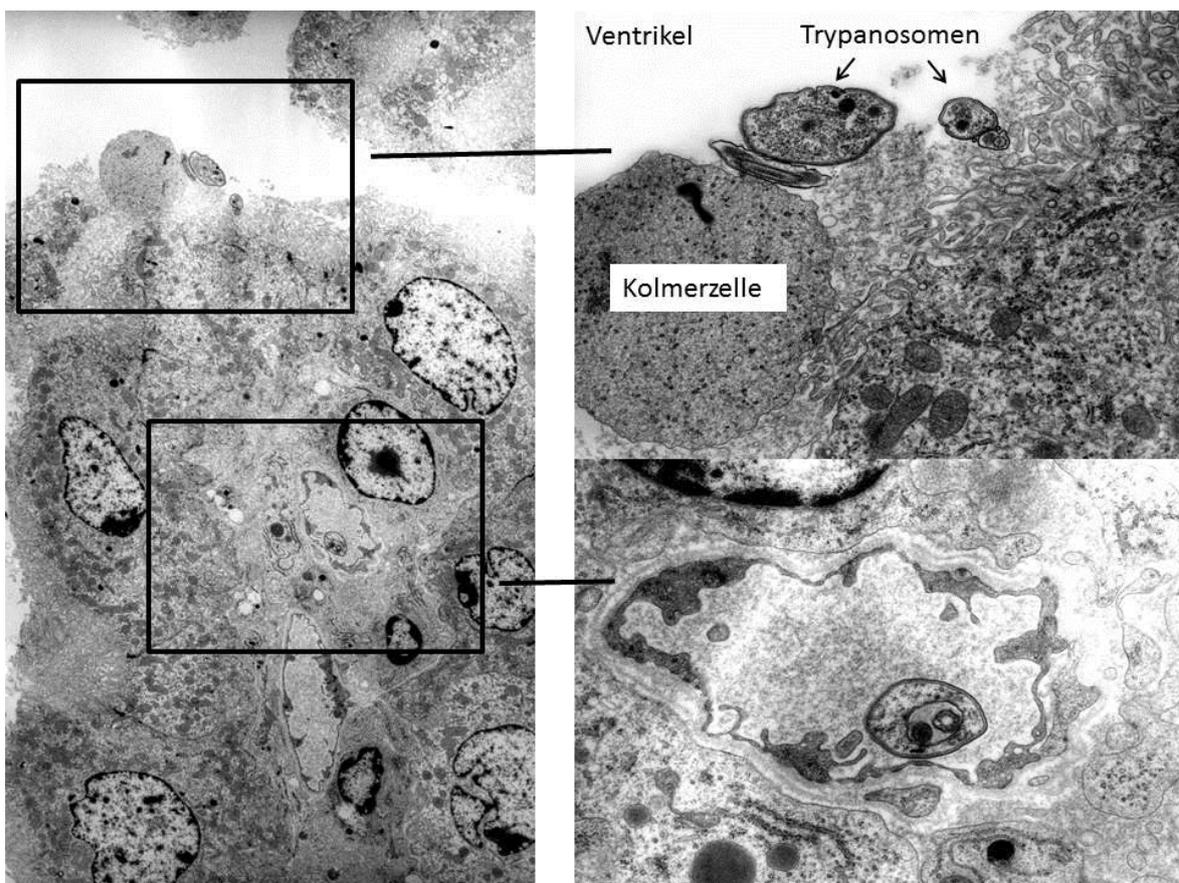


Abbildung 30: Trypanosomen im Ventrikelraum zusammen mit einer Kolmerzelle (oben); Trypanosom im Gefäß des Choroid plexus (unten)

3. Ergebnisse

In unseren Schnitten konnten Trypanosomen direkt am fenestrierten Kapillarendothel beobachtet werden. In Abbildung 31 sind in der *Tunica adventitia* des Gefäßes mehrere Trypanosomen angeschnitten.

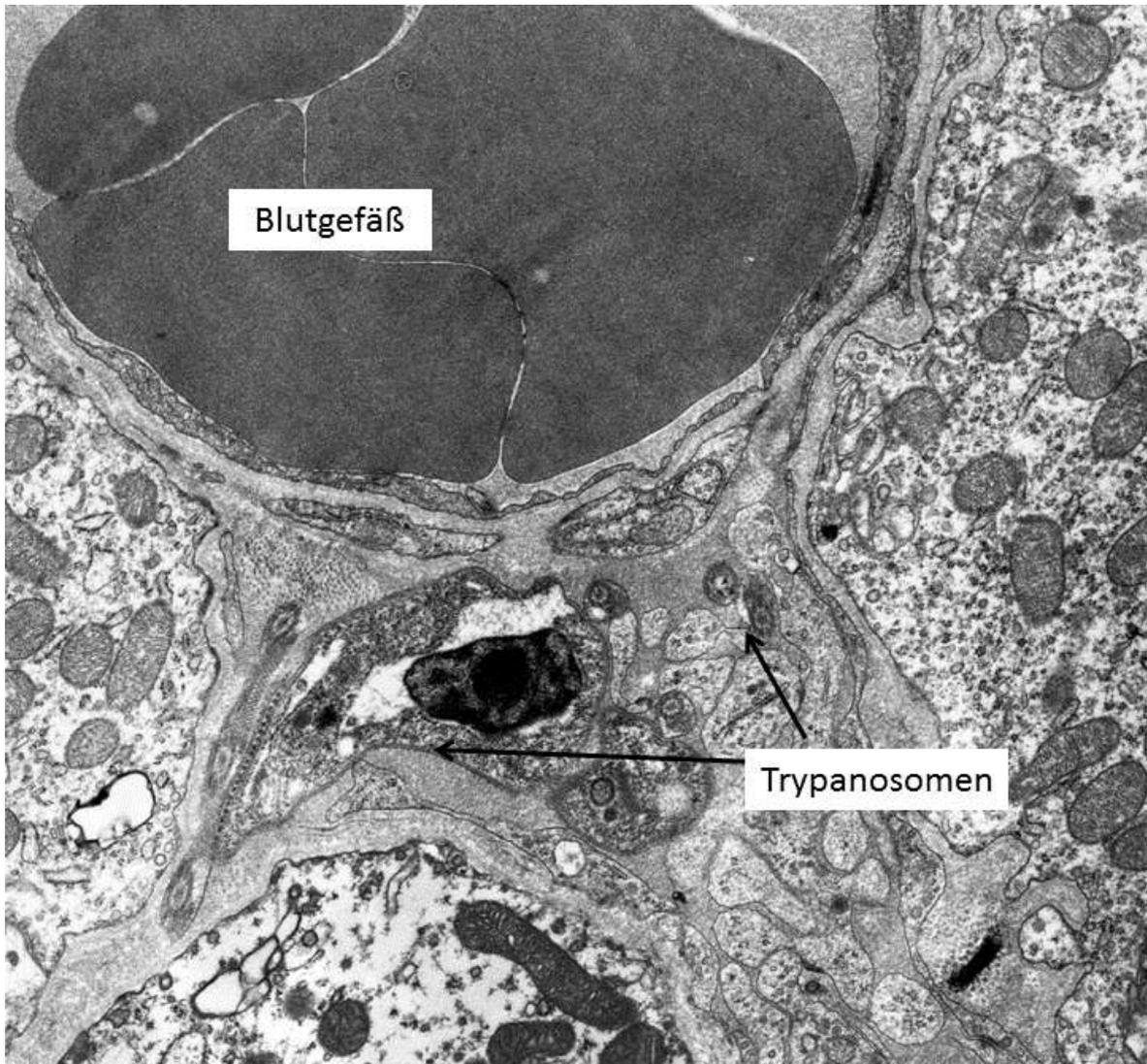


Abbildung 31: Trypanosomen in der Nähe eines fenestrierten Blutgefäßes im Choroid Plexus

3. Ergebnisse

Einigen Trypanosomen im Stroma des Plexus fehlte der Oberflächenmantel (siehe Abbildung 32).

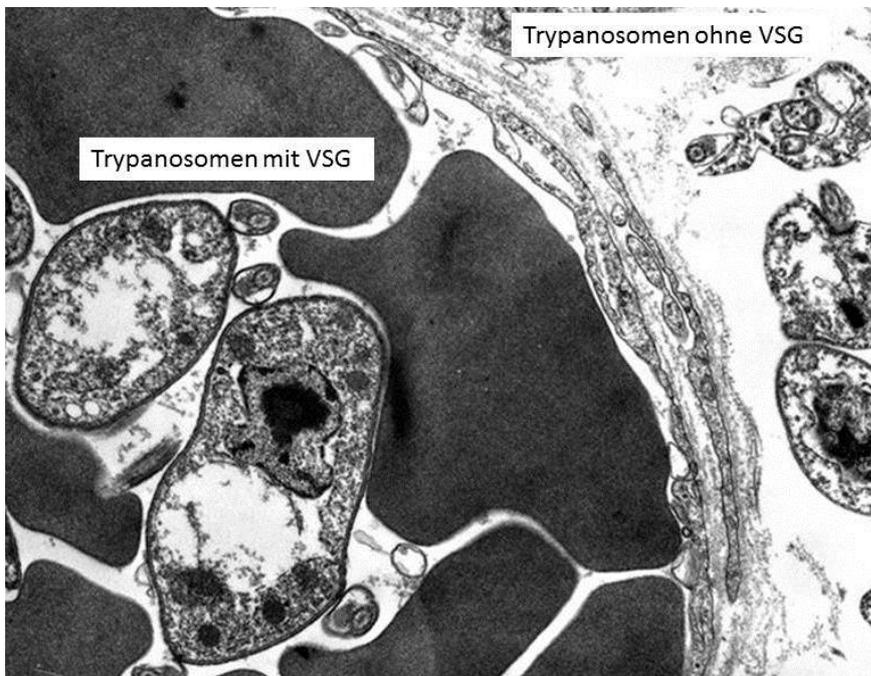


Abbildung 32: Trypanosomen im Choroid Plexus im Blutgefäß mit VSG-Mantel und im Stroma ohne VSG-Mantel

In einem der Schnitte war ein einzelner intrazellulärer Trypanosom zu sehen (siehe Abbildung 33).

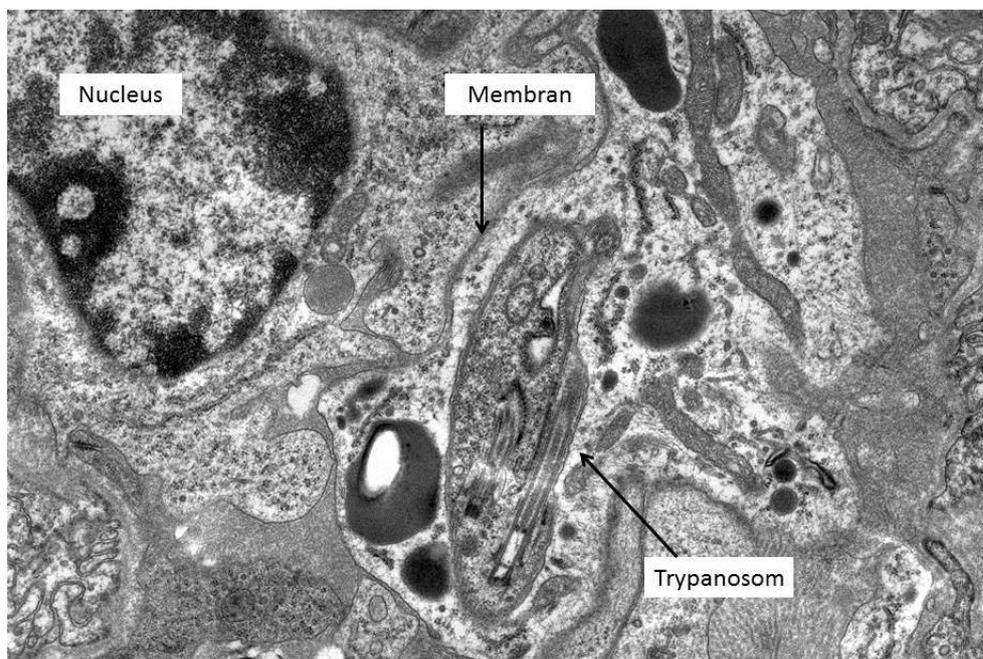


Abbildung 33: Intrazellulärer Trypanosom im Stroma des Choroid Plexus

3. Ergebnisse

Am oberen linken Rand ist der Kern der den Trypanosom umgebenden Zelle zu sehen. Das abgebildete Trypanosom ist gut erhalten. Innerhalb der Membran finden sich auch Mitochondrien und andere kleine Organelle.

Im Subarachnoidalraum und in den Virchow-Robin-Räumen finden sich sehr viele Trypanosomen (siehe Abbildung 34). Sie dringen in die Pia mater ein und sammeln sich dort (siehe Abbildung 35).

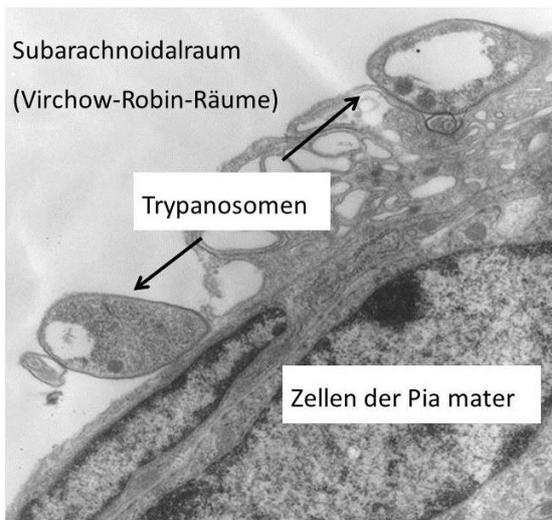


Abbildung 34: Trypanosomen im Subarachnoidalraum bzw. in den Virchow-Robin-Räumen

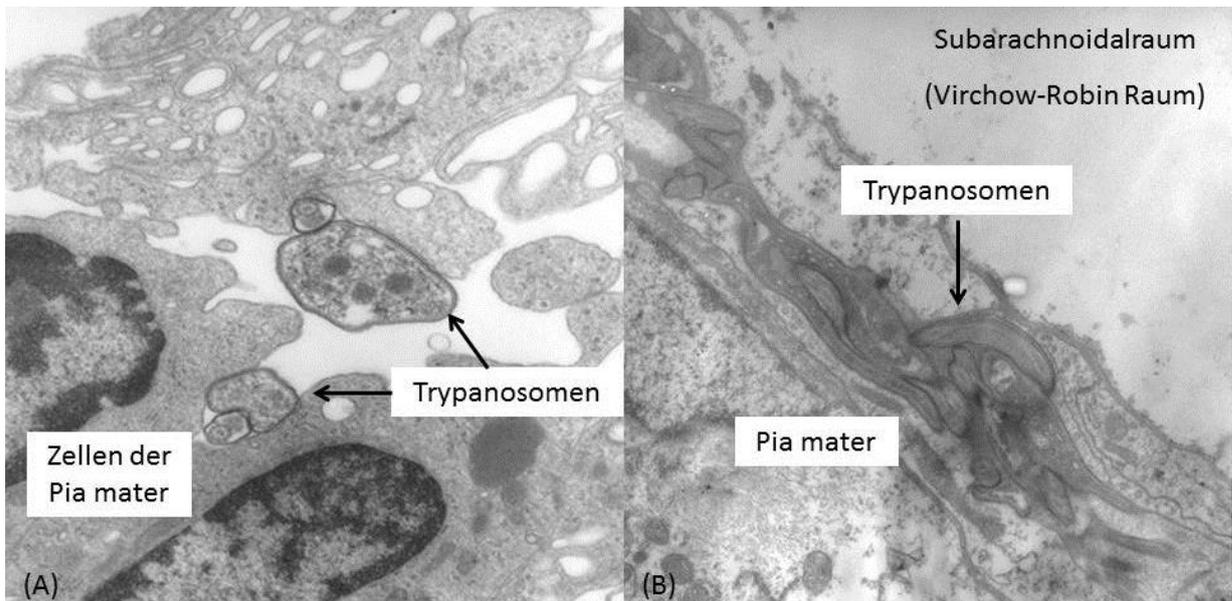


Abbildung 35: Trypanosomen dringen in die Pia mater ein (A) und sammeln sich dort (B)

3. Ergebnisse

Nirgends im Gehirnparenchym fanden sich Trypanosomen. In den Blutgefäßen des Gehirns konnten dagegen Trypanosomen beobachtet werden (siehe Abbildung 36).

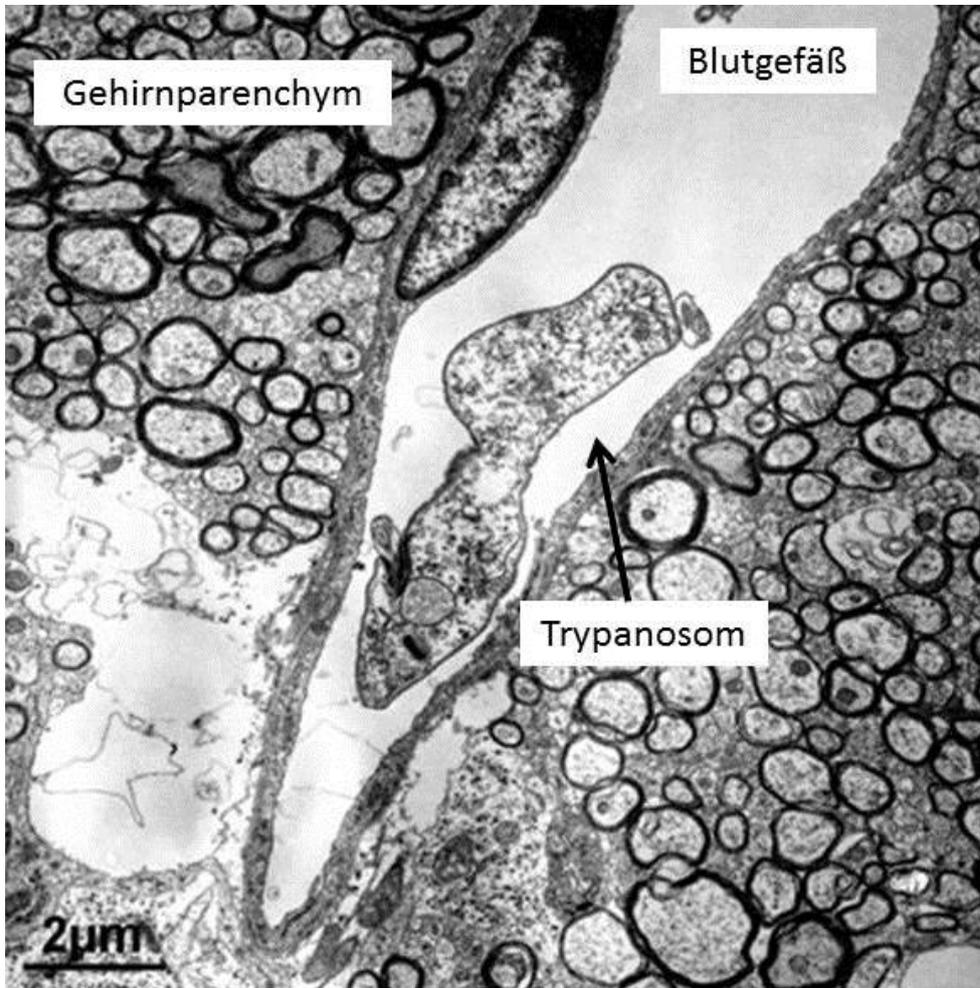


Abbildung 36: Trypanosom in einem Blutgefäß des Gehirns

3. Ergebnisse

3.5 Kartierung eines Rattengehirns entsprechend der Trypanosomendichte

Der Lokaltopismus von Trypanosomen im Gehirn wurde mittels RTq-PCR untersucht. Auf die Gesamt-DNA Menge konnte durch Einsatz eines *house-keeping gene* (GAP-DH) geschlossen werden. Die Amplifikationseffizienz der GAP-DH betrug 1,22. Die c_p -Werte (*crossing point*) der verschiedenen Proben ließen Rückschlüsse auf die relativen DNA-Mengen der verschiedenen Gehirnregionen zu. Zunächst wurde die relative Menge bestimmt, dann wurden die einzelnen Proben auch photometrisch gemessen. Ein Wert wurde beispielhaft übernommen und die anderen in Relation dazu berechnet (siehe Tabelle 6).

Formel zur Berechnung der relativen DNA-Menge über die c_p -Werte:

$$\text{Effizienz}^{\Delta c_{p1}} \cdot c(\text{DNA}_1) = \text{Effizienz}^{\Delta c_{p2}} \cdot c(\text{DNA}_2)$$

Die Koordinaten dienen der Orientierung der einzelnen Hirnproben in drei Richtungen (x,y,z). Die x-Koordinate unterteilt die Hemisphäre in einen medialen (x = 1) und einen lateralen (x = 2) Teil. Der y-Achsenabschnitt gibt an, wie weit rostral bzw. okzipital der Gehirnteil einzuordnen ist. Die basale (z = 2) oder apikale (z = 1) Ausrichtung wird durch die z-Koordinate angegeben (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

Der DNA_1 an der Stelle 1/1/1 wurde die relative DNA-Menge 1 zugeordnet und die anderen relativen DNA-Mengen dazu in Beziehung gebracht (siehe Tabelle 6).

3. Ergebnisse

Tabelle 6: DNA-Berechnung der GAP-DH RTq-PCR (z = 1), rechts

Y	X	Relative DNA-Menge (GAP-DH)	Absolute DNA-Konzentration [ng/μl]	Photometrische Bestimmung der DNA [ng/μl]
1	1	1,00	50	57
2	1	2,24	112	112
3	1	1,60	80	75
4	1	1,38	69	78
5	1	1,30	65	108
1	2	1,68	84	45
2	2	1,26	63	35
3	2	1,38	69	67
4	2	1,30	65	47
5	2	1,12	57	62

Die gleiche Vorgehensweise wurde auch für z = 2 verwendet (siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: DNA-Berechnung der GAP-DH RTq-PCR (z = 2), rechts

Y	X	Relative DNA-Menge (GAP-DH)	Absolute DNA-Konzentration [ng/μl]	Photometrische Bestimmung der DNA [ng/μl]
1	1	1,29	65	59
2	1	1,36	68	85
3	1	1,41	70	85
4	1	1,48	74	54
5	1	1,43	71	44
1	2	1,14	57	18
2	2	1,20	60	45
3	2	1,30	65	72
4	2	1,25	62	58
5	2	1,17	58	48

3. Ergebnisse

Zur eigentlichen Bestimmung der Trypanosomen-DNA wurde die trypanosomenspezifische alternative Oxidase (tbAOX) verwendet. Durch die Eichkurve aus vier Standardwerten (0, 10, 1 000, 10 000 ng/ μ l Trypanosomen-DNA) konnten die c_p -Werte der Gehirnproben in DNA-Konzentrationen umgerechnet werden. Diese wurden in Beziehung zur Gesamt-DNA-Menge gesetzt, um vergleichbar zu sein (relative Werte der GAP-DH). Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 und in Abbildung 38 dargestellt. Die Relation der Trypanosomenverteilung in den verschiedenen Gehirnteilen ist in der rechten Hemisphäre durch die Kugelgröße verdeutlicht. Am meisten Trypanosomen-DNA fand sich in der oberen medialen Hemisphäre ($x = 1, y = 3, z = 1$). Anatomisch liegen hier unter anderem der Thalamus und das Ventrikelsystem.

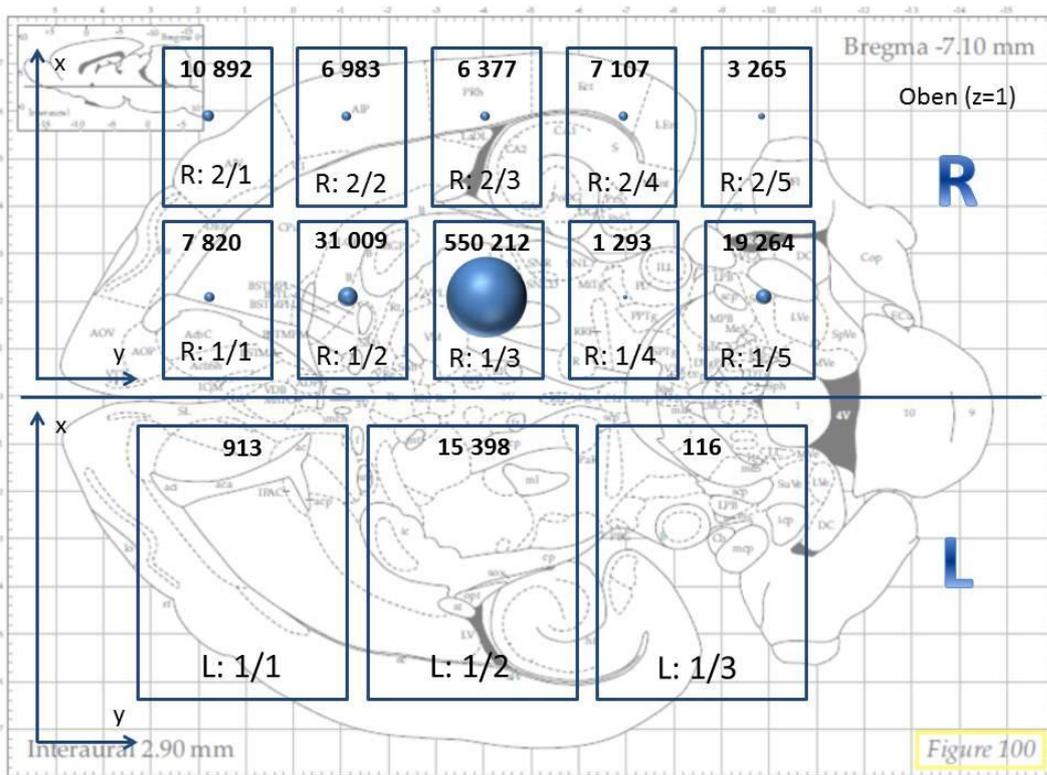


Abbildung 37: Trypanosomenverteilung in der rechten und linken oberen Hemisphäre

3. Ergebnisse

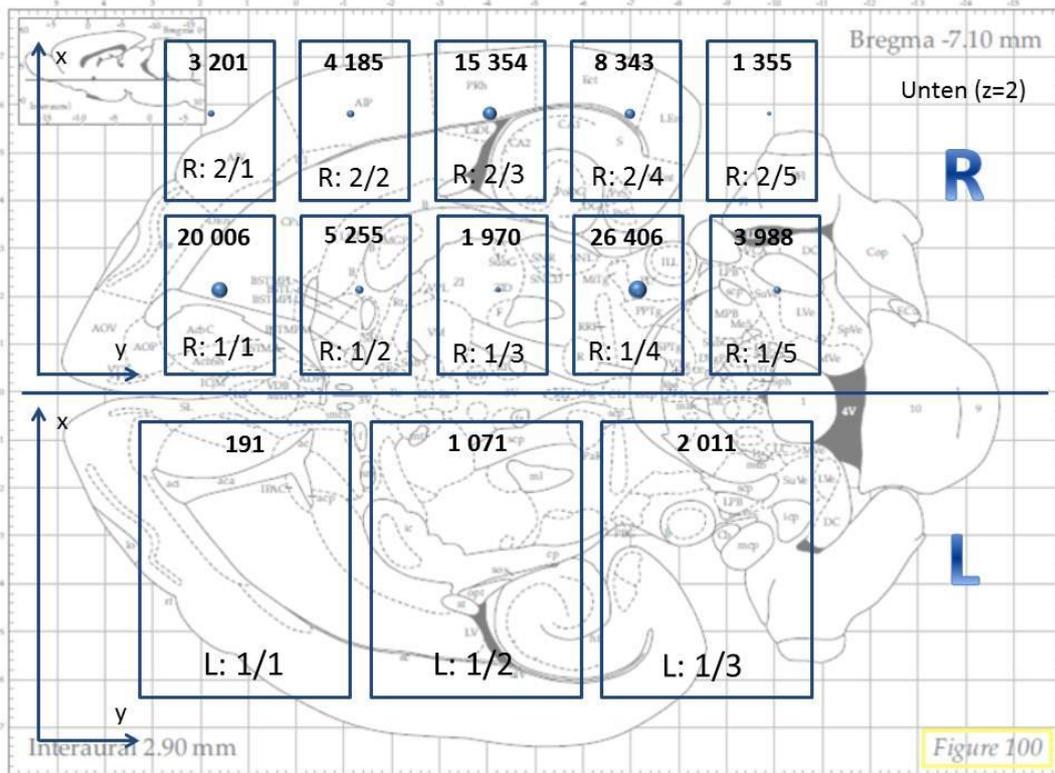


Abbildung 38: Trypanosomenverteilung in der rechten und linken unteren Hemisphäre

Im Kleinhirn war die Trypanosomenverteilung im Bereich von 1-15 935. Die größte Anzahl fand sich rechts okzipital.

3. Ergebnisse

3.6 Kultivierung von AnTat 1.1 in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)

Die Trypanosomen aus einem Stabilat wurde auf eine Zellzahl von circa $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und anschließend in verschiedenen Medien kultiviert.

Versuch 1:

- Kultivierung der Trypanosomen in 100% HMI-9 als Kontrolle
- Kultivierung in HMI-9 Medium und Liquor aus der Ratte im Verhältnis 1:1
- Kultivierung in 100% Rattenliquor

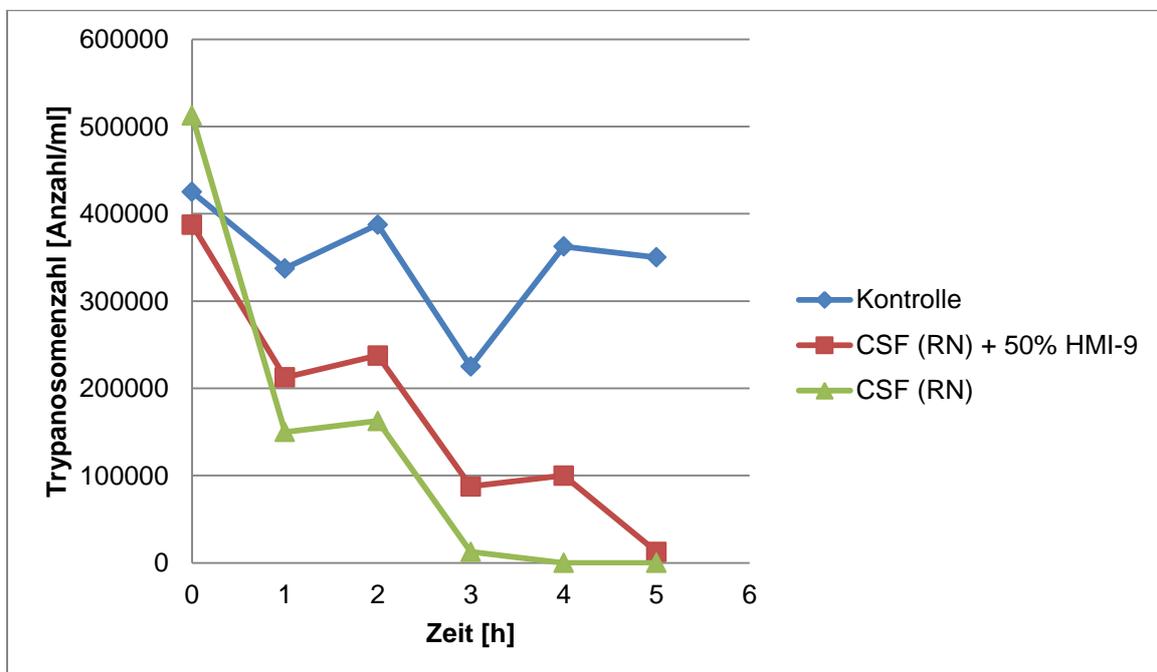


Abbildung 39: AnTat 1.1 Kultivierung in CSF aus einer Ratte (Versuch 1). Die Abbildung 39 zeigt, dass die Kontrolle sich rasch erholt und nach 10h relativ stabil geblieben ist, wohingegen Trypanosomen, die in Liquor inkubiert wurden bereits nach 5h tot waren. Das Überleben im gemischten Medium scheint etwas besser zu sein als in 100%igem Liquor, insbesondere im Hinblick auf die um $1 \cdot 10^5$ niedrigerer Ausgangskonzentration der Trypanosomen im gemischten Medium.

Die Trypanosomen-Konzentration wurde manuell mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt.

3. Ergebnisse

Versuch 2:

- Kultivierung der Trypanosomen in 100% HMI-9 als Kontrolle (siehe Versuch 1)
- Kultivierung in HMI-9 Medium und humanem Liquor im Verhältnis 1:1
- Kultivierung in 100% humanem Liquor

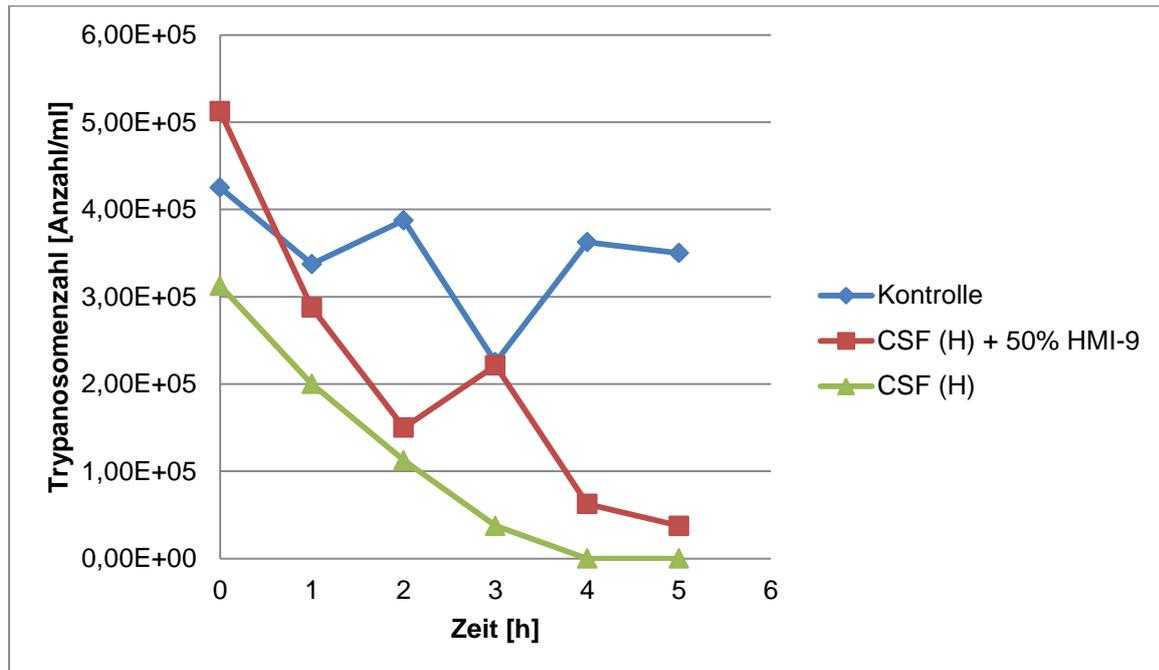


Abbildung 40: AnTat 1.1 Kultivierung in humanem CSF (Versuch 2). Der Kurvenverlauf in Abbildung 40 ähnelt Abbildung 39 in Versuch 1. Auch in humanem Liquor überleben die Trypanosomen nur 4-5h. In 100%igem humanem Liquor ist das Überleben schlechter als im gemischten Medium.

3. Ergebnisse

3.7 Vorversuche: Quantum dots und Trypanosomen

Ziel dieser Vorversuche war es, stabil über mehrere Tage fluoreszierende Trypanosomen zu entwickeln. Diese fluoreszierenden Blutformtrypanosomen sollten dann mittels einer Glaskapillare und einer Spritze, die über einen Schlauch verbunden waren, in verschiedene Hirnregionen der Ratte gespritzt werden. Die Hirninjektion von Blutformtrypanosomen könnte Aufschluss über einen eventuell vorliegenden Hirnregiontopismus geben. Ähnliche Versuche wurden bereits von unserer Kooperationsgruppe in Japan durchgeführt. Das Problem war jedoch das Wiederfinden der Trypanosomen, das lichtmikroskopisch nicht gelang. Dafür sollten nun Quantum dots eingesetzt werden. Um zu sehen, ob die Methode überhaupt funktioniert, wurde sie zunächst an Fibroblasten erprobt. Von Fibroblasten wurden die Quantum dots sehr gut aufgenommen (siehe Abbildung 41).

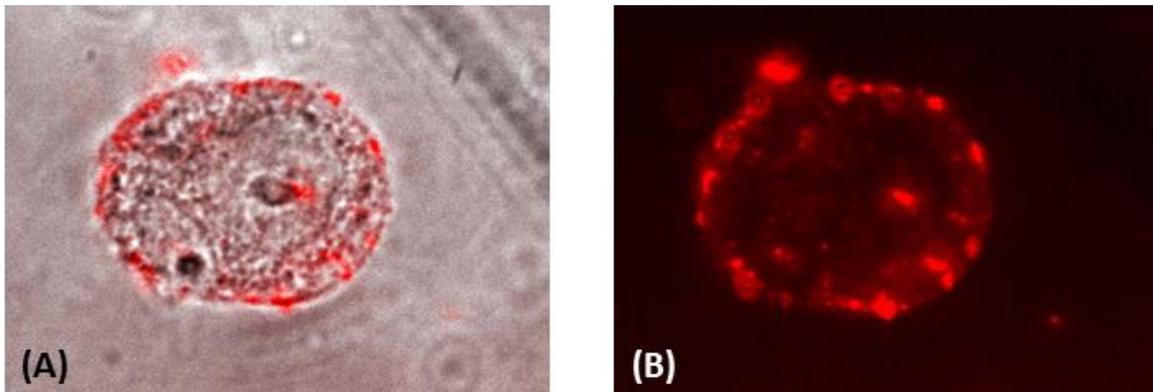


Abbildung 41: Fibroblasten mit Quantum dots (A) Durchlicht + Fluoreszenz; (B) Fluoreszenz

Im nächsten Schritt wurde die Aufnahme von Quantum dots durch prozyklische Trypanosomen untersucht, die keinen VSG-Mantel besitzen. Auch die prozyklischen Zellen fluoreszierten nach Aufnahme der Quantum dots stark (siehe Abbildung 42).

3. Ergebnisse

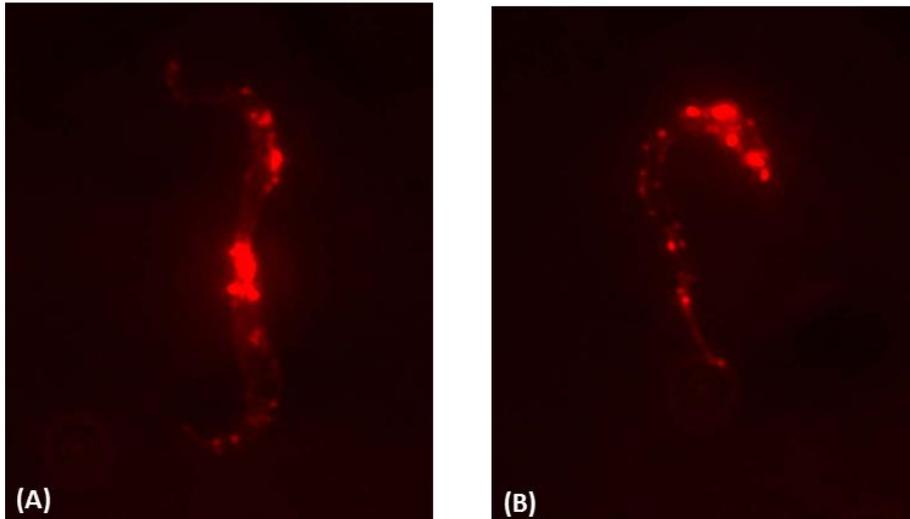


Abbildung 42: prozyklische Trypanosomen mit Quantum dots (A) *kissing trypanosomes* (B) einzelnes Trypanosom

Die Blutformen nahmen hingegen keine Quantum dots auf. Dies könnte auf den VSG-Mantel der Blutformtrypanosomen zurückzuführen sein, der den Transport der Nanokristalle ins Innere der Zellen zu verhindern scheint. Die Quantum dots sind an ein Peptid gekoppelt, das über Endozytose aufgenommen wird und in Vesikeln liegen bleibt. Blutformen nehmen dieses Peptid wahrscheinlich nicht auf. Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt, um die Quantum dots ins Zellinnere der Blutformtrypanosomen zu überführen:

1. Verschiedene pH-Werte

Die Inkubation bei verschiedenen pH-Werten, die eventuell die Membranladung der Blutformtrypanosomen verändern könnte, hatte keinen Erfolg.

2. Proteinase K

Die Idee war ein *cell-shaving* ohne die Zellen zu töten, damit die Blutformtrypanosomen ihr VSG verlieren und die Quantum dots aufnehmen könnten. Die Trypanosomen wurden eine Stunde mit Proteinase K und anschließend für eine Stunde mit Quantum dots inkubiert. Zwar überlebten die Trypanosomen die Prozedur, jedoch konnte intrazellulär keine Fluoreszenz beobachtet werden.

3. Ergebnisse

3. Proteinase K + Trypsin

Nach 15 min Inkubation mit beiden Proteinasen wurde die Enzymreaktion mit einem Inhibitor gestoppt, bevor die Trypanosomen 1h zusammen mit den Quantum dots inkubiert wurden. Nur sehr wenige Trypanosomen überlebten diese Behandlung, leider zeigten aber auch die sehr geschädigten, wenngleich noch bewegliche Trypanosomen keine Fluoreszenz.

4. Längere Inkubationszeit (bis zu 24h)

Trotz langer Inkubationszeit fluoreszierten nur die toten Trypanosomen.

5. Niedrige Temperatur (23°C)

Die Inkubation bei 23°C für 16h sollte eine Umwandlung der Trypanosomen in die prozyklische Form bewirken und die Aufnahme der Nanokristalle ermöglichen. Jedoch sollte der Versuch rechtzeitig abgebrochen werden, um eine irreversible Umwandlung zu verhindern. Nach 16h bei 23°C wurden die Zellen gemeinsam mit den Quantum dots für 1h bei 37°C inkubiert. Auch dieser Ansatz erwies sich als erfolglos.

6. Hohe Temperatur (42°C)

Die hohe Temperatur könnte die Durchlässigkeit der Parasitenzellmembran erhöhen und so die Aufnahme der Quantum dots erleichtert. Nach einer Inkubation bei 42°C für 45 min gemeinsam mit den Quantum dots war jedoch keine Fluoreszenz im Inneren der Zellen sichtbar.

7. Entfernen des VSG-Coats durch *cell-shaving* [98, 99]

Mittels *cell-shaving* wurde versucht die Plasmamembranproteine zu entfernen, aber auch in diesem Ansatz gelang es nicht, die Quantum dots in die Trypanosomen einzubringen, obwohl die Parasiten den Hitzeschock gut überstanden.

4. Diskussion

4.1 Verwendetes Modell zur Darstellung der Hirninfektion

Ein praktisches und reproduzierbares Tiermodell stellt bei der Untersuchung des Gehirnstadiums der Schlafkrankheit ein Problem dar. Eine chronische Infektion in Nagern mit entsprechender Neuropathogenese, lässt sich häufig nicht beobachten. Die Tiere sterben meist, bevor es zur Ausbildung einer vollständigen Hirninfektion kommt [96, 100, 101]. Bei größeren Säugetieren wie Affen [102] oder Rindern ist das Endstadium einer trypanosomen-induzierten Enzephalitis beschrieben worden [101]. Packchianian experimentiert 1963 mit verschiedenen Weißfußmäusearten (*Peromyscus*) und *Trypanosoma equiperdum* und konnte ebenfalls eine vollständige Hirninfektion beobachten. Akut und schnell fatal verlief hingegen die Infektion von *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* mit *Trypanosoma equiperdum* [103]. Poltera verwendete 1980 OF-1 Mäuse und *T. b. brucei* als Modellorganismen für die Schlafkrankheit und konnte nach neun Wochen eine beginnende Enzephalitis nachweisen [78].

Wir verwendeten für unsere Experimente *T. b. brucei* in Ratten (*Rattus norvegicus*), um besonders den frühen Verlauf einer Hirninfektion genauer zu untersuchen. Dementsprechend konnte eine Enzephalitis lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch nie nachgewiesen werden. Die Tiere lebten nur etwa 30-40 Tage, so dass vermutlich die Zeit zu kurz war, um eine vollständige Enzephalitis zu entwickeln. Dieses Modell eignete sich jedoch gut, um das Anfangsstadium der Gehirninfection zu untersuchen.

4.2 Weg der Trypanosomen ins Gehirn

Für Trypanosomen scheint der Befall des Gehirns auf den ersten Blick in einer Sackgasse zu münden. Von hier aus ist der Weg über die Tsetse-Fliegen in weitere Wirte versperrt. Auf die Frage, welchen Vorteil den Parasiten eine Hirninfektion bietet, gibt es mehrere Hypothesen:

Zum einen ist das Gehirn ein mehr oder weniger immunprivilegiertes Organ und bietet so einen gewissen Schutz vor dem Immunsystem. Selbst wenn es dem

4. Diskussion

Immunsystem gelänge die Parasiten im Blut zu eradizieren, könnte das Gehirn als Quelle für die erneute Etablierung einer Parasitämie (*relapse*) dienen. Ein Rückfall trotz erfolgreicher Chemotherapie ist so möglich [74].

Ferner ist die Tagesmüdigkeit der Erkrankten vorteilhaft für die Parasiten. Der Biss der tagaktiven Tsetse-Fliegen ist sehr schmerzhaft und ohne Abwehrverhalten steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich Fliegen infizieren und die Krankheit weiter übertragen sicher an.

Obwohl Castellani bereits 1903 Trypanosomen im Liquor entdeckte und somit einen ersten Hinweis auf eine ZNS-Beteiligung lieferte, fehlt bis heute ein definitiver Beweis, auf welchem Weg die Trypanosomen ins Gehirn gelangen [104]. Nach etwa 20 Tagen kann man bei Ratten von einer Hirninfektion ausgehen [78, 105, 106]. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe S. 26) gibt es über den Weg ins Gehirn im Wesentlichen zwei konkurrierende Lehrmeinungen: Eintritt über die BHS ([82-88, 107] oder die BLS [81, 100, 105, 108]. Unsere Ergebnisse favorisieren den Weg über die BLS:

1. Station: *Plexus choroideus*

Schon 1988 beschrieb Schultzberg et. al. erstmals die frühe Lokalisation von Trypanosomen in den CVO und dem Choroid Plexus [89]. Dies wurde in zahlreichen weiteren Arbeiten bestätigt [78, 96, 100, 105, 109, 110]. Die frühe Lokalisation im Choroid Plexus konnte durch unsere EM-Bilder bestätigt werden. Es sind zahlreichen Trypanosomen im Stroma zu finden (siehe Abbildung 29 und Abbildung 31). Die frühe Lokalisation der Trypanosomen im Plexus lässt sich auch mit den Ergebnissen der RTq-PCR Kartierung vereinbaren. Die größte Menge an Trypanosomen-DNA findet sich medial in der Mitte des Gehirns. Anatomisch liegen hier die lateralen Ventrikel mit ihren Plexus. Dies passt zu der schon früher beschriebenen Beobachtung, dass mehr Trypanosomen in den Plexus der lateralen Ventrikel zu finden sind, als in den Plexus des 3. und 4. Ventrikels (siehe Abbildung 43) [100].

4. Diskussion

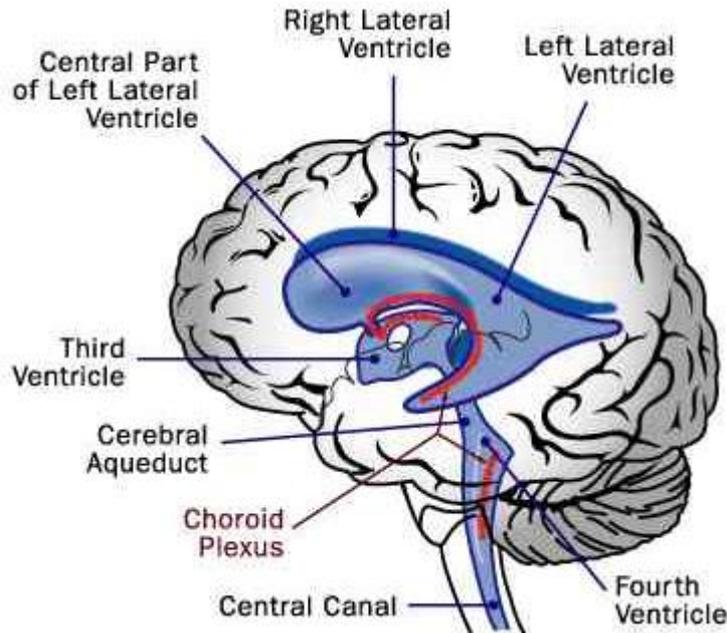


Abbildung 43: Ventrikelsystem des menschlichen Gehirns [111]

Im Plexusstroma waren auf einigen EM-Schnitten Trypanosomen ohne VSG-Mantel zu sehen (siehe Abbildung 32). Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Der VSG-Mantel könnte durch extrazelluläre Proteasen abgebaut werden, die von Immunzellen im Choroid Plexus als Abwehrmechanismus sezerniert werden. Denkbar wäre auch eine endogene Aktivierung der Phospholipase C [112] in Trypanosomen als Folge der parasitären Zelldichteregulation. Auch *Major Surface Proteases*, die von den Trypanosomen sezerniert werden, könnten einerseits den Weg über das Plexusepithel erleichtern, andererseits aber auch selbst den Mantel einiger Trypanosomen angreifen. Selten waren auf einigen EM-Schnitten des Choroid Plexus auch intrazelluläre Trypanosomen zu sehen (siehe Abbildung 33). Das abgebildete Trypanosom wurde wahrscheinlich gerade von einem Makrophagen phagozytiert. Festzuhalten ist, dass der Choroid Plexus für die Trypanosomen auf Dauer keine optimale Umgebung darstellt.

2. Station: Liquor

Trypanosomen werden bei Erkrankten nach einer Lumbalpunktion vereinzelt im Liquor gefunden und sind ein wichtiges diagnostisches Kriterium für das

4. Diskussion

meningoenzephalische Stadium der HAT. Entsprechend konnte experimentell bestätigt werden, dass Trypanosomen in der frühen Infektionsphase im Liquor von grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) und Mäusen nachweisbar sind [78, 105]. In den EM-Schnitten bei der experimentellen HAT in Nagern finden sich hin und wieder einzelne Trypanosomen (siehe Abbildung 30), wobei aber zu beachten ist, dass die Mehrzahl der Parasiten vermutlich durch die Präparation ausgewaschen wurden und nur erhalten bleiben, wenn sie an Hirnzellen (wie den Kolmarzellen) haften.

Die Liquorzusammensetzung ist proteinfreiem Plasma sehr ähnlich (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: CSF-Zusammensetzung

	CSF	Blut
Glukose	4 mM	4,5-7,5 mM
Proteine	0,2-0,3 mg/ml	60-80 mg/ml
Magnesium (Mg ²⁺)	2,3 mM	1,6 mM

Auch die Elektrolytkonzentration ist mit Ausnahme von Magnesium nahezu identisch. Im CSF sind wie im Blut metabolische Produkte, Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren zu finden. Auf den ersten Blick erscheint die Liquorzusammensetzung durchaus mit dem Überleben der Parasiten vereinbar zu sein. Glukose als essentieller Energielieferant für Trypanosomen ist in ausreichender Menge vorhanden [113]. Jedoch überleben *T. b. brucei* (AnTat 1.1) weder in Rattenliquor noch in humanem Liquor länger als 5h (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40). Unsere Messungen bestätigen die Ergebnisse von Pentreath et. al., der zeigt, dass AnTat 1.1 in humanem CSF nicht länger als 20h überleben [113]. In CSF von HAT-Patienten mit ZNS-Beteiligung sogar nur etwa 8h. Pentreath et. al. untersuchte jedoch lediglich *T. b. brucei* in humanem Liquor. *T. b. brucei* sind jedoch für den Menschen per se nicht infektiös. Unsere Experimente demonstrieren, dass es keinen Unterschied macht, ob die Trypanosomen in Rattenliquor oder humanem Liquor kultiviert werden. Grund dafür mag

4. Diskussion

die geringe Varianz der Liquorzusammensetzung der verschiedenen Spezies sein [113].

3. Station: Virchow-Robin-Räume/Ependymzellen

Der Weg ins Gehirnparenchym erfolgt entweder über die Virchow-Robin-Räume oder die Ependymzellen erfolgen. Trypanosomen und inflammatorische Zellen wurden häufig in den Virchow-Robin Räumen beobachtet (siehe Abbildung 44) [78, 96, 105, 106, 114].

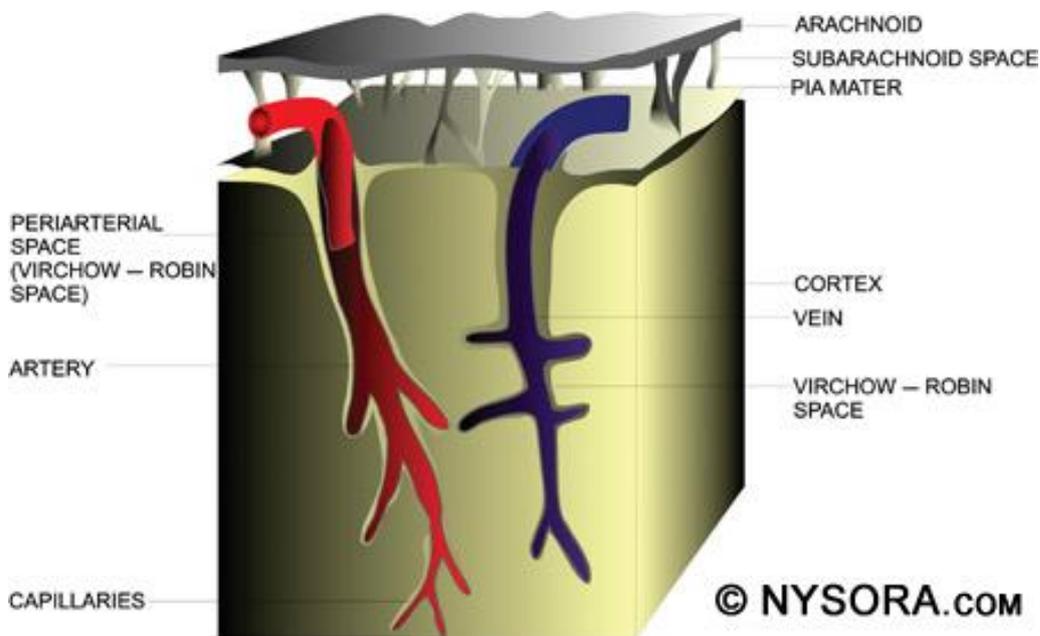


Abbildung 44: Virchow-Robin-Raum [73]

Diese Beobachtungen konnten wir mit unseren EM-Bildern (siehe Abbildung 34) bestätigen. Dies legt nahe, dass Trypanosomen im CSF über den Subarachnoidalraum in die Virchow-Robin-Räume gelangen und von dort ins Gehirnparenchym. Eine ähnliche Pathogenese zeigt die Wernicke Enzephalopathie: Toxine zerstören die BLS bei intakter BHS und es kommt zu einer Inflammation der perivaskulären Räume [115]. Zudem passen die Symptome der HAT zu der Akkumulation von Trypanosomen in den Virchow-Robin-Räumen: Trypanosomen produzieren zur Zelldichteregulation PGD_2 [10, 116], dass sich dann über den CSF im ganzen Ventrikelraum verteilen und so den Schlaf-Wach-Rhythmus in typischer Weise beeinflussen könnte [39] (siehe

4. Diskussion

1.3.4, Seite 34). Dies erklärt auch die erhöhten PGD_2 -Spiegel im CSF von Schlafkranken erklären [72].

Der Weg über die Ependymzellen ins Gehirn scheint im Hinblick auf diese Ergebnisse unwahrscheinlich. Obwohl Ependymzellen nur sehr schwache *tight junctions* ausbilden [79] und so den Übertritt der Trypanosomen ins Parenchym erleichtern würden. Ormerod und Hussein halten sogar ein intrazelluläres Stadium in den Ependymzellen für möglich [108]. Ein intrazelluläres Stadium konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden. Der Weg über die Ependymzellen würde aber eine Parasitenakkumulation um die Ventrikel wahrscheinlich machen, die aber so nicht nachgewiesen wurde [86].

4. Station: Gehirnparenchym

Im Unterschied zum Choroid Plexus werden im Gehirn lediglich isolierte Trypanosomen beobachtet. Diese sehen zudem degeneriert aus [109]. Lokalisiert sind die Trypanosomen im Gehirn vor allem um die Gefäße (siehe Abbildung 45) [105]. Dies unterstützt die Hypothese, dass Trypanosomen über die Virchow-Robin-Räume eindringen könnten.

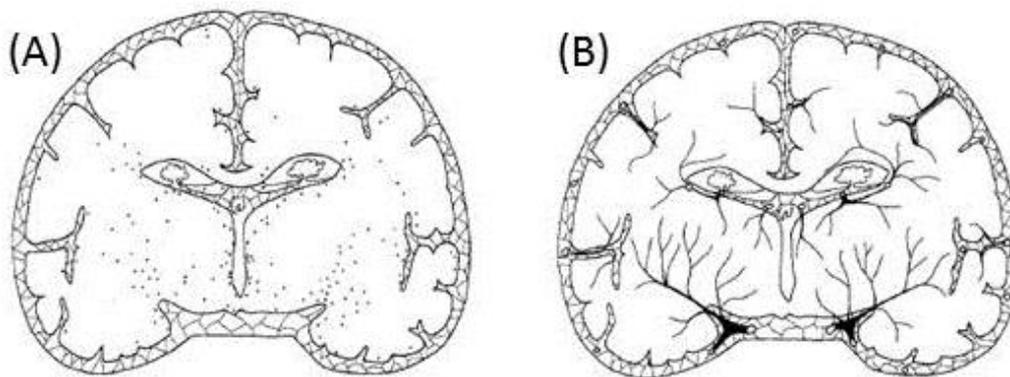


Abbildung 45: Lokalisation der Trypanosomen im Gehirnparenchym (A); Gefäßstruktur im Hirnparenchym (B) [102]

4.3 Verlauf der Hirninfektion

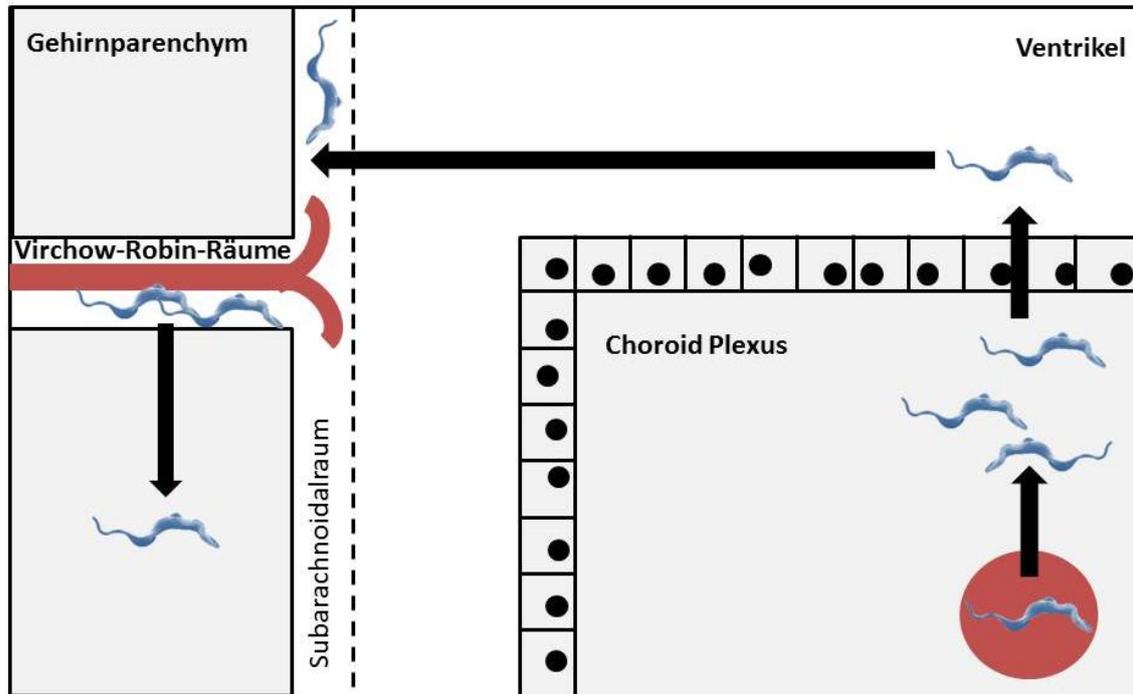


Abbildung 46: Möglicher Verlauf der Gehirninfektion

Durch die EM-Bilder, die Kultivierungsexperimente im Liquor und die quantitative RT-PCR konnte der in Abbildung 46 skizzierte Weg in den ersten drei Stadien bestätigt werden. Der gesamte Weg ist vereinbar mit den histopathologischen Befunden von Schmidt, der mit *T. b. rhodesiense* in einer Primatenart (Grüne Meerkatzen; *Cercopithecus aethiops*) experimentierte [105]. Für die Chronologie der vorgeschlagenen Route sprechen die neurologischen Befunde bei Patienten und im Tiermodelle. Zunächst tritt eine Plexitis auf, gefolgt von einer Meningitis und nach langem Krankheitsverlauf ist manchmal das Vollbild einer vollständig ausgebildeten Enzephalitis zu beobachten. Dies ist gut vereinbar mit dem dargestellten Weg: Die Trypanosomen invadieren zunächst den Choroid Plexus, dann die Ventrikelräume und schlussendlich über die Virchow-Robin-Räume das Gehirnparenchym. Gegen die direkte Überwindung der BHS spricht weiterhin, dass in den EM-Schnitten zwar immer Trypanosomen in den Blutgefäßen der

4. Diskussion

Gehirnkapillaren gefunden wurden, jedoch nie an Endothelzellen adhären Trypanosomen oder Trypanosomen, die die BHS überwunden haben.

Gegen eine BHS-Überquerung der Trypanosomen spricht auch, dass eine artifizielle Hirninfektion durch direkte Injektion von Trypanosomen ins Gehirn keine Meningoenzephalitis verursachen kann. Daher ist es wahrscheinlicher, dass eine Meningoenzephalitis eher durch die Invasion der Subarachnoidea und der Virchow-Robin-Räume verursacht wird [117].

Die Frage, ob die Trypanosomen die BLS transzellulär oder parazellulär überwinden, konnte nicht beantwortet werden und erfordert weitere Experimente.

4.4 Morphologie und Besonderheiten der Gehirntrypanosomen

Rekultivierte Trypanosomen aus dem Gehirn

Der Lebenszyklus der Trypanosomen umfasst fünf morphologisch und stoffwechselphysiologisch völlig verschiedene Stadien. In der Fliege geht die Besiedelung verschiedener Organe immer mit einer morphologischen und metabolischen Veränderung einher. Dass die Parasiten auch im Menschen beim Befall des Gehirns ihre Form und ihren Stoffwechsel an die neue Umgebung anpassen müssen, ist anzunehmen. Vor allem, wenn man bedenkt, dass die Parasiten bei direkter Injektion ins Gehirn degenerieren und auch in neuronalen *in vitro* Kulturen nicht lange überleben [74, 117].

Bei der Untersuchung der rekultivierten Trypanosomen aus dem Gehirn ist schon lichtmikroskopisch ein Unterschied zu den frühen Blutformtrypanosomen erkennbar. Diese sind nicht nur länger und dünner, sondern zeigen auch ein anderes Bewegungsmuster. Die Bewegungen der rekultivierten Trypanosomen sind schraubenförmig und hochfrequenter als die der frühen Blutformen. Einen weiteren Hinweis auf eine Veränderung der Trypanosomen aus dem ZNS gab die vergleichende lichtmikroskopische Auszählung, die in späteren Experimenten auch quantitativ anhand von REM-Bildern bestätigt wurde. Die veränderte Morphologie der Trypanosomen ist auf den REM-Bildern noch deutlicher zu sehen (siehe Abbildung 26). Eine verschobene Kern-Geißel Lokalisation, wie man es bei der Umwandlung von der prozyklischen in die

4. Diskussion

epimastigote Form findet, konnte mittels DAPI-Färbung bei den rekultivierten Trypanosomen nicht nachgewiesen werden. Auch in der TEM waren keine Auffälligkeiten der Organellenstruktur sichtbar (*data not shown*). Trypanosomen müssen möglicherweise eine morphologische Veränderung durchlaufen bevor sie ins Gehirn gelangen können. Dies würde erklären, warum Trypanosomen mehr als 20 Tage benötigen, bevor eine ZNS-Infektion etabliert ist. Die Dauer ist unabhängig von der Zellzahl der Parasiten, die wellenförmig schon nach dem 5. Tag ihr erstes Maximum erreicht.

4.5 Hirninjektion mit fluoreszierenden Trypanosomen

Trypanosomen sichtbar machen:

Eines der Hauptprobleme der Hirninjektion ist das Wiederfinden der Trypanosomen nach der Injektion. Ein vielversprechender Ansatz sind Quantum dots. Diese Nanopartikel werden in die Zelle aufgenommen und haben eine 100-1000fach höhere Photostabilität als herkömmliche organische Fluoreszenzfarbstoffe [118]. In Fibroblasten und prozyklischen Trypanosomen funktioniert die Methode gut. Bei den Blutformtrypanosomen mit VSG-Mantel gelang es jedoch bisher nicht die Quantum dots einzubringen. Hier bedarf es weiterer Experimente.

Injektion ins Gehirn

Zur Injektion von Trypanosomen ins Gehirn gab es bereits Vorversuche zusammen mit unserer Kooperationsgruppe in Japan und die Methode ist als solche etabliert. Bereits 1987 spritzten Schmidt und Bafort *T. b. rhodesiense* in säugende Mäuse. In der ersten Woche beobachtete er eine rapide Vermehrung der Parasiten um den Stichkanal. Danach gab es eine fortschreitende Reduktion der Trypanosomenzellzahl. Nach drei Wochen waren kaum noch Trypanosomen im Gehirnparenchym zu finden. Die wenigen Trypanosomen waren atrophisch. Die Hypothese der beiden Autoren ist, dass der Stichkanal einem Ödem ähnele und somit reich an Plasmainhalten sei. Daher könne die nährstoffreiche Umgebung das Wachstum der Trypanosomen zunächst

4. Diskussion

unterstützen. Die Einwanderung der Trypanosomen aus dem Gehirnparenchym ins Blut wurde ausgeschlossen [117]. Die Experimente von van Marck et. al. bestätigen auch, dass Trypanosomen im Gehirn meist degeneriert aussehen [109].

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus Rattengehirnen, wie Trypanosomen ins Gehirn gelangen und eine Infektion etablieren. Die Route der Trypanosomen über die BLS in den Ventrikel und von dort aus in den Subarachnoidalraum bzw. die Virchow-Robin-Räume konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie verfolgt werden. Die Kultivierungsversuche mit Liquor zeigen, dass die Trypanosomen nicht in der Lage sind, lange im Liquor zu überleben und relativ schnell in eine andere Gehirnregion gelangen müssen. Dieser Infektionsverlauf ist mit den Symptomen der Schlafkranken gut vereinbar: Zuerst entwickeln die Schlafkranken eine Plexitis, dann eine Meningitis und erst am Schluss ihrer Erkrankung eine Enzephalitis. Die Parasitenansammlung im Subarachnoidalraum und den Virchow-Robin-Räumen und in der Folge eine Wachstumskontrolle der Parasiten mittels PGD_2 würde zudem die erhöhten PGD_2 -Spiegel im Liquor der Patienten erklären.

Durch die Untersuchung von aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen gibt diese Arbeit eine mögliche Erklärung auf die Frage, warum sich eine Hirninfektion erst verhältnismäßig spät im Krankheitslauf manifestiert und nicht mit dem Erreichen der maximalen Parasitendichte korreliert. In der vorliegenden Dissertation wurde demonstriert, dass die isolierten Trypanosomen aus dem Gehirn sowohl lichtmikroskopisch, als auch rasterlektronenmikroskopisch eine deutliche morphologische Veränderung zeigen. Trypanosomen wechseln im Laufe ihres Lebenszyklus immer wieder Morphologie und Stoffwechselphysiologie um sich an neue Gegebenheiten anzupassen. So könnte eine weitere Differenzierung für die Etablierung einer Infektion im Gehirn notwendig sein. Die Bestätigung diese These bedarf aber noch weiterer Experimente.

Die Vorversuche mit Quantum dots lassen vermuten, dass mit ihrer Hilfe Trypanosomen im Gehirngewebe sichtbar gemacht und fluoreszierende Trypanosomen für Hirninjektionen eingesetzt werden könnten. Mithilfe der Hirninjektionen kann ein Hirnregiontopismus und das Verhalten von Trypanosomen im Gehirnparenchym untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit trägt zu einem besseren Verständnis der Hirninfektion von Schlafkranken bei. Durch weitere Arbeiten an diesem Thema wird es hoffentlich bald möglich sein, das Gehirn stadium der Schlafkrankheit vollständig zu verstehen und auf diesem Verständnis basierend neue, wirksamere Medikamente zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. SM Adl, AG Simpson, MA Farmer, RA Andersen, OR Anderson, JR Barta, SS Bowser, G Brugerolle, RA Fensome, S Fredericq, et al: **The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.** *J Eukaryot Microbiol* 2005, **52**:399-451.
2. K Vickerman: **The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates.** *International journal for parasitology* 1994, **24**:1317-1331.
3. D Maslov, S Podlipaev, J Lukes: **Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001, **96**:397-402.
4. C Hoare: **Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1964, **11**:200-207.
5. M Field, C Allen, V Dhir, D Goulding, B Hall, G Morgan, P Veazey, M Engstler: **New approaches to the microscopic imaging of Trypanosoma brucei.** *Microscopy and Microanalysis* 2004, **10**:621-636.
6. KR Matthews: **The developmental cell biology of Trypanosoma brucei.** *J Cell Sci* 2005, **118**:283-290.
7. SNJ Moreno, R Docampo: **The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2009, **56**:208-213.
8. NM El-Sayed, P Hegde, J Quackenbush, SE Melville, JE Donelson: **The African trypanosome genome.** *International journal for parasitology* 2000, **30**:329-345.
9. KR Matthews, JR Ellis, A Paterou: **Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes.** *Trends Parasitol* 2004, **20**:40-47.
10. M Duszenko, K Figarella, ET Macleod, SC Welburn: **Death of a trypanosome: a selfish altruism.** *Trends Parasitol* 2006, **22**:536-542.
11. D Despommier, R Gwadz, P Hotez, C Knirsch, L Miller: **Parasitic diseases:** Springer-Verlag New York, 1995; 32-38.
12. World Health Organization: **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/index.html];
22.02.2011.

6. Literaturverzeichnis

13. JH Remme, E Blas, L Chitsulo, PM Desjeux, HD Engers, TP Kanyok, JF Kayondo, DW Kioy, V Kumaraswami, JK Lazdins, et al: **Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective.** *Trends Microbiol* 2002, **10**:435-440.
14. V Hannaert, P Michels: **Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastida.** *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1994, **26**:205-212.
15. FR Opperdoes, P Baudhuin, I Coppens, C De Roe, SW Edwards, PJ Weijers, O Misset: **Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate Trypanosoma brucei.** *J Cell Biol* 1984, **98**:1178-1184.
16. BM Bakker, FI Menonides, B Teusink, P van Hoek, PA Michels, HV Westerhoff: **Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:2087-2092.
17. M Parsons: **Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose.** *Molecular microbiology* 2004, **53**:717-724.
18. P Michels, V Hannaert, F Bringaud: **Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae-new data and views.** *Parasitology Today* 2000, **16**:482-489.
19. M Duszenko: **Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit.** *Biologie in unserer Zeit* 1998, **28**:72-81.
20. L Flohe, HJ Hecht, P Steinert: **Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism.** *Free radical biology & medicine* 1999, **27**:966-984.
21. MS Alphey, GA Leonard, DG Gourley, E Tetaud, AH Fairlamb, WN Hunter: **The High Resolution Crystal Structure of Recombinant Crithidia fasciculata Tryparedoxin-I.** *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**:256-313.
22. R Ross, D Thomson: **A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: regular periodical increase of the parasites disclosed.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 1910, **82**:411-415.
23. K Vickerman: **Functional aspects of the cytology of trypanosomes.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 1970, **64**:180-181.

24. GA Cross: **Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei***. *Parasitology* 1975, **71**:393-417.
25. A Varki: **Essentials of glycobiology**. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009; 551-561.
26. CM Turner: **The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei***. *FEMS Microbiology Letters* 1997, **153**:227-231.
27. T Hiepe: **Allgemeine Parasitologie: mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung**: Georg Thieme Verlag, 2006; 230-234.
28. L Marcello, JD Barry: **Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure**. *Genome research* 2007, **17**:1344-1352.
29. E Pays, M Guyaux, D Aerts, N Van Meirvenne, M Steinert: **Telomeric reciprocal recombination as a possible mechanism for antigenic variation in trypanosomes**. *Nature* 1985, **316**:562-564.
30. G Thon, T Baltz, C Giroud, H Eisen: **Trypanosome variable surface glycoproteins: composite genes and order of expression**. *Genes & development* 1990, **4**:1374-1383.
31. A Barbet, S Kamper: **The importance of mosaic genes to trypanosome survival**. *Parasitology Today* 1993, **9**:63-66.
32. W Bitter, H Gerrits, R Kieft, P Borst: **The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei***. *Nature* 1998, **391**:499-502.
33. R Young, JE Taylor, A Kurioka, M Becker, EJ Louis, G Rudenko: **Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum***. *BMC genomics* 2008, **9**:385-401.
34. LJ Morrison, L Marcello, R McCulloch: **Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity**. *Cellular Microbiology* 2009, **11**:1724-1734.
35. CE Boothroyd, O Dreesen, T Leonova, KI Ly, LM Figueiredo, GAM Cross, FN Papavasiliou: **A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei***. *Nature* 2009, **459**:278-281.

6. Literaturverzeichnis

36. M Duszenko: **Afrikanische Trypanosomen: Die Erreger der Schlafkrankheit.** *Biologie in unserer Zeit* 1998, **28**:72-81.
37. S Madison-Antenucci, J Grams, SL Hajduk: **Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing.** *Cell* 2002, **108**:435-438.
38. H Hahn, K Adler, D Schad, T Ulrichs: **Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie:** Springer Verlag 2008; 647-650.
39. K Kristensson, M Nygard, G Bertini, M Bentivoglio: **African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions.** *Prog Neurobiol* 2010, **91**:152-171.
40. D Steverding: **The history of African trypanosomiasis.** *Parasites & Vectors* 2008, **1**:3-11.
41. JR Stevens, W Gibson: **The molecular evolution of trypanosomes.** *Parasitol Today* 1999, **15**:432-437.
42. S Winkle: **Zur Geschichte der Trypanosomiasen.** [<http://www.collasius.org/WINKLE/04HTML/trypanosomiasen.htm#%2852%29>]; 19.02.2011.
43. F Cox: **History of sleeping sickness (African trypanosomiasis).** *Infectious disease clinics of North America* 2004, **18**:231-245.
44. G Hide: **History of sleeping sickness in East Africa.** *Clinical Microbiology Reviews* 1999, **12**:112-125.
45. R Brun, J Blum, F Chappuis, C Burri: **Human African trypanosomiasis.** *The Lancet* 2010, **375**:148-159.
46. A Havelaar: **Methodological choices for calculating the disease burden and cost-of-illness of foodborne zoonoses in European countries.** *EU Report* 2007, 1-16.
47. PP Joshi, VR Shegokar, RM Powar, S Herder, R Katti, HR Salkar, VS Dani, A Bhargava, J Jannin, P Truc: **Human trypanosomiasis caused by Trypanosoma evansi in India: the first case report.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2005, **73**:491-495.
48. MP Barrett, RJ Burchmore, A Stich, JO Lazzari, AC Frasch, JJ Cazzulo, S Krishna: **The trypanosomiasis.** *Lancet* 2003, **362**:1469-1480.
49. P Simarro, J Jannin, P Cattand: **Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next.** *PLoS medicine* 2008, **5**:174-180.

6. Literaturverzeichnis

50. E Magnus, T Vervoort, N Van Meirvenne: **A card-agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of TB gambiense trypanosomiasis.** *Annales de la Societe Belge de medicine tropicale* 1978, **58**:169-176.
51. D Steverding: **A new initiative for the development of new diagnostic tests for human African trypanosomiasis.** *Kinetoplastid biology and disease* 2006, **5**:1-3.
52. M Radwanska: **Emerging trends in the diagnosis of Human African Trypanosomiasis.** *Parasitology* 2006:1-10.
53. K Miksits, H Hahn: **Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie:** Springer Verlag 2007; 247-248.
54. PGE Kennedy: **Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis.** *International journal for parasitology* 2006, **36**:505-512.
55. F Spinazzola, C D'Amato, A De Felici, R Giannuzzi, MG Paglia, C Struglia, G Tocci, G Visco, S Galgani, E Cotroneo: **Plasmapheresis for late-stage trypanosomiasis.** *Lancet* 1989, **1**:1200.
56. PA Kager, HG Schipper, J Stam, CBLM Majoie: **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**:947-952.
57. HMH Braakman, FJJM van de Molengraft, WWA Hubert, DH Boerman: **Lethal African trypanosomiasis in a traveler: MRI and neuropathology.** *Neurology* 2006, **66**:1094-1096.
58. AH Fairlamb: **Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects.** *Trends in parasitology* 2003, **19**:488-494.
59. E Torreele, BB Trunz, D Tweats, M Kaiser, R Brun, G Mazué, MA Bray, B Pécoul: **Fexinidazole—A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010, **4**:553-558.
60. SR Wilkinson, JM Kelly: **Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets.** *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2009, **11**:1-23.
61. M Schlitzer: **Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im letzten Jahrhundert entwickelt.** *Pharmazie in unserer Zeit* 2009, **38**:552-558.

6. Literaturverzeichnis

62. NS Carter, BJ Berger, AH Fairlamb: **Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and-resistant *Trypanosoma brucei brucei*.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**:28153-28157.
63. R Brun, J Blum, F Chappuis, C Burri, A Banerjee, A Hollis, T Pogge: **Killer coma: the evolving story of sleeping sickness treatment.** *The Lancet* 2010, **375**:148-159.
64. V Lutje, J Seixas, A Kennedy: **Chemotherapy for second-stage Human African trypanosomiasis.** *The Cochrane Library* 2010, **8**:1-46.
65. B Enanga, RJS Burchmore, ML Stewart, MP Barrett: **Sleeping sickness and the brain.** *Cellular & Molecular Life Sciences* 2002, **59**:845-58.
66. O Yun, G Priotto, J Tong, L Flevaud, F Chappuis, M Boelaert: **NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010, **4**:71-80.
67. G Priotto, S Kasparian, W Mutombo, D Ngouama, S Ghorashian, U Arnold, S Ghabri, E Baudin, V Buard, S Kazadi-Kyanza: **Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial.** *The Lancet* 2009, **374**:56-64.
68. I Midgley, K Fitzpatrick, LM Taylor, TL Houchen, SJ Henderson, SJ Wright, ZR Cybulski, BA John, A McBurney, DW Boykin: **Pharmacokinetics and metabolism of the prodrug DB289 (2, 5-bis [4-(N-methoxyamidino) phenyl] furan monomaleate) in rat and monkey and its conversion to the antiprotozoal/antifungal drug DB75 (2, 5-bis (4-guanylphenyl) furan dihydrochloride).** *Drug Metabolism and Disposition* 2007, **35**:955-967.
69. CJ Schofield, I Maudlin: **Trypanosomiasis control.** *International journal for parasitology* 2001, **31**:614-619.
70. MJ Vreysen: **Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique.** *Medecine Tropicale* 2001, **61**:397-411.
71. G Cecchi, M Paone, JR Franco, EM Fèvre, A Diarra, JA Ruiz, RC Mattioli, PP Simarro: **Towards the Atlas of human African trypanosomiasis.** *International Journal of Health Geographics* 2009, **8**:57-75.

72. V Pentreath: **Trypanosomiasis and the nervous system:: Pathology and immunology.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1995, **89**:9-15.
73. Nysora
[http://www.nysora.com/regional_anesthesia/neuraxial_techniques/3119-spinal_anesthesia.html]; 26.04.2012
74. L Stoppini, PA Buchs, R Brun, D Muller, S Duport, L Parisi, T Seebeck: **Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with Trypanosoma brucei brucei.** *Ijmm International Journal of Medical Microbiology* 2000, **290**:105-113.
75. M Bakhiet, M Hamadien, A Tjernlund, A Mousa, Å Seiger: **African trypanosomes activate human fetal brain cells to proliferation and IFN-[gamma] production.** *NeuroReport* 2002, **13**:53-56.
76. J Rodgers: **Trypanosomiasis and the brain.** *Parasitology* 2010, **137**:1995-2006.
77. P Lambert, M Berney, G Kazyumba: **Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis: correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis.** *Journal of Clinical Investigation* 1981, **67**:77-85.
78. O Dreesen, B Li, GAM Cross: **Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal.** *Nature Reviews Microbiology* 2006, **5**:70-75.
79. E Zhang, C Inman, R Weller: **Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum.** *Journal of anatomy* 1990, **170**:111-123.
80. PU Brenner: **Die Struktur der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke - eine Literaturstudie** - Medizinische Dissertationschrift 2006, Ludwig-Maximilians Universität München.
81. JR Zhang, E Tuomanen: **Molecular and cellular mechanisms for microbial entry into the CNS.** *J Neurovirol* 1999, **5**:591-603.
82. HM Elsheikha, NA Khan: **Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system.** *FEMS Microbiol Rev* 2010, **34**:532-553.
83. J Moulton: **Relapse infection after chemotherapy in goats experimentally infected with Trypanosoma brucei: Pathological changes in central nervous system.** *Veterinary Pathology Online* 1986, **23**:21-28.

6. Literaturverzeichnis

84. DJ Grab, O Nikolskaia, YV Kim, JD Lonsdale-Eccles, S Ito, T Hara, T Fukuma, E Nyarko, KJ Kim, MF Stins, et al: **African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier.** *Journal of Parasitology* 2004, **90**:970-979.
85. C Mulenga, JD Mhlanga, K Kristensson, B Robertson: **Trypanosoma brucei brucei crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001, **27**:77-85.
86. W Masocha, ME Rottenberg, K Kristensson: **Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier.** *Physiol Behav* 2007, **92**:110-114.
87. DJ Grab, PGE Kennedy: **Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier.** *Journal of Neurovirology* 2008, **14**:344-351.
88. DJ Grab, JC Garcia-Garcia, OV Nikolskaia, YV Kim, A Brown, CA Pardo, Y Zhang, KG Becker, BA Wilson, ALAP de, et al: **Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells.** *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3**:479-492.
89. M Schultzberg, M Ambatsis, E Samuelsson, K Kristensson, N Van Meirvenne: **Spread of Trypanosoma brucei to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia.** *Journal of neuroscience research* 1988, **21**:56-61.
90. M Duszenko, M Ferguson, GS Lamont, MR Rifkin, G Cross: **Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of Trypanosoma brucei bloodstream forms in vitro.** *The Journal of experimental medicine* 1985, **162**:1256-1263.
91. GB Lundkvist, K Kristensson, M Bentivoglio: **Why trypanosomes cause sleeping sickness.** *Physiology* 2004, **19**:198-206.
92. W Masocha, B Robertson, ME Rottenberg, J Mhlanga, L Sorokin, K Kristensson: **Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define Trypanosoma brucei brucei penetration of the blood-brain barrier.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **114**:689-694.
93. V Denninger, R Koopmann, K Muhammad, T Barth, B Bassarak, C Schonfeld, BK Kilunga, M Duszenko: **Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways?** *Methods Enzymol* 2008, **451**:373-408.
94. H Eagle: **Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.** *Science* 1959, **130**:432-437.

6. Literaturverzeichnis

95. M Duszenko, K Mühlstädt, A Broder: **Cysteine is an essential growth factor for Trypanosoma brucei bloodstream forms.** *Molecular and biochemical parasitology* 1992, **50**:269-273.
96. V Denninger: **Effekte von Troglitazon und anderen Thiazolidindionen auf die Blutform von Trypanosoma brucei-Induktion der Differenzierung von slender-Formen.** Biochemische Dissertationsschrift 2007, Eberhard Karls Universität Tübingen.
97. G Paxinos, C Watson: **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition:** Academic press, 2007.
98. N Solis, MR Larsen, SJ Cordwell: **Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in Staphylococcus aureus using a false-positive control.** *PROTEOMICS* 2010, **10**:2037-2049.
99. K Cottingham: **Shaving proteins off the plasma membrane.** *Journal of Proteome Research* 2006, **5**:738.
100. V Denninger, R Koopmann, K Muhammad, T Barth, B Bassarak, C Schönfeld, BK Kilunga, M Duszenko: **Chapter Twenty-Five Kinetoplastida:: Model Organisms for Simple Autophagic Pathways?** *Methods in enzymology* 2008, **451**:373-408.
101. BO Ikede, GJ Losos: **Pathological changes in cattle infected with Trypanosoma brucei.** *Veterinary pathology* 1972, **9**:272-277.
102. JM Bafort, H Schmidt: **Experimental chronic Trypanosoma brucei rhodesiense infection in Microtus montanus.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1983, **32**:968-975.
103. A Packchanian: **Susceptibility and Resistance of American Rodents to Trypanosoma Equiperdum.** *Texas Reports on Biology & Medicine* 1963, **21**:380-390.
104. A Castellani: **Some Observations on the Morphology of the Trypanosoma Found in Sleeping Sickness.** *British Medical Journal* 1903, **1**:1431-432.
105. H Schmidt: **The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in trypanosoma rhodesiense infected vervet monkeys.** *Virchows Archiv - A, Pathological Anatomy & Histopathology* 1983, **399**:333-343.
106. H Schmidt, JM Bafort: **African trypanosomiasis: treatment-induced invasion of brain and encephalitis.** *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 1985, **34**:64-68.

107. B Chirimwami, E Van Marck, J Brucher, M Wery, P Gigase: **Progression of central nervous system lesions in the rat infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. A light microscopic study.** *Ann Soc Belg Med Trop* 1988, **68**:205-218.
108. WE Ormerod, MS Hussein: **The ventricular ependyma of mice infected with *Trypanosoma brucei*.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 1986, **80**:626-633.
109. The Rockefeller University: **An introduction to molecular parasitology and trypanosomes.**
[http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_introduction.html];
26.04.2012
110. E Fink, H Schmidt: **Meningoencephalitis in chronic *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection of the white mouse.** *Tropenmedizin und Parasitologie* 1979, **30**:206-211.
111. **The Ventricular System of the Human Brain.** In, vol. 2011. City.
112. M Ferguson, M Low, G Cross: **Glycosyl-sn-1, 2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.** *Journal of Biological Chemistry* 1985, **260**:14547-14555.
113. VW Pentreath, AO Owolabi, F Doua: **Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid.** *Ann Trop Med Parasitol* 1992, **86**:29-34.
114. CA Hunter, JW Gow, PG Kennedy, FW Jennings, M Murray: **Immunopathology of experimental African sleeping sickness: detection of cytokine mRNA in the brains of *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice.** *Infection & Immunity* 1991, **59**:4636-4640.
115. PF Nixon, L Jordan, C Zimitat, SE Rose, F Zelaya: **Choroid plexus dysfunction: the initial event in the pathogenesis of Wernicke's encephalopathy and ethanol intoxication.** *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 2008, **32**:1513-1523.
116. BK Kubata, M Duszenko, KS Martin, Y Urade: **Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites.** *Trends Parasitol* 2007, **23**:325-331.
117. JM Bafort, H Schmidt, DH Molyneux: **Development of *Trypanosoma brucei* in suckling mouse brain following intracerebral injection.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987, **81**:487-490.
118. C Wang, X Gao, X Su: **In vitro and in vivo imaging with quantum dots.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010, **397**:1397-1415.

7. Veröffentlichungen

7. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

H Wolburg, S Mogk, S Acker, C Frey, M Meinert, C Schönfeld, M Lazarus, Y Urade, BK Kubata, M Duszenko: **Late stage infection in sleeping sickness.** *PLoS One* 2012, **7**:e34304.

S Mogk, H Wolburg, C Frey, B Kubata, M Duszenko: **Brain infection by African trypanosomes during sleeping sickness.** *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 2012, **18**:49-51.