

Aus dem Interfakultären Institut für Biochemie
der Universität Tübingen

**Herstellung von eGFP exprimierenden Stämmen von
Trypanosoma brucei brucei und Darstellung des
Infektionsverlaufs im zentralen Nervensystem**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Boßelmann, Christian Malte

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Schraermeyer

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Mordmüller

Tag der Disputation: 05.02.2016

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis April 2015 in der Arbeitsgruppe für Molekulare Parasitologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls Universität Tübingen angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht und in Form eines Posters präsentiert.

Veröffentlichung:

Mogk S, Meiwes A, Boßelmann CM, Wolburg H, Duszenko M
“The lane to the brain: how African trypanosomes invade the CNS”
Trends in Parasitology, Volume 30, Issue 10, October 2014, Pages 470-477,
ISSN 1471-4922, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.

Mogk S, Boßelmann CM, Mudogo CN, Stein J, Wolburg H, Duszenko M
“African trypanosomes and brain infection – the unsolved question.”
Biol Rev, 92: 1675-1687. doi: 10.1111/brv.12301

Posterpräsentation:

Boßelmann, C.M., “Expression of eGFP in *Trypanosoma brucei brucei*”.
20. Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen, 20.10.2014.

Authentizitätserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorgelegte Inaugural-Dissertation mit dem folgenden Titel **“Herstellung von eGFP exprimierenden Stämmen von Trypanosoma brucei brucei und Darstellung des Infektionsverlaufs im zentralen Nervensystem“** selbstständig, ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen, insbesondere dem Internet, entnommen sind, sind als solche eindeutig und wieder auffindbar kenntlich gemacht. Alle diese Quellen sind vollständig und abschließend in einem Literaturverzeichnis angegeben. Die vorliegende Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht. Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens war.

Ort, Datum

Name

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Trypanosomen.....	1
1.1.1. Taxonomische Einteilung	1
1.1.2. Morphologie.....	3
1.1.3. Morphologische Stadien.....	5
1.1.5. Monomorphe und pleomorphe Stämme	8
1.3. Humane Afrikanische Trypanosomiasis.....	9
1.3.1. Die Tse-Tse Fliege als Vektor	9
1.3.2. Epidemiologie.....	10
1.3.3. Krankheitsverlauf.....	11
1.3.4. Diagnostik	14
1.3.5. Therapie	15
1.3.6. Prognose.....	17
1.3.8. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. E. coli.....	20
2.1.1. Kultivierung	20
2.1.2. Herstellung von E.coli-Stabilaten.....	21
2.1.3. Isolierung von hochreinen Plasmiden.....	21
2.1.4. Amplifikation der eGFP-Sequenz durch	
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.1.5. Subklonierung	23
2.1.6. Transformation	23
2.1.7. Kolonie-PCR.....	24
2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese	25
2.1.9. Plasmidgewinnung durch Gelextraktion	26
2.1.10. Ligation in Zielvektoren pHD309 und pUB39.....	26
2.1.11. Sequenzierung	27
2.2. Tiere	28
2.2.1. Infektion.....	28

2.2.2. Chloralhydrat-Narkotisierung.....	29
2.2.4. Exsanguinierung.....	30
2.3. Trypanosomen.....	30
2.3.1. Isolierung von Blutform-Trypanosomen.....	31
2.3.2. Kultivierung	32
2.3.1. Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten	34
2.3.2. Transfektion monomorpher Stämme	36
2.3.3. Transfektion pleomorpher Stämme	38
2.3.4. Nachweis von cDNA und gDNA	39
2.3.5. Phasenkontrastmikroskopie	40
2.3.6. Fluoreszenzmikroskopie.....	41
2.3.7. Co-Kultivierung pleomorpher Trypanosomen mit murinem, hippocampalem Gewebe.....	43
2.3.8. Messung der Motilität von Trypanosomen.....	47
3. Ergebnisse	49
3.1. Herstellung von zwei stabil transfizierbaren,	
eGFP kodierenden Plasmiden.....	49
3.1.1. Generierung der Plasmide pHD309eGFP und pUB39eGFP	49
3.1.2. Restriktionsverdau.....	53
3.1.4. Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	54
3.2. Implementierung und Charakterisierung eines Systems zur	
axenischen, kontinuierlichen Kultivierung von Trypanosomen	59
3.2.1. Verlauf der Zelldichte über Zeit	59
3.2.2. Differenzierungsverhalten in Kultur	61
3.3. Transfektion durch Elektroporation zur Herstellung	
fluoreszierender Trypanosomen	66
3.3.1. Elektroporation von monomorphen und	
pleomorphen Trypanosomen.....	66
3.3.2. Nachweis eines für eGFP kodierenden Abschnitts in trypanosomaler, genomischer DNA.....	68
3.3.3. Nachweis von messenger RNA für eGFP in drei	
generierten Trypanosomenstämmen.....	69

3.3.4. Nachweis mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie	70
3.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen	
nach Co-Kultivierung mit mikroglialen Zellen.....	73
3.5. Messung der Motilität von Trypanosomen	77
4. Diskussion.....	81
4.1. Fluoreszierende Trypanosomen	81
4.2. Elektroporation monomorpher und pleomorpher Trypanosomen	83
4.3. Kultivierung pleomorpher Trypanosomen.....	84
4.5. Messung der Motilität von Trypanosomen	86
4.6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von	
Trypanosomen nach Co-Kultivierung mit mikroglialen Zellen.....	87
5. Zusammenfassung.....	92
6. Literatur.....	93
7. Danksagungen.....	105
8. Lebenslauf	107

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Familie der Trypanosomatidae.....	1
Abb. 2: Morphologie von Trypanosoma brucei brucei	3
Abb. 3: Lebenszyklus von Trypanosoma brucei im Wirtstier	5
Abb. 4: Die Tse-Tse-Fliege (Glossina spp.) und ihre Erkennungsmerkmale	9
Abb. 5: Epidemiologie	10
Abb. 6: Symptomatik	13
Abb. 9: Verlauf der afrikanischen Schlafkrankheit.....	17
Abb. 10: Primer-Alignment	22
Abb. 11: Formel zur Berechnung der benötigten Menge für die Ligation	27
Abb. 12: Neubauer-Zählkammer	29
Abb. 13: Emissionsspektren von DAPI, eGFP und FITC.....	43
Abb. 14: Bestätigung der Transformation	49
Abb. 16: Aufbau des neu generierten Plasmids pHD309eGFP.....	51
Abb. 17: Aufbau des neu generierten Plasmids pUB39eGFP.....	52
Abb. 22: Wachstumskurve	60
Abb. 23: Beziehung zwischen dem Differential der Wachstumskurve und dem prozentualen Anteil von Trypanosomen in proliferativen Formen	61
Abb. 25: Der Beginn einer realistischen Infektion in Mäusen als Tiermodell	63
Abb. 26: Der späte Kulturverlauf von pleomorphen Trypanosomen.....	64
Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einem monomorphen Trypanosom vom Stamm MITat1.2 mit dem Plasmid pHD309eGFP	70
Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei monomorphen Trypanosomen vom Stamm SMB mit dem Plasmid pUB39eGFP.....	71
Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei pleomorphen Trypanosomen vom Stamm AnTat1.1 mit dem Plasmid pHD309eGFP... ..	72
Abb. 33: Trypanosom nach 24h Co-Kultivierung <i>ohne</i> mikrogliale Zellen	73
Abb. 34: Trypanosom nach 24h Co-Kultivierung <i>mit</i> mikroglialen Zellen	74
Abb. 35: Eigenschaften der morphologischen Formen in Liquor und Blut.....	77
Abb. 36: Auftrennung der morphologischen Formen nach Geschwindigkeit. ...	77
Abb. 37: Auftrennung der morphologischen Formen nach Länge und Breite ...	78

Abb. 38: Vergleich eines Hirnform-Trypanosoms mit einem Blutform-Trypanosom, die einen ähnlichen Länge-Breite-Quotient besitzen.....	79
Abb. 39: Mazeriertes Hirngewebe mit eingezeichneter Strecke	
eines einzelnen Trypanosoms	80

Abkürzungsverzeichnis

ALD	Aldolase
AnTat1.1	Antwerp Trypanozoon <i>antigenic type</i>
BLE	Bleomycin-Resistenzgen
BSA	bovines Serumalbumin
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulanz
csf	<i>cerebrospinal fluid</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSBs	DNA <i>double strand breaks</i>
EB	<i>elution buffer</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G418	Geneticin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMI-9	<i>Hirumi's modified Iscove's medium</i>
HYG	Hygromycin-Resistenzgen
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
kDNA	Kinetoplasten-DNA
LB	<i>lysogeny broth</i>
MITat1.2 221	Molteno Institute Trypanozoon <i>antigenic type</i> , VSG 221
NECT	Nifurtimox-Eflornithin <i>combination therapy</i>
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PUR	Puromycin-Resistenzgen
SMB	<i>single marker bloodstream form</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
spp.	<i>species pluralis</i>

SRA	<i>serum resistance-associated gene</i>
T.	Trypanosoma
T.b.	Trypanosoma brucei
T.b.b.	Trypanosoma brucei brucei
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Buffer
TDB	<i>trypanosome dilution buffer</i>
TLF	<i>trypanolytic factor</i>
TryR	Trypanothion-Reduktase
UTR	<i>untranslated region</i>
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Abstract

Die Afrikanische Schlafkrankheit wird durch begeißelte Protozoen der Art *Trypanosoma brucei* verursacht. Fliegen der Gattung *Glossina* sind als Wirt der Infektionsvektor und übertragen die Erreger auf ein speziesabhängiges Wirtsspektrum von Säugetieren. Die Erkrankung ist auf das Verbreitungsgebiet der Glossinen beschränkt. Man unterscheidet eine vermehrt chronisch verlaufende, westafrikanische Schlafkrankheit und eine ostafrikanische Schlafkrankheit mit akutem Verlauf und schlechter Prognose. 70 Millionen Menschen werden von der Weltgesundheitsorganisation als infektionsgefährdet eingestuft. Die jährliche Inzidenz liegt zur Zeit bei unter 10.000 Fällen.

Der Krankheitsverlauf wird in ein hämatolymphatisches und ein meningoenzephalisches Stadium unterteilt. Das zweite Stadium wird mit dem Nachweis der Erreger im Liquor cerebrospinalis erreicht und geht einher mit der namensgebenden Fragmentierung des zirkadianen Rhythmus'. Mit dem Erreichen dieses Stadiums verschlechtert sich die Prognose erheblich. Die medikamentöse Therapie beruht auf Pharmazeutika, die seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts in Verwendung sind und ein ungünstiges Spektrum an Nebenwirkungen hervorrufen.

Der Weg, auf dem die Infektion des zentralen Nervensystems erfolgt, ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass die Trypanosomen die Blut-Liquor-Schranke im *Plexus choroideus* überwinden, durch den *Liquor cerebrospinalis* zu den Meningen gelangen und zwischen den Zellen der *Pia mater*, in einem immunprivilegierten Raum, persistieren. Die Überprüfung dieser Hypothese setzt zuverlässige Methoden der Detektion einzelner Parasiten voraus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei grünfluoreszente Stämme hergestellt, um Grundlagen für weitere Arbeiten zu schaffen. In weiterführenden Kooperationen wurden einzelne Fragestellungen zum Modus der Hirninfektion geprüft. Zur Motilität der hirnadaptierten Trypanosomen und zur Abwehrreaktion durch die zelluläre Immunantwort wurden erste grundlegende Experimente durchgeführt.

Abstract

The causative agent of sleeping sickness, Human African Trypanosomiasis (HAT), is a flagellated protozoon called *Trypanosoma brucei*. The disease is transmitted by the Tse-Tse fly (*Glossina spp.*) and affects a variety of mammals. Hence the spread of sleeping sickness is limited geographically to regions where *Glossina spp.* are endemic. HAT is subdivided into a Western type, characterised by an often chronic progression, and an Eastern type with rapid progression and an unfavourable prognosis. The World Health Organisation (WHO) estimates the population at risk to be 70 million. Currently, new cases are recorded at a rate of less than 10.000 per year.

The initial haematolymphatic stage of the disease invariably progresses to a meningoencephalitic stage. Detection of parasites within the cerebro-spinal fluid (csf) is considered one of the diagnostic criteria for second stage sleeping sickness. It is accompanied by a characteristic fragmentation of sleep patterns which lent the disease its name. The pharmacotherapy of sleeping sickness is almost exclusively limited to compounds with heavy side-effects, some of which are based on arsenic, that were designed in the early 20th century.

The mode by which trypanosomes infect the central nervous system continues to be subject to debate. It is surmised that they penetrate the blood-csf-barrier within the choroid plexus. Continuing onwards they appear to traverse the csf to reach the pial cells and the perivascular space where they can persist. To validate this hypothesis there is need for improvements to be made in the detection and localisation of parasites within the rodent model.

As part of this thesis, three different strains of transgenic trypanosomes were produced which express enhanced green fluorescent protein (eGFP). This lays the groundwork for further studies in the ongoing project. As part of a national cooperation of multiple research groups we considered leading questions concerning central nervous infection. Experiments were carried out to characterise the motility of CNS-adapted trypanosomes as well as the cellular immune response by microglial cells.

1. Einleitung

1.1. Trypanosomen

1.1.1. Taxonomische Einteilung

Ordnung	Gattung	Untergattung	Art	Unterart	Erkrankung
Trypanosomatida	Trypanosoma	Salivaria	Brucei	Brucei	Nagana
				Gambiense	Schlafkrankheit
				Rhodesiense	Schlafkrankheit
		Stercoraria	Cruzi		Chagas
	Leishmania				Leishmaniose

Abb. 1: Familie der Trypanosomatidae als Ordnung der Kinetoplastidae und der mit ihnen assoziierten Erkrankungen. Vereinfachte Darstellung nach dem Web-Projekt „Tree of Life“ [1].

Trypanosomen sind eukaryote, einzellige, begeißelte Protozoen. Sie sind Teil der Familie der Kinetoplastidae [2], die aus den Gruppen der Trypanosomatidae und Bodonidae zusammengesetzt wurde. Als Kinetoplastidae weisen sie ein charakteristisches Organell auf, den Kinetoplasten, d.h. die mitochondriale DNA, die innerhalb des Mitochondriums stets neben der Flagellumtasche angeordnet ist und früher als eigenständiges Organell angesehen wurde.

Alle Trypanosomatiden sind Parasiten, die speziesspezifisch ein weites Spektrum an Wirtstieren befallen können. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl von Krankheitsbildern zu verursachen. Dabei sind sie heteroxen, d.h. sie unterliegen einem obligaten Wirtswechsel. Von großer medizinischer Relevanz sind neben der Gattung *Leishmania* auch die Untergattungen der Gattung *Trypanosoma*, und zwar die *Salivaria* und die *Stercoraria* (Abb. 1).

Trypanosomen der Untergattung *Stercoraria* reifen im hinteren Verdauungstrakt des Insektenvektors heran und werden über Schleimhäute, Kratzwunden oder fäkal-orale Kontamination übertragen [3]. Ein Beispiel hierfür ist *Trypanosoma cruzi*, der prinzipielle Erreger der Amerikanischen Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit). Die *Salivaria* sind im Mitteldarm der Tse-Tse-Fliege zu finden und werden über ihren Stich vermittelt. Hierzu gehört die Art *Trypanosoma brucei*, benannt nach ihrem Erstbeschreiber, dem britischen Generalmajor Sir David Bruce [4]. Häufig sind Trypanosomen dieser Art die Erreger von Tierseuchen wie Nagana (*T.b. brucei*), Surra (*T. evansi*) und der Beschälseuche (*T. equiperdum*).

Humanpathogene Stämme wurden erstmalig von Stevens [5] und Dutton beobachtet [6,7]. Sie sind nach den Orten ihrer Entdeckung, Rhodesien und Gambia, benannt. Entsprechend unterscheidet man den Erreger der westafrikanischen Schlafkrankheit (*T.b. gambiense*) und den Erreger der ostafrikanischen Schlafkrankheit (*T.b. rhodesiense*). *T.b. rhodesiense* und *T.b. gambiense* unterscheiden sich von *T.b. brucei*, unter anderem, in ihrer Pathogenität. Sie verfügen über ein *serum resistance associated protein* (SRA), das ihnen ermöglicht, dem *trypanolytic factor* (TLF) im menschlichen Serum zu widerstehen, der die Zellen sonst lysieren würde. Aktiver Bestandteil von TLF ist Apolipoprotein L1, ein Teil der Fraktion des *high density lipoprotein* (HDL) [8].

1.1.2. Morphologie

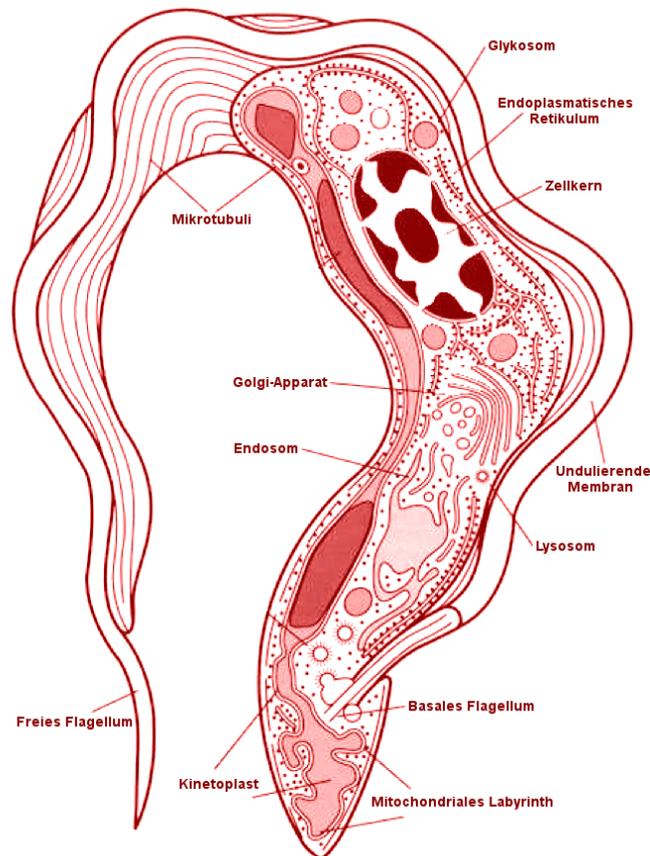


Abb. 2: Morphologie von *Trypanosoma brucei brucei*. Übersetzt und abgeändert nach Vickermann, 1977.

Bei Beobachtung im lichtmikroskopischen Bild zeigen sich die Trypanosomen eher länglich und gewunden verdreht. Entsprechend beziehen sie ihren Namen aus dem Altgriechischen: Τρύπανον (trypanon, Bohrer) und σῶμα (sōma, Körper) ergeben die Bedeutung „Bohrkörper“ [9,10]. Ihre Länge ist im Lauf des Zellzyklus stark variabel [11]. Die kurze, gedrungene *stumpy* Form kann bis zu 12µm kurz werden, während die *long slender* Hirnform eine Länge von bis zu 40µm erreichen. Die durchschnittliche Breite beträgt bis zu 3µm. Ein einzelnes Flagellum erstreckt sich über die Länge der Zelle und haftet dabei über Fleckdesmosomen an der Zellmembran an. Nur der letzte Abschnitt ist frei beweglich. Das Flagellum entspringt einer Tasche, dem einzigen Ort, an dem Endo- und Exocytose stattfinden können [12]. Die Lokalisation der Flagellumtasche im Vergleich zum Zellkern ist maßgebend für die Einteilung in die morphologischen

Stadien. Ein einzelnes, längliches Mitochondrium erstreckt sich über einen großen Teil der Zelle. Dieses weist im Wirtstier keine, im Insektenvektor viele Cristae auf. In diesem Mitochondrium befindet sich nahe der Flagellumtasche eine Ansammlung von kDNA, die früher als Organell angesehen wurde. Dieser Kinetoplast ist namensgebend für die Familie der Kinetoplastida. Bei Nukleinsäure-Färbungen zeigt sich hier ein zweites, charakteristisches Signal am Geißelansatz. Zwischen dem Zellkern und dem Kinetoplast befindet sich das endoplasmatische Retikulum des Trypanosoms. Damit hat es engen räumlichen und funktionellen Bezug zur Flagellumtasche [13,14]. Hier befinden sich auch andere Organellen wie der Golgi-Apparat, ein Teil der Lysosomen und die Endosomen [15]. Über die Zelle verteilt sind die spezifischen Organellen der Trypanosomen. Acidocalcisome ermöglichen die Regulation des osmotischen Drucks durch Speicherung von Polyphosphaten und Calcium [16]. In eigenständigen Kompartimenten, den Glykosomen, findet die Glykolyse statt [17]. Diese sind den Peroxysomen ähnlich und vermutlich daraus entstanden; andere Peroxysomen kommen bei Trypanosomen nicht vor.

Wie der gesamte Aufbau des Trypanosoms ist das Zytoskelett polar angelegt [18]. Es verläuft nah an der Zellmembran und ist dicht ausgeprägt, um die Form der Zelle zu erhalten [19]. Auf der Zelloberfläche liegt ein einheitlicher Mantel aus einem sogenannten *variant surface glycoprotein* (VSG), der zuerst Ende der sechziger Jahre elektronenmikroskopisch beobachtet wurde [20]. 10^7 Moleküle von etwa 60 kDa Größe sind dort durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankert. Diese sind das einzige Antigen der Zelle, das bei lebenden Trypanosomen vom Immunsystem erkannt werden kann [21]. Kleine Anteile der Population wechseln jede Generation den VSG-Typ durch Rekombinationsprozesse [22]. Die restlichen Trypanosomen werden von der humoralen Abwehr erkannt und gehen zugrunde. So ergibt sich der zyklische Infektionsverlauf, der zuvor beobachtet wurde [23].

1.1.3. Morphologische Stadien

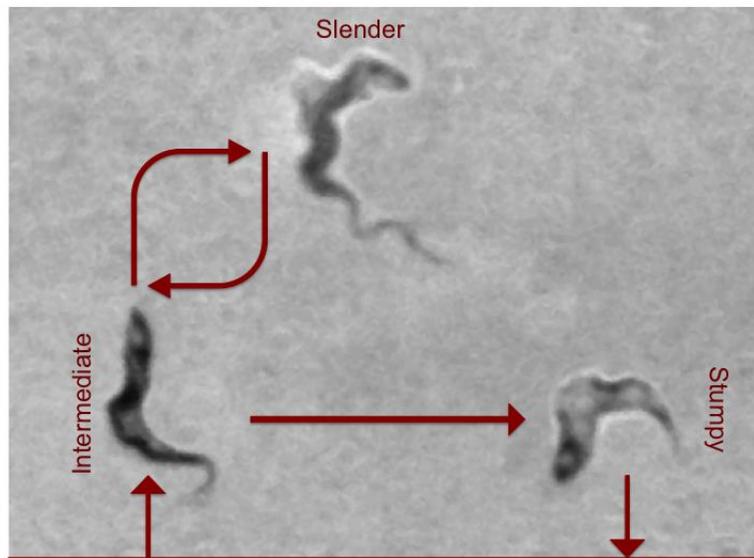


Abb. 3: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* im Wirtstier. Nach dem Stich liegt anfangs eine Population vor, die hauptsächlich aus der *intermediate* Form besteht. Über ein Reservoir im ZNS und Relapse steht sie im Austausch mit der *slender* Population. Hohe Zelldichte führt zur Differenzierung zur *stumpy* Form, die zur Infektion der Fliege präadaptiert ist.

Man unterteilt die morphologischen Stadien und damit den Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* in Abhängigkeit davon, ob sie im Insektenvektor oder im Wirtsorganismus vorliegen. Mit dem Stich einer infizierten Tse-Tse-Fliege beginnt der Teil des Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*, der sich im Wirtstier abspielt. Es wird eine kleine Zahl ($\sim 10^4$ Parasiten) von metazyklischen Trypanosomen übertragen [24], die im dermalen Gewebe zur lokalen Reaktion führen [25,26]. Schon früh nach dem Infektionsbeginn liegen die Trypanosomen im Blut in einer mittellangen und proliferativen *intermediate* Form vor [27]. Durch binäre, geschlossene Zellteilung nimmt die Zelldichte im Blut schnell zu. Hierbei sind die Trypanosomen auf die Glucose im Blut des Wirtstieres zur Energieversorgung durch Glycolyse angewiesen. In dieser vereinfachten Stoffwechsellage wird das Mitochondrium nicht benötigt: es bildet sich zurück, d.h. Cytochrome werden nicht mehr exprimiert und die Anzahl der *Cristae* wird stark reduziert.

Mit fortschreitender Parasitämie beginnt eine Ausdifferenzierung zu einer kurzen, gedrungenen *stumpy* Form. Diese Ausdifferenzierung ist abhängig von der Zelldichte und beruht auf der Anreicherung eines intrinsischen Differenzierungsfaktors der Parasiten [28]. Die *stumpy* Trypanosomen sind in der Phase G1 des Zellzyklus arretiert. Sie produzieren Prostaglandin D₂ und führen so zur eigenen Caspase-unabhängigen Apoptose [29,30]. Es wird vermutet, dass dieser Vorgang dem altruistischen Erhalt der Gesamtpopulation dient [31].

Wenige *intermediate* Form verbleiben. Sie sind darauf angewiesen, durch das Wechseln ihres Oberflächenmantels der zellulären Immunantwort auszuweichen. Zu diesem Zweck besitzen sie (Pseudo-)Gene des *variant surface glycoprotein* (VSG) in subtelomerischen Bereichen und Genarrays. Ausgehend von diesen *silent* Loci werden die Sequenzen den *expression sites* zugeführt, wo sie von assoziierten Genen (ESAGs) reguliert und von RNA Polymerase I transkribiert werden. Das Produkt sind Mosaik-VSGs auf der Basis von bis zu >1000 Genabschnitten [32]. Der Wechsel des Oberflächenmantels ermöglicht den Erhalt der Population, bis das Wirtstier wieder ausreichend hohe, spezifische Antikörper-Titer erreicht hat. Es ergibt sich ein wellenförmiger Infektionsverlauf [33]. Mit dem erstmaligen Erreichen einer hohen Zelldichte im Blut des Wirtstieres überqueren einzelne Trypanosomen die Blut-Hirn-Schranke [23]. Die epitheliale Auskleidung des Plexus choroideus wird auf bisher ungeklärte Weise überwunden und die Trypanosomen treten durch das Stroma des Plexus in den Ventrikelraum über. Sie schwimmen gerichtet durch den Liquor cerebrospinalis und erreichen so die umliegenden Hirnhäute [34].

Im Virchow-Robin-Raum, an den pialen Zellen, finden die Trypanosomen einen immunprivilegierten Raum vor. Hier kann sich die Zellpopulation erhalten. Durch oben beschriebene Maßnahmen der parakrinen Regulation wird die Zelldichte beschränkt. Aus diesem Reservoir können die Trypanosomen, als *long slender* Hirnform, in das Blut zurück gelangen (*relapse*) und eine erneute Parasitämie verursachen.

Erfolgt nun ein Stich durch eine Tse-Tse-Fliege, so nimmt diese mit der Blutmahlzeit auch Trypanosomen auf. Die *stumpy* Form ist durch ihren aktivierten Citratzyklus und einen Metabolismus, der bevorzugt Prolin verstoffwechselt, an dieses Milieu prä-adaptiert [35]. Im Darm der Fliege können sie, induziert durch die Körpertemperatur des Insekts (27°C) und cis-Aconitat, zur prozyklischen Form differenzieren. Die *intermediate* und *slender* Formen werden ebenfalls aufgenommen, gehen aber aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Glucose zugrunde.

Vom Verdauungstrakt der Fliege wandern die prozyklischen Trypanosomen in die Speicheldrüse und differenzieren über die epimastigote zur metazyklischen Form. In der Speicheldrüse liegen sie bis zum nächsten Stich vor. Zusammen mit dem gerinnungshemmenden Sekret werden sie in die gerissene Stichwunde gegeben und der Lebenszyklus beginnt erneut.

1.1.4. Monomorphe und pleomorphe Stämme

Die in der Wildbahn bzw. in Patienten gefundenen Trypanosomen sind sogenannte pleomorphe Stämme, die alle Stadien des beschriebenen Lebenszyklus‘ ausbilden können. Dabei zeigen sie eine rapide Variation ihres VSG-Antigenmantels. Etwa $1:10^2$ Zellen wechseln pro Generation ihren Mantel [36]. Sie besitzen also einen funktionierenden und sehr effizienten Mechanismus zur Vermeidung der humoralen Immunantwort. Entsprechend bedeutet ihr Name im Griechischen „vielförmig“. Sie eignen sich insbesondere als *in vivo* Modell für den vollständigen Krankheitsverlauf.

Monomorphe Trypanosomen entstehen durch wiederholtes Passagieren der Zellen durch Kultursysteme. Sie sind laboradaptierte Formen, die ihre Anpassung an das Blut des Wirtstieres und den Verdauungstrakt der Fliege eingebüßt haben. Nur $1:10^6$ Zellen pro Generation zeigen Antigenvariation ihres VSG-Mantels [36]. Die Parasitämie schwankt nicht unter der eigenen Regulation der Zelldichte, sondern erreicht stattdessen in kürzester Zeit eine Höhe von bis zu 10^9 Zellen/ml, da die monomorphen Zelllinien auf eine geringe Generationszeit hin selektiert worden sind. Ihre Fähigkeit, zur *stumpy* oder *slender* Form zu differenzieren ist eingeschränkt. Durch Zugabe von konditioniertem Medium, das zuvor gebildeten Differenzierungsfaktor enthält, kann die *stumpy* Form beobachtet werden, während die *slender* Form den pleomorphen Stämmen vorbehalten ist. Monomorphe Stämme sind für die Tse-Tse-Fliege weniger infektiös [37]. Durch ihre Adaptation an Laborbedingungen sind sie weniger anspruchsvoll zu kultivieren und dienen als robustes *in vitro* Modell.

1.3. Humane Afrikanische Trypanosomiasis

1.3.1. Die Tse-Tse Fliege als Vektor

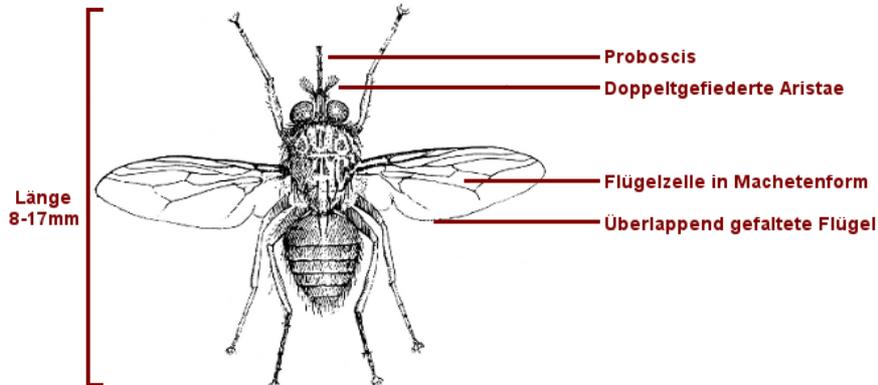


Abb. 4: Die Tse-Tse-Fliege (*Glossina* spp.) und ihre Erkennungsmerkmale. Skizze ergänzt nach [38].

Die Tse-Tse-Fliegen werden der Gattung *Glossina* zugeordnet, als Teil der Familie *Glossinidae* und der Ordnung *Diptera*. Ihre Bezeichnung bezieht die Gattung aus der Form der Flügel, die sich in Ruhe vollständig übereinander lagern und eine zungenähnliche Form besitzen. Von besonderem Interesse sind die Arten *Glossina morsitans* und *Glossina palpalis*. Diese dienen als die Überträger der Trypanosomatiden. Sie können von anderen Fliegen-Arten nicht ersetzt werden, da nur hier der Lebenszyklus komplett abläuft. Die gesamte Fliege ist von einer chitinösen Kutikula überzogen. Der andere Hauptbestandteil dieser Schicht ist Sklerotin, das der Fliege ihre fleckige, hellbräunliche Färbung verleiht [39]. Der schmale und längliche Rüssel liegt üblicherweise zwischen den maxillären Tastern. Labium und Labrum können sich aneinanderlagern, um Blut durch einen Pumpmechanismus aufzunehmen [40]. Um zu stechen, kehrt die Tse-Tse-Fliege die Zähne an der Innenseite des Labellums nach außen und penetriert hiermit die Haut. Tieferliegende Kapillaren werden aufgerissen und Blut tritt aus. Es entsteht eine Wunde gefüllt mit einem Gemisch von Blut, Lymphe und dem stark gerinnungshemmenden Fliegenspeichel. Man nennt die Fliegen daher auch *pool feeder* [41]. Ist die Fliege infiziert, gelangen metazyklische Trypanosomen aus der Speicheldrüse über das Blut-Speichel-Gemisch in den Blutkreislauf des Wirtstieres.

1.3.2. Epidemiologie

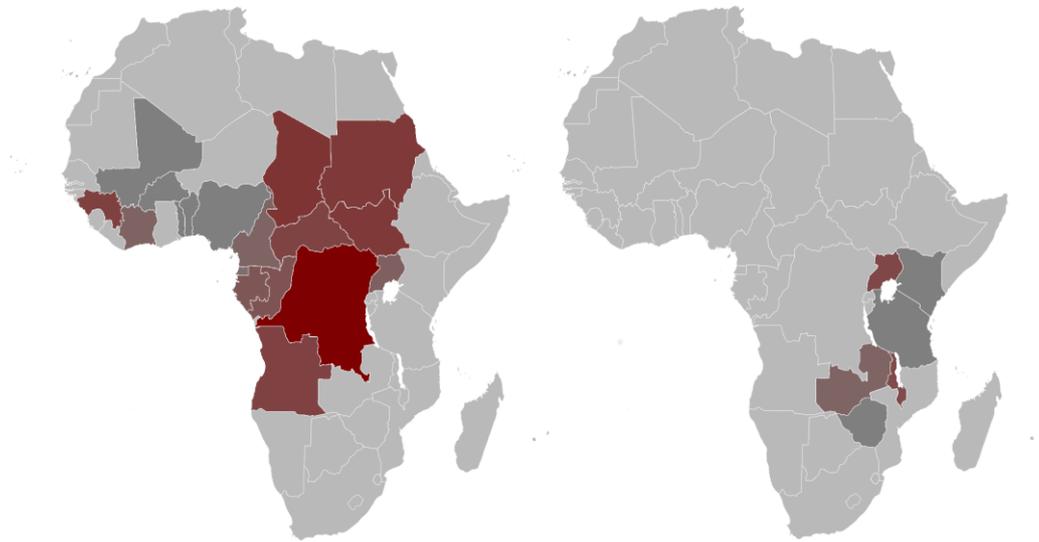


Abb. 5: Epidemiologie der westafrikanischen Schlafkrankheit (links) und der ostafrikanischen Schlafkrankheit (rechts). Logarithmisches Mapping auf Sättigung. Volle Sättigung (rot) entspricht einer Inzidenz 6000 Fällen pro Jahr. Statistik von 2013 [42].

Die Schlafkrankheit galt immer als endemisch in Afrika [43]. Insbesondere am Anfang des 20. Jahrhunderts dezimierte sie weite Teile der Bevölkerung. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde bekannt, dass die Schlafkrankheit durch die Tse-Tse-Fliege übertragen wird [44]. Das Verteilungsgebiet der Subspezies von *Glossina morsitans* und *Glossina palpalis* entspricht damit den Gebieten, in denen die Schlafkrankheit endemisch ist [45].

Die Kolonialmächte implementierten weitreichende und erfolgreiche Methoden der Vektorkontrolle [44], wodurch bis in die 1960er Jahre ein Minimum von Fallzahlen erreicht werden konnte [46]. Politische Instabilität und Bürgerkriege verhinderten jedoch bald die erfolgreiche Vektorkontrolle und führten in den Achtzigern und Neunzigern des 20. Jahrhunderts zu einem wieder stärkeren Auftreten der Krankheit [47-49], wobei Schätzungen von 300.000 Fällen sprachen [50]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) führt die Kontrollprogramme wieder verstärkt durch, wodurch die Fallzahlen seit 2000 jährlich sinken. 2009 wurden weniger als 10.000 neue Fälle gemeldet [51]. Das tatsächliche Risiko für die Bevölkerung ist bedeutend größer: So werden rund 70 Millionen Menschen als infektionsgefährdet eingestuft [52].

1.3.3. Krankheitsverlauf

Eine Infektion mit der Schlafkrankheit erfordert die Übertragung von teilungsfähigen Trypanosomen, die an die Bedingungen im Blutkreislauf adaptiert sind. Hauptsächlich ist dies die metazyklische Form, die von der Tse-Tse Fliege übertragen werden. Denkbar ist auch eine Übertragung der proliferativen *slender* und *intermediate* Formen über das Blut. Solche Fälle sind nicht an das Endemiegebiet, den Lebensraum der *Glossina* spp. gebunden, sondern können weltweit auftreten. Es wurden diverse Fälle der kongenitalen, vertikalen Übertragung zwischen Mutter und Kind im Rahmen der Geburt beschrieben [53-56]. Seltener, aber vermutlich mit einer großen Dunkelziffer assoziiert, ist die Übertragung während des Geschlechtsverkehrs [57]. Es kam zu vereinzelt Übertragungen durch Transfusionen, bei denen nicht standardmäßig auf die Präsenz von Trypanosomen im zu transfundierenden Blut getestet wurde [58]. Auch transplantierte Organe enthielten bereits vitale Parasiten [59].

Bei der natürlichen Infektion befinden sich die Trypanosomen anschließend teils im Kapillarbett, teils im mesenchymalen Gewebe. Diese lokale Entzündungsreaktion bezeichnet man als Trypanosomenschanter [60,61]. Dieser ist einige Zentimeter breit und verbleibt für mehrere Wochen. Über die Lymphbahnen können die Trypanosomen abfließen, um sich so im hämolymphatischen System zu verbreiten. Über das Lymphsystem verursachen die Parasiten eine typische zervikale und nuchale Lymphadenopathie. Diese tritt insbesondere im hinteren Halsdreieck auf und wird dort als Winterbottom-Zeichen bezeichnet [62]. Für die westafrikanische Schlafkrankheit, die zuvor noch sehr grippeähnlich und unspezifisch verläuft, ist dies oft das erste Zeichen [63].

Die ostafrikanische Schlafkrankheit, verursacht durch *T.b. rhodesiense*, verläuft bereits im ersten Stadium fulminant. Zu den akuten entzündlichen Geschehen gehören Perikardergüsse, Lungenödeme und eine schwerwiegende Myokarditis. An Herzversagen versterben die Patienten in kurzer Zeit, oft bevor sie das zweite Stadium erreicht haben [62,64].

Das zweite Stadium beginnt mit dem Erreichen des ersten Maximums der Parasitämie. In infizierten Ratten tritt dies bei Standardmethoden innerhalb von fünf Tagen nach Infektion ein, bei Patienten mit der ostafrikanischen Schlafkrankheit nach wenigen Wochen. Patienten mit der westafrikanischen Schlafkrankheit zeigen einen eher chronischen Verlauf. Hier wird das zweite Stadium nach Literaturangaben erst nach mehreren Monaten bis Jahren erreicht. In Ausnahmen konnten hier auch sehr chronische Verläufe über Jahrzehnte beobachtet werden [65].

Das zweite Stadium der Krankheit wird definiert durch die Infiltration von Organen, insbesondere des zentralen Nervensystems [66-68]. Parasiten können in diversen Organen detektiert werden. Im Herz und den Hoden bleiben sie vital. Im Plexus choroideus, der Leber und dem Nebenhoden werden sie phagozytiert. Im Auge scheinen sie zu zerfallen und verursachen eine ausgeprägte vasculäre Schädigung und Retinopathie [23].

Oft ist das erste Indiz die namensgebende Umkehrung des zirkadianischen Rhythmus. Die Patienten zeigen eine Fragmentierung des Schlafes mit einer charakteristischen Somnolenz während des Tages. Nachts leiden sie unter Schlaflosigkeit und Agitation. Parallel können andere Schlafstörungen auftreten. Diese hängen in der Regel mit dem Befall der paraventriculären Organe zusammen, insbesondere des Nucleus suprachiasmaticus, der charakteristischerweise eine Rolle bei der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus' spielt. Hier induzieren die Trypanosomen die Ausschüttung von Zytokinen und die Aktivierung von Mikroglia-Zellen [69,70].

Die bereits zu Beginn der Infektion auftretenden Kopfschmerzen verschlimmern sich, hinzu kommen ausgeprägte psychische Störungen. In einer Fallvorstellung wurden hier Verfolgungswahn, religiöse Wahnvorstellungen, auditorische und visuelle Halluzinationen, Depression, Suizidalität und eine tangentielle Kommunikationsstörung beschrieben [71].

Mit dem fortschreitenden Befall des zentralen Nervensystems setzt eine irreversible, autoimmune Demyelinisierung ein. Diese äußert sich in ataktischer, parkinsonoider Dyskinesie, kognitiver Einschränkung, Gewichtsverlust und endokrinen Störungen, bis schließlich Koma und Tod eintreten.

Der Tod tritt häufig durch Herzversagen nach Pankarditis ein. Eine Immunsuppression durch die übermäßige Aktivierung des Abwehrsystems führt zu Enzephalitis oder opportunistischen Infektionen. Der fragmentierte Schlaf und die Bewegungsstörung können zu lebensbedrohlichen Mangelernährungszuständen führen.

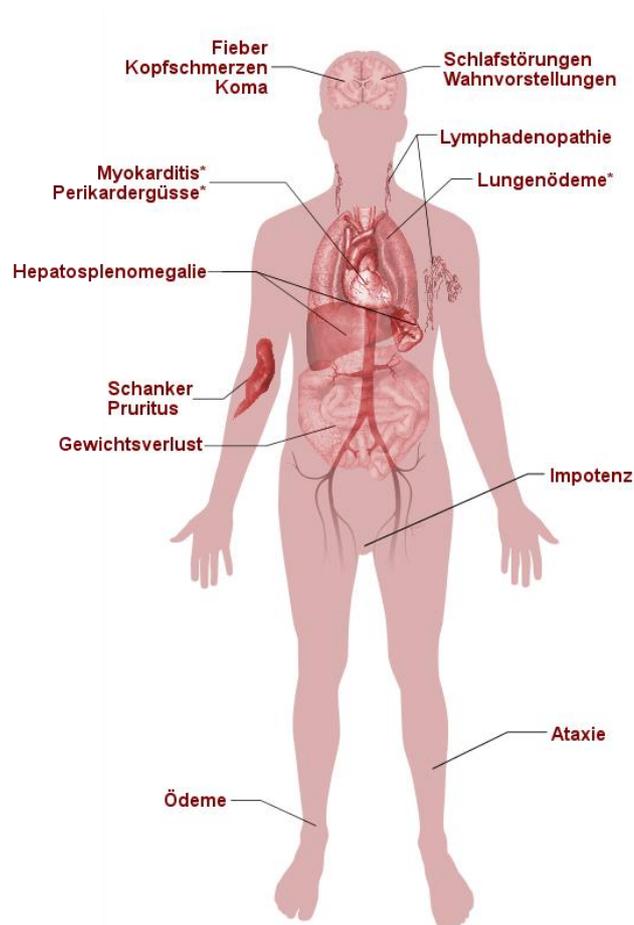


Abb. 6: Symptomatik der humanen afrikanischen Trypanosomiasis [62]. Mit * beschriftete Symptome treten nur bei der ostafrikanischen Trypanosomiasis auf. Körperschema und Organgrafiken zur Verfügung gestellt von Mikael Häggström MD (Universität Uppsala).

1.3.4. Diagnostik

Die verwendeten diagnostischen Maßnahmen sind abhängig vom Stadium und dem Erreger der Schlafkrankheit. In der Anamnese ist die Reise in endemische Gebiete, die Exposition durch Insektenstiche und die Schlafanamnese von Bedeutung. Ergänzt wird die Krankengeschichte durch die klinische Untersuchung mit besonderer Aufmerksamkeit auf Schanker, Winterbottom-Zeichen und schwankende Hyperthermie. Ein serologisches Screening steht mit dem günstigen und feldtauglichen Card Agglutination Test für die ostafrikanische Schlafkrankheit zur Verfügung [72,73].

In der Labordiagnostik zeigt sich IgM stark erhöht [74], begleitet von einer Lymphozytose, erhöhtem Liquorproteinspiegel und der Präsenz schaumig gefüllter Plasmazellen (Mott-Zellen), wie sie sonst beim Plasmozytom auftreten [62]. Im einfachen Blutaussstrich lassen sich Trypanosomen nicht ausreichend sensitiv ermitteln. Hier helfen Maßnahmen wie die doppelte Zentrifugation oder das Anfertigen eines „Dicken Tropfens“. Im Lumbalpunktat sind Trypanosomen, bedingt durch die niedrige Zelldichte, eher ein Zufallsbefund. Hier ist jedes Trypanosomen ein diagnostischer Marker, aufgrund des eher seltenen Auftretens von Parasiten gilt aber auch ein Wert von >5 Lymphozyten als diagnostisches Kriterium für das meningoenzephalitische Stadium der Erkrankung. Diagnostik durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist verfügbar, gilt aber als nicht feldtauglich [75].

Im Computertomogramm lassen sich Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Volumen des Aszites gut beurteilen. Eine Magnetresonanztomographie gehört nicht zur üblichen Diagnostik, kann aber auf bilaterale Signalveränderungen in der weißen Substanz hinweisen [76].

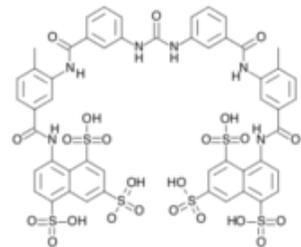
1.3.5. Therapie

Drei der vier Therapieoptionen für die afrikanische Schlafkrankheit sind veraltet, finden aber weiterhin Anwendung [77]. Suramin ist seit 1916 bekannt und seit den 1920er Jahren in der therapeutischen Anwendung. Die intravenöse Verabreichung erschwert die Verwendung in ländlichen Regionen Afrikas und benötigt ausgebildetes Personal. Der Wirkmechanismus ist unbekannt. Vermutet wird eine Bindung an eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem an Fumarase, Dihydrofolat-Reduktase, RNA-Polymerasen, Thymidinkinase und einige Enzyme der Glyolyse [78]. Suramin gilt daher als *dirty drug*, die durch die unspezifische Enzyminhibition ein breites Spektrum an Nebenwirkungen hervorrufen kann [79,80].

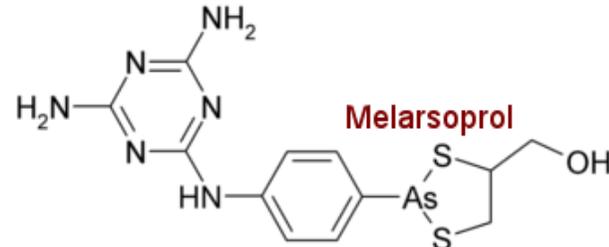
Pentamidin, produziert durch Aventis, stammt aus den 1940er Jahren. Als Nebenwirkung dominiert hier die Störung des Glucosehaushalts und die damit verbundene Hyper-/Hypoglykämie. Ein Long-QT-Syndrom kann auftreten, das zu mitunter lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führt. Ähnlich alt ist Melarsoprol. Als unpolare Arsenverbindung muss es in Propylenglykol gelöst verabreicht werden, wodurch eine starke Reizung des Gewebes und eine Schädigung des Gefäßendothels zu erwarten sind [81]. In 5-10% der Fälle führt Melarsoprol zu einer reaktiven, oft lethalen Enzephalitis [82].

Eflornithin ist eine modernere Therapieoption, die seit den späten 1970er Jahren für die Behandlung westafrikanischer Schlafkrankheit verfügbar ist. Mit Nifurtimox kombiniert ergibt sich das NECT-Therapieschema [83]. Dieses Schema gilt als effektiv auch in der zweiten, meningoenzephalischen Phase der Erkrankung und ist somit eine der wenigen Alternativen zu Melarsoprol. Hier bestehen Hürden in der intravenösen Administration, den hohen therapieassoziierten Kosten, den schwerwiegenden Nebenwirkungen und der Möglichkeit zur Resistenzbildung [84]. Auf der nachfolgenden Seite ist eine Übersicht über die geltenden Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation aufgelistet [80].

	Stadium	Name	Applikation	Mechanismus	Nebenwirkungen
T.b. rhodesiense	1	Suramin	i.v.	Trypanblau-Analogon	Nephrotoxizität, periphere Neuropathie, Knochenmarkstoxizität
	2	Melarsoprol	i.v.	TryR-Inhibition	Enzephalopathie, Agranulocytose, periphere Neuropathie, Arrhythmie



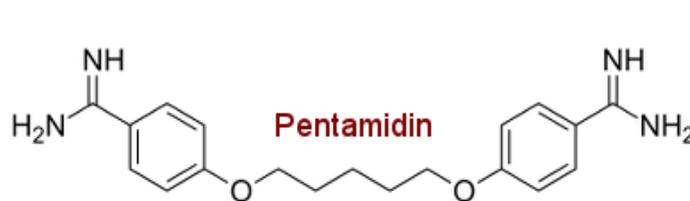
Suramin



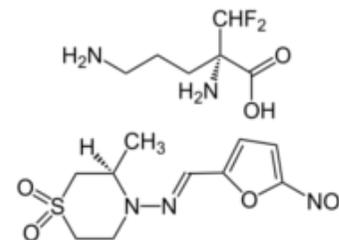
Melarsoprol

Abb. 7: First-Line-Treatment für die ostafrikanische Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei rhodesiense*).

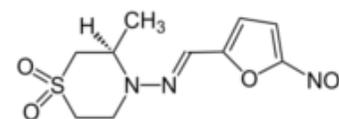
	Stadium	Name	Applikation	Mechanismus	Nebenwirkungen
T.b. gambiense	1	Pentamidin	i.m.	Ubiquitin-Modifizierung	Hyper-/Hypoglykämie, Long-QT-Syndrom, Hypotonie, Gastrointestinale Störung
	2	Eflornithin	i.v.	ODC-Inhibition	Knochenmarkstoxizität, Alopezie, Krampfanfälle, Gastrointestinale Störung
		Nifurtimox	p.o.	5-Nitrofuran	Gewichtsverlust, Reizbarkeit, Schläfrigkeit, Gastrointestinale Störung



Pentamidin



Eflornithin



Nifurtimox

Abb. 8: First-Line-Treatment für die westafrikanische Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei gambiense*).

1.3.6. Prognose

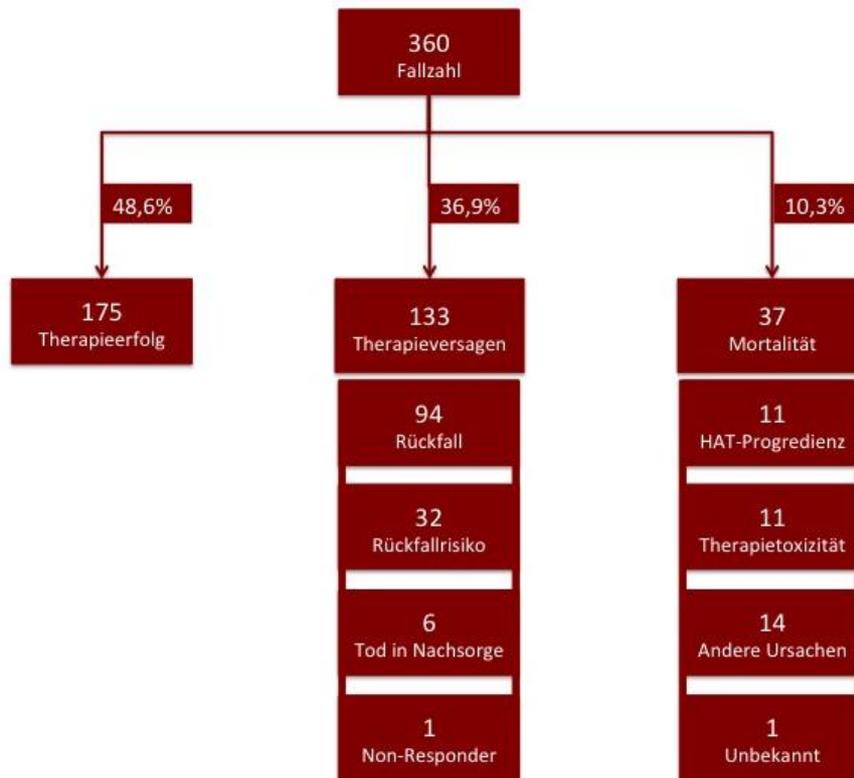


Abb. 9: Verlauf der afrikanischen Schlafkrankheit über zwei Jahre der Therapie und Nachsorge. Daten entnommen, übersetzt und vereinfacht visualisiert nach [85].

Grundsätzlich geht man davon aus, dass beide Arten der afrikanischen Schlafkrankheit unbehandelt in 100% der Fälle tödlich verlaufen. Die Wirksamkeit der Therapie einzuschätzen ist langwierig, denn im ländlichen Afrika ist das Patientenkollektiv selten für die nötige Nachsorge über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren verfügbar. Die individuelle Compliance, das heißt, die Bereitschaft, an den Untersuchungen teilzunehmen, ist niedrig. [86].

Abb. 9 fasst eine der wenigen umfassenden Studien zusammen. Die Patienten wurden nach den aktuellen Empfehlungen behandelt und befanden sich zum Großteil im zweiten Stadium der Krankheit. Die Kategorien für Therapieversagen und Mortalität sind jeweils unterteilt in die respektiven Ursachen. Auffallend ist die hohe Rate an therapieresistenten Rezidiven, d.h. erneutem Auftreten von Parasiten im Blut (sog. *relapse*).

1.3.7. Zielsetzung der Arbeit

Es bestehen konkurrierende Ansichten, auf welchem Weg es zur Progression vom ersten zum zweiten Stadium der Schlafkrankheit kommt. Dabei ist entscheidend, welche Barriere überwunden wird. Einige Publikationen beschreiben das Vorliegen perivaskulärer Trypanosomen im Parenchym und vermuten eine Überquerung der Blut-Hirn-Barriere. Diese wird auf immunologischer Basis erklärt und beschreibt eine, durch Interferon vermittelte, Öffnung der Barriere ohne Schädigung der Zellkontakte, vergleichbar mit lymphozytärer Diapedese [87-89]. In anderen Publikationen wird genauer auf die frühe Phase der zentralnervösen Infektion eingegangen, die mit dem Befall des Plexus choroideus und des Liquor cerebrospinalis beginnt. Hier wird der Überwindung der Blut-Liquor-Schranke größere Bedeutung zugemessen, da die Parasiten von den Liquorräumen aus einen kurzen Weg zu ihrem Reservoir an den pialen Zellen und zu ihrem ersten parenchymalen Ziel, den zirkumventrikulären Organen, haben [23,34,90].

Hier wäre es hilfreich, wenn fluoreszierende Trypanosomen-Stämme vorliegen würden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen erlauben kaum Aufschlüsse über die genaue Verteilung der Parasiten im Krankheitsverlauf des Tiermodells. Gerade diese Verteilung im Verlauf ist aber entscheidend, um zu beobachten, wann (und welche) Barriere durch die Trypanosomen überwunden wird. Ein starkes Fluoreszenzsignal ist wünschenswert, um die Lokalisation zu vereinfachen. Pleomorphe Trypanosomen sollten transfiziert werden, um die Verwendung im Tiermodell zu ermöglichen. Monomorphe Stämme können dann zur Durchführung von *in vitro* Experimenten verwendet werden. Im Rahmen dieser Dissertation sollen Stämme produziert werden, die ein geeignetes fluoreszentes Protein, in diesem Fall eGFP, exprimieren.

Bis zur Fertigstellung der fluoreszierenden Stämme soll darüber hinaus elektronenmikroskopische Bildgebung verwendet werden, um Trypanosomen in murinem Hirngewebe zu beobachten und insbesondere auf ihre Vitalität in Gegenwart von zellulärer Abwehr durch Mikroglia zu beurteilen. Dies ist in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Biber an der Universität Freiburg geplant. Das Ziel ist ein erster, orientierender Einblick in die Abwehrreaktion des menschlichen Wirts gegen die trypanosomale Hirninfektion.

Die Kultivierung pleomorpher Trypanosomen durchlief in der Vergangenheit viele Anpassungen. Es ist entscheidend, ob das Kultursystem folgende Ansprüche erfüllt. So müssen die Zellen *in vitro* eine Generationszeit erreichen, die dem Arbeitsablauf zuträglich ist. Im zeitlichen Verlauf der Kultur müssen alle morphologischen Stadien des trypanosomalen Lebenszyklus durchlaufen werden. Erfüllt die Kultur diese Ansprüche, können pleomorphe Trypanosomen für längere Zeit *in vitro* aufbewahrt und selektiert werden, ohne ihre charakteristischen Eigenschaften zu verlieren. Im Rahmen dieser Dissertation wird die Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen auf einer Agarosematrix implementiert und charakterisiert werden. Nicht nur in der Kultivierung ist die Arbeit mit pleomorphen Trypanosomen anspruchsvoll. Die physikalische Transfektion baut auf Protokollen auf, die für monomorphe Stämme konzipiert worden sind [91,92]. Die bisher bekannten Protokolle sind dementsprechend nur eingeschränkt anwendbar. Die erreichte Transfektionseffizienz ist gering und erschwert die geplante Durchführung der Arbeit. Eine Optimierung der Elektroporation von pleomorphen Trypanosomen ist Bestandteil dieser Arbeit.

Ein stabiles Kultursystem ist die Grundlage für die Arbeit mit morphologischen Formen. Ihre Charakterisierung nach Länge, biochemischen [28,93] oder motilen Eigenschaften [94] ist von Interesse, um den Ablauf ihrer Differenzierung im Rahmen der Infektion besser zu verstehen. Hierzu besteht eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Engstler an der Universität Würzburg, um insbesondere das Schwimmverhalten der *long slender* Hirnform zu beurteilen.

2. Material und Methoden

2.1. E. coli

2.1.1. Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in LB-Flüssigmedium. Das verwendete LB-Vollmedium konnte abhängig von den verwendeten Bakterien gegebenenfalls mit 50 µg/ml versetzt werden. Zur Herstellung von 0,8% LB-Agarplatten wurde 2x LB-Vollmedium und 1,6% Agarlösung verwendet. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden bei 155rpm geschüttelt.

Die Zelldichte im Kulturverlauf wurde durch ein Spektralphotometer (GeneQuant 1300 von GE Healthcare UK, Buckinghamshire) bestimmt. Bei 600 nm wurde dabei angenommen, dass 10^9 Zellen/ml einer OD600 von 0,5-0,8 entsprechen.

LB-Vollmedium

Pepton	1%	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	0,5%	Roth	Karlsruhe
NaCl	0,5%	Merck	Darmstadt
Aqua dest.			
NaOH	Ad pH 7,0		
Autoklavieren	Dampfsterilisator	Münchner Mechanik	Stadlern

LB-Agarplatten

LB-Vollmedium	2x		
Agar	1,6%	Roth	Karlsruhe
Ampicillin	50 µg/ml		
Aqua dest.			

Antibiotika

Ampicillin	1000x/EtOH	Roth	Karlsruhe
-------------------	------------	------	-----------

2.1.2. Herstellung von E.coli-Stabilaten

Photometrisch wurde die stationäre Phase einer Flüssigkultur bestimmt. Über Zentrifugation wurde aus 1ml Kultur ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde in 1ml Gefriermedium (30% LB-Medium und 70% Glycerin) wieder aufgenommen und unmittelbar in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte ebenso in flüssigem Stickstoff.

Stabilatherstellung

Glycerin	Roth	Karlsruhe
Kryogefäße Cryo.S	Greiner Bio-One	Kremsmünster

2.1.3. Isolierung von hochreinen Plasmiden

Für die Isolierung von *high copy* Plasmiden wurde abhängig von der benötigten Menge entweder das *mini prep* oder das *midi prep* Qiagen-Kit (Qiagen, Hilden) gewählt. Über Zentrifugation (6800g, 3min, 25°C RT) wurde aus 3ml (*mini prep*) oder 100ml Flüssigkultur (*midi prep*) ein Zellpellet gewonnen. Es wurde weiter nach Herstellerangaben verfahren.

Kits

QIAGEN Mini Kit	Qiagen	Hilden
QIAGEN Midi Kit	Qiagen	Hilden

Die Reinheit der isolierten Plasmide wurde photometrisch ermittelt. Die Probe wurde 1:50 in EB-Buffer (Qiagen) verdünnt. A260nm/A280nm wurde als Maß für die Verunreinigung durch Proteine verwendet. A260nm galt als Maß für die Konzentration der vorliegenden Plasmid-DNA.

2.1.4. Amplifikation der eGFP-Sequenz durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vorbereitung des PCR-Produkts für die Subklonierung erfolgte durch Amplifikation des gesuchten eGFP-Abschnittes mit folgenden Primern.

Primer		
Forward	(A [^] AGCT_T)ATGGTGAGCAAGGGCGAG	Hilden
Reverse	(G [^] GATC_C)TACTTGTACAGCTCGTCCATGC	Hilden

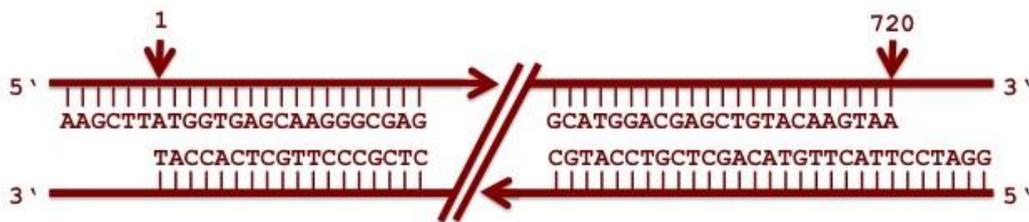


Abb. 10: Primer-Alignment. Gezeigt sind die Positionen komplementärer Bindung zwischen den hitzedenaturierten Template-Strängen der eGFP-Sequenz und den Primern. Links gezeigt ist der Forward Primer, rechts der Reverse Primer.

Die Primer (Invitrogen) tragen zusätzlich die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamH1 (GGATCC) und HindIII (AAGCTT) zur späteren Verwendung in der Plasmidkonstruktion. Sie wurden mithilfe der Online-Software Primer3 (SimGene.com) erstellt und mit Hinblick auf ihre Spezifität optimiert. Das nachfolgende PCR-Protokoll berücksichtigt die ermittelten Schmelzpunkte der Primer.

PCR			
Taq Mastermix	25µl	Qiagen	Hilden
Forward primer	5µl/10µM		
Reverse primer	5µl/10µM		
Template	pLew100eGFP		
Ampuwa	Ad 50µl	Fresenius	Bad Homburg
Denaturierung	15min	95°C	
	1min (30x)	94°C	
Annealing	1min (30x)	55°C	
	1min (30x)	72°C	
Elongation	10min	72°C	
Reaktionsgefäße		Roth	Karlsruhe
Cycler	PTC150 Mini	MJ Research	San Francisco

2.1.5. Subklonierung

Verwendet wurde der Transformationsvektor pJET1.2 aus dem CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Nach Herstellerangaben wurde das Protokoll der *blunt end ligation* durchgeführt, um die eGFP-Sequenz und ihre zusätzlichen Restriktionsendonucleasen-Schnittstellen einzufügen.

2.1.6. Transformation

Für die Transformation wurden chemisch kompetente TOP10 E.coli (Invitrogen) im TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Die Vorbereitung des Transformationsansatzes erfolgte durch 5min Inkubation bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde nach dem *OneShot Chemical Transformation* Protokoll verfahren.

TOPO TA Cloning

eGFP/pJET1.2	0,5-4,0µl		
Salzlösung	1µl	Invitrogen	Kalifornien
Aqua dest.	Ad 5µl		
TOPO-Vektor	1µl	Invitrogen	Kalifornien
Inkubation	5min	RT	
TOP10 E.coli		Invitrogen	Kalifornien
Inkubation	5min	0°C	
Hitzeschock	30s	42°C	

Die transformierten Zellen wurden wieder auf Eis gelegt. Auf 0,8% Agar-Ampicillinplatten wurden sie erst 1:10 mit sterilem SOC-Medium verdünnt, dann ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert, bis einzelne Kolonien zu beobachten waren.

SOC-Medium

Trypton	20g/l	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	5g/l	Roth	Karlsruhe
NaCl	0,5g/l	Roth	Karlsruhe
MgCl₂	1M 10ml/l	Merck	Darmstadt
MgSO₄	1M 10ml/l	Merck	Darmstadt
Glucose	2M 10ml/l	AppliChem	Darmstadt
NaOH	Ad pH 7,0	Merck	Darmstadt

2.1.7. Kolonie-PCR

Zur schnellen, unkomplizierten Detektion des Transformationsvektors eGFP/pJET1.2 in den kultivierten E.coli wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie aufgenommen und im PCR-Ansatz geschwenkt. Die PCR wurde nach oben stehendem Protokoll durchgeführt. Das Produkt wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als positiv galt hierbei eine Produktbande, die der Länge der eGFP-Sequenz (732bp) in Basenpaaren entsprach.

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Eine 1% (w/v) Agaroselösung (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) in 1x TAE-Buffer wurde bis zum Siedepunkt erhitzt und so vollständig verflüssigt. Die Lösung wurde kurz abgekühlt und dann mit 1µl Midori Green Advanced DNA Stain (Nippon Genetics GmbH Europe) versetzt. In einer Elektrophoresekammer (Modell 40-0708 der PEQLAB GmbH) wurde das Gel gegossen. Mit 1x TAE-Buffer wurde die Kammer nach Herstellervorgaben aufgefüllt, bis das Gel mit Buffer bedeckt war, um elektrischen Kontakt herzustellen.

50x TAE-Buffer

Tris	242g	Roth	Karlsruhe
Essigsäure	57,1ml	Roth	Karlsruhe
Natrium-EDTA	37,2g	Roth	Karlsruhe
Aqua dest.	Ad 1000ml		

Zu den Proben wurde im entsprechenden Verhältnis ein bromphenolhaltiger Laufpuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific) gegeben. Als Marker diente GeneRuler 1kB DNA Ladder (Thermo Scientific). Eine Spannung von 80V wurde angesetzt, bis die Gelbanden des Markers nach 45 Minuten ausreichend aufgetrennt waren. Die Banden wurden unter einem Fastgene Blue LED Illuminator (Nippon Genetics GmbH Europe) sichtbar gemacht und softwaregestützt photographisch dokumentiert.

2.1.9. Plasmidgewinnung durch Gelextraktion

Der aus der positiven Kolonie gewonnene Transformationsvektor eGFP/pJET1.2 wurde amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden die oben beschriebenen *forward* und *reverse* Primer verwendet, um die eGFP-Sequenz zu gewinnen. Um die amplifizierte Sequenz aus dem Gel zu gewinnen, wurde die gewünschte Bande unter Sichtkontrolle auf dem Illuminator ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelfragment wurde für das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet.

2.1.10. Ligation in Zielvektoren pHD309 und pUB39

pUB39-VSG-BLE (addgene) und pHD309-PUR-HYG (George Cross, Rockefeller University) wurden im *double digest* mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamH1 verdaut. Der zu verwendende Reaktionsansatz wurde mit Hilfe des Webtools „DoubleDigest“ (ThermoScientific) ermittelt.

Restriktionsverdau			
BamH1	1U	ThermoScientific	Pittsburgh, PA
HindIII	2U	ThermoScientific	Pittsburgh, PA
BamH1-Buffer	10x	ThermoScientific	Pittsburgh, PA
Aqua dest.	Ad 20µl		
Inkubation	2h	37°C	
Inaktivierung	20min	80°C	

Die Verdauprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und, wie oben beschrieben, über ein QIAquick Gel Extraction Kit ausgeschnitten. So wurden pUB39-BLE und pHD309-HYG gewonnen und beide mit HindIII und BamH1 verdaut. Zwischen dem einzufügenden Abschnitt und dem offenen Plasmidrückgrat des Vektors bestand ein Reaktionsverhältnis von 6:1. Die einzusetzende DNA-Menge wurde nach der Gleichung in Abb. 11 ermittelt.

$$\text{Sequenzmasse [ng]} = 6 \times \frac{\text{Sequenzlänge [bp]}}{\text{Vektorlänge [bp]}} \times \text{Vektormasse [ng]}$$

Abb. 11: Formel zur Berechnung der benötigten Menge des einzufügenden Abschnitts für die Ligation der eGFP-Sequenz in die Zielvektoren.

Berechnung des Ligationsansatzes

Sequenzlänge AAGCTT-eGFP-CCTAGG	732bp
Vektorlänge pHD309-HYG	5528bp
Vektorlänge pUB39-BLE	4911bp
Vektormasse pHD309-HYG	200ng
Vektormasse pUB39-BLE	200ng
Sequenzmasse pHD309-HYG-eGFP	158,9ng
Sequenzmasse pUB39-BLE-eGFP	178,9ng

Die Ligation erfolgte mit 1 U einer T4 DNA Ligase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers in den unten aufgeführten Temperaturschritten.

Ligationsablauf

2h	22°C
6h	16°C
8h	4°C

2.1.11. Sequenzierung

Die gewonnenen Plasmide wurden zur Sanger-Standardsequenzierung eingeschickt. Der Auftrag wurde durch die GATC Biotech GmbH ausgeführt. Dabei wurden die oben erwähnten *forward* und *reverse* Primer verwendet. Die Auswertung der Sequenzdaten im Format .abs erfolgte mit der Software DNAMAN (Lynnon Corp Bioinformatic Solutions).

Zur besseren Visualisierung wurden sie mit ExPASy Translate (Swiss Institute of Bioinformatics) in Aminosäuresequenzen übertragen und mit dem ExPASy SIM Alignment (Swiss Institute of Bioinformatics) verglichen. Bei Ungenauigkeiten in der automatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten wurden die Chromatogramme zum manuellen Vergleich herangezogen.

2.2. Tiere

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Ratten (Wistar) und Mäuse (NMRI), die über Harlan-Winkelmann GmbH (Harlan Sprague Dawley Inc, USA) bezogen wurden. Sie erhielten Alma-Futter (Botzenhardt, Kempten) und Wasser nach Belieben und waren im Tierstall des Instituts untergebracht.

2.2.1. Infektion

Als Vorbereitung wurden die Ratten einem Gemisch aus 70% CO₂ und 30% O₂ bis zur Betäubung ausgesetzt. Dieses führt zu einer tierrechtlich unbedenklichen Ultrakurzzeitnarkose. Intraperitoneal wurden 10⁵ Trypanosomen des benötigten Stamms injiziert.

Injektionswerkzeug

Einmalspritze Luer 2ml	Braun AG	Melsungen
Kanüle Mikrolance 30G (gelb)	BD	Drogheda, Irland
Zellstofftupfer Brauncel	Braun AG	Melsungen
Desinfektionsmittel Softasept	Braun AG	Melsungen

Der Verlauf der Infektion unterlag engmaschiger Kontrolle. Dazu wurde täglich der Zustand der Tiere in Hinblick auf Gewicht, Verhalten und Fellglanz bewertet. Die Parasitämie wurde über tägliche Schwanzspitzenbiopsien ermittelt. Hierzu wurde am Schwanzende ein kleiner Schnitt gesetzt und das austretende Kapillarblut 1:100 mit Citrat-Glucose-Antikoagulanzen (CGA) verdünnt.

Citrat-Glucose-Antikoagulan (CGA), pH 7,7

Natriumcitrat x 2 H₂O 29,91g/l Roth Karlsruhe

Glucose x H₂O 7,93g/l AppliChem Darmstadt

Aqua dest.

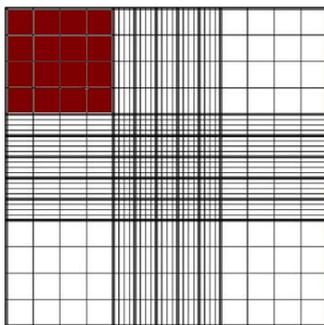


Abb. 12: Neubauer-Zählkammer, Marke "Assistent". Rot: ein Großquadrat.

Die Auswertung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Marke „Assistent“, Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim) mit einer Tiefe von 0,020mm. Die hier rotgefärbte Fläche entspricht einem Großquadrat. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Trypanosomen in vier Großquadraten ausgezählt, gemittelt und mit dem Kammerfaktor (5×10^4) multipliziert, um die Zelldichte pro Milliliter zu ermitteln.

2.2.2. Chloralhydrat-Narkotisierung

Die Chloralhydrat-Narkotisierung wurde bei infizierten Mäusen und Ratten angewendet, die zur Exsanguinierung oder Hirnentnahme getötet werden mussten. Die Absicht war die Herbeiführung einer tiefen Hypnose mit Schmerzausschaltung. Nach Bedarf wurden 0,5-1,0ml Chloralhydrat (Roth, Karlsruhe) in 50% Verdünnung intraperitoneal injiziert. Die Beurteilung der Narkosetiefe erfolgte nach Kontrolle der Schutzreflexe. Zuerst blieb der Stellreflex aus, bedingt durch den Tonusverlust des entspannten Tiers. Schmerzreize wurden an der Schwanzwurzel und der Zwischenzehenhaut appliziert, um eine Abwehrreaktion zu provozieren. Zuletzt wurde behutsam der Kornealreflex durch Lidschluss als Reaktion auf einen Fremdkörper geprüft.

2.2.3. Exsanguinierung

Das Bauch- und Brustfell des narkotisierten Tieres wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Dann wurde mit einer Schere ein erster, oberflächlicher Schnitt vom Processus xiphoideus bis zum Manubrium sterni geführt. Das Fell wurde abgelöst, um den Thorax darzustellen. Zwei Schnitte wurden vom Processus xiphoideus nach kraneo-lateral geführt, um beidseits die Rippen zu durchtrennen. Durch Abheben des Sternums konnte das Diaphragma dargestellt werden. Dieses wurde durchtrennt. In den nun eröffneten Thorax wurde Citrat-Glucose-Antikoagulanz (CGA) vorgelegt. Die Durchtrennung der Vena cava inferior führte zum Austreten von 1ml (Maus) bis 10ml (Ratte) Vollblut. Der linke Ventrikel wurde punktiert, um das Gefäßsystem mit 50ml CGA zu spülen. Bei Bedarf konnte die Ausbeute durch Zerschneiden des Herzens erhöht werden. Mit einer Pipette wurde das mit CGA vermischte Vollblut in sterile Röhrchen gegeben. Das so gewonnene Vollblut wurde direkt für den nächsten Schritt verwendet.

Exsanguinierung

Zellstofftupfer Brauncel	Braun AG	Melsungen
Ethanol 70%	Universitätsapotheke	Tübingen
Einweg-Pasteurpipetten	Roth	Karlsruhe
Cellstar Tubes	Greiner Bio-One	Kremsmünster

2.3. Trypanosomen

Als monomorphe Linie diente MITat1.2 (Molteno Institute Trypanozoon antigenic type, VSG 221) als Klon des LiTat 427 aus EATRO 27, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. P. Overath, Tübingen.

Zusätzlich wurde eine modifizierte monomorphe Linie verwendet, die man als *single marker bloodstream form* (SMB) bezeichnet. Trypanosomen der SMB-Linie exprimieren die T7 RNA Polymerase abhängig von einem Tetracyclin-induzierten Promotor und sind über einen Tetracyclin-Repressor doppelt induzierbar. Selektiert werden sie mit G418 [95,96]. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. Clayton, Heidelberg.

Die pleomorphen Trypanosomen stammten aus der Linie AnTat1.1 (Antwerp Trypanozoon antigenic type), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. Clayton, Heidelberg.

2.3.1. Isolierung von Blutform-Trypanosomen

Der Auslaß einer Säule mit einer Höhe von 5cm wurde mit Filterpapier abgedeckt bevor DEAE-Sephacel (Sigma-Aldrich) unter Wasserstrahl-Vakuum eingefüllt wurde. Das Vollblut aus der oben beschriebenen Exsanguinierung wurde bei 1000g und 4°C für 10min abzentrifugiert (Sigma 3k12 von Bachofer, Reutlingen). Dies teilte das Vollblut in Serum und korpuskuläre Blutbestandteile. Mit einer Einweg-Pasteurpipette wurde der Überstand, das Serum, fast vollständig entnommen und der *buffy coat*, der Trypanosomen und Thrombozyten enthält, im verbliebenen Serum vorsichtig resuspendiert und möglichst erythrozytenfrei abgenommen. Der Rest des Bluts wurde verworfen. Der *buffy coat* wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule anschließend mit separation buffer gespült. Da das VSG bei pH 8 keine Oberflächenladung besitzt, erscheinen die Parasiten im Durchlauf, während alle Blutzellen an den Ionentauscher gebunden werden.

Separationsbuffer, pH 8,0

Na₂HPO₄ x 12 H₂O	20,41g/l	Roth	Karlsruhe
KH₂PO₄	0,41g/l	Merck	Darmstadt
NaCl	2,57g/l	Roth	Karlsruhe
Glucose x H₂O	10,91g/l	AppliChem	Darmstadt

Nach Gebrauch war die DEAE-Säule mit Blutbestandteilen kontaminiert. Das Säulenmaterial wurde deshalb entnommen und unter Verwendung eines Regenerationsbuffers gewaschen und autoklaviert, bevor es wieder eingesetzt werden konnte.

Regenerationsbuffer, pH 3,0

NaCl	58,44g/l	Roth	Karlsruhe
NaN₃	Spatelspitze	AppliChem	Darmstadt

2.3.2. Kultivierung

Die Kultivierung der Trypanosomen erfolgte abhängig von der Zelllinie. Monomorphe Stämme wurden in HMI-9 Medium als Flüssigkultur in Kulturflaschen entsprechender Volumina gehalten. Die Kultivierung von pleomorphen Stämmen erfolgte auf 24er *well* Platten in je 1ml HMI-9 Medium auf einer Matrix aus 0,65% Agar/HMI-9 [97]. Die Matrix bestand aus einer *low melt large DNA grade* 6,5% Agaroselösung (AppliChem, Darmstadt), die bei 56°C in einem Verhältnis von 1:10 mit HMI-9 Medium verdünnt wurde. 200µl des 0,65% Agar/HMI-9 Gemisches wurden pro *well* gleichmäßig aufgetragen und polymerisierten über Nacht zu einer semi-soliden Matrix. Die Platten wurden unter Begasung mit 5% CO₂ bei 37°C Temperatur inkubiert.

IMDM Grundmedium

IMDM		Sigma-Aldrich	Steinheim
NaHCO₃	3,02g	Merck	Darmstadt
Aqua dest.	Ad 900ml		
	pH 7,1-7,3		
Aqua dest.	Ad 1000ml		

HMI-9 Kulturmedium

IMDM Grundmedium	890ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
Hypoxanthin	100x/11ml	Merck	Darmstadt
L-Cystein	100x/11ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
Pyruvat	1000x/1,11ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
Thymidin	1000x/1,11ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
Bathocuproinsulfat	1000x/1,11ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
2-Mercaptoethanol	15,5µl	Merck	Darmstadt
Pen/Strep	100x/11ml	PAA	Cölbe
	pH 7,4		
Sterilfiltration	0,22µm		
Fetales Bovines Serum	110ml	Sigma-Aldrich	Steinheim
Serum Plus	110ml	SAFC	Andover, UK

Verbrauchsmaterial

Sterilfilter	Nalge	Hereford, UK
Kulturflaschen 12,5-175ml	Greiner	Frickenhausen
24er well Platten	Greiner	Frickenhausen
Serologische Pipetten 5-50ml	Greiner	Frickenhausen

Geräte

Brutschrank Hera Cell (5% CO₂, 37°C)	Heraeus	Osterode
pH-Messgerät	WTW	Weilheim
Magnetrührer Combimag RCO	IKA	Staufen
Sterilbank LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus	Hanau
Pipettor Accu-Jet Pro	Brand	Wertheim

Die Kulturen wurden täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Zelldichte wurde, wie unter 3.2.3 beschrieben, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt,.

2.3.3. Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten

Zur Herstellung von Blutformstabilaten der AnTat1.1-Trypanosomen wurde eine Maus oder Ratte beim Auftreten des ersten Maximum der Parasitämie exsanguiniert. Wie unter 3.2.6. beschrieben erfolgte die Isolierung der Trypanosomen. Die Trypanosomen im Separationsbuffer wurden abzentrifugiert und mit einer Zelldichte von 5×10^7 in HMI-9 Medium resuspendiert. Dasselbe Volumen an eiskaltem Einfriermedium wurde hinzugegeben, bevor die Suspension auf jeweils 1ml in Kryogefäßen aliquotiert wurde.

Zur Infektion neuer Versuchstiere wurden Vollblutstabilate verwendet. Unter 3.2.5. ist beschrieben, wie das Blut gewonnen wurde. Aus dem abzentrifugierten Blut wurde der *buffy coat* möglichst erythrozytenfrei entnommen und mit CGA auf eine Zelldichte von 5×10^7 verdünnt. Zu dem verdünnten Blut wurde dasselbe Volumen an eiskaltem Einfriermedium gegeben. Auch hier wurde auf Kryogefäße aliquotiert. Durch den Einfrier/Auftau-Prozeß werden dabei eventuell vorhandene Erythrozyten lysiert.

Aus Dauerkulturen monomorpher Trypanosomen wurden Kulturstabilate angefertigt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in *Trypanosome dilution buffer* (TDB) auf einer Zelldichte von 5×10^7 resuspendiert und ebenfalls im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium verdünnt.

Einfriermedium

TDB 77ml

Glycerin 87%/23ml Roth Karlsruhe

Trypanosome dilution buffer (TDB)

Na₂HPO₄ x 12 H₂O	4,3g	Roth	Karlsruhe
KCl	0,37g	Merck	Darmstadt
NaH₂PO₄ x H₂O	1,12g	Roth	Karlsruhe
NaCl	4,67g	Roth	Karlsruhe
Glucose x H₂O	3,96g	AppliChem	Darmstadt
Aqua dest.	Ad 1000ml		
	pH 7,0		
Sterilfiltration	0,22µm		

Die Aliquots wurden mit $-1^{\circ}\text{C}/\text{h}$ auf -80°C abgekühlt. Dies wurde durch die Verwendung eines Cryo-Safe Coolers (Bel-Art Products, Wayne, USA), bestehend aus Polycarbonat und gefüllt mit 100% Isopropylalkohol, erzielt. Anschließend wurden die Stabilate in Flüssigstickstoff eingelagert.

2.3.4. Transfektion monomorpher Stämme

Für die Transfektion von MITat1.2 und SMB wurde als Grundlage das für Blutform-Trypanosomen optimierte Elektroporationsprotokoll nach Mogk verwendet und angepasst [98]. Eine Dauerkultur wurde durch tägliche Verdünnung zwischen 10^5 und 10^6 Zellen/ml gehalten. Durch Zentrifugation bei 1000g und 37°C für 10min wurde aus $2,5 \times 10^7$ Zellen ein Pellet gewonnen und bei 37°C in 15ml Cytomix gewaschen. Aus dieser Zellsuspension wurde die Zelldichte vor der Elektroporation durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in 440 μl Cytomix resuspendiert. Hinzu kamen 10 μg DNA (lineariert durch Restriktionsverdau mit NotI) in 10 μl EB-Buffer, sodass sich ein Gesamtvolumen von 450 μl ergab. Dieses wurde in eine 2ml Elektroporationsküvette überführt.

Über den Elektroporator wurde eine Spannung von 1400V bei 25 μF und $\infty \Omega$ für 0,3ms appliziert. Die elektroporierten Zellen wurden in eine 50ml Kulturflasche mit 36ml 37°C HMI-9 Medium überführt und daraus erneut ausgezählt. Die Kultur wurde für 6h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden, bei Bedarf, folgende Antibiotika zur Selektion transfizierter, rekombinanter Zellen hinzugegeben.

Antibiotika

Hygromycin B	0,5-5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Roche	Basel
Geneticin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Roth	Darmstadt
Phleomycin	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	InvivoGen	San Diego, USA

Damit die rekombinanten Zellen annähernd monoklonal wachsen konnten, wurde von der Kultur je 1ml pro *well* auf 24 *well* Platten ausgebracht.

Durch tägliche lichtmikroskopische Kontrolle und Zellzahlbestimmung wurden positive Kulturen erkannt und als Dauerkulturen in größere Volumina überführt, um für die anschließenden Versuche bereitzustehen.

Cytomix Buffer, pH 7,6

EGTA	0,38g	Sigma-Aldrich	Steinheim
KCl	4,44g	Merck	Darmstadt
CaCl₂ x 2 H₂O	9,6mg	Merck	Darmstadt
MgCl₂ x 6 H₂O	505mg	Merck	Darmstadt
Glucose	2,5g	Merck	Darmstadt
Bovines Serum Albumin	50mg	Sigma-Aldrich	Steinheim
HEPES	2,98g	Sigma-Aldrich	Steinheim
K₂HPO₄/KH₂PO₄	10x/50ml	Merck	Darmstadt
Hypoxanthin	100x/5ml	Merck	Darmstadt
Aqua dest.	Ad 500ml		
	pH 7,6		
Sterilfiltration	0,22µm		

Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvette 2mm	BTX	San Diego, USA
Kulturflaschen 12,5-175ml	Greiner	Frickenhausen
24er <i>well</i> Platten	Greiner	Frickenhausen
Serologische Pipetten 5-50ml	Greiner	Frickenhausen

Geräte

Brutschrank Hera Cell (5% CO₂, 37°C)	Heraeus	Osterode
Elektroporator GenePulser XCell	BioRad	Hercules, USA
Elektroporator CE Module	BioRad	Hercules, USA
Sterilbank LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus	Hanau
Pipettor Accu-Jet Pro	Brand	Wertheim

2.3.5. Transfektion pleomorpher Stämme

Die Transfektion von AnTat1.1-Trypanosomen erwies sich als nicht zuverlässig durchführbar. Das Protokoll zur Elektroporation von Blutform-Trypanosomen ließ sich nicht für pleomorphe Stämme anpassen. Ersatzweise wurde dieser Schritt in Kooperation mit Dr. Ines Subota am Biozentrum der Universität Würzburg durchgeführt.

Eine AnTat1.1-Flüssigkultur wurde mit HMI-9 Medium und Methylcellulose angesetzt und bei einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml mit vorgewärmten TDB 1:4 verdünnt. Durch Filtration (Nalgene, MN615 Filter) wurde die Methylcellulose aus der Zellsuspension entfernt, bevor für 10 Minuten eine Zentrifugation bei 1400g und Raumtemperatur folgte. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet in 100µl Elektroporationslösung (Amaxa) resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette (Amaxa) überführt. 15µg/12µl der mit der Restriktionsendonuklease NotI linearisierten DNA wurden hinzugegeben. Es wurde das Programm x-001 des Amaxa Nucleofektors verwendet. Die elektroporierten Zellen wurden auf einer 24 well Platte in Kultur aufgenommen und nach 6h Inkubation mit den entsprechenden Antibiotika versehen. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen zurück nach Tübingen transportiert.

2.3.6. Nachweis von cDNA und gDNA

Für die Extraktion von mRNA wurden 1×10^5 Trypanosomen aus Kultur verwendet, die durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300g gewonnen wurden. Nach Entfernung des Überstands wurden sie in 350µl Lysepuffer RLT (Qiagen) wieder aufgenommen und durch einen Vortexer gründlich gemischt. Die Homogenisierung der Probe erfolgte durch Zentrifugation bei 17000g für 2min über eine QIAshredder Säule (Qiagen). Es wurde ein Volumen an 70% Ethanol hinzugegeben, bevor die Probe auf einer RNeasy Säule (Qiagen) gegeben wurde. In den folgenden Waschschrritten wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung der vorgeschlagenen Puffer und Einhaltung RNase-freier Bedingungen verfahren. Die produzierte RNA wurde spektrophotometrisch auf ihre Reinheit getestet. Dabei wurde für reine Proben ein Quotient aus A_{260}/A_{280} von 2,0 bestimmt. Im Folgenden wurde die produzierte RNA für die Reverse Transkription mit dem Boehringer 1st Strand cDNA Synthesis Kit verwendet.

Reaktionsansatz

Reverse Transkriptase	4U
Buffer für Reverse Transkriptase	10x/2µl
dNTPs	5mM/2µl
RNA Template	2µg
<i>random hexamer</i> Primer	2µl
Aqua dest.	Ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert und im Anschluss für 5min bei 95°C durch Hitze inaktiviert. Das Produkt wurde nach dem unter 3.1.4 beschriebenen PCR-Protokoll amplifiziert. Für die Isolierung von genomischer DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) verwendet.

1x10⁵ Trypanosomen wurden für 5min bei 300g abzentrifugiert und in 200µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers ly-siert, um die DNA freizusetzen. Die DNA wurde über eine Säule aufgereinigt.

Phosphate buffered saline (PBS-Buffer)			
NaCl	16,00g	Roth	Karlsruhe
KCl	0,40g	Merck	Darmstadt
KH₂PO₄	0,48g	Merck	Darmstadt
Na₂HPO₄ x 12 H₂O	7,26g	Roth	Karlsruhe
Aqua dest.	Ad 1000ml		
pH 7,6			

Die oben beschriebene reverse Transkription und Isolierung genomischer DNA wurde für jeden der rekombinanten Stämme durchgeführt. Der Vergleich der Produktlänge erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese wie unter 3.1.8 beschrieben.

2.3.7. Phasenkontrastmikroskopie

Für die Beobachtung der morphologischen Progression *in vitro* wurde den zu beobachtenden Kulturen in regelmäßigen Abständen 1ml entnommen. Die darin enthaltenen Trypanosomen wurden bei Raumtemperatur und 1000g für 10min abzentrifugiert und in 20µl PBS aufgenommen. Dieser Tropfen wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem zwischen 20-40° angewinkelten Deckglas gleichmäßig ausgestrichen. Der Ausstrich wurde an der Luft getrocknet und mit 10% Formalinlösung für 5min fixiert. Mit PBS wurden Formalin und eventuelle Salzurückstände abgewaschen, bevor der Ausstrich mit einem Einschlußmittel eingedeckt und so zur längeren Verwendung konserviert wurde. So konnte auch mit Blutausstrichen infizierter Tiere verfahren werden.

Verbrauchsmaterial

Objektträger Menzel GmbH Braunschweig

Deckgläser Roth Karlsruhe

Chemikalien

10% Formalin Hedwin Corp. Baltimore, USA

Einschlussmittel Roti-Mount Roth Karlsruhe

Von den angefertigten Ausstrichen wurden mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast gemacht. Die Längenmessung einzelner Trypanosomen erfolgte manuell mit der Software ImageJ (National Institute of Health, USA). Hier wurde ein Pfad von der Spitze des freien Anteils des Flagellums bis zum hinteren Zellpol gezogen und die Pfadlänge bestimmt. Eine Eichung der Pixel pro μm erfolgte durch Messung einer Kantenlänge der Neubauer-Zählkammer.

2.3.8. Fluoreszenzmikroskopie

Die Dauerobjekte wurden ähnlich präpariert wie die Objekte für die Phasenkontrastmikroskopie, siehe 3.2.11. Als alternatives Einschlussmittel wurde Prolong Anti-Fade Gold (Life Technologies) gewählt, das Fluoreszenzsignale länger erhält. Zur Beobachtung der nativen Fluoreszenz fand keine weitere Fixierung der Probe statt. Sie wurden in warmem *Trypanosome dilution buffer* (TDB) resuspendiert und sofort als Objekt für Echtzeit-Filmaufnahmen verwendet.

Zur besseren Kontrastierung der Zellen wurde bei Bedarf ein Immunostaining mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden 1×10^5 Trypanosomen aus einer Kultur entnommen und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10% Formalin resuspendiert und für 10min fixiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 0,1% Triton X-100 (Merck, Darmstadt) permeabilisiert, für einige Sekunden bei $>6000g$ und RT abzentrifugiert und in 1% (w/v) BSA/PBS für 20min geblockt.

Nach erneuter Zentrifugation wurde der Primärantikörper Maus IgG anti-eGFP (Boehringer-Ingelheim, Biberach) in der Verdünnung 1:1000, gelöst in 1% (w/v) BSA/PBS, hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1h. Es folgten drei Waschschrirte mit 1% (w/v) BSA/PBS. Als Sekundärantikörper wurde FITC-konjugiertes anti-Maus-IgG (Sigma-Aldrich) in der Verdünnung 1:15000 in TBS gelöst verwendet. Gleichzeitig erfolgte eine Färbung mit DAPI 1:1000 (Sigma-Aldrich, Steinheim). Nach 30min folgten fünf weitere Waschschrirte mit 1% (w/v) BSA/PBS. Das Präparat wurde mit Prolong Anti-Fade Gold (Life Technologies) eingedeckelt und dunkel bei 4°C gelagert.

1% (w/v) BSA/PBS

Bovines Serum Albumin	1g	Sigma-Aldrich	Steinheim
NaN₃	10%/0,2ml	AppliChem	Darmstadt
PBS	Ad 100ml		

Tris buffered saline (TBS), pH 7,4

Tris	25mM	Roth	Karlsruhe
NaCl	120mM	Roth	Karlsruhe
KCl	8,7mM	Merck	Darmstadt
Aqua dest.			

pH 7,4

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BH2-RFCA von Olympus, Hamburg. Hochauflösende Bilder wurden mit freundlicher Unterstützung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dodt mit dem Fluoreszenzmikroskop CellObserver von Zeiss, Oberkochen angefertigt.

Die Belichtungszeit betrug standardmäßig 500ms. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software AxioVision von Zeiss und GIMP. Hierbei wurde das Signal durch Anpassung von Kontrast und Helligkeit klarer dargestellt, ohne die Farbverläufe nicht-linear zu verzerren. Die Einfärbung von Graustufen-Signalen des CellObserver-Mikroskops erfolgte nach Abb. 13.

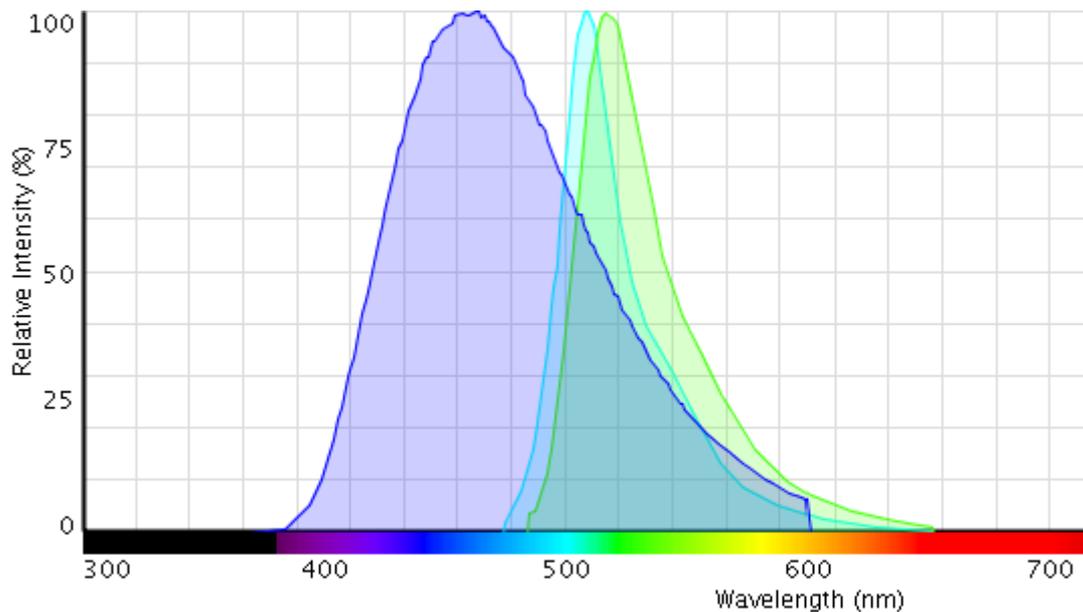


Abb. 13: Emissionsspektren von DAPI, eGFP und FITC (von links nach rechts). Informationen entnommen aus dem Fluorescence SpectraViewer von Life Technologies. Zur Einfärbung wurden jeweils die Emissionsmaxima verwendet.

2.3.9. Co-Kultivierung pleomorpher Trypanosomen mit murinem, hippocampalem Gewebe

Die Durchführung des folgenden Experiments erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Molekulare Psychiatrie“ von Prof. Dr. rer. nat. Knut Biber an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik Freiburg. Im Folgenden ist das verwendete Protokoll zur Präparation der hippocampalen Gewebeschnitte kurz zusammengefasst. Das Protokoll wurde bereits im Rahmen einer anderen Arbeit publiziert [99].

Mäuse im Alter von zwei bis drei Tagen wurden enthauptet, um das Gehirn zu entnehmen. Die Hippocampi wurden beidseits entnommen und in ein eiskaltes, serumfreies Medium zur Aufbewahrung überführt. Das Medium bestand aus Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit 0,5% Glucose und 15mM HEPES.

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)			
NaCl	8000mg	Invitrogen	Niederlande
KCl	400mg	Invitrogen	Niederlande
Na₂HPO₄	48mg	Invitrogen	Niederlande
KH₂PO₄	60mg	Invitrogen	Niederlande
MgSO₄ x 7 H₂O	200mg	Invitrogen	Niederlande
CaCl₂	140mg	Invitrogen	Niederlande
Glukose	1000mg	Invitrogen	Niederlande
Phenolrot	10mg	Invitrogen	Niederlande
NaHCO₃	350mg	Invitrogen	Niederlande
Aqua dest.	Ad 1000ml		
Sterilfiltration	0,22µm		

Das hippocampale Gewebe wurde durch ein Hackmesser (McIlwain) in Schnitte von 350-375µm Dicke geteilt. Die Kultivierung erfolgte auf Kulturplatten-Einsätzen mit einer Porengröße von 0,4µm (Millipore). In einer 6er well Platte wurde pro well ein Volumen von 1,2ml Kulturmedium verwendet. Die anschließende Inkubation der organotypischen, hippocampalen Gewebeschnitt-Kulturen erfolgte bei 35°C und 5% CO₂-Begasung. Das Kulturmedium wurde an Tag 2 und nachfolgend an jedem zweiten Tag gewechselt.

Medium für hippocampale Schnittkulturen

MEM	50%	Invitrogen	Niederlande
Hitzeinaktiviertes Pferdeserum	25%	Invitrogen	Niederlande
BME Basalmedium	25%	Invitrogen	Niederlande
Glutamax	2mM	Invitrogen	Niederlande
Glukose	0,65%	Invitrogen	Niederlande

Die Entfernung von Mikrogliazellen aus den Schnittkulturen erfolgte durch Inkubation mit 0,5mg/ml CL₂MDP Clodronat-Liposomen (Department of Molecular Cell Biology, Free University of Amsterdam, The Netherlands). Mit einer anschließenden Wäsche in PBS wurden überschüssige Liposomen entfernt. Für die nachfolgende Co-Kultivierung wurden die Schnittkulturen ohne Mikrogliazellen als Negativkontrollen verwendet.

Die verwendeten Trypanosomen wurden bei -80°C als Stabilat auf Trockeneis transportiert. Nach zügigem Auftauen wurde die Zelldichte der Trypanosomen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen von Schnittkulturmedium bei 35°C resuspendiert. Zielkonzentration war eine Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ μ l. Pro Schnittkultur wurden 3 μ l der Zellsuspension direkt auf den Schnitt aufgebracht. Auf diese Weise wurden mindestens sechs Schnitte mit Mikrogliazellen und sechs Schnitte ohne Mikrogliazellen behandelt.

Nach 24h bei 35°C/5% CO₂ Inkubation wurden die Schnittkulturen mit 35°C PBS einmalig gewaschen. Die Fixierung erfolgte in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer über Nacht bei 4°C. Für den anschließenden Transport wurden die fixierten Schnittkulturen in 0,1M Cacodylatpuffer überführt und bei 4°C und pH 7,4 aufbewahrt.

0,1M Cacodylatbuffer

Natrium-Cacodylat 21,4g Agar Scientific Ltd. Essex, UK

Aqua dest. Ad 1000ml

pH 7,4

Die anschließende Verarbeitung der fixierten Proben erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartwig Wolburg am Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen. Das folgende Protokoll findet sich in ausführlicher Form in einer aktuellen Publikation [100]. Die Proben wurden in einer 1% Lösung aus Osmiumtetroxid in 0,1M Cacodylatpuffer nachkontrastiert. Überschüssiges Osmiumtetroxid wurde durch dreimaliges Waschen in PBS wieder entfernt. Anschließend wurden die Proben in einer Ethanolreihe dehydriert.

Dehydrierungsreihe in Ethanol

Ethanol	30%	15min	
	50%	15min	
	70%	15min	+ Uranylacetat
	90%	15min	
	96%	15min	
	99%	30min	
	99%	30min	

Die entwässerten Proben wurden zweimal in Propylenoxid gewaschen und in Araldite 502 (Sigma-Aldrich) bei 60°C für 48h eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit einem Leica FCR Ultracut Ultramikrotom angefertigt und mit Bleicitrat gefärbt. Zur Betrachtung der Ultradünnschnitte wurde ein Zeiss EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop verwendet. Der Abbildungsmaßstab wurde rechnerisch ermittelt auf Grundlage der Endvergrößerung.

2.3.10. Messung der Motilität von Trypanosomen

Das folgende Experiment wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Engstler am Institut Zoologie I der Universität Würzburg durchgeführt.

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurden zwei Wistar-Ratten über die intraperitoneale Injektion von Trypanosomen infiziert. Am 21. Tag *post infectionem* war das zweite Stadium der Hirninfektion im Tiermodell erreicht. Die Ratten wurden nach Würzburg transportiert, dort narkotisiert und exsanguiniert. Das gewonnene Blut wurde zur Isolierung von Trypanosomen nach Kapitel 2.3.1 verwendet.

Anschließend wurden die Tiere dekapitiert. Mit einem okzipitalen Schnitt wurde das Foramen magnum eröffnet. Unter stumpfer Präparation wurde die Schädelkalotte und mit ihr die Dura mater eröffnet und abgehoben. Dies wurde fortgesetzt, bis die Hirnoberfläche vollständig dargestellt war. Nun wurden die Reste der Dura mater mit einer Pinzette abgeschält. Mit einem stumpfen Spatel wurden die Hirnnerven an der Schädelbasis gekappt. Der Hirnstamm und der Bulbus olfactorius wurden auf die gleiche Weise abgetrennt. Das Gehirn der Ratte wurde in 15ml HMI-9 Medium (37°C) überführt. Das Hirngewebe wurde manuell mechanisch mazeriert und für 10 Minuten in dem Kulturmedium belassen. Auf diese Weise wurden Hirnform-Trypanosomen aus dem infizierten Gewebe gelöst. Anschließend erfolgte die Filtration mit einer Porengröße von 22µm, um Gewebepartikel abzutrennen.

Zur mikroskopischen Beobachtung wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24x60mm) bedeckt. Dadurch ergab sich ein Raum von 10µm Höhe, in dem sich die Trypanosomen frei bewegen konnten. Es erfolgte keine Fixierung. Die Zellen wurden weiterhin auf 37°C gehalten, um eine unveränderte Motilität zu gewährleisten. Die Aufnahmen wurden mit dem vollautomatisierten Fluoreszenzmikroskop iMIC (TILL Photonics, Gräfelfing) durch die Objektive 100x(NA 1.4) und 60x(NA1.45) von Olympus angefertigt. Einzelbilder wurden mit den CCD-Sensor gesteuerten Kameras pco.1600 und sensicam.qe (PCO AG, Keilheim) aufgenommen.

Videoaufnahmen erfolgten mit der Kamera Phantom v9.1 (Vision Research, New Jersey) bei 250fps unter Berücksichtigung des Nyquist-Shannon-Theorems [101].

Es wurde eine *single frame* Analyse durchgeführt, um Bild für Bild manuell die Frequenz und die Amplitude des Geißelschlags zu bestimmen. Morphometrische Methoden wurden zur Gewinnung von Daten zur Länge, Breite und Form der einzelnen Zellen verwendet. Um die Bewegung der Trypanosomen im Raum zu quantifizieren, wurde der optische Fluss aufgezeichnet. Dr. T. Krüger von der Arbeitsgruppe Prof. Engstler führte die mathematische Auswertung nach oben beschriebenen Methoden durch.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung von zwei stabil transfizierbaren, eGFP kodierenden Plasmiden

3.1.1. Generierung der Plasmide pHD309eGFP und pUB39eGFP

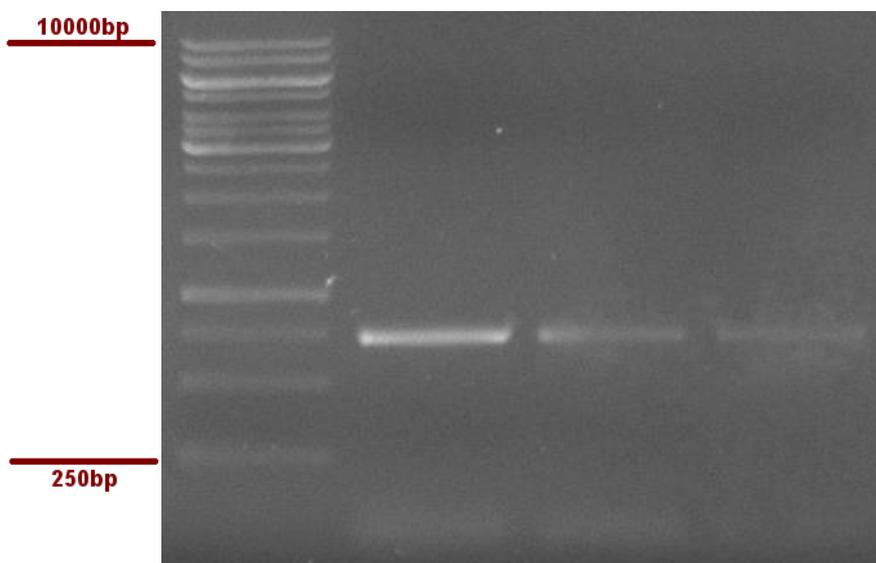


Abb. 14: Bestätigung der Transformation von eGFP/pJET1.2 in TOP10-E.coli durch gel-elektrophoretische Auftrennung der Produkte einer colony PCR.

Gezeigt wird die Bestätigung der Transformation, beschrieben unter 3.1.6. Drei Kolonien wurden nach 3.1.7. als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (*colony PCR*) verwendet. Es zeigten sich durchweg Banden auf einer Höhe von 732bp, die dem Molekulargewicht von eGFP mit dem Zusatz der Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen (GGATCC für BamH1 und AAGCT für HindIII) entsprechen. Weitere diffuse Banden am Ende des Gels entsprachen dem überschüssigen Primergemisch. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Ligation von GGATCC-eGFP-AAGCT in CloneJet1.2, die Transformation in chemisch kompetente TOP10 E.coli und die nachfolgende Selektion mit Ampicillin erfolgreich waren. Auf diese Weise wurde somit der Subklonierungsvektor eGFP/pJET1.2 hergestellt.

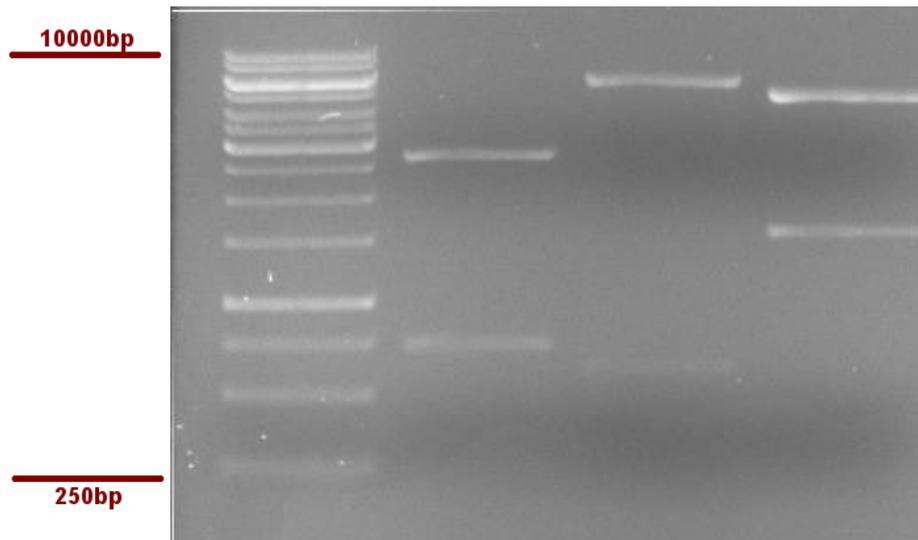


Abb. 15: Gelelektrophorese der Produkte des *double digest* mit HindIII und BamH1. Bahn 1: ThermoScientific 1kb DNA Ladder. Bahn 2: eGFP/pJET1.2. Bahn 3: pHD309-PUR. Bahn 4: pUB39-VSG.

Wie unter 3.1.5. beschrieben, wurden der Subklonierungsvektor eGFP/pJET1.2, das Plasmid pUB39-VSG und das Plasmid pHD309-PUR jeweils einem *double digest* mit den Restriktionsendonukleasen BamH1 und Hind III unterzogen. Das Ergebnis dieses Restriktionsverdaus zeigt Abb. 15. Im Verdau von eGFP/pJET1.2, aufgetragen auf der zweiten Bahn, ergaben sich zwei Banden. Die obere Bande ist bei etwa 2750bp zu beobachten und entspricht dem pJET1.2-Subklonierungsvektor (2974bp). Die untere Bande liegt bei etwa 750bp und entspricht eGFP (732bp). Auf der dritten Bahn der Verdau von pHD309-PUR aufgetragen. Auch hier entspricht die obere Bande bei etwa 5500bp dem restlichen Vektor (5528bp), während die untere Bande bei etwa 600bp der entfernten PUR-Sequenz zuzuordnen ist (609bp). Auf der vierten, letzten Bahn finden sich die Verdauprodukte von pUB39-VSG. Die obere Bande liegt bei etwa 5000bp und entspricht dem größeren Teil des verdauten Vektors (4911bp), während die untere Bande dann zur entfernten Sequenz für VSG117 (1587bp) gehört und bei etwa 1500bp zu beobachten ist.

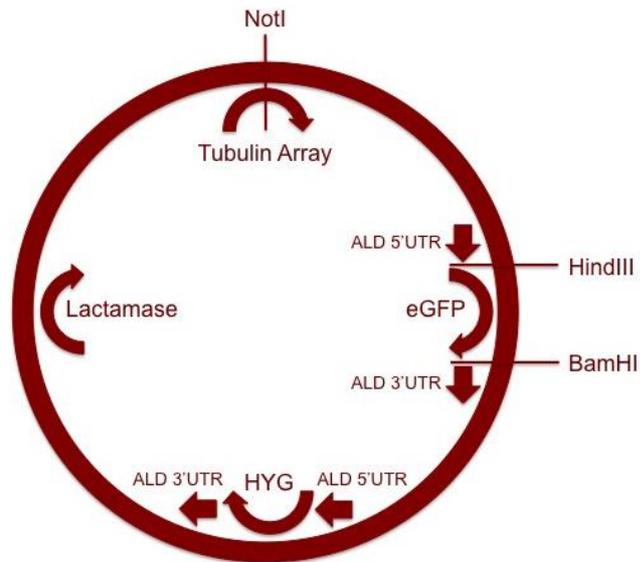


Abb. 16: Aufbau des neu generierten Plasmids pHD309eGFP. Vereinfachte, schematische Darstellung nach Cross [102]. Abkürzungen: HYG – Hygromycin-Resistenzgen, ALD – Aldolase, UTR – untranslated region, eGFP – enhanced green fluorescent protein.

In Abb. 16 sind alle für die Arbeit relevanten Abschnitte und Schnittstellen vermerkt. Das Tubulin Array bezeichnet eine Sequenz, die homolog zum gleichnamigen Bereich des trypanosomalen Genoms ist. In diesen sogenannten Arrays liegen die Gene für viele Proteingruppen vor, so auch die Abschnitte für Strukturproteine. Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease NotI ergibt sich ein linearisiertes Plasmid, das nach Transfektion leichter in dieses Array integriert werden kann. Das Tubulin Array ist eine hochgradig transkribierte Region. Hier wird in polycistronischen Transkriptionseinheiten abgelesen, weitestgehend unabhängig vom Zellzyklus und unter geringer Regulation. Mehrfache Insertion des Plasmids ist möglich und erhöht die Transkriptmenge. Die inserierte eGFP-Sequenz wird *upstream* und *downstream* von *untranslated regions* (UTR) des Aldolase-Locus flankiert. So verhält es sich auch mit dem weiter *downstream* liegenden Hygromycin-Resistenzgen. Die Transkriptionsrate ist folglich ähnlich. Die Resistenz besteht in der Expression einer inaktivierenden Kinase. Eine Resistenz durch ein Lactamase-kodierendes Gen dient der Selektion in E.coli und kommt im Trypanosom mangels einer Aldolase-Region nicht zum Tragen.

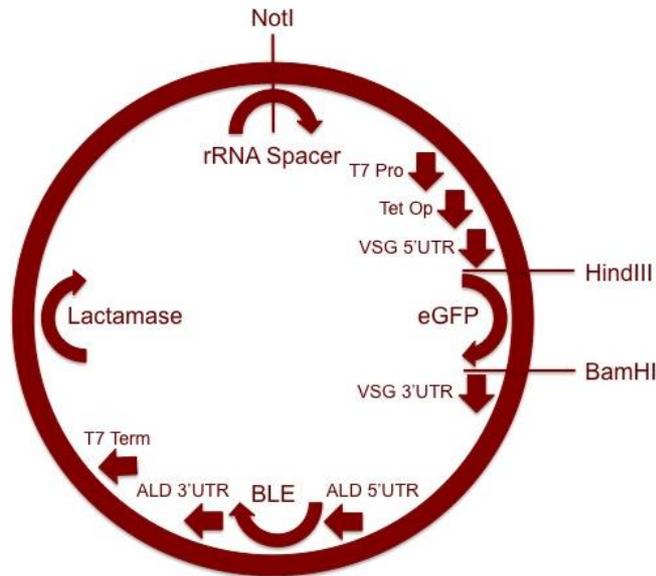


Abb. 17: Aufbau des neu generierten Plasmids pUB39eGFP. Vereinfachte, schematische Darstellung nach Cross [102]. Abkürzungen: T7 – T7 RNA-Polymerase, Pro – Promotor, OP – Operator, VSG – *variant surface glycoprotein*, BLE – Bleomycin-Resistenzgen.

Das in Abb. 17 gezeigte Plasmid pUB39eGFP ist Teil eines zweiteiligen Expressionssystems. Um die Transkriptionseffizienz zu standardisieren, wird nicht auf eine trypanosomale RNA-Polymerase zurückgegriffen. Stattdessen wird eine T7-RNA-Polymerase verwendet, die an einen Tetracyclin-Repressors gekoppelt ist. Dies ist in der monomorphen *single marker bloodstream* Form (SMB) gegeben und wäre in AnTat1.1 mit dem Plasmid pHD328 (Clayton) etablierbar.

Der Tetracyclin-Operator sitzt in der exogenen Promotorregion der T7-RNA-Polymerase. Hier befand sich zuvor der trypanosomale PARP-Promotor, der in vorherigen Versionen des Plasmids noch verwendet wurde, jedoch eine erheblich geringere Expressionsaktivität aufweist. Von der T7-Promotorregion sind sowohl das gewünschte eGFP-Gen als auch die nachfolgende Bleomycin-Resistenz abhängig. Das eGFP-Gen wird flankiert von den *untranslated regions* des VSG117-Proteins. So ergibt sich eine höhere Transkriptionsrate, als es im Aldolase-Locus der Fall wäre. Abschließend findet sich auch hier ein Lactamase-Gen zur Selektion von *E. coli* mit Ampicillin.

3.1.2. Restriktionsverdau

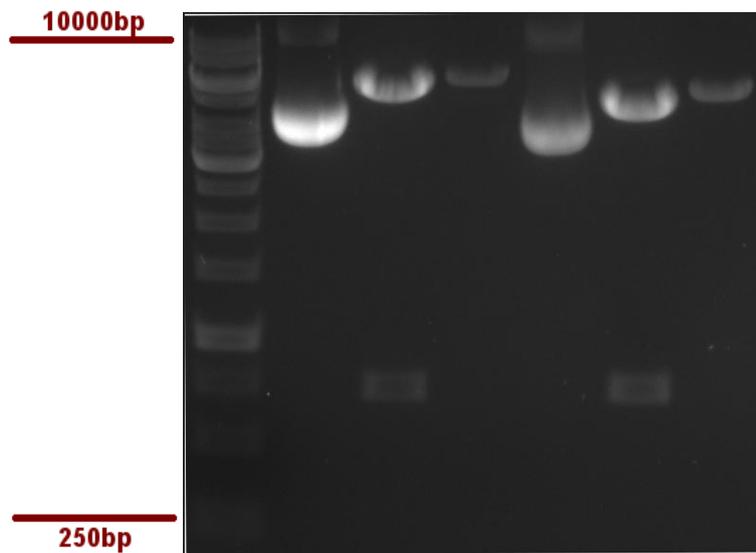


Abb. 18: Gelelektrophorese der Plasmide nach *double digest* und Linearisierung. Bahn 1: ThermoScientific 1kb DNA Ladder. Bahn 2: Plasmid pUB39eGFP. Bahn 3: Plasmid pUB39eGFP nach *double digest* mit BamH1 und HindIII. Bahn 4: Plasmid pUB39eGFP nach Linearisierung mit NotI. Bahn 5: Plasmid pHD309eGFP. Bahn 6: Plasmid pHD309eGFP nach *double digest* mit BamH1 und HindIII. Bahn 7: pHD309eGFP nach Linearisierung mit NotI.

Wie unter 3.1.10. beschrieben, wurden die Plasmide pUB39eGFP und pHD309eGFP einem *double digest* mit den Restriktionsendonukleasen BamH1 und HindIII unterzogen. Hier zeigt sich auf Bahnen 3 und 6 eine untere Bande bei circa 750bp, die dem eGFP-Fragment (732bp) entspricht. Die Bahnen 4 und 7 zeigen die Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease NotI in Vorbereitung auf die Transfektion der Trypanosomen. Die Bahnen 2 und 5 zeigen die zwei Plasmidkonformationen, die sich bei doppelsträngiger, ringförmig geschlossener Struktur ausbilden. Die oberen, schwächeren Banden enthalten die *relaxed* Konformation der Plasmide, während die unteren, kräftigeren Banden die natürliche Konformation des Plasmids zeigen, nämlich die *supercoiled* Form. Durch die Linearisierung mit NotI heben sich diese Ringstrukturen und damit die Fähigkeit zur Konformationsbildung auf. Es zeigen sich Banden auf einer Höhe, die den Molekulargewichten der beiden Plasmide entsprechen.

3.1.3. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Plasmide pUB39eGFP und pHD309eGFP wurden, wie unter 3.1.11. beschrieben, sequenziert. Auf den nachfolgenden Seiten ist das Ergebnis der Analyse zusammengefasst.

pUB39eGFP zeigt keine Veränderungen der Basenfolge und folglich auch keine *silent*, *mis-sense* oder *frameshift* Mutationen. Das Chromatogramm ist vollständig und eindeutig. Es zeigt sich ein intaktes und vollständig integriertes Gen für das *enhanced green fluorescent protein*.

pHD309eGFP zeigt keine Verschiebung des Leserasters und keine *mis-sense* oder *silent* Mutationen. Jedoch kam es hier zu einigen Ungenauigkeiten in der Auslesung der Chromatogramme. Insgesamt fünf Basen konnten nicht automatisch detektiert werden, so dass eine manuelle Auswertung durchgeführt wurde. Die unten aufgeführten Chromatogramme zeigen an den markierten Stellen zwar schwache, aber eindeutige Signale. Nach Anpassung der automatischen Auswertung ergab sich folglich eine vollständige und intakte Sequenz für eGFP.

Es ist davon auszugehen, dass beide Plasmide ohne Mutationen, Deletionen oder sonstige Veränderungen der Sequenz von eGFP vorliegen und für ein funktionsfähiges Produkt kodieren.

```
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F
I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V
Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K
L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P
I G D G P A L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D
E L Y K
```

Produkt des Plasmids pUB39eGFP, gegeben als Abfolge von Aminosäuren zur besseren Darstellung. Errechnet aus Sequenzierungsergebnissen. Aminosäuren abgekürzt nach dem Einbuchstabencode.

```
M V S K G E E L X X G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F
I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V
Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K
L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P
I G D G P A L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A X X T L G M D
E L Y K
```

Produkt des Plasmids pHD309eGFP, gegeben als Abfolge von Aminosäuren zur besseren Darstellung. Errechnet aus Sequenzierungsergebnissen. Aminosäuren abgekürzt nach dem Einbuchstabencode. Hierbei gilt ein „X“ als nicht automatisch ablesbar. Eine manuelle Auswertung anhand der Chromatogramme folgt.

eGFP	1	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPT *****
pUB39eGFP	1	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPT *****
eGFP	61	LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL *****
pUB39eGFP	61	LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL *****
eGFP	121	VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA *****
pUB39eGFP	121	VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA *****
eGFP	181	DHYQQNTPIGDGPALLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK *****
pUB39eGFP	181	DHYQQNTPIGDGPALLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK *****

Abgleich der Sequenz von eGFP auf dem Plasmid pUB39eGFP mit der Referenzsequenz von eGFP. Vereinfacht dargestellt als Abfolge von Aminosäuren, bezeichnet nach dem Einbuchstabencode. Übereinstimmungen dargestellt als „*“.

eGFP	1	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPT ***** XX *****
pHD309eGFP	1	MVSKGEEL XX GVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICTTGKLPVPWPT
eGFP	61	LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL *****
pHD309eGFP	61	LVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL
eGFP	121	VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA *****
pHD309eGFP	121	VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA
eGFP	181	DHYQQNTPIGDGPALLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK ***** XX *****
pHD309eGFP	181	DHYQQNTPIGDGPALLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTA XX TLGMDELYK

Abgleich der Sequenz von eGFP auf dem Plasmid pHD309eGFP mit der Referenzsequenz von eGFP. Vereinfacht dargestellt als Abfolge von Aminosäuren, bezeichnet nach dem Einbuchstabencode. Übereinstimmungen dargestellt als „*“. Abweichungen von der Referenzsequenz dargestellt als „X“.

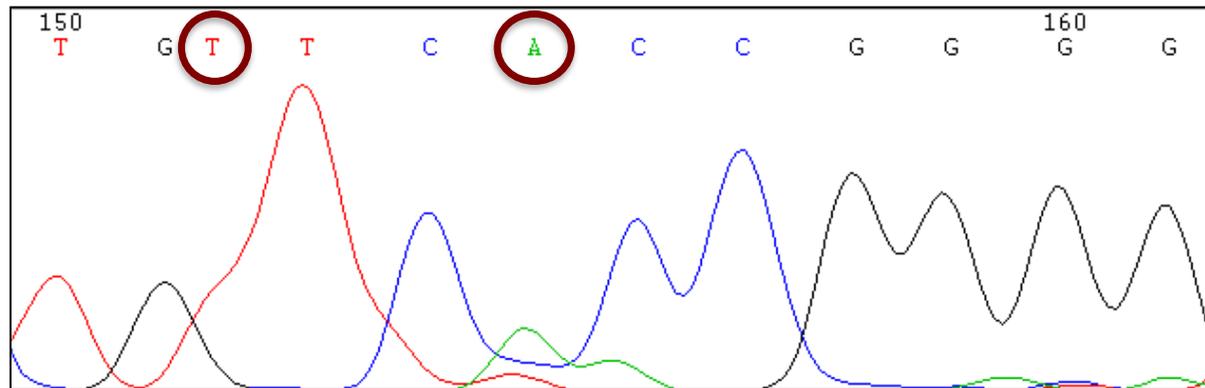


Abb. 19: Ausschnitt des Chromatogramms als Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids pHD309eGFP. Mangelnde Signalstärke an Position 9 und 10 ergab 5'-ntcnCC-3' statt 5'-ttcacc-3'. In Sequenzdaten ausgehend vom reverse primer liegt dieser Abschnitt korrekt vor.

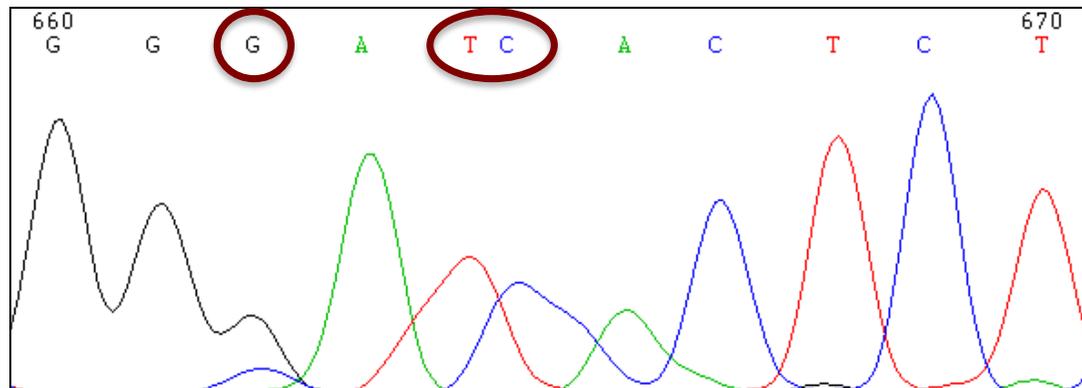


Abb. 20: Ausschnitt des Chromatogramms als Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids pHD309eGFP. Mangelnde Signalstärke an Position 170 und 171 ergab 5'-GGnAnn-3' statt 5'-gggatc-3'. In Sequenzdaten ausgehend vom forward primer liegt dieser Abschnitt korrekt vor.

3.2. Implementierung und Charakterisierung eines Systems zur axenischen, kontinuierlichen Kultivierung von Trypanosomen

3.2.1. Verlauf der Zelldichte über Zeit

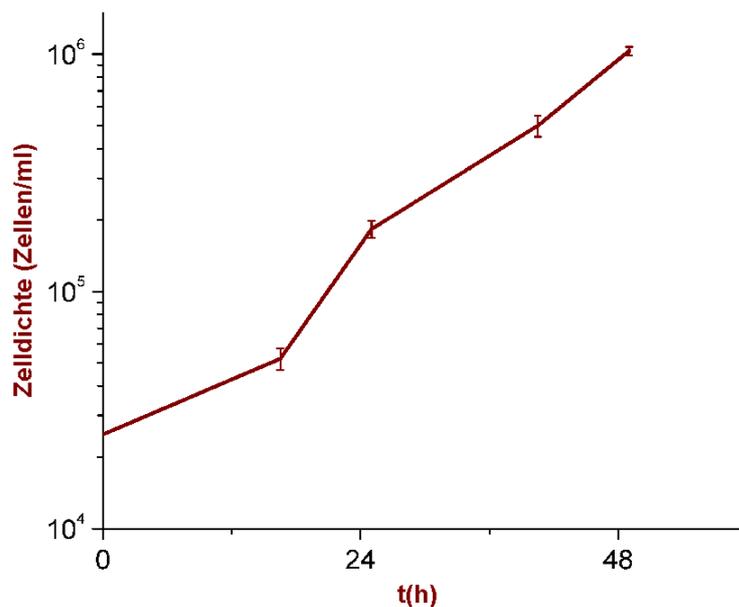


Abb. 21: Wachstumskurve als logarithmische Darstellung der Zelldichte über Zeit. Gezeigt ist der durchschnittliche Verlauf einer Kultur von pleomorphen Trypanosomen des Stamms AnTat1.1. (n=9)

Das obenstehende Diagramm zeigt den durchschnittlichen Kulturverlauf, ermittelt aus drei einzelnen, methodisch gleichen Kulturansätzen. Hierzu wurden pleomorphe Trypanosomen vom Stamm AnTat1.1, wie unter 3.2.7. beschrieben, auf einem semisoliden Nährboden nach Vassella kultiviert [97]. Zu fünf gleichmäßig verteilten Zeitpunkten wurden aus jedem Kulturansatz jeweils drei Proben entnommen und ausgezählt. Insgesamt ergaben sich also 45 Messpunkte, die durch den *avecure*-Algorithmus der Origin8-Software gemittelt wurden. Zur kontinuierlichen Darstellung des Kulturverlaufs zwischen den diskreten Messungszeitpunkten wurde interpoliert.

In den Kulturansätzen wurde nach 48h Inkubation die im Verlauf höchste Zelldichte von durchschnittlich 10^6 Zellen/ml erreicht. Hierbei ergab sich eine durchschnittliche Generationszeit von 11,5 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase. Entgegen des Kulturverlaufs von monomorphen Trypanosomen in Flüssigkultur, ergibt sich bei der Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen auf einer semi-soliden Agarosematrix keine oder eine sehr kurze verzögerte Wachstumsphase (*lag phase*). Die Kulturen waren ohne Selektion und ohne Ersatz des Mediums für 96-108 Stunden stabil.

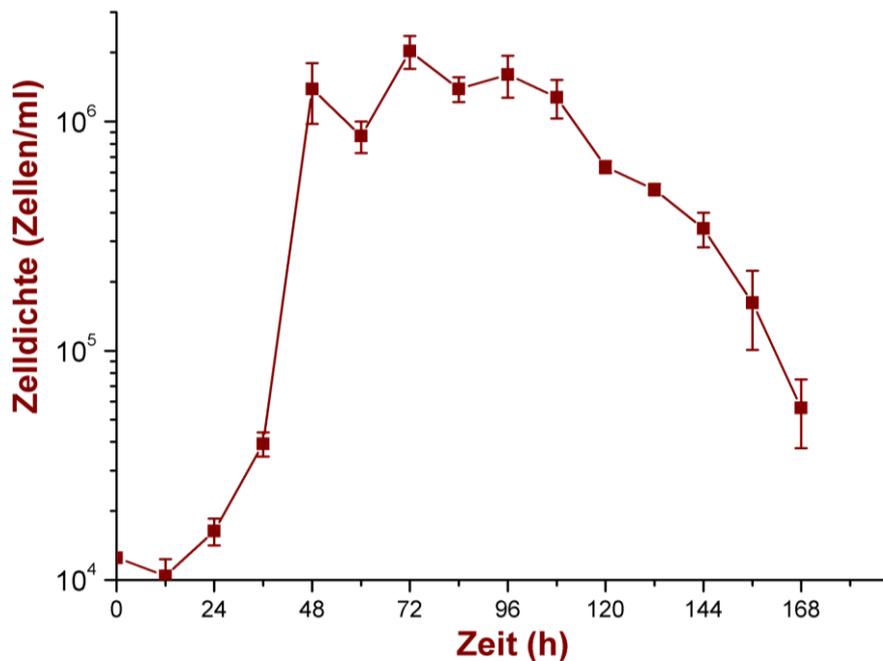


Abb. 22: Wachstumskurve als logarithmische Darstellung der Zelldichte über Zeit. Gezeigt ist der durchschnittliche Verlauf einer Kultur von pleomorphen Trypanosomen des Stamms AnTat1.1. über einen längeren Verlauf. (n=3)

Die gezeigten Daten entstanden in Zusammenarbeit mit Julia Lorenz.

3.2.2. Differenzierungsverhalten in Kultur

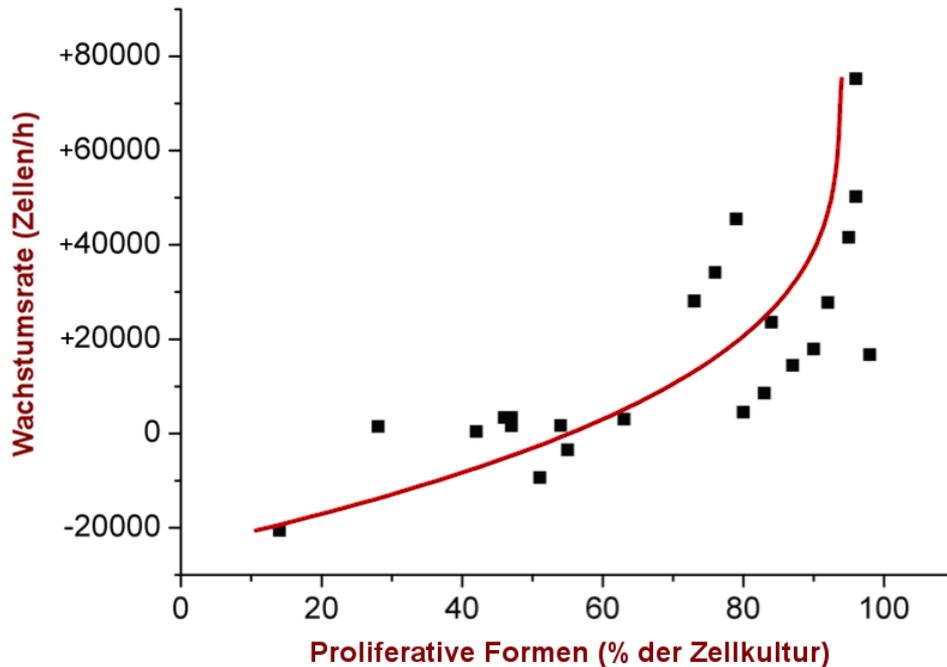


Abb. 23: Beziehung zwischen dem Differential der Wachstumskurve und dem prozentualen Anteil von Trypanosomen in proliferativen Formen an der Gesamtpopulation. Das Differential der Wachstumskurve ist hier als Wachstumsrate bezeichnet und zeigt die Zu- oder Abnahme der Zellzahl über der Zeit. Trypanosomen über $22\mu\text{m}$ wurden zusammengefasst als „proliferative Formen“ bezeichnet.

Im obenstehenden Diagramm entspricht jeder Punkt 100 ausgemessenen Trypanosomen. Die Zelllänge wurde zur Einteilung der Trypanosomen in *stumpy*, *intermediate* und *slender* Formen verwendet. Dabei galten Trypanosomen mit einer Länge von weniger als $22\mu\text{m}$ als *stumpy*, Trypanosomen bis $26\mu\text{m}$ als *intermediate* und Trypanosomen größer als $26\mu\text{m}$ als *slender*. Trypanosomen über einer Länge von über $22\mu\text{m}$, also *intermediate* und *slender* Formen, wurden als proliferative Formen zusammengefasst. Diese kategorische Einteilung nach Zelllänge wurde in Bezug zum Differential der Zelldichte über der Zeit gesetzt. Das Differential der Wachstumskurve wurde als Wachstumsrate bezeichnet und ist gegeben in Veränderung der gesamten Zellzahl über der Zeit.

Es ergab sich eine Grafik zur Darstellung der Beziehung zwischen der Länge der Trypanosomen und der Entwicklung der Kultur. Hier ließ sich folgendes beobachten: Lagen verhältnismäßig mehr Trypanosomen oberhalb einer Länge von $22\mu\text{m}$ vor, wächst die Kultur. Bei annähernd 100% proliferativen Formen in der Zellkultur nimmt die Zellzahl dabei um $7,2 \times 10^4$ Zellen pro Stunde zu. Wird eine Schwelle von 55% Anteil der proliferativen Formen an der gesamten Zellkultur unterschritten, so stagniert das Wachstum. Bald darauf verfällt die Kultur, wobei bei unter 20% proliferativen Formen bis zu 2×10^4 Zellen pro Stunde zugrunde gehen.

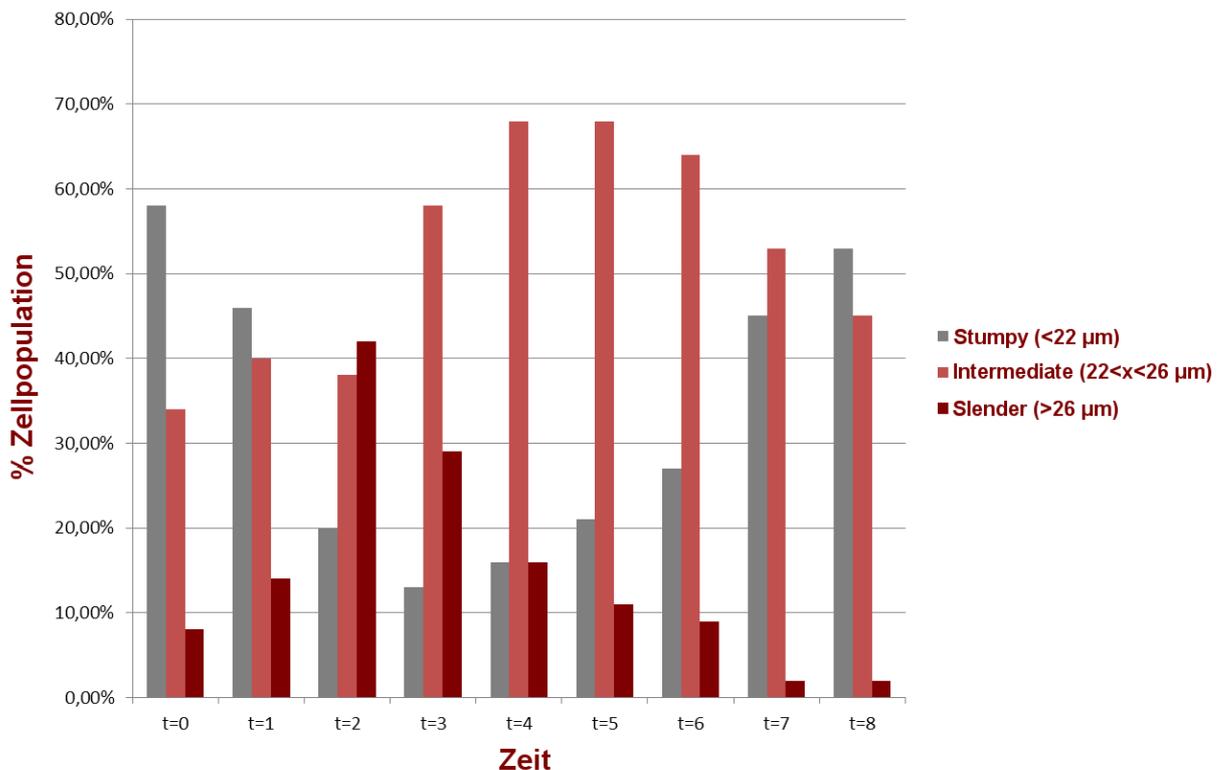


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf der prozentualen Anteile morphologischer Formen an einer pleomorphen Zellpopulation. Als Messzeitpunkte wurden gleichmäßige Abstände gewählt, bezeichnet als t=0 bis t=8.

Die gezeigten Daten entstanden in Zusammenarbeit mit Eva Dreßen, BSc. In ist der Zusammenhang zwischen der Verteilung der Zellpopulationen und der zeitlichen Entwicklung der Kultur noch einmal deutlicher dargestellt. Über einen längeren Zeitraum, unterteilt in regelmäßigen Abständen, wurden pleomorphe Trypanosomen aus einer Zellkultur stichprobenartig entnommen und vermes-

sen. Die Kultur wurde aus einem Stabilat angesetzt und auf einer semi-soliden Agarosematrix in HMI-9 Medium kultiviert. Ihrer Länge entsprechend wurden sie einer der Populationen zugeteilt. Es zeigt sich initial ein zügiger Anstieg der proliferativen *intermediate* und *slender* Trypanosomen. Zu $t=2$, nach 24h, besteht die Zellkultur zum größten Teil aus *slender* Morphologien. Ab $t=2$ ist dieser Anteil wieder rückläufig, bis sie ab $t=6$ kaum noch zu detektieren sind. Die *intermediate* Population erreicht verzögert ihr Maximum bei $t=4$ und fällt flach ab $t=5$ wieder ab. Ausgehend von $t=3$ steigt der Anteil der *stumpy* Trypanosomen und überwiegt schließlich ab $t=8$. Ab diesem Zeitpunkt war die Zelldichte rückläufig und die Kultur ging zugrunde.

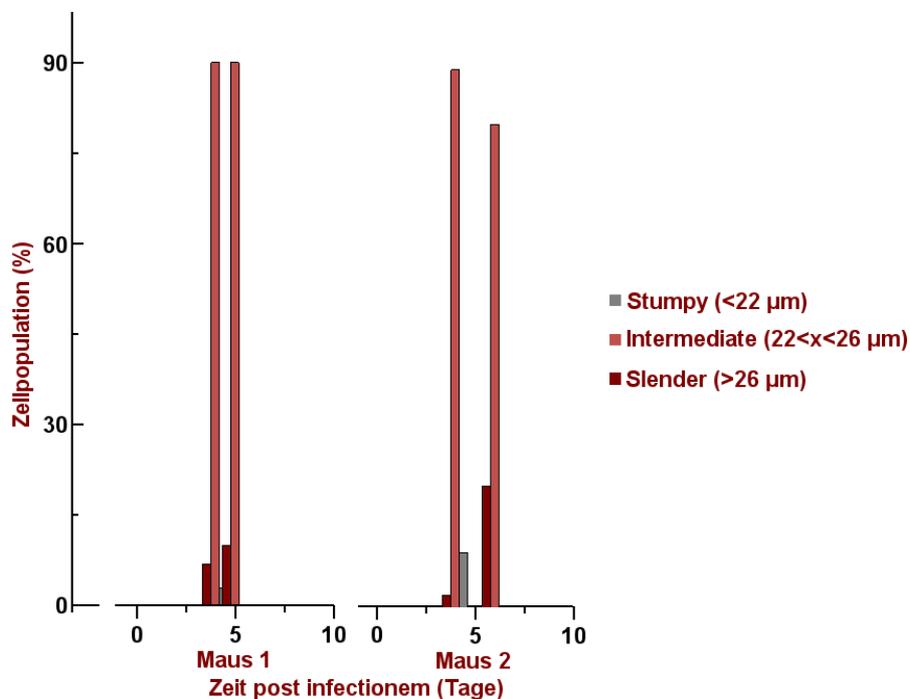


Abb. 25: Der Beginn einer realistischen Infektion in Mäusen als Tiermodell, vermittelt durch die Stiche von im Labor infizierten Tse-Tse-Fliegen. Gezeigt sind der Zeitpunkt, an dem die Parasitämie detektierbar wurde und die Verteilung der Trypanosomenpopulation auf die morphologischen Formen.

Die gezeigten Daten entstanden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Engstler am Institut für Tropenbiologie der Universität Würzburg. Es wurden zwei Mäuse auf natürlichem Wege infiziert, indem sie in Kontakt zu Tse-Tse-Fliegen gebracht wurden, die selbst mit *Trypanosoma brucei brucei* infiziert waren.

Dargestellt ist der Beginn der Parasitämie, ermittelt durch regelmäßige Schwanzspitzenbiopsien. An Tag 4 überstieg die Parasitendichte im Blut die Detektionsgrenze von $2,5 \times 10^4$ Trypanosomen pro Milliliter. Die aus dem Blut isolierten Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, im Mikroskop fotografiert und im der Länge nach von der Spitze des Flagellums bis zum hinteren Zellpol vermessen. Anschließend erfolgte die Zuordnung zu den einzelnen morphologischen Formen.

Die Grafik dient dem Vergleich mit Abb. 24. Es lässt sich sehen, dass *in vivo* die zum Beginn der Infektion vorliegenden Trypanosomen zum größten Teil *intermediate*, teils *slender* und praktisch nicht *stumpy* sind. Die Trypanosomen liegen zu diesem Zeitpunkt also fast ausschließlich als proliferative Formen vor.

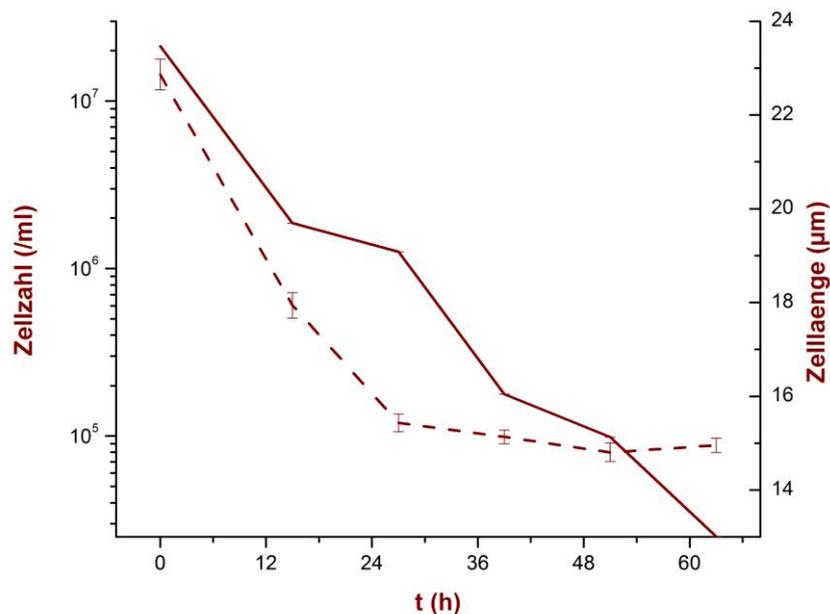


Abb. 26: Der späte Kulturverlauf von pleomorphen Trypanosomen. Die kontinuierliche Linie zeigt hierbei die Zelldichte, mit dem *standard error of the mean* (SEM) als Fehlermaß. Die diskontinuierliche Linie zeigt die durchschnittliche Zelllänge mit dem SEM als Fehlermaß.

Erreichte eine Kultur hohe Zelldichten von über 2×10^6 Trypanosomen/ml, ist zu beobachten, wie die Kultur im exponentiellen Verfall zugrunde geht. Für Abb. 26 wurde initial eine Dichte von 2×10^7 Zellen/ml gewählt. Hierzu wurde durch

Zentrifugation aus einer Kultur ein Zellpellet gewonnen, dass in einer entsprechenden Verdünnung in neuem Medium suspendiert wurde. Die Zellen verloren ab Beginn der Kultivierung kontinuierlich an Länge bis zu einem Minimum von durchschnittlich 15µm Distanz zwischen der Spitze des freien Flagellums und des posterioren Zellpols. Ab einer Länge von 22µm werden sie als *stumpy* Form definiert.

3.3. Transfektion durch Elektroporation zur Herstellung fluoreszierender Trypanosomen

3.3.1. Elektroporation von monomorphen und pleomorphen Trypanosomen

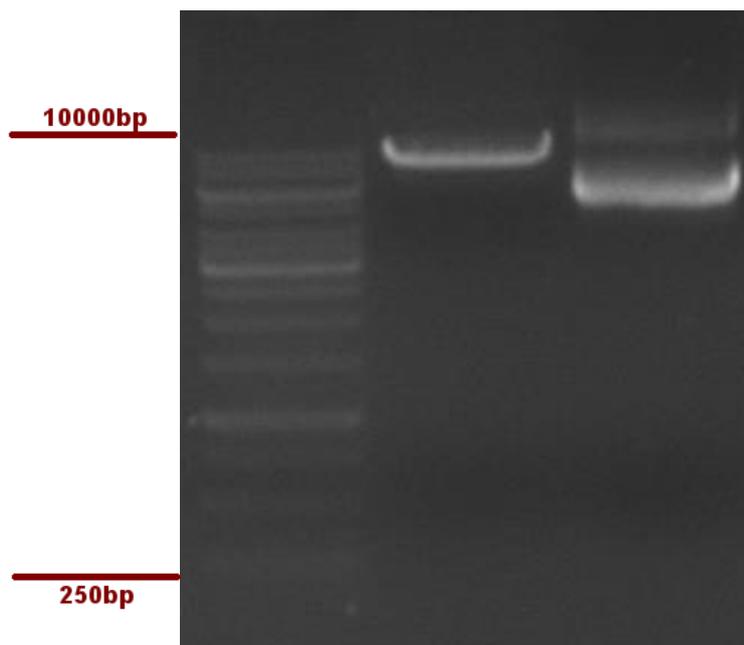


Abb. 27: Ergebnis der Linearisierung des Plasmids pHD309eGFP durch die Restriktionsendonuklease NotI. Bahn 1: ThermoScientific 1kb DNA Ladder. Bahn 2: Stichprobe eines Linearisierungsprodukts. Bahn 3: pHD309eGFP, aufgeteilt in die Konformationen *supercoiled* und *relaxed*.

Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease NotI wurde eine Linearisierung der Zielvektoren angestrebt, um die Integration in das trypanosomale Genom zu erleichtern. Gelelektrophoretische Kontrollen demonstrieren deutlich den Verlust der zwei Banden von *supercoiled* und *relaxed* Plasmidkonformationen zugunsten einer homogenen Menge linearer DNA, die sich auf dem Gel als einzelne Bande darstellte. In der anschließenden Aufreinigung durch Ethanol-fällung wurden A_{260}/A_{280} -Quotienten von näherungsweise 1,80 erreicht, als Indiz für die weitgehende Entfernung der Proteinzusätze in der Nukleinsäuresuspension.

Nach Abschnitt 3.2.2. (Methoden-Teil) wurde die linearisierte DNA zur Elektroporation monomorpher Trypanosomen verwendet. Die Herstellung der Stämme SMB/pUB39eGFP und 221/pHD309eGFP aus monomorphen Zelllinien erfolgte nach diesem bekanntem Protokoll. Für die Transfektion von pleomorphen Trypanosomen musste das Protokoll adaptiert werden. In dreißig Iterationen wurden die Parameter systematisch angepasst, um eine Optimierung der Transfektionseffizienz zu erreichen. In der folgenden Tabelle sind die Rahmenbedingungen für die Anpassungen des Protokolls aufgeführt. Nicht angepasst wurden Kapazität oder Impedanz, die der verwendete Elektroporator vorgibt.

Optimierung des Elektroporationsprotokolls

Parameter	Minimum	Maximum
DNA: Menge [μg]	10	40
Zellzahl	5×10^6	5×10^7
Schock: Anzahl	1x	2x
Spannung [V]	1000	1500
Schock: Dauer [ms]	0,2	0,4
Selektion: Druck [$\mu\text{g/ml}$]	0,5	5,0
Inkubation: Dauer [h]	6	48

Den Schock überlebten dabei durchschnittlich 4‰ Zellen. In der Selektionsphase ging jede der elektroporierten Populationen zugrunde. Auch nach einer verlängerten Inkubation, d.h. nach Kultivierung ohne Selektion, ließen sich keine Trypanosomen beobachten. Eine schrittweise Anpassung des Protokolls erschien daher nicht durchführbar. Ersatzweise wurde ein alternatives Protokoll der Arbeitsgruppe Engstler am Lehrstuhl „Zoologie I“ der Universität Würzburg verwendet, beschrieben unter 3.2.3.

3.3.2. Nachweis eines für eGFP kodierenden Abschnitts in trypanosomaler, genomischer DNA

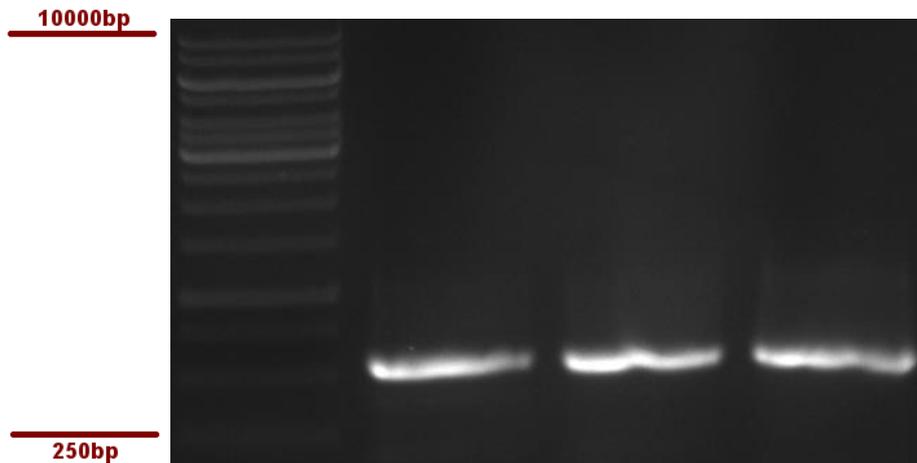


Abb. 28: Nachweis der Nukleinsäuresequenz für eGFP in isolierter gDNA der generierten Trypanosomenstämme. Amplifiziert durch Polymerase-Kettenreaktion mit für eGFP spezifischen Primern, anschließend aufgetrennt durch Agarose-Gelelektrophorese. Bahn 1: ThermoScientific 1kb DNA Ladder. Bahn 2: Stamm 221/pHD309eGFP. Bahn 3: Stamm SMB/pUB39eGFP. Bahn 4: Stamm AnTat1.1/pHD309eGFP.

Wie in 3.2.4. beschrieben, wurde zur Bestätigung der physikalischen Transfektion, der Elektroporation, die Analyse auf genomischer und transkriptioneller Ebene gewählt. Zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ergibt sich ein umfassendes Bild. Es folgt eine Zusammenschau dieser Ergebnisse beginnend mit der gelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der DNA-Isolierung.

In Abb. 28 ist in jeder der drei Bahnen der Gelelektrophorese jeweils eine Signalbande zu sehen. Diese drei Banden befinden sich auf der derselben Höhe von etwa 700 Basenpaaren. Das Molekulargewicht der Nukleotidsequenz von eGFP liegt bei 720 Basenpaaren. Die Signale sind stark ausgeprägt, bedingt durch eine hohe Masse an Produkten der Polymerase-Kettenreaktion. Diese führte durch die Verwendung von spezifischen Primern zur Amplifikation des Abschnitts, der für eGFP kodiert.

3.3.3. Nachweis von *messenger* RNA für eGFP in drei generierten Trypanosomenstämmen

Der Nachweis genomischer Integration des Plasmids pHD309eGFP in die Trypanosomenstämme MiTat1.2 (221) und AnTat1.1 und der Integration des Plasmids pUB39eGFP in SMB-Zellen erfolgte nach Abschnitt 4.4.2 (Diskussion). Anschließend wurden die Stämme 221/pHD309eGFP, SMB/pUB39eGFP und AnTat1.1/pHD309eGFP kultiviert, lysiert und zur Gewinnung von mRNA eingesetzt. Nach reverser Transkription und eGFP-spezifischer Polymerase-Kettenreaktion wurden die Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis zeigt Abb. 29.

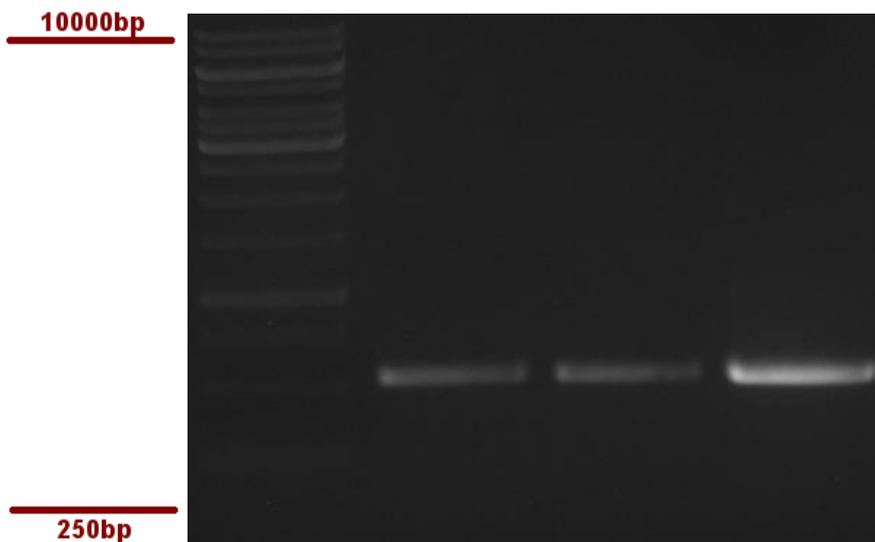


Abb. 29: Nachweis der mRNA für eGFP in lysierten Zellen der generierten Trypanosomenstämme. Revers transkribiert und amplifiziert durch Polymerase-Kettenreaktion mit für eGFP spezifischen Primern, anschließend aufgetrennt durch Agarose-Gelelektrophorese. Bahn 1: ThermoScientific 1kb DNA Ladder. Bahn 2: Stamm 221/pHD309eGFP. Bahn 3: Stamm SMB/pUB39eGFP. Bahn 4: Stamm AnTat1.1/pHD309eGFP.

Die drei Bahnen auf den Positionen 2-4 zeigen jeweils dieselbe Bande auf einer geschätzten Höhe von 700bp. Wie bereits demonstriert, entspricht dies dem Referenzwert für das Molekulargewicht der Nukleinsäuresequenz für eGFP. Auch entspricht dies den unter 3.1.2 bereits beobachteten Produktbanden.

3.3.4. Nachweis mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie

Wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben, wurden rekombinante Trypanosomen der drei produzierten fluoreszierenden Stämme in Kultur vermehrt. DAPI wurde als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, um die DNA im Nucleus und die kDNA im Kinetoplasten anzufärben. Dies ermöglichte eine vereinfachte Identifizierung intakter Zellen. Ein primärer Antikörper gegen eGFP und ein sekundärer, FITC-konjugierter Antikörper wurden verwendet, um das grünfluoreszierende Signal zu erhalten. Dieses wurde sonst im Rahmen der DAPI-Färbung *quenched*, d.h. unterdrückt.

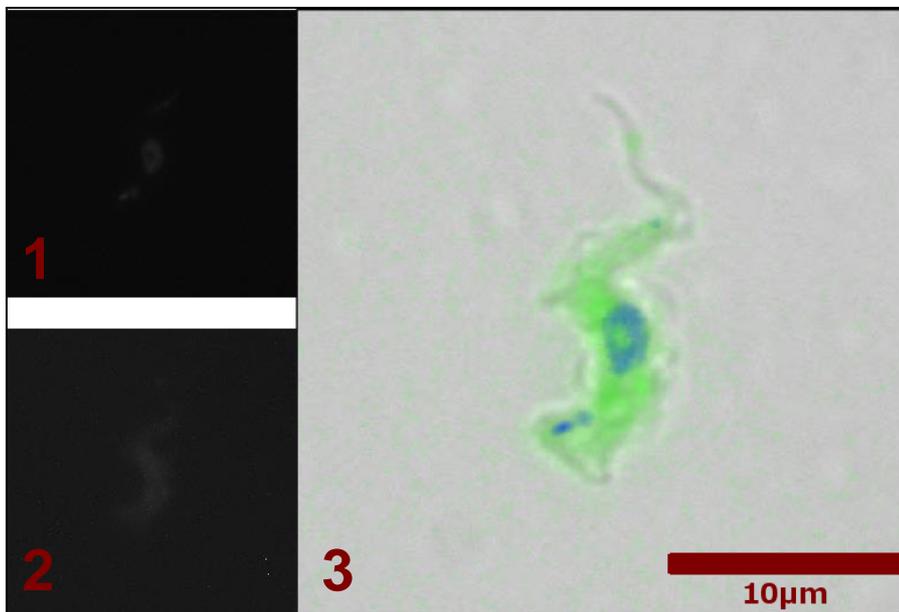


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einem monomorphen Trypanosom vom Stamm MITat1.2 VSG 221 mit dem Plasmid pHD309eGFP. 1 – Blaukanal mit dem Signal der DAPI-Färbung. 2 – Grünkanal. 3 – Eingefärbtes Kompositbild mit Skala. Belichtungszeit 500ms.

Die Aufnahme zeigt ein monomorphes Trypanosom mit dem Plasmid pHD309eGFP. In der Abbildung liegen erkennbare Signale im Grünkanal und im Blaukanal vor. Das DAPI-Signal zeigt zwei Signale, vereinbar mit der Anfärbung der nukleären DNA und der Kinetoplasten-DNA. Die Färbung ist schwach. Das eGFP-Signal im Grünkanal ist schwach ausgeprägt, kann aber auch bei niedrigen Belichtungszeiten eindeutig abgegrenzt werden.

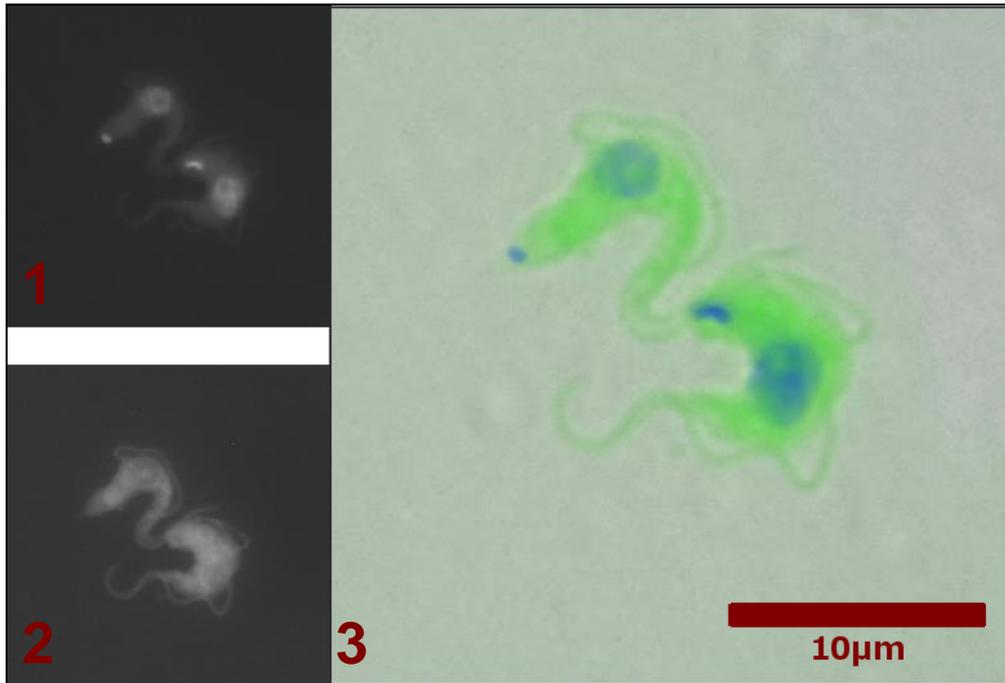


Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei monomorphen Trypanosomen vom Stamm SMB mit dem Plasmid pUB39eGFP. 1 – Blaukanal mit dem Signal der DAPI-Färbung. 2 – Grünkanal. 3 – Eingefärbtes Kompositbild mit Skala. Belichtungszeit 500ms.

Die Aufnahme zeigt zwei monomorphe Trypanosomen der *single marker bloodstream form* (SMB), die mit dem Plasmid pUB39eGFP. In der Abbildung liegen erkennbare Signale im Grünkanal und im Blaukanal vor. Das DAPI-Signal zeigt auch hier die erwarteten zwei Signale, die Kern-DNA und die kDNA.

Das eGFP-Signal im Grünkanal ist sehr stark ausgeprägt und entsprechend hochauflösend. Es lassen sich also weitere Schlüsse über die Verteilung von eGFP im Trypanosom ziehen. Hier ist das Grünsignal gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt. Es spart den Kinetoplasten und den Nukleus aus, die als Kompartimente vom restlichen Zellvolumen abgegrenzt sind. Auch der hintere Zellpol nahe des Kinetoplasten ist schwächer bis gar nicht gefärbt. Die Flagellartasche und das freie Flagellum sind mit einer gewissen Hintergrundfluoreszenz erkennbar, zeigen aber nicht dieselbe Signalintensität wie das Zytosol.

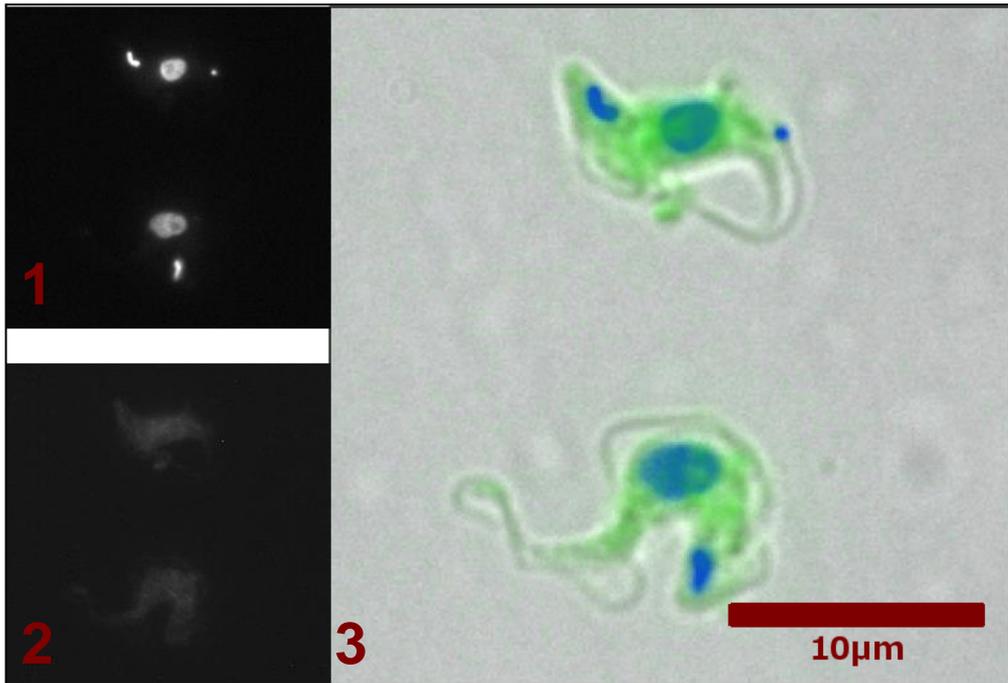


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei pleomorphen Trypanosomen vom Stamm AnTat1.1 mit dem Plasmid pHD309eGFP. 1 – Blaukanal mit dem Signal der DAPI-Färbung. 2 – Grünkanal. 3 – Eingefärbtes Kompositbild mit Skala. Belichtungszeit 500ms.

Die Aufnahme zeigt zwei pleomorphe Trypanosomen (AnTat1.1) nach Transfektion mit dem Plasmid pHD309eGFP. In der Abbildung liegen erkennbare Signale im Grünkanal und im Blaukanal vor. Das DAPI-Signal zeigt klar und deutlich die zwei Signale für Nukleus und Kinetoplast, die Färbung war also erfolgreich. Das eGFP-Signal im Grünkanal ist schwach und entspricht damit in der Intensität dem eGFP-Signal des Trypanosoms in Abb. 30, das dasselbe Plasmid erhalten hatte.

3.4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen nach Co-Kultivierung mit mikroglialen Zellen

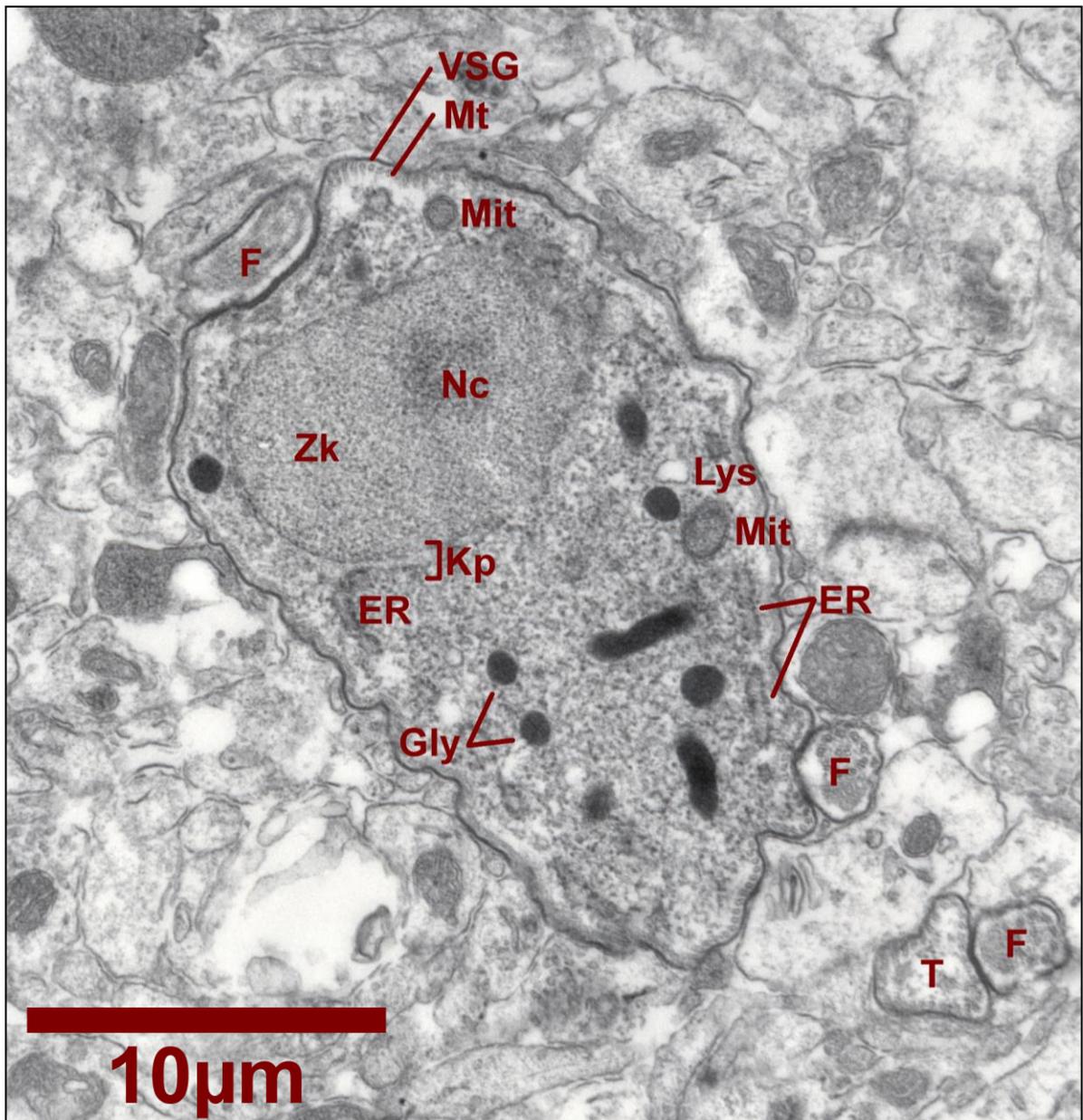


Abb. 33: Trypanosom nach 24h Co-Kultivierung *ohne* mikrogliale Zellen. Hintergrund: murines, hippocampales Gewebe. VSG – *variant surface glycoprotein* Oberflächenmantel, Mt – Mikrotubuli-Zytoskelett, Mit – Mitochondrium, F – Flagellum, Nc – Nucleolus, - Zk – Zellkern, Lys – Lysosom, Kp – Kernpore, ER – raues endoplasmatisches Retikulum, Gly – Glykosom, T – Trypanosom.

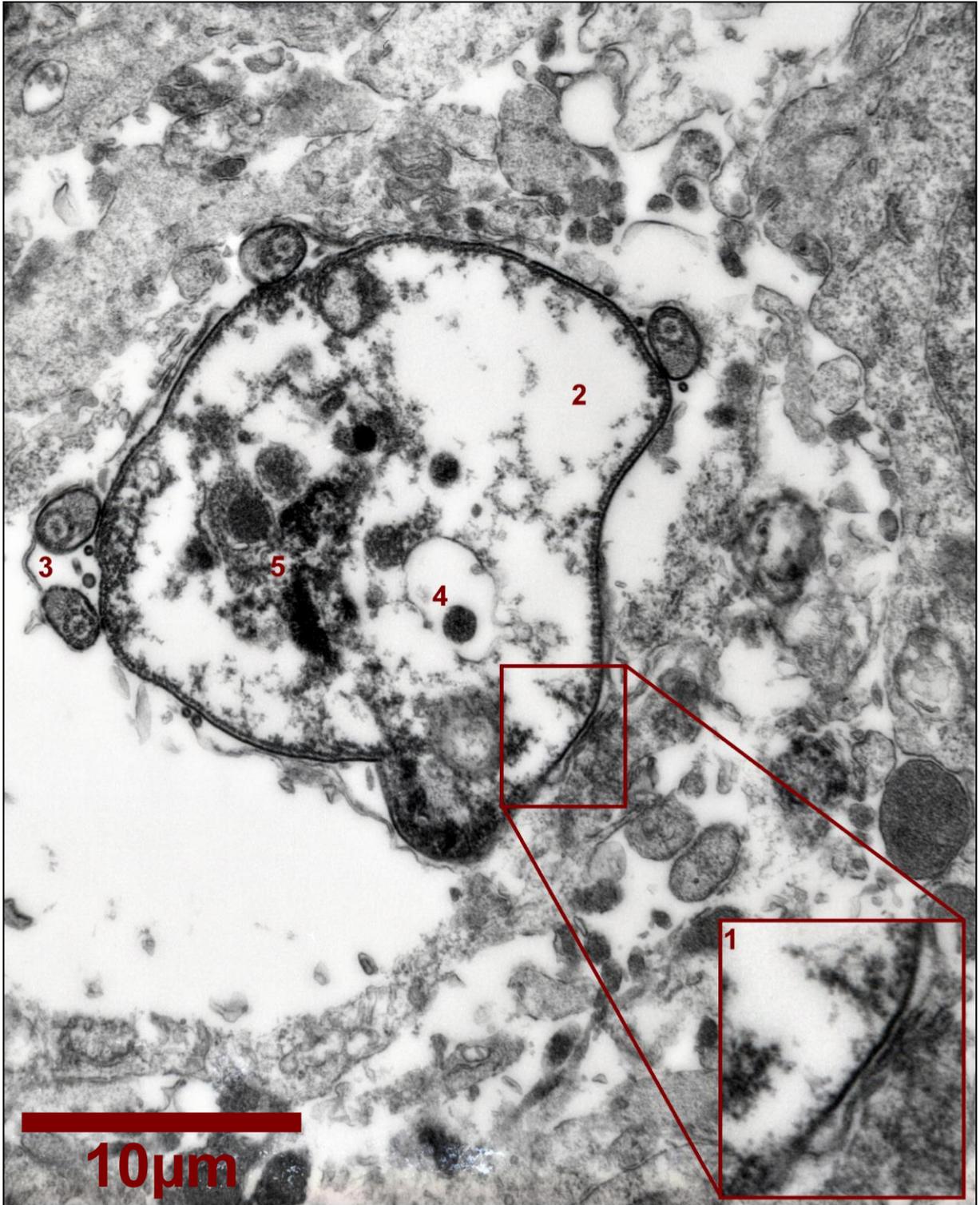


Abb. 34: Trypanosom nach 24h Co-Kultivierung *mit* mikroglialen Zellen. Hintergrund: murines, hippocampales Gewebe. 1 – Lückenhaftes Zytoskelett, 2 – Gelichtetes Zytoplasma, 3 – Bis zu vier Flagellen, 4 – Autophagiezeichen, 5 – Zellorganellen.

Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen in murinem, hippocampalem Gewebe. Für einen Teil der Kulturansätze, gezeigt in Abb. 33, wurden zuvor die mikroglialen Zellen unter Verwendung von Clodronat-Liposomen ausgewaschen [99]. Diese Co-Kulturen ohne Mikrogliazellen dienten als Kontrolle. Insgesamt waren die isolierten Trypanosomen für 24h in Kultur mit dem Schnittgewebe. Das genaue Prozedere ist im Kapitel 2.3.9 beschrieben.

In Abb. 33 zeigen sich zwei Trypanosomen (T) mit ihren Geißeln (F). Die Flagellen lassen sich eindeutig an der 9x2+2-Struktur erkennen. Zentral zu erkennen sind die zwei einzelnen Tubuli. Diese werden umgeben von neun A-Tubuli, denen umarmend neun B-Tubuli anliegen. Die Dynein-Ärmchen als motile Elemente zwischen den A- und B-Tubuli lassen sich in der Aufnahme erahnen. Einer dieser Trypanosomen ist großflächig angeschnitten, während von der anderen Zelle nur noch Ausläufer der Membran, die Struktur des Zytoskeletts und einige wenige Ribosomen im Zytosol zu sehen sind. Sie befindet sich in einer anderen Ebene. Beide Trypanosomen liegen aber zu jeder Seite hin dicht am umliegenden, neuronalen Gewebe an. Dieses wirkt lückenlos und, soweit beurteilbar, intakt. Betrachtet man das Trypanosom in der Bildmitte, erlaubt der Oberflächenmantel Rückschlüsse auf die Zellvitalität. Der VSG-Mantel, die Zellmembran darunter und das Zytoskelett aus unter der Membran befindlichen, regelmäßig angeordneten Mikrotubuli sind dicht und kontinuierlich. Die Verteilung der Ribosomen im Zytosol des Trypanosoms ist annähernd homogen, ohne größere Lücken. Die Ribosomen können an ihrer geringen Größe und an der Häufigkeit erkannt werden, mit der sie vorliegen. Einige Zellorganellen sind angeschnitten und können auf dieser Abbildung beurteilt werden. So zeigen sich zwei Anschnitte von, vermutlich, demselben Mitochondrium (Mit), zu erkennen an der doppelten Membran, den Cristae und dem Kontrastunterschied zwischen der Matrix und der mitochondrialen Membran. Die Glykosomen (Gly) zeigen sich rundlich und stark kontrastiert. In der Nähe befindlich sind ähnlich stark kontrastierte Objekte, die in der Ebene längs angeschnitten wurden. Diese sind nicht eindeutig zu beurteilen. Die länglichen, röhrenförmigen Strukturen, besetzt

mit Ribosomen, sind als raues, endoplasmatisches Retikulum (ER) zu identifizieren. Deutlich wird dies an dem ER, das in räumlicher Nähe zum Zellkern (Zk) abgebildet ist. Dort ist die Kernhülle leicht dilatiert. Diese morphologische Kontinuität ist vereinbar mit dem Übergang der ER-Membran in die Kernhülle. Im Zellkern selbst ist eine grobkörnige Verdichtung zu erkennen. Hier ist der Nucleolus (Nc) angeschnitten. Als letztes eindeutig erkennbares Organell ist ein Lysosom dargestellt. Die Lipiddoppelschicht des Lysosoms ist noch klar kontrastiert, während der Inhalt gänzlich kontrastfrei ist.

In Abb. 34 ist ein einzelnes Trypanosom zu sehen, umgeben von neuronalem Gewebe. Die Kontrastierung fällt hier stärker aus als in der Aufnahme in Abb. 33. Es handelt sich um ein Beispiel für Trypanosomen nach 24h Co-Kultivierung mit unbehandeltem, parenchymalem Gewebe. Von der zuvor beschriebenen Kontrolle unterscheidet sich dieser Versuchsansatz also nur durch die Präsenz von mikroglialen Zellen. Mit den Zahlen 1-5 wurden auffällige Areale in der Zelle beschriftet. In dem vergrößerten Ausschnitt (1) ist ein Teil der Zellmembran dargestellt. Die Zelloberfläche ist in der dieser Ebene unauffällig und größtenteils kontinuierlich. Das sehr geordnete Zytoskelett aus Mikrotubuli darunter ist an der gekennzeichneten Position lückenhaft. Es lässt sich nicht klar bestimmen, ob es sich um einen Zellschaden handelt oder nur durch die Schnittebene so erscheint. Generell wirkt das Zytosol sehr gelichtet (2). Ribosomen sind nur noch spärlich und heterogen verteilt vorhanden, was auf einen Verlust von Zellinhalt schließen lässt. Insgesamt besitzt die Zelle vier Flagellen (3), was auf eine fehlerhafte Teilung und anschließenden Zelltod hindeutet. Vergleichbare *giant* Trypanosomen mit einem Vielfachen an Flagellen, Zellkernen und Zellvolumen wurden zuvor unter ungünstigen Kulturbedingungen beobachtet [103]. Der schlechte Zustand des Trypanosoms zeigt sich auch an dem erweiterten Lysosom (4), das gerade im Rahmen von Autophagozytose ein Zellorganell umschlossen hat und dieses lysiert. Die restlichen Organellen (5) sind stark kontrastiert und im nahen, räumlichen Bezug zueinander. Sie lassen sich daher nicht genauer beurteilen.

3.5. Messung der Motilität von Trypanosomen

Die folgende Auswertung entstand mit Hilfe durch Dr. T. Krüger von der Arbeitsgruppe Prof. Engstler am zoologischen Institut der Universität Würzburg.

	v [$\mu\text{m/s}$]	f [Hz]	l/b
Hirnform in Liquor	20,5	22,0	9,4
Hirnform in Serum	23,6	27,6	9,2
Blutform in Serum	11,8	22,5	6,4

Abb. 35: Eigenschaften der morphologischen Formen in Liquor und Blut. Gezeigt sind Geschwindigkeit, Frequenz des Flagellenschlags und der Quotient aus Länge und Breite. (n=24)

Die Ergebnisse der Morphometrie und optischen Flussanalyse sind in Abb. 35 zusammengefasst. Hirnform-Trypanosomen im Blut, die sogenannte *relapse* Form, erreichen eine um 200% höhere Geschwindigkeit als die Blutform-Trypanosomen. Für diese Steigerung der Geschwindigkeit erhöhen sie die Frequenz ihres Flagellenschlags um das 1,2-fache. Am effizientesten ist die Fortbewegung der Hirnform-Trypanosomen im Liquor cerebrospinalis. Sie erreichen eine um 174% höhere Geschwindigkeit als die Blutform bei gleicher Frequenz des Flagellenschlags.

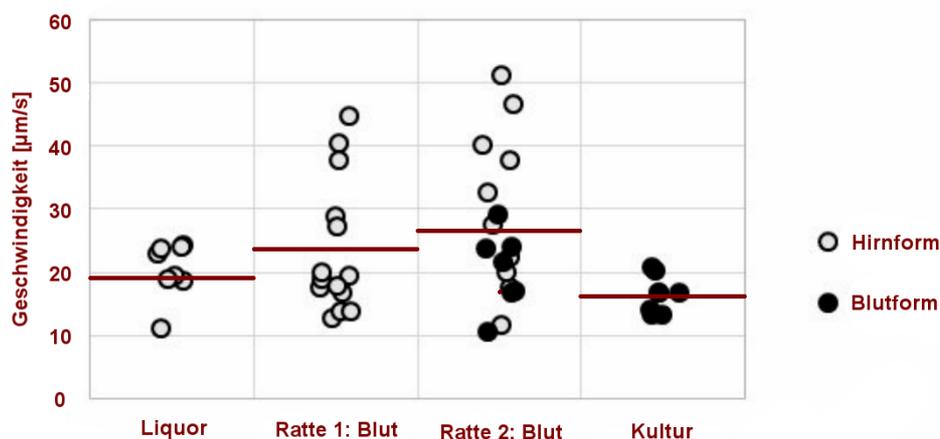


Abb. 36: Auftrennung der morphologischen Formen nach Geschwindigkeit. Geordnet nach Eigenschaften in Liquor, Blut und Kulturmedium. Durchschnitt gezeigt als roter Balken .

Diese höhere Geschwindigkeit der Hirnform-Trypanosomen spiegelt sich in Abb. 36 wider. Hier wurden die einzeln beobachteten Zellen nach Herkunft (Blut oder Liquor) eingeteilt. Auffällige Ausreißer sind einige Hirnform-Trypanosomen im Blut, sogenannte *relapse* Formen, die eine sehr hohe Geschwindigkeit zeigen. Die Einteilung nach Geschwindigkeit ist jedoch kein eindeutiges Kriterium, um zwischen Hirnform und Blutform zu unterscheiden. Die Hirnform ist in einer trypanotoxischen Umgebung wie dem Liquor beispielsweise genau so schnell wie die Blutform unter optimalen Kulturbedingungen. Hier besteht eine Überschneidung, die keine klare Unterscheidung erlaubt.

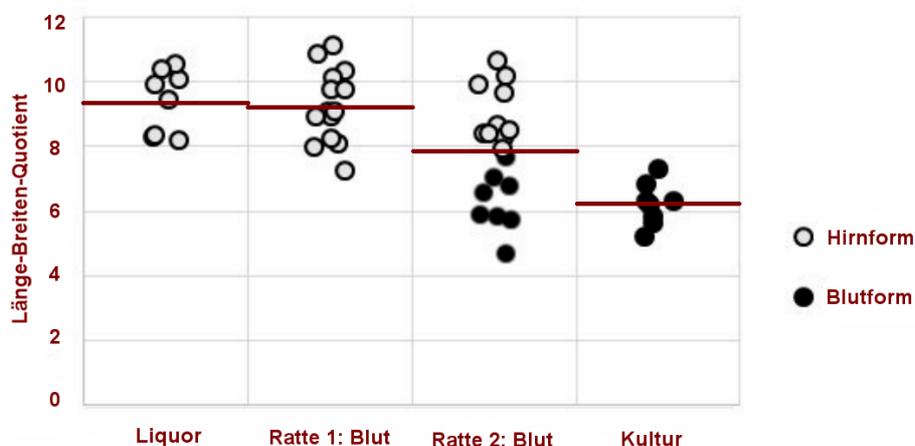


Abb. 37: Auftrennung der morphologischen Formen nach Länge und Breite. Geordnet nach Eigenschaften in Liquor, Blut und Kulturmedium. Durchschnitt gezeigt in rot.

Um die Unterscheidung zwischen den morphologischen Formen zu ermöglichen, musste ein weiteres Kriterium gesucht werden. Abb. 37 zeigt die Einteilung der Zellen nach einem Quotienten aus Länge und Breite. In vorherigen Experimenten wurde die Einteilung nur anhand der Länge vorgenommen. Es zeigt sich eine klare Trennung bei einem l/b-Quotienten von 7,8.

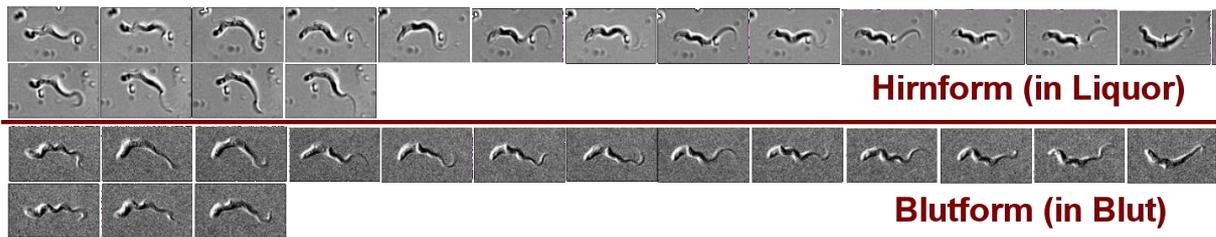


Abb. 38: Vergleich eines Hirnform-Trypanosoms mit einem Blutform-Trypanosom, die einen ähnlichen Länge-Breite-Quotient besitzen. Gezeigt sind 16 bzw. 17 Frames. Hirnform-Trypanosom: l/b 7,9 mit $20,1\mu\text{m/s}$. Blutform-Trypanosom: l/b 7,7 mit $16,7\mu\text{m/s}$.

Es gibt Grenzfälle von Blutform- und Hirnform-Trypanosomen, die sich diesem l/b -Quotienten von 7,8 annähern. Hier ist die Unterscheidung schwieriger. Abb. 38 zeigt die *single frame* Analyse von zwei solcher Trypanosomen. Im Vergleich von Frame zu Frame oder bei Betrachtung der Videoaufnahmen wirkt der Hirnform-Trypanosom flexibler. Er bewegt sich bei annähernd gleicher Schlagfrequenz mit größeren Schlägen des Flagellums und erreicht eine höhere Geschwindigkeit. Die gesamte Zelle scheint in die Bewegung eingebunden zu sein und verformt sich mehr, als es bei dem Blutform-Trypanosom zu beobachten ist. Dadurch erweckt das Hirnform-Trypanosom den Eindruck, labil oder unstet zu sein. Diese Beobachtung konnte bisher durch 2D-Bildanalysen noch nicht quantifiziert werden.

Im Rahmen der Videoaufnahmen der Hirnform-Trypanosomen aus mazeriertem Hirngewebe kam es zu einem Zufallsbefund, den Abb. 39 zeigt. Ein einzelnes Trypanosom bewegte sich über eine Strecke von $40\mu\text{m}$ zielstrebig auf Gewebe zu und durchquerte dieses Gewebe insgesamt mehr als sechs Mal in kurzer Abfolge. Es erreichte dabei eine Höchstgeschwindigkeit von $51\mu\text{m/s}$ und eine durchschnittliche Geschwindigkeit von $28\mu\text{m/s}$. Trotz der erhöhten Dichte, die das Hirngewebe bietet, gehört es damit zu den schnellsten Trypanosomen, die im Rahmen dieses Experiments beobachtet wurden.

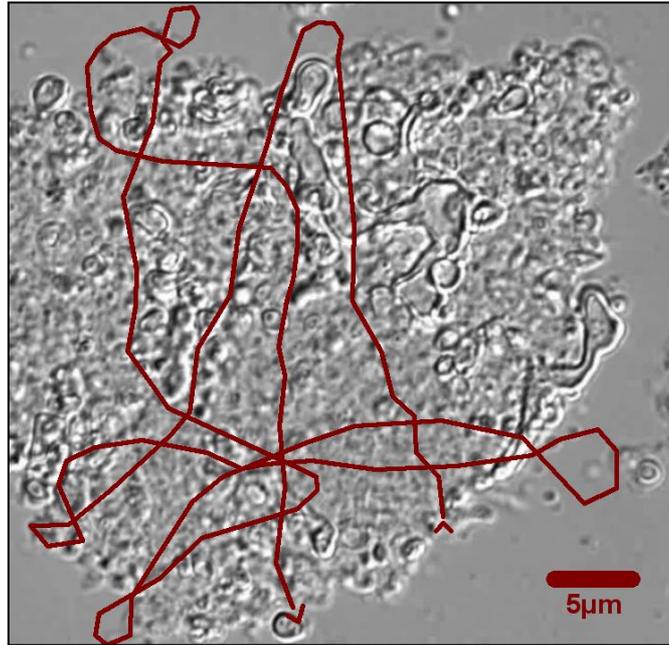


Abb. 39: Mazeriertes Hirngewebe mit eingezeichneter Strecke eines einzelnen Trypanosoms. Höchstgeschwindigkeit $51\mu\text{m/s}$, durchschnittliche Geschwindigkeit $28\mu\text{m/s}$ bei einer gesamten Laufzeit von 33s.

4. Diskussion

4.1. Fluoreszierende Trypanosomen

Transgene Trypanosomen sind ein vielversprechendes Werkzeug zur Aufklärung des Infektionsverlaufs im Rahmen des zweiten Stadiums der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im murinen Modell sind sie zwangsläufig notwendig. Wie zuvor beschrieben, wechseln pleomorphe Wildtyp-Trypanosomen häufig ihren VSG-Oberflächenmantel. Dies erfolgt in 1% der Zellen pro Generation [36]. Ein Reservoir hunderter stillgelegter Gene ermöglicht die dafür notwendige spontane Rekombination [104]. Der VSG-Mantel ist äußerst dicht und besteht aus 10^7 regelmäßig angeordneten Molekülen [105]. Der Mantel ist 15nm dick, wobei jedes Molekül ein Molekulargewicht von etwa 60kDa besitzt. Insgesamt beträgt der Anteil von VSG an der gesamten Proteinmenge der Zelle etwa 10% [21]. Der N-terminale Anteil dieses dichten VSG-Mantels ist das einzige trypanosomenspezifische Antigen, das vom Immunsystem erkannt und gegen das Antikörper hergestellt werden können [106]. Eine Immunmarkierung pleomorpher Trypanosomen ist, als Resultat dieser Immunevasion, nicht durchführbar.

Eine Alternative zur Immunmarkierung ist die Biolumineszenz. Die Expression von Luciferasen hat sich als bewährtes Werkzeug herausgestellt, um die Verteilung der Trypanosomen im Krankheitsmodell zu verfolgen [107]. Die Verwendung von rotlumineszierender PpyRE9H-Luciferase ermöglicht die zuverlässige Detektion des Signals auch durch das Gewebe des Tiermodells [108]. Im therapeutisch behandelten Tiermodell bewirkte die Biolumineszenz die Auffindung von Trypanosomen in einem anderen immunprivilegierten Raum, nämlich vor der Blut-Hoden-Schranke [109]. Die Auflösung dieser neuartigen Methode ist noch nicht optimiert. Die Anwendung beschränkt sich daher auf die Beurteilung der Therapie-Effizienz im Tier.

Gesucht wird eine Methode, um einzelne Trypanosomen mit hoher, räumlicher Auflösung detektieren zu können. Fluoreszierende Trypanosomen wurden zuvor schon hergestellt. Primäre Anwendungen waren hier, beispielsweise, die

Beobachtung von sogenannten *mating events* in der Fliege [110,111] und die Herstellung von Fusionsproteinen [112,113]. Mit der Zielsetzung der Detektion von fluoreszierenden, pleomorphen Trypanosomen im zentralnervösen Gewebe des murinen Modells beschäftigte sich bereits eine Dissertationsschrift [114]. Diese pHD309-mCherry-Trypanosomen zeigten ein geringes Expressionsniveau.

Zur Optimierung des Expressionsniveaus wurde ein zweiteiliges System konzipiert. Abb. 30 und Abb. 31 in Kapitel 3.3.4 demonstrieren die erreichte Steigerung eindrucklich. Über die Transfektion von pHD328 oder die Verwendung der *single marker bloodstream* Form liegt intrazellulär die T7 RNA-Polymerase vor. pUB39eGFP, das in dieser Arbeit hergestellt wurde, setzt diese T7 RNA-Polymerase voraus und bietet dafür das höchstmögliche Expressionsniveau des inserierten eGFP [115]. Eine Beschreibung des Plasmids findet sich in Kapitel 3.1.1. Parallel dazu wurden monomorphe und pleomorphe Trypanosomen mit dem Plasmid pHD309eGFP generiert. Diese Stämme dienen als vergleichende Kontrolle für die Stämme mit pUB39eGFP. Mit ihnen wurde versucht, die Transfektion durch Elektroporation zu optimieren.

Als Resultat dieser Arbeit liegen drei unterschiedliche Stämme grünfluoreszierender Trypanosomen vor. Monomorphe MITat1.2-Trypanosomen des VSG-Typs 221 erhielten das Plasmid pHD309eGFP und dienten als Prozesskontrolle und *proof of concept*. Monomorphe *single marker bloodstream form* (SMB) Trypanosomen erhielten das Plasmid pUB39eGFP. Hier konnte ein höheres Expressionsniveau erreicht werden als bei monomorphen MITat1.2. Pleomorphe AnTat1.1-Trypanosomen wurden mit pHD309eGFP transfiziert und stehen zur Verfügung, um zukünftig die Detektion und Lokalisation von Trypanosomen in fluoreszenzmikroskopischen Schnitten zu erleichtern. Optimal wären AnTat1.1-Trypanosomen mit den Plasmiden pHD328 und pUB39eGFP. Dass dieses Expressionssystem eine Weiterentwicklung darstellt, wurde demonstriert. Die Herausforderung in der Umsetzung wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2. Elektroporation monomorpher und pleomorpher Trypanosomen

Die Elektroporation von prozyklischen Trypanosomen und monomorphen Blutformen ist zuverlässig durchführbar. Die üblichen Protokolle erzielen hier eine Transfektionseffizienz von $1:10^7$ bis $1:10^8$. Die Transfektion von pleomorphen Trypanosomen ist zwar möglich, wird aber als problematisch eingestuft [116]. Der erste Ansatz war die Linearisierung der zirkulären DNA durch die Restriktionsendonuklease NotI. Durch diese sogenannten *site specific DNA double-strand breaks* (DSBs) in den RNA *spacer* Regionen konnte die genomische Integration und damit die Transfektionseffizienz um das 250x-fache angehoben werden [117].

Der zweite Ansatz baut auf der patentierten Lösung eines Herstellers auf. Die Firma Amaxa bietet die Produktreihe „Nucleofector“ an. Dieser Elektroporator bietet Programme in Abhängigkeit der verwendeten Zellen. Die Programme sind vorgegeben, die verwendeten Parameter sind jedoch unbekannt. Nach Herstellerangaben soll die DNA unmittelbar in den Zellkern gelangen, der Erfolg soll also nicht von der anschließenden Zellteilung abhängig sein [118]. Das Protokoll des Herstellers setzt eine Verwendung einer sogenannten Nucleofector-Lösung voraus. Die Komposition dieser Lösung ist nicht bekannt. Der Amaxa Nucleofector hat die Transfektion von monomorphen Blutformen um das 1000x-fache optimiert, also auf eine Effizienz von $1:10^4$ bis $1:10^5$ Zellen [119].

Pleomorphe Trypanosomen können inzwischen auch über den Amaxa Nucleofector transfiziert werden. Diese Methode ist neu und trat erst im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit auf. Hier konnte eine Effizienz von $1:10^6$ bis $1:10^7$ Zellen erreicht werden [120]. Ohne diese Optimierung liegt die Effizienz bei schätzungsweise $1:10^9$ bis $1:10^{10}$ Zellen, die erwartete Erfolgsrate ist also gering und eine Optimierung basierend auf einem üblichen Elektroporator erscheint nicht durchführbar. Kapitel 3.3.1 fasst zusammen, dass in 30 Iterationen versucht wurde, das Protokoll anzupassen.

4.3. Kultivierung pleomorpher Trypanosomen

Ein solides Kultursystem für pleomorphe Trypanosomen ist die Voraussetzung für die Herstellung transgener Stämme. Die Zellen sind nach der Elektroporation meist schwer beschädigt, müssen aber noch einmal ihren Zellzyklus durchlaufen und sich teilen, bis die genomische Integration der gewünschten Sequenz erfolgt ist. Dafür benötigen sie optimale Bedingungen.

Es gibt verschiedene Ansätze, um Wildtyp-Trypanosomen in Kultur zu halten. Frühe Kultursysteme verwendeten Fibroblasten als *feeder cells* [121]. Dieses System wurde abgelöst, als Medien aufkamen, die mit Cystein oder Cystin und Mercaptoethanol angereichert waren [122]. Die Handhabung von bovinen Fibroblasten ist zeitintensiv und aufwendig. Alternativ kann man dem serum- und cysteinreichen Medium HMI-9 1,1% Methylcellulose zugeben [123]. Es ergibt sich ein viskoses Medium, das axenische Wachstum mit einer Generationszeit von 8 Stunden erlaubt. Die Zellen zeigen ihre vollständige, morphologische Progression und können antibiotisch selektiert werden. Auch hier ist der Umgang mit dem Kulturmedium zeit- und arbeitsintensiv. Vor der Verwendung der kultivierten Trypanosomen muss jedes Mal eine Filtration erfolgen, um die Viskosität zu reduzieren.

Für die Durchführung dieser Arbeit wurde die Kultivierung in HMI-9 Medium auf einer Matrix aus Agarose gewählt [97]. Hier wird nur eine relativ kurze Vorlaufzeit benötigt, um die Matrix zu gießen und polymerisieren zu lassen. Das Material ist günstig und die Durchführung kann leicht standardisiert werden. In Abb. 21, Kapitel 3.2.1, wurde demonstriert, dass die Generationszeit bei 11,5h Stunden liegt. Die Kultur zeigt bei einer Zelldichte von bis zu 2×10^6 Zellen/ml für etwa 72 Stunden einen eher stationären Verlauf. Die axenische Kultivierung ist nicht nur ein Werkzeug im Rahmen der Elektroporation. Sie kann auch als Modell genutzt werden, um die einzelnen Morphologien zu beobachten und zu charakterisieren. Kapitel 3.2.2 fasst die Kulturentwicklung im zeitlichen Verlauf zusammen. Nach einer kurzen Anpassungsphase, der *lag phase*, steigt die Zelldichte zügig an. Während dieser *log* Phase überwiegt die *intermediate*

Form, gefolgt von der *slender* Form. Ist die stationäre Phase der Kultur erreicht, liegen noch viele *intermediate* Trypanosomen vor. Längere Formen waren dabei nicht mehr detektierbar. Ab diesem Zeitpunkt steigt nun der Anteil der *stumpy* Trypanosomen an, bis sie schließlich überwiegen. Die Kultur geht zugrunde. Abb. 23 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil von *intermediate* und *slender* Morphologien an der gesamten Zellpopulation und dem Kulturverlauf. Hier wird verdeutlicht, dass die Phasen des Kulturwachstums mit den einzelnen morphologischen Formen assoziiert sind. Abb. 24 und Abb. 25 ergänzen dieses Bild. Wie im infizierten Tier sind *intermediate* Trypanosomen auch im Kultursystem die proliferative Form. In der Phase des exponentiellen Wachstums kommt die *slender* Form hinzu, die im Tier in der Lage wäre, das zentrale Nervensystem zu infizieren. Erreicht die Kultur zu hohe Zelldichten, reichert sich der Differenzierungsfaktor an und führt zum vermehrten Auftreten der *stumpy* Form. Im Wirtstier wäre nun die Übertragung auf eine Tse-Tse-Fliege möglich. Das Kultursystem geht ab diesem Zeitpunkt die Kultur zugrunde, unabhängig von der Verfügbarkeit der Nährstoffe wie Cystein oder Glucose.

Zusammenfassend wurde demonstriert, dass die *in vitro* Kultivierung pleomorpher Trypanosomen in HMI-9 Medium auf einer *soft agar* Matrix ein geeignetes Modell ist, um die morphologische Differenzierung der Trypanosomen zu beobachten. Darauf aufbauend kann versucht werden, die einzelnen Populationen voneinander zu trennen und genauer zu charakterisieren.

4.4. Messung der Motilität von Trypanosomen

Die Lebensphase im Wildtier stellt für Trypanosomen eine Herausforderung dar. Nach der Infektion durch den Stich einer Tse-Tse-Fliege befindet sich der Parasit im Blutstrom. Selbst in den Kapillarbetten ist die Flussgeschwindigkeit des Blutes ($800\mu\text{m/s}$) [124] mindestens eine Größenordnung höher als die Geschwindigkeit der Trypanosomen ($35\mu\text{m/s}$) [101,125]. Die Fortbewegungsart der Trypanosomen stellt eine einzigartige Anpassung an die Umgebung im Wirtstier dar. Sie bewegen sich effizienter, wenn der Flagellenschlag auf Objekte wie Erythrocyten trifft [101]. Gleichzeitig bewirkt die aktive Schwimmbewegung, dass Antikörper von der Zelloberfläche durch hydrodynamische Kräfte entfernt werden [126]. Diese Oberflächensortierung bewegt Antikörper zur Flagellartasche, wo sie endocytiert und abgebaut werden können [127]. Dies wird anschaulich demonstriert, wenn sie die eigene Schwimmbewegung verlieren. Reduziert man die Zellmotilität durch Gabe von Suramin, werden Trypanosomen leichter opsoniert und von der zellulären Immunantwort durch Endozytose abgebaut [128].

Der Liquor cerebrospinalis, in den Trypanosomen während des meningoencephalitischen Stadiums gelangen, ist ein feindliches Milieu. Hier findet sich vermutlich ein nicht näher charakterisiertes Neuropeptid in nanomolarer Konzentration, das einen toxischen Effekt auf Trypanosomen hat [129,130]. Im Liquor kann die Zelldichte der Trypanosomen nicht zunehmen und sie gehen nach höchstens 24h vollständig zugrunde [131]. Sie sind darauf angewiesen, den Liquor möglichst schnell zu durchqueren und wieder zu verlassen. Trypanosomen, die sich im Liquor bewegen, zeigen morphologische Veränderungen. Durch die Zunahme der Länge verändert sich auch ihr Schwimmverhalten. Längere Trypanosomen zeigen ein steiferes Zytoskelett und daher eine geradlinige Fortbewegung [132]. Sie legen eine gegebene Strecke in kürzerer Zeit zurück. Diese Adaptation kann dabei behilflich sein, den Liquor schnell zu durchqueren. Es gibt außerdem Vermutungen, dass diese zielgerichtete Fortbewegung entweder bei der Invasion von Gewebe [87] oder bei der Suche von Nährstoffen [133] von Vorteil sein könnte [132]. Eine genauere Beschreibung

von Hirnform-Trypanosomen hat bisher noch nicht stattgefunden, da diese Population nicht isolierbar ist.

Kapitel 3.5 fasst die Unterschiede zwischen liquor- und blutadaptierten Trypanosomen zusammen. Die Hirnformen zeigten einen Länge-Breite-Quotienten von 9,2 bis 9,4 und waren damit wesentlich schlanker als die Blutformen. Bei selber Frequenz des Flagellenschlags legten sie eine vorgegebene Strecke in annähernd der doppelten Geschwindigkeit zurück. Sie zeigten dabei ein Bewegungsmuster, das nicht mit dem der Blutformen übereinstimmt und sich nur schwer mathematisch erfassen lässt.

Auf eine oben erwähnte mögliche Rolle der morphologischen Anpassung für die Invasion von Gewebe weist Abb. 39 hin. Hier durchquerte ein Trypanosom mit hoher Geschwindigkeit mehrmals in direkter Abfolge eine Probe von Hirngewebe. Dieses Verhalten ist bisher noch nicht systematisch beobachtet worden.

4.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen nach Co-Kultivierung mit mikroglialen Zellen

Die Invasion von Trypanosomen in das Parenchym zentrale Nervensystem unterliegt einer zeitlichen Latenz unklarer Ursache. Diese Enzephalitis ist als späte Ausprägung der Krankheit abzugrenzen, die im murinen Modell nach circa drei Wochen erreicht wird [134]. Der genaue Zeitpunkt ist dabei von der Spezies des Wirtstieres abhängig und kann im Menschen mehrere Wochen betragen. Insbesondere in Fällen der ostafrikanischen Schlafkrankheit kann es zu Inkubationszeiten von mehreren Jahren kommen bis neurologische Symptome auftreten [135]. Zuvor werden Trypanosomen im Liquor festgestellt, im murinen Modell zeitlich zusammenhängend mit dem ersten *peak* der Parasitämie, womit das zweite Stadium beginnt, in dessen Verlauf es zusätzlich zu den beschriebenen, neurologischen Symptomen kommt.

Die Beurteilung der Krankheitsprogression nach Symptomen ist schwierig. Wie zuvor beschrieben, verläuft das erste Stadium oft sehr unspezifisch und geht mit diffusem Kopfschmerz, febrilen Phasen, generellem Unwohlsein und einer Minderung des Allgemeinzustands einher [136]. Die anschließende zentralnervöse Infektion befällt zuerst ventrikuläre und zirkumventrikuläre Strukturen, die Kapillaren mit fenestriertem Endothel aufweisen. Das bekannteste Beispiel ist der Plexus choroideus, durch den die Trypanosomen die Blut-Liquor-Barriere überqueren. Die Blut-Hirn-Schranke ist hier nicht vorhanden [137]. Die Eminencia mediana hypothalami ist eine weitere dieser gefährdeten Strukturen [138], die als wichtigste Kontaktstelle zwischen dem neuroendokrinen System und der Hypophyse gilt. Ihr Ausfall erklärt die neuroendokrinen Dysregulationen, die u.a. zu Impotenz und Infertilität führen können [139]. Die Area postrema zeigt ebenfalls ein fenestriertes Endothel [140]. Ihre inflammatorische Reizung führt zu der häufig beobachteten Übelkeit mit Erbrechen [141]. Auch sensorische Spinalganglien besitzen fenestrierte Kapillaren [142]. Ihre Störung durch trypanosomale Infektion führt zu Missempfindungen und generalisierten, diffusen Schmerzen in Abhängigkeit der befallenen Segmente. Somnolenz tritt bereits früh in der Infektion auf [143], prägt sich aber erst im späten Verlauf zu der charakteristischen Fragmentierung des Schlafmusters mit Phasen der Agitiertheit aus [88].

In einer aktuellen Studie zum Verlauf der ostafrikanischen Schlafkrankheit traten Gangunsicherheit, Tremor, Fazialispareesen und Somnolenz sowohl früh, als auch spät im Verlauf auf [144]. Nur Somnolenz trat mit fortschreitender Krankheit häufiger auf. Das einzige Symptom, das nur im späten Verlauf auftrat, war ein Score in der Glasgow-Coma-Scale (GCS) von <12, also eine Verschlechterung des Gesamtzustands im Hinblick auf motorische, vegetative und kognitive Funktion [144]. Die Eingliederung in frühes und spätes Stadium ist hier unzuverlässig, da die Lumbalpunktion eine nur geringe Sensitivität aufweist. Es wird versucht, auf IL-10 als diagnostischen Marker auszuweichen.

Im Tiermodell zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Befall des parenchymalen Gewebes und der Immunantwort durch Mediatoren wie IL-10, TNF-alpha und Interferon-gamma. Dagegen zeigt sich ein negativer Zusammenhang mit dem Mediator TGF-beta. Es besteht kein Zusammenhang zur Höhe der Parasitämie, die invers korreliert mit dem IgM-Titer [145]. Die ausgeprägte Immunantwort zeigt sich auch in intrathekaler Synthese der Immunglobuline IgM, IgA und IgG. Diese oligoklonale Synthese ist als ein Zeichen der erhöhten Aktivität von B-Plasmazellen zu werten, die in diesem entzündlichen Milieu langlebig und aktiv sind [146]. Die Syntheseleistung nimmt im späten Verlauf der Krankheit noch zu [144]. Es zeigen sich hier Parallelen zu anderen inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems wie der Multiplen Sklerose. Auch hier kann man Demyelinisierung, zentrale Läsionen in der weißen Substanz, intrathekale Immunglobulinsynthese, Aktivierung mikroglialer Zellen und die Aktivierung homöostatischer Zytokine wie CXCL10 beobachten [147].

Die Beurteilung der Krankheitsprogression wird durch den Einfluss der genetischen Prädisposition des Wirts und die individuelle Virulenz des Parasitenstammes erschwert. Dies führte zu vielfältigen Fallbeschreibungen, die in einem wechselnden zeitlichen Rahmen abliefen und zuletzt von Sternberg und Reed zusammengefasst worden sind [148]. Diese Varianz überträgt sich auch auf das Tiermodell. Hier zeigen sich in der mikroskopischen Beobachtung zwei verschiedene Zustände. Entweder sind die Trypanosomen intravasal oder disseminiert im Parenchym aufzufinden [87].

Die Disseminierung, der generalisierte Befall, findet kurz vor dem Tod durch Enzephalitis statt und ist ab circa dem 30 Tag post infectionem zu erwarten. Der genaue Pathomechanismus ist noch nicht bekannt. Endothelschäden durch Immunkomplexe als Resultat eines prolongierten Infektionsverlaufs bei hoher Antigen- und Antikörperlast wären eine logische Erklärung. Es wurde jedoch berichtet, dass die Fleckdesmosomen der Blut-Hirn-Schranke und damit ihre Kontinuität intakt bleiben [89].

Zuvor scheint das Parenchym geschützt. Das frühe meningoenzephalitische Stadium beginnt mit der Detektion der Parasiten im Liquor und endet mit dem Beginn der Enzephalitis. Injiziert man Trypanosomen in das Parenchym, gehen sie zugrunde. Es kommt zu keiner Infektion. Injiziert man intrathekal und gibt die Parasiten in den Liquor cerebrospinalis, erkranken die Tiere und zeigen eine Parasitämie [131]. Diese Schutzfunktion geht also im Verlauf der Infektion verloren. Hypothetisch sind die Zellen der Mikroglia das zelluläre Pendant dieser Abwehr intraparenchymaler "Fremdkörper".

Mikrogliale Zellen sind mesenchymal und mit den übrigen Makrophagen verwandt. Sie stammen von Vorläuferzellen des Dottersacks ab. Im aktivierten Zustand demonstrieren sie ein amöboides Fortbewegungsmuster und strecken ihre Zellausläufer aus, um Fremdkörper zu phagozytieren. Unter anderem sezernieren sie auch TGF-beta, das durch vermehrte Zytokinausschüttung einen Befall des Gewebes durch Trypanosomen erschwert [145]. Die andauernde Aktivierung von mikroglialen Zellen steht über neurotoxische Effekte in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [149,150]. Sie sind langlebig und vermutlich dazu in der Lage, sich lokal zu regenerieren, da ihre Population keine Zellen enthält, die im Knochenmark entstanden sind [151].

In vorhergehenden Experimenten konnte elektronenmikroskopisch beobachtet werden, dass eine mikrogliale Zelle ein Trypanosom umschloss und mit der Phagozytose begonnen hatte (Mogk et al., noch nicht publiziert). In nachfolgenden Experimenten sollte jetzt festgestellt werden, welchen Einfluss die Präsenz von mikroglialen Zellen auf die Vitalität der Trypanosomen im parenchymalen Gewebe hat. Der Versuchsaufbau basierte auf der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Gewebeschnitten. Als Kontrolle dienten infizierte Gewebeschnitte, aus denen vor der Kultivierung die mikroglialen Zellen spezifisch entfernt wurden. Kapitel 2.3.9 fasst das Prozedere zusammen.

In Kapitel 3.4 sind zwei Aufnahmen gezeigt, die als Beispiele für die Gesamtheit der angefertigten Aufnahmen dienen. Die Trypanosomen, die sich in Kultur mit Mikroglia befanden, zeigen vermehrt Anzeichen der Zellschädigung, die Abb. 34 zusammenfasst. Die Kontinuität der Zellmembran ist oft gestört, was zum Verlust an Zellinhalt und einem lichten Zytosol führt. Fehlerhafte Teilung führt zu Trypanosomen mit mehreren Zellkernen, einem vergrößerten Volumen und mehr als einem Flagellum, den sogenannten *giants*. Diese treten gehäuft unter ungünstigen Kulturbedingungen auf. Vereinzelt konnten Zeichen der Autophagie beobachtet werden, wie beispielsweise der Einschluss eines Zellorganells in ein Autophagosom.

Die Aussagekraft dieser rein qualitativen Beobachtungen ist eingeschränkt durch die suboptimale Fixierung des Gewebes und die geringe Anzahl an Trypanosomen, die im Gewebe beobachtet werden konnten. Die Trypanosomen in Kulturen ohne Mikroglia zeigen sich jedoch in der Regel intakt. Die Zellmembran, der VSG-Mantel und das Zytoskelett aus regelrecht angeordneten Mikrotubuli waren vollständig erhalten und kontinuierlich. Auch sonst zeigten sich keine Dilatation der Kernmembran und keine Anzeichen der Apoptose. Die Kulturbedingungen waren also wohl grundsätzlich ausreichend, um sowohl das neuronale Gewebe, als auch die darin befindlichen Trypanosomen im zeitlichen Rahmen des Versuchsablaufs zu erhalten. Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen ein vorläufiges Protokoll zur gemeinsamen Haltung von Hirngewebe und pleomorphen Trypanosomen und somit ein vielversprechender Ansatz, um die zelluläre Abwehr parenchymaler Infektionen aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit fügt sich in das fortlaufende Projekt zum Thema der Hirninfektion im Rahmen der humanen afrikanischen Trypanosomiasis ein. Es wurde Grundlagenarbeit zur Implementierung, Charakterisierung und Optimierung der modellgerechten Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen sowie der Transfektion dieser Parasiten durch Elektroporation geleistet.

Darauf aufbauend wurden drei grünfluoreszierende Stämme von Trypanosomen produziert. Der Entwurf eines zweiteiligen Expressionssystems und die Demonstration eines hohen Expressionsniveaus sowie die bedarfsgerechte Möglichkeit zur Regulation ermöglichen ein breites Spektrum an Anwendungen *in vitro*. Die erfolgreiche Transfektion pleomorpher Trypanosomen ermöglicht zukünftig die bessere fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung der Parasiten in Gewebeschnitten des chronisch erkrankten Tiermodells.

Parallel dazu wurden nationale Kooperationen durchgeführt, um ergänzende Fragestellungen zu beleuchten. Aufbauend auf einer *in vitro* Beschreibung der morphologischen Formen wurden Verfahren der Morphometrie und optischen Flussanalyse eingesetzt, um hochauflösende Aufnahmen von Trypanosomen aus Hirn und Blut anzufertigen und in Hinblick auf ihre Fortbewegung zu quantifizieren. Hirnformen, sogenannte *long slender* Trypanosomen, wurden als eigenständige Population mit angepasster Form und einem anderen Bewegungsmuster bestätigt. Eine entsprechende Adaptation an das toxische Milieu des Liquors und die Möglichkeit zur besseren mechanischen Gewebeinvasion ist wahrscheinlich und verdient nähere Untersuchung.

In einer weiteren Kooperation wurde der Grundstein gelegt, um das zelluläre Korrelat der Abwehr gegen die Invasion des Hirnparenchyms durch Trypanosomen zu bestimmen. Vorläufige Ergebnisse, basierend auf einem neuartigen Protokoll zur Kultivierung von hippocampalen Schnittkulturen mit pleomorphen Trypanosomen, weisen auf eine Rolle der mikroglialen Zellen in der zellulären Antwort gegen die Schlafkrankheit hin.

6. Literatur

1. Maddison DRS, K. S. (2007) Tree of Life Web Project.
2. Simpson A, Stevens J, Lukes J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology* 22: 168-174.
3. Ian Maudlin PHH, Michael A. Miles (2004) *The Trypanosomiases*: CABI.
4. Bruce D (1895) Preliminary Report on Tsetse Fly Disease or Nagana in Zululand. Durban: Bennet & Davis.
5. Stevens F (1910) On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*T. rhodesiense*).
6. Dutton JE (1902) Preliminary note upon a trypanosome occurring in blood of man.: Thomson Yates Laboratory Reports, 4, 455-467.
7. RM F (1902) Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed.
8. Wheeler RJ (2010) The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in Parasitology* 26: 457-464.
9. Gruby D (1843) Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*.: Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences, Paris, 1843, 17: 1134-1136.
10. Perseus Digital Library. In: Crane GR, editor: Tufts University.
11. Kayser FHB, E. C.; Zonkernagel, R. M.; Eckert, J.; Deplazes, P. (2010) *Medizinische Mikrobiologie*: Thieme.
12. Landfear SMI, M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115: 1-17.
13. Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Field MC, Carrington M (2002) The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends Parasitol* 18: 540--546.
14. Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Carrington M, Field MC (2002) The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol* 18: 491--496.

15. Field M, Allen C, Dhir V, Goulding D, Hall B, et al. (2004) New approaches to the microscopic imaging of *Trypanosoma brucei*. *Microscopy and Microanalysis* 10: 621-636.
16. Docampo RM, S. N. J. (2008) The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. *Curr Pharm Des* 14: 882-888.
17. Opperdoes FR, Borst P (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80: 360--364.
18. Robinson DRS, T.; Ploubidou, A.; Byard, E. H.; Gull, K. (1995) Microtubule Polarity and Dynamics in the Control of Organelle Positioning, Segregation, and Cytokinesis in the Trypanosome Cell Cycle. *J Cell Biol* 128: 1163-1172.
19. Hemphill AL, D.; Seebeck, T. (1991) The Cytoskeletal Architecture of *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol* 77: 603-612.
20. Vickerman K (1965) Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature* 208: 762--766.
21. Cross GA (1975) Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71: 393--417.
22. Borst P, Ulbert S (2001) Control of VSG gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol* 114: 17--27.
23. Mogk S, Meiwes A, Shtopel S, Schraermeyer U, Lazarus M, et al. (2014) Cyclical appearance of african trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. *PLoS One* 9: e91372.
24. Fenn K, Matthews KR (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current opinion in microbiology* 10: 539-546.
25. Barry JD, Emergy DL (1984) Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology* 88 (Pt 1): 67--84.
26. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. *The Lancet* 375: 148-159.
27. Hendriks EvD, F. J.; Wilson, J.; Sarkar, M.; Timms, M.; Matthews, K. R. (2000) Life-cycle differentiation in *Trypanosoma brucei*: molecules and mutants. *Biochem Soc Trans* 28: 531-536.

28. Reuner B, Vassella E, Yutzy B, Boshart M (1997) Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Molecular and biochemical parasitology* 90: 269-280.
29. Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, et al. (2005) Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ* 12: 335--346.
30. Figarella K, Uzcategui NL, Beck A, Schoenfeld C, Kubata BK, et al. (2006) Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell Death Differ* 13: 1802--1814.
31. Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC (2006) Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* 22: 536-542.
32. Stockdale C, Swiderski MR, Barry JD, McCulloch R (2008) Antigenic Variation in *Trypanosoma brucei*: Joining the DOTs. *PLoS Biol* 6: e185.
33. Ross R, Thomson D (1910) 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* 82: 411-415.
34. Mogk S, Meiwes A, Boßelmann C, Wolburg H, Duszenko M (2014) The lane to the brain: How African trypanosomes invade the CNS. *Trends in parasitolog.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.
35. Hart DTM, O.; Edwards, S.; Opperdoes, F. R. (1984) A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 12: 159-172.
36. Robinson NP, Burman N, Melville SE, Barry JD (1999) Predominance of Duplicative VSG Gene Conversion in Antigenic Variation in African Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5839-5846.
37. Hajduk SLC, C. R.; Barry, J. D.; Vickerman, K. (1981) Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*. Variable antigen type composition of metacyclic trypanosome populations from the salivary glands of *Glossina morsitans*. *Parasitology* 83: 595-607.
38. J. Arthur Thomson MA, LL.D. (1916) *Outlines of Zoology*. New York: D. Appleton & Company.
39. Mulligan HWP, W. H. (1970) *The African trypanosomiases*. London: Alien & Unwin.
40. Rice MJ (1970c) Function of the resilin in tsetse fly feeding mechanism. *Nature* 228.

41. Glasgow JP (1961) The feeding habits of *Glossina swynnertoni*. *J An Ecol* 30: 77-85.
42. Franco JR SP, Diarra A, Jannin JG (2014) Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology* 2014;6: 257-275.
43. De Raadt P (1976) African sleeping sickness today. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976;70(2): 114-116.
44. Steverding D (2008) The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* 1: 3.
45. WHO (2013) Control and surveillance of human African trypanosomiasis. World Health Organization technical report series: 1-237.
46. WHO (2000) WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-Prone Infectious Diseases. who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSR_ISR_2000.1.pdf.
47. Moore A RM (2001) Re-emergence of epidemic sleeping sickness in southern Sudan. *Trop Med Int Health* 6: 342-347.
48. Ekwanzala M PJ, Khonde N, Molisho S, Bruneel H, De Wals P (1996) In the heart of darkness: sleeping sickness in Zaire. *Lancet* 348: 1427-1430.
49. Stanghellini A JT (2001) The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health* 6: 330-334.
50. WHO (1998) Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization technical report series 881: I-VI, 1-114.
51. Franco JR SP, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Jannin JG (2014) The journey towards elimination of gambiense human african trypanosomiasis: not far, nor easy. *Parasitology* 141: 748-760.
52. Simarro P, Cecchi, G., Franco J.R. (2012) Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 6.
53. Woodruff AW ED, Owino NO (1982) A healthy carrier of African trypanosomiasis. *J Infect* 5: 89-92.
54. Sina G TG, Triolo N, Trova P, Cramet B (1979) Some new cases of congenital human African trypanosomiasis (Frz.). *Med Trop (Mars)* 39: 57-63.
55. Kazyumba L WM, Ruppel JF (1978) Congenital transmission of *Trypanosoma gambiense*. *Ann Soc Belg Med Trop* 58: 65-66.
56. Lindner AK PG (2010) The unknown risk of vertical transmission in sleeping sickness - a literature review. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e783.

57. Rocha G MA, Gama G, Brandao F, Atouguia J (2004) Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet* 363: 247.
58. Hira PR HS (1979) Some transfusion-induced parasitic infections in Zambia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 23: 436-444.
59. Martin-Dávila P FJ, López-Véléz R (2008) Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev* 21: 60-96.
60. Hope-Rapp EMC, O.; Klement, E.; Danis, M.; Bricaire, F.; Caumes, E. (2009) Double trypanosomal chancre revealing West African trypanosomiasis in a Frenchman living in Gabon (Frz.). *Ann Dermatol Venereol* 136: 341-345.
61. Naessens JM, D. M.; Buza, J.; Moolo, S. K. (2003) Local skin reaction (chancre) induced following inoculation of metacyclic trypanosomes in cattle by tsetse flies is dependent on CD4 T lymphocytes. *Parasite immunology* 25: 413-419.
62. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, et al. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480.
63. Peters WG, M. H. (1989) *Color Atlas of Tropical Medicine and Parasitology*: CRC Press.
64. Despommier D, Gwadz R, Hotez P, Knirsch C, Miller L (1995) *Parasitic diseases*: Springer-Verlag New York.
65. Sudarshi DL, S.; Pickrell, W. O.; Eligar, V.; Walters, R.; Quaderi, S.; Walker, A.; Capewell, P.; Clucas, C.; Vincent, A.; Checchi, F.; MacLeod, A.; Brown, M. (2014) Human African Trypanosomiasis Presenting at Least 29 Years after Infection - What Can This Teach Us about the Pathogenesis and Control of this Neglected Tropical Disease? *PLoS Negl Trop Dis* 8: ee3349.
66. Enanga B, Burchmore RJS, Stewart ML, Barrett MP (2002) Sleeping sickness and the brain. *Cellular & Molecular Life Sciences* 59: 845-858.
67. Chimelli L, Scaravilli F (1997) Trypanosomiasis. *Brain Pathol* 7: 599-611.
68. Pentreath VW (1995) Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 May 1994. Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89: 9-15.

69. Chianella S, Semprevivo M, Peng ZC, Zaccheo D, Bentivoglio M, et al. (1999) Microglia activation in a model of sleep disorder: an immunohistochemical study in the rat brain during *Trypanosoma brucei* infection. *Brain research* 832: 54-62.
70. Quan NM, J. D.; Whiteside, M. B.; McCoy, A. N.; Kristensson, K.; Herkenham, M. (1999) Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. *J Comp Neurol* 414: 114-130.
71. Sahlas DJ, MacLean JD, Janevski J, Detsky AS (2002) Clinical problem-solving. Out of Africa. *The New England journal of medicine* 347: 749-753.
72. Chappuis FS, E.; Adams, K.; Kidane, S.; Pittet, A.; Bovier, P. A. (2004) Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African Trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 71: 313-317.
73. Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Buscher P (2005) Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 133-146.
74. Louis FJ, Buscher P, Lejon V (2001) [Diagnosis of human African trypanosomiasis in 2001]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial* 61: 340-346.
75. Mugasa CMA, E. R.; Boer, K. R. (2012) Diagnostic accuracy of molecular amplification tests for human African trypanosomiasis - systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1438.
76. Rodgers J, McCabe C, Gettinby G, Bradley B, Condon B, et al. (2011) Magnetic resonance imaging to assess blood-brain barrier damage in murine trypanosomiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84: 344-350.
77. Stein J, Mogk S, Mudogo CN, Sommer BP, Scholze M, et al. (2014) Drug Development Against Sleeping Sickness: Old Wine in New Bottles? *Curr Med Chem* 21: 1713-1727.
78. Schlitzer M (2009) Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im letzten Jahrhundert entwickelt. *Pharmazie in unserer Zeit* 38: 552-558.
79. Fries DSF, A. H. (2003) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Chemotherapeutic Agents*; Abraham DJ, editor: John Wiley & Sons.

80. Kennedy PG (2012) Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet neurology*.
81. Pepin J, Milord F, Khonde A, Niyonsenga T, Loko L, et al. (1994) Gambiense trypanosomiasis: frequency of, and risk factors for, failure of melarsoprol therapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 447-452.
82. Fairlamb AH (2003) Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology* 19: 488-494.
83. Yun O, Priotto G, Tong J, Flevaud L, Chappuis F, et al. (2010) NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: 71-80.
84. Vincent IMC, D.; Watson, D. G. (2010) A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathogens* 6: e1001204.
85. Mumba Ngoyi D, Lejon V, Pyana P, Boelaert M, Ilunga M, et al. (2010) How to shorten patient follow-up after treatment for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *The Journal of infectious diseases* 201: 453-463.
86. Priotto G, Chappuis F, Bastard M, Flevaud L, Etard JF (2012) Early prediction of treatment efficacy in second-stage gambiense human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1662.
87. Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K (2007) Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiol Behav* 92: 110-114.
88. Kristensson K, Nygard M, Bertini G, Bentivoglio M (2010) African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog Neurobiol* 91: 152-171.
89. Mulenga C, Mhlanga JD, Kristensson K, Robertson B (2001) *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27: 77-85.
90. Mogk S, Wolburg H, Frey C, Kubata B, Duszenko M (2012) Brain infection by African trypanosomes during sleeping sickness. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 18: 49-51.
91. Li F, Gottesdiener KM (1996) An efficient method for stable transfection of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 24: 534--535.

92. Burkard G, Fragoso CM, Roditi I (2007) Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 153: 220-223.
93. Hamm B, Schindler A, Mecke D, Duszenko M (1990) Differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. *Molecular and biochemical parasitology* 40: 13-22.
94. Uppaluri S, Heddergott N, Stellamanns E, Herminghaus S, Zottl A, et al. (2012) Flow loading induces oscillatory trajectories in a bloodstream parasite. *Biophysical journal* 103: 1162-1169.
95. Wirtz E, Clayton C (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268: 1179--1183.
96. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 89-101.
97. Vassella E, Boshart M (1996) High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Molecular and biochemical parasitology* 82: 91-105.
98. Mogk S (2009) Etablierung eines induzierbaren knockdown des autophagy-related gene 8 in *Trypanosoma brucei* mittels RNA Interferenz: Eberhard Karls Universität Tübingen.
99. Vinet J, van Weering H, Heinrich A, Kalin R, Wegner A, et al. (2012) Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *Journal of Neuroinflammation* 9: 27.
100. Mogk S, Meiwes A, Shtopel S, Schraermeyer U, Lazarus M, et al. (2013) Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. Manuscript submitted.
101. Heddergott N, Kruger T, Babu SB, Wei A, Stellamanns E, et al. (2012) Trypanosome motion represents an adaptation to the crowded environment of the vertebrate bloodstream. *PLoS Pathogens* 8: e1003023.
102. Cross, Laboratory of Molecular Parasitology, Rockefeller University. <http://tryps.rockefeller.edu/>
103. Ellis DS, Evans DA, Stamford S (1982) Studies by electron microscopy of the giant forms of some African and South American trypanosomes found other than within their mammalian host. *Folia Parasitol (Praha)* 29: 5-11.

104. Horn D (2014) Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 195: 123-129.
105. Cross GAM (1996) Antigenic variation in trypanosomes: Secrets surface slowly. *BioEssays* 18: 283-291.
106. Schwede A, Jones N, Engstler M, Carrington M (2011) The VSG C-terminal domain is inaccessible to antibodies on live trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 175: 201-204.
107. Van Reet N, Van de Vyver H, Pyana PP, Van der Linden AM, Buscher P A panel of *Trypanosoma brucei* strains tagged with blue and red-shifted luciferases for bioluminescent imaging in murine infection models.
108. McLatchie AP, Burrell-Saward H, Myburgh E, Lewis MD, Ward TH, et al. (2013) Highly sensitive in vivo imaging of *Trypanosoma brucei* expressing "red-shifted" luciferase. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2571.
109. Claes F, Vodnala SK, van Reet N, Boucher N, Lunden-Miguel H, et al. (2009) Bioluminescent imaging of *Trypanosoma brucei* shows preferential testis dissemination which may hamper drug efficacy in sleeping sickness. *PLoS neglected tropical diseases* 3: e486.
110. Bingle LE, Eastlake JL, Bailey M, Gibson WC (2001) A novel GFP approach for the analysis of genetic exchange in trypanosomes allowing the in situ detection of mating events. *Microbiology* 147: 3231-3240.
111. Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W (2009) Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 2: 43.
112. Absalon S, Blisnick T, Kohl L, Toutirais G, Dore G, Julkowska D, et al. Intraflagellar transport and functional analysis of genes required for flagellum formation in trypanosomes.
113. He CY, Ho Hh Fau - Malsam J, Malsam J Fau - Chalouni C, Chalouni C Fau - West CM, West Cm Fau - Ullu E, et al. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*.
114. Acker S - Dissertation
115. Cross - pHD309-HYG http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_plasmids.html.
116. McCulloch R, Vassella E, Burton P, Boshart M, Barry JD (2004) Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* 262: 53-86.
117. Glover L, Horn D (2009) Site-specific DNA double-strand breaks greatly increase stable transformation efficiency in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 166: 194-197.

118. Hamm A, Krott N Fau - Breibach I, Breibach I Fau - Blindt R, Blindt R Fau - Bosserhoff AK, Bosserhoff AK Efficient transfection method for primary cells.
119. Burkard G, Fragoso CM, Roditi I (2007) Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 220--223.
120. MacGregor P, Rojas F, Dean S, Matthews KR (2013) Stable transformation of pleomorphic bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 190: 60-62.
121. Hirumi H, Hirumi K, Doyle JJ, Cross GA (1980) In vitro cloning of animal-infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 80: 371-382.
122. Duszenko M, Ferguson MA, Lamont GS, Rifkin MR, Cross GA (1985) Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *J Exp Med* 162: 1256--1263.
123. Van Reet N, Pyana PP, Deborggraeve S, Buscher P, Claes F (2011) *Trypanosoma brucei gambiense*: HMI-9 medium containing methylcellulose and human serum supports the continuous axenic in vitro propagation of the bloodstream form. *Experimental parasitology* 128: 285-290.
124. Ivanov KP, Kalinina MK, Levkovich YI (1981) Blood flow velocity in capillaries of brain and muscles and its physiological significance. *Microvascular Research* 22: 143-155.
125. Weisse S, Heddergott N, Heydt M, Pflasterer D, Maier T, et al. (2012) A quantitative 3D motility analysis of *Trypanosoma brucei* by use of digital in-line holographic microscopy. *PLoS One* 7: e37296.
126. Dean SD, Matthews KR (2007) Restless Gossamers: Antibody Clearance by Hydrodynamic Flow Forces Generated at the Surface of Motile Trypanosome Parasites. *Cell Host & Microbe* 2: 279-281.
127. Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S, Boshart M, Wiegertjes G, et al. (2007) Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131: 505-515.
128. Hochstetter A, Stellamanns E, Deshpande S, Uppaluri S, Engstler M, et al. (2015) Microfluidics-based single cell analysis reveals drug-dependent motility changes in trypanosomes. *Lab on a Chip* 15: 1961-1968.
129. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M (2006) VIP: an agent with license to kill infective parasites. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070: 303-308.

130. Delgado M, Anderson P, Garcia-Salcedo JA, Caro M, Gonzalez-Rey E (2009) Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell death and differentiation* 16: 406-416.
131. Wolburg H, Mogk S, Acker S, Frey C, Meinert M, et al. (2012) Late stage infection in sleeping sickness. *PLoS One* 7: e34304.
132. Uppaluri S, Nagler J, Stellamanns E, Heddergott N, Herminghaus S, et al. (2011) Impact of microscopic motility on the swimming behavior of parasites: straighter trypanosomes are more directional. *PLoS computational biology* 7: e1002058.
133. Li L, Norrelykke SF, Cox EC (2008) Persistent cell motion in the absence of external signals: a search strategy for eukaryotic cells. *PLoS One* 3: e2093.
134. Poltera AA, Hochmann A, Rudin W, Lambert PH (1980) *Trypanosoma brucei brucei*: a model for cerebral trypanosomiasis in mice--an immunological, histological and electronmicroscopic study. *Clinical and experimental immunology* 40: 496-507.
135. Wengert O, Kopp M, Siebert E, Stenzel W, Hegasy G, et al. (2014) Human African trypanosomiasis with 7-year incubation period: Clinical, laboratory and neuroimaging findings. *Parasitology International* 63: 557-560.
136. Jelinek T, Bisoffi Z, Bonazzi L, van Thiel P, Bronner U, et al. (2002) Cluster of African Trypanosomiasis in Travelers to Tanzanian National Parks. *Emerging Infectious Diseases* 8: 634.
137. Wolburg H, Paulus W (2010) Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119: 75-88.
138. Scott DE, Pepe GJ (1987) The fetal baboon median eminence as a circumventricular organ: I. Transmission electron microscopy. *Brain Research Bulletin* 19: 87-94.
139. Schultzberg M, Ambatsis M, Samuelsson E, Kristensson K, Van Meirvenne N (1988) Spread of *Trypanosoma brucei* to the nervous system: early attack on circumventricular organs and sensory ganglia. *Journal of neuroscience research* 21: 56-61.
140. Klara PM, Brizzee KR (1975) The ultrastructural morphology of the squirrel monkey area postrema. *Cell Tissue Res* 160: 315-326.
141. Kato CD, Nanteza A, Mugasa C, Edyelu A, Matovu E, et al. (2015) Clinical Profiles, Disease Outcome and Co-Morbidities among *T. b. rhodesiense* Sleeping Sickness Patients in Uganda. *PLoS ONE* 10: e0118370.

142. Anzil AP, Blinzinger K, Herrlinger H (1976) Fenestrated blood capillaries in rat cranio-spinal sensory ganglia. *Cell Tissue Res* 167: 563-567.
143. MacLean LM, Odiit M, Chisi JE, Kennedy PG, Sternberg JM (2010) Focus-specific clinical profiles in human African Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: e906.
144. MacLean L, Reiber H, Kennedy PGE, Sternberg JM (2012) Stage Progression and Neurological Symptoms in *Trypanosoma brucei rhodesiense* Sleeping Sickness: Role of the CNS Inflammatory Response. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1857.
145. Masocha W, Amin DN, Kristensson K, Rottenberg ME (2008) Differential Invasion of *Trypanosoma brucei brucei* and Lymphocytes into the Brain of C57BL/6 and 129Sv/Ev Mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 68: 484-491.
146. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R (2006) B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of Neurology* 59: 880-892.
147. Meinl E, Krumbholz M, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R (2008) Compartmentalization of inflammation in the CNS: A major mechanism driving progressive multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 274: 42-44.
148. Sternberg JM, MacLean L (2010) A spectrum of disease in Human African trypanosomiasis: the host and parasite genetics of virulence. *Parasitology* 137: 2007-2015.
149. Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10: 826-837.
150. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, et al. (2009) Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15: 1318-1321.
151. Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11: 775-787.

7. Danksagungen

Prof. Dr. Michael Duszenko, dem Leiter der Arbeitsgruppe und meinem Doktorvater, danke ich für die faszinierende Fragestellung, die lebhaften Diskussionen und das gute Betreuungsverhältnis.

Dr. Stefan Mogk, dem Leiter des Projekts zur Aufklärung der Hirninfektion in der Arbeitsgruppe Duszenko, danke ich für die Einarbeitung in die molekular- und mikrobiologischen Methoden und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Den anderen Mitarbeitern des Labors im Zeitraum 2013-2015 danke ich für das gute Arbeitsklima.

Prof. Dr. Hartwig Wolburg vom Institut für Pathologie der Universität danke ich für die Beratung bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Rita Knittel und Gabi Frommer-Kästle, den technischen Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen, danke ich für die Verarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie.

Cand. med. Julia Lorenz und Eva Dreßen BSc von der Arbeitsgruppe Duszenko danke ich für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung des Kultursystems.

Vera Sippel MSc von der Arbeitsgruppe Dodt am Interfakultären Institut für Biochemie, Tübingen, danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzmikroskopie.

Prof. Dr. Knut Biber und Dr. Annette Heinrich von der Arbeitsgruppe „Molekulare Psychiatrie“ der Universität Freiburg danke ich für die Kooperation zum Thema „Co-Kultivierung pleomorpher Trypanosomen mit murinem, hippocampalem Gewebe in An- und Abwesenheit mikroglialer Zellen“.

Prof. Dr. Engstler und Dr. Tim Krüger vom Institut Zoologie I der Universität Würzburg danke ich für die Kooperationen zu den Themen „Motilität von Trypanosomen aus Hirngewebe und Blut infizierter Ratten“ und „Verlauf der Schlafkrankheit in Mäusen nach Infektion durch Tse-Tse-Fliegen“.

Dr. Ines Subota vom Institut Zoologie I der Universität Würzburg danke ich für die Unterstützung bei der Elektroporation pleomorpher Trypanosomen.

Prof. Dr. Christine Clayton vom Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg danke ich für das Plasmid pHD328.

Prof. Dr. Marlies Knippers und Dr. Inka Montero vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Tübingen danke ich für das rahmengebende Promotionskolleg und die zusätzliche Betreuung.

Myriam Bittner MA von der mediävistischen Abteilung der Germanistik an der Universität Tübingen danke ich für die Beratung in sprachlichem Ausdruck.

Dr. Gerhard Bosselmann, Claudia Bosselmann, Caroline Bosselmann und Hannelore Wick danke ich für den familiären Rückhalt.

8. Lebenslauf

- Name: Christian Malte Boßelmann
Geboren am 30.09.1992 in Hamburg
- Bildung: 2011 – 2017 Studium der Medizin an der Eberhard Karls Universität
Tübingen, Karls-Universität Prag & Newcastle University
2013 – 2016 Promotion, Arbeitsgruppe Prof. M. Duszenko
2008 – 2010 Glenalmond College, Schottland: Abitur
- Förderung: 2016 – 2017 Förderung durch ein Erasmus-Reisestipendium
der Europäischen Kommission
2013 – 2014 Förderung durch das Promotionskolleg des Zentrums für
interdisziplinäre klinische Forschung (IZKF)
- Sonstiges: 2013 – 2014 Tutor: Seminar und Praktikum „Biochemie für Mediziner“
2013 Kenntniskurs Strahlenschutz
2010 – 2011 Ehrenamtliches Engagement auf dem Lazarettsschiff
MV Africa Mercy

Publikationen: Mogk S, Meiwes A, Boßelmann CM, Wolburg H, Duszenko M “The lane to the brain: how African trypanosomes invade the CNS” Trends in Parasitology, Volume 30, Issue 10, October 2014, Pages 470-477, ISSN 1471-4922, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.

Mogk S, Boßelmann CM, Mudogo CN, Stein J, Wolburg H, Duszenko M “African trypanosomes and brain infection – the unsolved question.” Biol Rev, 92: 1675-1687. doi: 10.1111/brv.12301

Sprachkenntnisse: Deutsch, Englisch, Latein, Altgriechisch

Sonstiges: [linkedin.com/in/christianbosselmann](https://www.linkedin.com/in/christianbosselmann)