

**Aufklärung des Infektionsweges der
Gehirninfektion von *Trypanosoma brucei* und
Charakterisierung der Parasiten im zentralen
Nervensystem**

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefan Mogk
aus Esslingen a.N.

Tübingen
2014

Tag der mündlichen Qualifikation: 22.12.2014

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Duszenko
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hartwig Wolburg
3. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Engstler

Meinen Eltern.

*Fahre mit der Eisenbahn,
fahre, Junge, fahre!
Auf dem Deck vom Wasserkahn
wehen deine Haare.*

*Tauch in fremde Städte ein,
lauf in fremden Gassen;
höre fremde Menschen schrein,
trink aus fremden Tassen.*

*Flieh Betrieb und Telefon,
grab in alten Schmökern,
sieh am Seinekai, mein Sohn,
Weisheit still verhökern.*

*Lauf in Afrika umher,
reite durch Oasen;
lausche auf ein blaues Meer,
hör den Mistral blasen!*

*Wie du auch die Welt durchflitzt
ohne Rast und Ruh –:
Hinten auf dem Puffer sitzt
du.*

(Kurt Tucholsky)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität zu Tübingen durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, seine intensive und kollegiale Betreuung, sowie seine Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Allen Kooperationspartnern, die an diesem spannenden Projekt mitgewirkt haben, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Bei Prof. Dr. Hartwig Wolburg und Prof. Dr. Markus Engstler bedanke ich mich besonders für die Übernahme meines Zweit- und Drittgutachtens.

Außerordentlich dankbar bin ich auch meinen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima, die hervorragende Zusammenarbeit und den regen Ideenaustausch. Stellvertretend für alle, die in unserer Gruppe gearbeitet haben, möchte ich mich bei Torsten Barth, Jasmin Stein, Matthias Huber und Agnes Gray bedanken. Mit Euch hat jeder Arbeitstag viel Freude gemacht.

Allen medizinischen Doktoranden, die ich mit betreuen durfte, danke ich ganz herzlich für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen wertvollen Diskussionen und Ideen. Tausend Dank an Sven Acker, Claudia Frey, Andreas Meiwes, Julia Lorenz und Christian Boßelmann.

Zuletzt gilt mein Dank unseren Praktikanten und Bachelor-Studenten, deren Versuche ich teilweise mit betreute, namentlich Claudia Kielkopf, Swetlana Shtopel und Eva Dreßen.

Abkürzungsverzeichnis

AnTat	<i>Antwerp Trypanozoon antigen type</i>
AP	alkalische Phosphatase
APS	Aminosilan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CATT	<i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i>
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CT	Computer-Tomographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure
ES(AG)	<i>expression site (associated gene)</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Gd-DTPA	Gadolinium Diethylentriaminpentaessigsäure
gDNA	genomische DNA
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i>
HIBCPP	<i>Human Choroid Plexus Papilloma Cells</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's minimum essential medium</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDNA	Kinetoplasten DNA

KM	Kontrastmittel
LiTat	<i>Lille Trypanozoon antigen type</i>
MCP	mCherry-Protein
MiTat	<i>Molteno Institute Trypanozoon antigenic type</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	<i>Major surface metalloprotease</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCPEC	<i>Primary Porcine Choroid Plexus Epithelial Cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	<i>Reactive oxigen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SF9	<i>Spodoptera frugiperda insect cell</i>
SHAM	Salicylhydroxamsäure
ssRNA	einzelsträngige RNA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TDB	<i>Trypanosome dilution buffer</i>
TE	<i>Time to echo</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Time to repeat
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VSG	<i>Variant surface glycoprotein</i>
ZBV	Zerebrales Blutvolumen
ZNS	Zerebrales Nervensystem
ZVO	Zirkumventrikuläre Organe

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
A.	Afrikanische Schlafkrankheit	1
1.	Epidemiologie und Krankheitsbild	1
2.	Geschichte	5
3.	Diagnose	7
4.	Prophylaxe und Therapie	9
B.	Trypanosoma brucei	14
1.	Phylogenetische Einordnung	14
2.	Morphologie	16
3.	Lebenszyklus	18
4.	Antigenvariation	21
5.	Energiestoffwechsel	23
C.	Barrieren des zentralen Nervensystems	26
1.	Aufbau der Blut-Hirn-Schranke	26
2.	Aufbau der Blut-CSF-Schranke	30
3.	Gehirninfektion von Trypanosoma brucei	34
D.	Zielsetzung der Arbeit	42
II.	Material und Methoden	44
A.	Material	44
1.	Tiere und Zelllinien	44
2.	Laborgeräte und Instrumente	44
3.	Verbrauchsmaterialien	46
4.	Primer und Plasmide	49
5.	Medien, Puffer und Lösungen	49
6.	Software	53
B.	Methoden	54
1.	Zellkulturen	54
2.	Arbeiten mit Versuchstieren	58
3.	Licht- und Elektronenmikroskopie	63
4.	Molekularbiologische Arbeiten	67
5.	Immunologische Nachweisverfahren	75
6.	Kernspintomographie	77
7.	Durchflusszytometrie	78

III.	Ergebnisse	79
A.	Isolierung von Trypanosomen aus dem Gehirn	79
1.	Ausbeute und Reinheit.....	79
2.	Rasterelektronenmikroskopische Vermessung	81
3.	Motilität	86
4.	Rekultivierung	89
5.	Gefrierbruchtechnik.....	92
B.	Lokalisation infizierter Areale mittels qPCR.....	94
C.	Intracerebrale Injektion und Detektion	98
1.	Intracerebrale Injektion	98
2.	Fluoreszenzbasierte Bildgebung	101
3.	Transmissionselektronenmikroskopie	108
D.	Kernspintomographische Untersuchung	111
E.	Elektronenmikroskopische Aufklärung des Infektionsweges ...	114
1.	Blut-Hirn-Schranke	114
2.	Blut-CSF-Schranke	116
F.	Untersuchungen des <i>Liquor cerebrospinalis</i>	124
1.	Zyklischer Infektionsverlauf des CSF	124
2.	Immunglobulin G im Liquor	127
3.	CSF als Kulturmedium	129
G.	Interaktion mit Plexusepithelzellen	132
1.	Artifizielle Blut-CSF-Schranke.....	132
2.	Wechselwirkung mit Claudin-11	137
H.	Organinfektion	141
1.	Morphologisch intakte Trypanosomen.....	142
2.	Degenerierte oder phagozytierte Trypanosomen	144
3.	Augeninfektion.....	147
IV.	Diskussion	150
V.	Zusammenfassung	163
VI.	Abstract.....	166
VII.	Literaturverzeichnis.....	169

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitung der Afrikanischen Schlafkrankheit..	2
Abbildung 2: <i>Winterbottom sign</i> und Kachektisches Zebu-Rind	4
Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von <i>T.b.brucei</i>	15
Abbildung 4: Vereinfachte morphologische Darstellung von <i>T. brucei</i>	17
Abbildung 5: Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	20
Abbildung 6: Energiestoffwechsel von Blutform-Trypanosomen	25
Abbildung 7: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.	27
Abbildung 8: Aufbau der Blut-CSF-Schranke.	31
Abbildung 9: Coronale Projektion von Gehirn und Ventrikeln	35
Abbildung 10: Isolierung von Trypanosomen aus Gehirn (Ausbeute)	80
Abbildung 11: Vermessung von Trypanosomen	82
Abbildung 12: Längenvergleich von Trypanosomen aus Blut/Gehirn	83
Abbildung 13: Längenverteilung von Trypanosomen aus dem Blut	84
Abbildung 14: Längenverteilung von Trypanosomen aus Blut/CSF.	86
Abbildung 15: Bewegungsmuster von Trypanosomen	88
Abbildung 16: Position von Kern und kDNA	88
Abbildung 17: Rekultivierung auf semisolider HMI-9-Agarose	90
Abbildung 18: Wachstumskurven von Trypanosomen aus Gehirn	91
Abbildung 19: Gefrierbrüche von Trypanosomen	93
Abbildung 20: Kalibrierung der qPCR.	95
Abbildung 21: Verteilung von Trypanosomen im Gehirn (qPCR)	97
Abbildung 22: Stereotaktische intracerebrale Injektion (Schema)	99
Abbildung 23: Nachweis von injizierten Trypanosomen mittels PCR	101
Abbildung 24: anti-VSG 221 Färbung / mCherry-Trypanosomen	103
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopie mit <i>quantom dots</i>	105
Abbildung 26: Immunfluoreszenznachweis injizierter Trypanosomen	107
Abbildung 27: Nachweis injizierter Trypanosomen (TEM)	109
Abbildung 28: Native Magnetresonanztomographie (Rattenhirn)	112
Abbildung 29: Magnetresonanztomographie mit Kontrastmittel	113
Abbildung 30: Trypanosomen und Blut-Hirn-Schranke (TEM).	115
Abbildung 31: Trypanosomen im Stroma des Plexus (TEM)	117
Abbildung 32: Antikörpernachweis in immunisiertem Rattenblut	118
Abbildung 33: Trypanosomen im Lateralventrikel (TEM)	120
Abbildung 34: Darstellung des Liquorflusses (Schema)	121

Abbildung 35: Trypanosomen im Subarachnoidalraum (TEM)	121
Abbildung 36: Trypanosomen in der <i>Pia mater</i> (TEM).....	122
Abbildung 37: Atlanto-occipitale CSF-Entnahme (Schema)	125
Abbildung 38: Zyklische Blut- und CSF-Infektion.....	126
Abbildung 39: Immunglobuline im CSF.	128
Abbildung 40: Wachstumskurven pleomorpher Tryp. in CSF	131
Abbildung 41: Aufbau der inversen artifiziellen Blut-CSF-Schranke	133
Abbildung 42: Transmigration durch artifizielle Blut-CSF-Schranke	134
Abbildung 43: Immunfluoreszenz der artifiziellen Blut-CSF-Schranke...	136
Abbildung 44: Immunfluoreszenz von Claudin-11 in SF9-Zellen.....	139
Abbildung 45: Wechselwirkung Trypanosomen/Claudin-11 (Statistik) .	139
Abbildung 46: Wechselwirkung Trypanosomen/Claudin-11 (REM).....	140
Abbildung 47: Trypanosomen in Herzmuskelzellen (TEM)	143
Abbildung 48: Trypanosomen im Hoden (TEM).	143
Abbildung 49: Splenomegalie im Rahmen einer Trypanosomiasis.	144
Abbildung 50: Trypanosomen in der roten Pulpa der Milz (TEM).....	145
Abbildung 51: Trypanosomen im Nebenhoden (TEM).....	146
Abbildung 52: Trypanosomen im Auge (TEM).....	147
Abbildung 53: Zytoplasmatische Vesikel in Tryp. in der Aderhaut (TEM)	148

I. Einleitung

A. Afrikanische Schlafkrankheit

1. Epidemiologie und Krankheitsbild

Die afrikanische Schlafkrankheit (*Human African Trypanosomiasis, HAT*) ist eine unbehandelt letal verlaufende Infektionskrankheit, die von einzelligen Blutparasiten der *Trypanosoma brucei* - Gruppe verursacht wird. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich über weite Teile des afrikanischen Tropengürtels. Innerhalb dieses Areal, d.h. zwischen dem 14. nördlichen und dem 20. südlichen Breitengrad, finden die als Überträger fungierenden Tsetse-Fliegen (*Glossina spec.*) geeignete Lebensbedingungen vor, wobei unterschiedliche Klimazonen von bestimmten Tsetse-Fliegenarten bevorzugt werden. Während *Glossina palpalis* in feuchten Biotopen wie den Regenwäldern Westafrikas vorkommt, werden trockene Savannenbiotope im Osten Afrikas von *Glossina morsitans* besiedelt. Da sich die drei Unterarten von *Trypanosoma brucei* in ihrer Wirtsspezifität unterscheiden, existiert entsprechend der jeweils vorherrschenden Tsetse-Fliegenart eine west- (*T. brucei gambiense*) und ostafrikanische (*T. brucei rhodesiense*) Schlafkrankheit. Die Grenze zwischen beiden Krankheitsformen verläuft durch Südost-Sudan, Uganda, Lake Victoria, Ruanda/Burundi und Zambia. Bezogen auf die Tsetse-Fliegen ist die Prävalenz mit 0,1% sehr gering, weswegen weite Gebiete auch als frei von HAT bezeichnet werden können (Abbildung 1). Im letzten Jahrhundert gab es drei schwere Epidemien mit hunderttausenden Toten: 1) zwischen 1896 und 1906 in Uganda und im Kongobecken, 2) zwischen 1920 und 1940 in verschiedenen afrikanischen

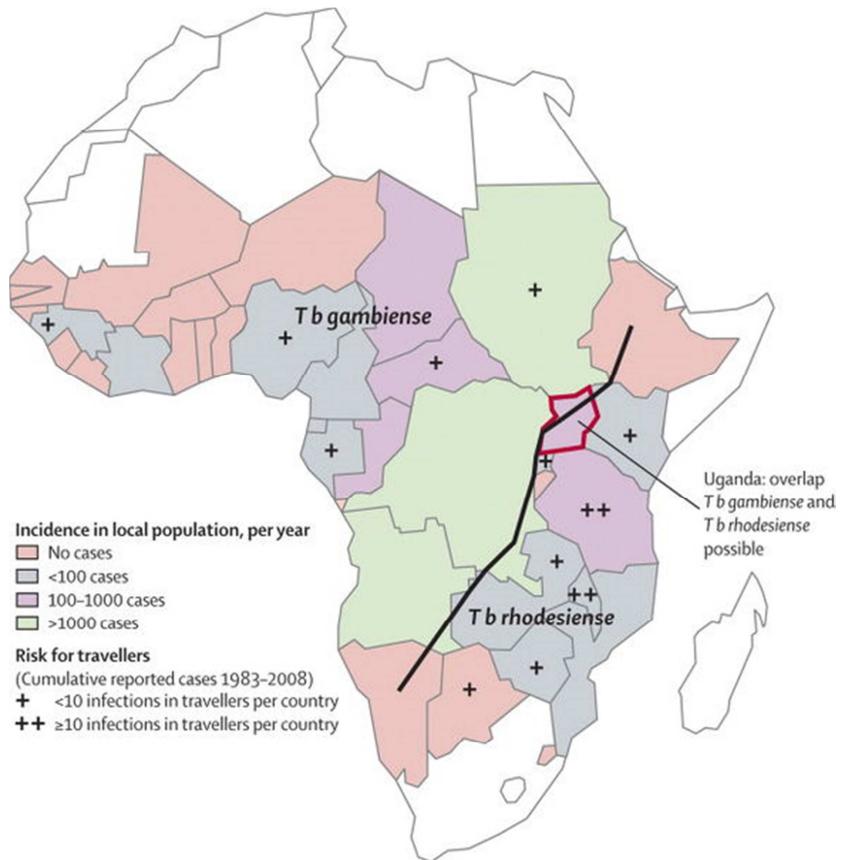


Abbildung 1: Verbreitung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Abbildung aus [1].

Ländern und 3) ab 1970, als mit dem Erreichen der Unabhängigkeit aller afrikanischen Staaten und dem Ausbruch von Bürgerkriegen die Kontrollmaßnahmen der Kolonialmächte zum Erliegen kamen [1]. Beispielsweise traten in Angola um 1975 nur noch vereinzelt HAT-Fälle auf, während nach der Unabhängigkeit von Portugal mehr als 100 000 Menschen jährlich erkrankten. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde im Jahre 1995 bei 30 000 Menschen HAT diagnostiziert, wobei

die Dunkelziffer vor allem auf Grund schlechter medizinischer Versorgung auf 300 000 geschätzt wurde [2]. 2009 sank die Inzidenz erstmals seit 50 Jahren auf unter 10 000 Neuinfektionen [3], ein Jahr später gab es sogar nur rund 7 000 gemeldete Neuinfektionen. Die Prävalenz wurde 2012 mit rund 20 000 angegeben [2].

Hausschweine und Riesenhamsterratten bilden nach Dönges [4] das Reservoir der westafrikanischen Trypanosomenunterart *T. brucei gambiense*. Werden die Parasiten mit dem Speichel einer blutsaugenden Tsetse-Fliege auf den Menschen übertragen, bildet sich zunächst eine lokale Schwellung (ein sogenannter Trypanosomenschanker) im Bereich der Einstichstelle. Danach wandern die Trypanosomen mit der Lympheflüssigkeit in den Blutkreislauf ein. Das erste, hämolympathische Stadium äußert sich klinisch in einem allgemeinen Krankheitsgefühl mit Lymphknotenschwellungen (*Winterbottom's sign*, Abbildung 2a), Kopf-, Gelenk-, Muskelschmerzen, Fieber und Schüttelfrost. Auch endokrine Symptome, Herzfunktionsstörungen, Gewichtsverlust, Anämie und Thrombozytopenie können auftreten [1].

Nach mehreren Monaten invadieren die Parasiten in das zerebrale Nervensystem (ZNS). In der meningoenzephalitischen Phase treten Verwirrungszustände, Koordinationsschwierigkeiten, Sinnesstörungen, epileptiforme Krämpfe, Apathie sowie Kachexie auf [1]. Es kommt zu einer Deregulation der Schlaf- / Wachzyklen mit Somnolenz am Tage und nächtlicher Insomnie. Der Krankheitsverlauf kann sich über Jahre erstrecken. Letztlich fallen die Patienten in einen dauerhaften komatösen

Dämmerzustand [1]. Unbehandelt hat die Schlafkrankheit stets einen letalen Ausgang.

Als Reservoir von *T. brucei rhodesiense* dienen hauptsächlich Schirrantilopen, aber auch Hausrinder, Kuhantilopen, Büffel, Fleckenhyaänen und Löwen [4]. Die Erreger der ostafrikanischen Form der Schlafkrankheit sind schlecht an den menschlichen Wirt adaptiert, weshalb die Erkrankung rasch progredient verläuft. Die meningoenzephalitische Phase tritt hier bereits nach wenigen Wochen ein, der *Exitus letalis* nach wenigen Monaten.

T. brucei brucei ist die einzige für den Menschen ungefährliche Art. Diese befällt normalerweise Antilopen und andere in Afrika einheimische Wildtiere, meist ohne symptomatisch zu werden. Erkranken jedoch eingeführte Nutz- und Haustiere wie Pferde, Esel, Hunde oder Katzen, führt dies zu einer als

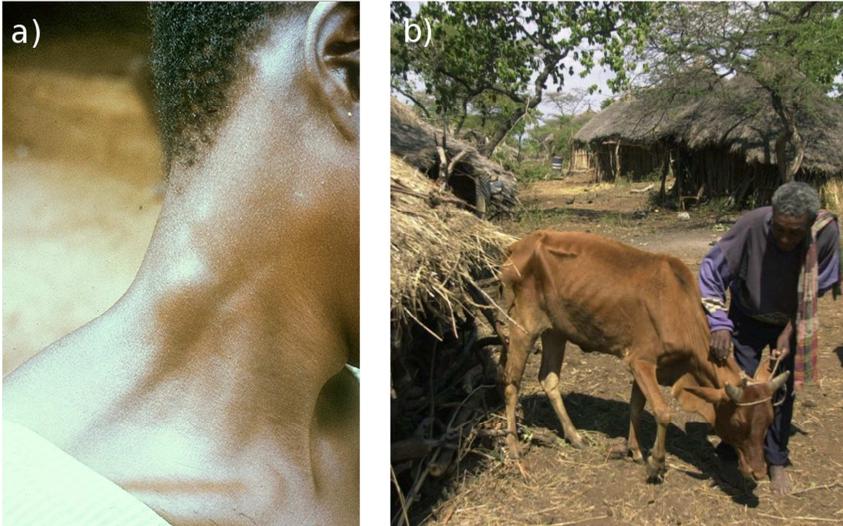


Abbildung 2: a) Lymphknotenschwellung (*Winterbottom sign*) als typisches Zeichen einer *T. brucei gambiense*-Infektion. Abbildung aus [5]. b) Kachektisches Zebu-Rind bei *Nagana-Seuche* (*T. brucei brucei*). Abbildung aus [6].

Nagana bezeichneten Krankheit. Auch einheimische Zebu-Rinder (nicht aber Ndama-Rinder), die der Nahrungsmittelgewinnung dienen, sind von *T. brucei brucei* betroffen (Abbildung 2b). Anderes Nutzvieh wie Hausrinder und Schafe (*T. vivax*), Wiederkäuer allgemein (*T. congolense*), sowie Schweine (*T. simiae*) werden ebenfalls von Trypanosomen befallen, wodurch enorme wirtschaftliche Ausfälle entstehen.

2. Geschichte

Die ersten Berichte über die afrikanische Schlafkrankheit gehen bis ins 14. Jahrhundert zurück und beziehen sich auf den heutigen Niger. Diese wurden 1927 von Baron de Slane wiederentdeckt [7], als er Werke des arabischen Historikers Ibn Chaldun ins Französische übersetzte [8]. Danach traten gesicherte Berichte erst wieder vom Jahr 1734 an auf, diesmal über Krankheitsausbrüche an der Guineaküste [9]. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Krankheit als *sleepy distemper* beschrieben, während die eigentliche Ursache noch nicht bekannt war. Schmerzlose Lymphknotenschwellungen im dorsal-lateralen Halsbereich wurden von Winterbottom um 1803 untersucht [10]. Das sogenannte *Winterbottom sign* gilt bis heute als Leitsymptom des hämolymphatischen Stadiums. 1843 entdeckte der ungarische Arzt Gruby Blutparasiten in einem *Trypanosoma sanguinis* infizierten Frosch [11]. Nach ihrem Erscheinungsbild benannte er sie als Trypanosomen, einer Wortschöpfung aus dem griechischen Verb *tryp* (durchbohren) und dem Substantiv *soma* (Körper). 1902 identifizierte Dutton ähnliche Parasiten in

Patientenblut aus Westafrika, die er als *Trypanosoma gambiense* (nach heutiger Systematik *T. brucei gambiense*) klassifizierte [12]. Nur ein Jahr später fand Castellani dieselben Parasiten in Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) [13]. Obwohl sich dieser Befund bei mehreren Patienten aus Uganda bestätigte, war der Zusammenhang zwischen „Trypanosomenfieber“ und Schlafkrankheit noch nicht hergestellt [8]. Castellani ging davon aus, dass es sich um eine Co-Infektion zweier unabhängiger Krankheiten handelte [8,14]. 1903 erkannte der schottische Armeearzt Bruce schließlich, dass die Trypanosomen selbst Auslöser der afrikanischen Schlafkrankheit sind [15]. Außerdem studierte er *T. brucei brucei*, die Erreger der Nagana-Seuche bei Rindern. Nach ihm wurde später die Art *Trypanosoma brucei* benannt. Bald wurde klar, dass Trypanosomen von Tsetsefliegen (*Glossina spec.*) übertragen werden [16]. Jedoch waren sich Koch [17] und Bruce uneinig darüber, ob die Übertragung rein mechanisch erfolgt, oder sich die Parasiten im Verdauungstrakt der Fliege vermehren [18]. Letztlich zeigte sich, dass die Parasiten einen komplexen Infektionszyklus mit Wirtswechsel durchlaufen [19]. 1908 wurden dann die Erreger der ostafrikanischen Schlafkrankheit (*T. brucei rhodesiense*) von Stephens und Fantham gefunden [20]. Weitere Untersuchungen von Ross und Thomson zeigten 1910 den charakteristischen zyklischen Verlauf der Parasitämie [21]. 1917 fand der deutsche Wissenschaftler Taute an Experimenten mit „freiwilligen“ Versuchspersonen heraus, dass die in dieser Arbeit verwendete Unterart *T. brucei brucei* nicht humanpathogen ist [22]. Erst Jahrzehnte später wurde dies durch einen Lysetest in humanem Serum bewiesen [23,24]. Der dafür verantwortliche trypanolytische Faktor wurde 1978 von Rifkin in der *high density lipoprotein*

Fraktion nachgewiesen [25] und in den folgenden Jahren mechanistisch untersucht [24]. Die evolutionäre Entstehung der *Salivaria*, die mit dem Speichel des Insektenvektors übertragen werden, war 1998 Gegenstand von Genomanalysen [26]. Diese führten schließlich mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms im Jahr 2005 zu einem weiteren Meilenstein in der Trypanosomenforschung [27]. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurde die Geschichte der afrikanischen Schlafkrankheit in mehreren Publikationen zusammengefasst [28,29,30,31].

3. Diagnose

Allgemeine Krankheitssymptome, wie sie zu Beginn einer Infektion auftreten, sind zu unspezifisch, um eine Diagnose zu ermöglichen. Auch im fortgeschrittenen Stadium können die Beschwerden vielseitig und schwer zu deuten sein. Neben den klassischen Symptomen (vgl. Seite 1ff) wurden vereinzelt auch Depressionen, auditorische und visuelle Halluzinationen, sowie Paranoia beschrieben [32]. Eine eingehende Anamnese ist wichtig, um beispielsweise zurückliegende Tropenreisen zu erfragen. Differentialdiagnostisch müssen Syphilis, Leishmaniose, Malaria, HIV, Tuberkulose, Typhus und Lymphome ausgeschlossen werden [33,34].

Für eine vorläufige Diagnose ist beispielsweise der *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT) geeignet. Er ermöglicht einen Antikörpernachweis gegen *T. brucei gambiense* (LiTat 1.3) in Blut, Serum und Plasma [35]. Aufgrund der einfachen Handhabung ist der CATT hervorragend

für *screenings* unter Feldbedingungen geeignet. Als problematisch sind jedoch die geringe Sensitivität von 87-98% und die Kreuzreaktivität zu anderen Trypanosomenstämmen (Spezifität 74-95%) anzusehen [36]. Ein Verdacht auf Trypanosomiasis muss deshalb unbedingt durch weitere Untersuchungen gesichert werden [37]. Dies erfolgt im einfachsten Fall durch mikroskopische Blutanalyse, wobei die Detektionsgrenze bei 10^4 Parasiten pro ml liegt. Da die Parasitämie fluktuiert [21], wird empfohlen, das Blut durch Antrocknen zu konzentrieren („dicker Tropfen“, Nachweisgrenze bis zu $5 \cdot 10^3$ Parasiten pro ml). Noch empfindlicher sind Anreicherungen durch Mikrohämatokritzentrifugation, Abnahme des *buffy coats* und Anionen-austauschchromatographie (Nachweisgrenze bis zu 10^2 Parasiten pro ml) [38].

Da sich die Medikation von hämolymphtischem und meningoenzephalitischem Stadium fundamental unterscheidet, muss vor Behandlungsbeginn ein *staging* durchgeführt werden. Dazu wird in der Regel CSF durch Lumbalpunktion entnommen. Eine Gehirninfection wird angenommen, wenn 1) Parasiten im CSF zu finden sind, 2) die Leukozytenkonzentration größer als 5 Zellen pro μl ist [39] oder 3) die Proteinkonzentration über 25mg pro dl liegt [37,40].

Kernspintomographisch kann eine Trypanosomen-induzierte Enzephalitis in T2-gewichteten (wassersensitiven) Sequenzen diagnostiziert werden. Oftmals findet sich zudem eine Vergrößerung der Ventrikelräume [41,42]. Außerdem kann während der Behandlung mit Melarsoprol eine auftretende *post-treatment reactive encephalitis* rechtzeitig erkannt werden. Dieses

Krankheitsbild erfordert ein sofortiges Absetzen der trypanoziden Medikamente und die hochdosierte Gabe von Kortikosteroiden.

In Zukunft könnten neue, sensitivere Verfahren die Diagnostik erleichtern [43]. Sollen diese jedoch in den betroffenen Endemiegebieten zum Einsatz kommen, müssen sie vor allem kostengünstig und unter Feldbedingungen handhabbar sein. So könnten z.B. mit Hilfe von Aptameren konservierte VSG (*variant surface glycoprotein*) - Bereiche erkannt werden [44]. Trypanosomen-spezifische 18S rRNA, *expression site associated genes* und *serum resistance associated genes* könnten mittels PCR oder *loop-mediated isothermal amplification* nachgewiesen werden [43]. Letztere hätte den Vorteil, dass sie mit einer Detektionsgrenze von 1fg DNA sehr empfindlich, gleichzeitig aber methodisch einfach durchzuführen ist [43]. Ferner gibt es Bestrebungen, den CATT durch *lateral flow tests* mit potenteren immundiagnostischen Antigenen zu ersetzen [45]. Die Identifikation von Biomarkern im CSF soll ein sicheres *staging* ermöglichen [46].

4. Prophylaxe und Therapie

Da keine prophylaktische Medikation gegen Trypanosomiasen existiert, ist es ratsam, krankheitsübertragende Tsetse-Fliegen (*Glossina spec.*) durch den Einsatz von Repellents oder Fliegennetzen vom Körper fernzuhalten. In der Vergangenheit wurden mehrere Versuche unternommen, das natürliche Reservoir der Trypanosomen zu reduzieren. So wurden im 20. Jahrhundert mit der großflächigen Waldrodung und der Massenschlachtung von

Wildtieren gute (wenngleich ökologisch bedenkliche) Ergebnisse erzielt [40]. Ab 1940 wurden zudem synthetische Insektizide eingesetzt, um die Tsetse-Fliegenpopulation zu reduzieren [47]. Theoretisch wäre es möglich gewesen, nur die bevorzugten Nischen der Tsetse-Fliegen zu besprühen (d.h. beispielsweise den bodennahen Teil bestimmter Bäume). Meist wurde jedoch eine Aerosol-Sprühtechnik mit Hilfe von Flugzeugen angewandt, wodurch auch andere Tierarten belastet wurden und Umweltgifte in die Nahrungskette gelangten [47]. Aus ökologischen und ethischen Gründen wird heutzutage auf solche Maßnahmen verzichtet. Stattdessen kommen umweltfreundliche Fliegenfallen zum Einsatz, die zudem einfach und kostengünstig anzubringen sind [37]. Auch mit Insektiziden behandelte Nutztiere werden als lebende Fliegenfalle (sog. *live baits*) verwendet. Eine relativ neue Methode der Vektorkontrolle stellt die Ausbringung steriler Männchen dar. Die *sterile insect technique* verhindert Resistenzbildungen, ohne das ökologische Gleichgewicht zu stören [40,47,48]. Allerdings ist ihr Einsatz auf lokal begrenzte Fliegenpopulationen beschränkt, so dass es sich hierbei nur um eine ergänzende Maßnahme handeln kann. Prophylaktisch können Nutztiere mit Trypanoziden behandelt werden, um wirtschaftliche Ausfälle durch die Nagana-Seuche zu verhindern. Allerdings führten zu niedrige Dosierungen und falsche Anwendungen zur Resistenzentwicklung gegen Diminazen, Isometamidium und Homidium [49].

Für den Menschen existieren nur wenige therapeutische Medikamente, die zudem starke Nebenwirkungen haben [50]. In ersten Therapieversuchen griff David Livingstone noch auf Arsen zurück [50], das bald darauf von Thomas und Breindl [51] durch vermeintlich nicht-toxische

Arsenverbindungen wie Arsanilsäure („Atoxyl“) ersetzt wurde. Doch auch bei diesen Substanzen war der therapeutische Nutzen gering und mögliche Nebenwirkungen (wie Erblindung und Tod) schwerwiegend. Im Jahr 1904 synthetisierte Paul Ehrlich den anionischen Diazofarbstoff Trypanblau [52], mit dem Edwin Goldman 1913 die Blut-Hirn-Schranke untersuchte. Wurde Trypanblau in den Spinalkanal von Hunden injiziert, führte dies zu einer Färbung des ZNS, nicht jedoch anderer Organe [53]. Als hoch zytotoxische (und damit natürlich auch trypanozide) Verbindung diente Trypanblau der Firma Bayer als Ausgangssubstanz zur Entwicklung farbloser und weniger giftiger anti-trypanosomaler Medikamente. 1916 wurde „Bayer 205“ unter dem Handelsnamen Germanin® verkauft, dessen Struktur bis zur Offenlegung von Fourneau im Jahr 1924 Betriebsgeheimnis blieb [54]. Danach boten mehrere Firmen ein Generikum unter dem Namen Suramin an. Da Suramin die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht überwindet, eignet es sich lediglich zur Behandlung des hämolymphatischen Stadiums [55].

Unter Paul Ehrlichs Leitung wurde Atoxyl systematisch modifiziert. Der Austausch funktioneller Gruppen und der Einsatz unterschiedlicher Oxidationsstufen des Arsens waren seinerzeit revolutionäre Ansätze der Medikamentenentwicklung [56]. Das auf diese Art synthetisierte Arspenamin (Handelsname Salvarsan®) wurde von der Firma Hoechst 1910 gegen Syphilis vertrieben. Ehrlich schlug vor, Salvarsan auch gegen Trypanosomiasen zu erproben. Da die Applikation jedoch stationär erfolgen musste, und in den Endemiegebieten nur wenige qualifizierte Ärzte zur Verfügung standen, setzte sich Salvarsan zur Behandlung von HAT nicht durch.

Im Jahre 1949 wurde das von Ernst Friedheim entwickelte Melarsoprol (Handelsname Arsobal®) auf dem Markt eingeführt [57]. Dabei handelt es sich um eine Arsen-organische Verbindung des Melamins, die in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und sich daher zur Behandlung des meningoenzephalitischen Stadiums von *T. brucei gambiense* und *T.b.rhodesiense* eignet [58]. Auch diese Substanz induziert zahlreiche Nebenwirkungen wie Fieber, Spasmen, Synkopen, Exantheme, Übelkeit und Erbrechen [59]. Schwere Komplikationen wie die *post-treatment reactive encephalitis* führen bei 5-10% der Patienten zum Tod [60].

Seit den 1980er Jahren wird Difluoromethylornithin (generischer Name Eflornithin) gegen Trypanosomiasen eingesetzt. Der irreversible Inhibitor der Ornithindecaboxylase hemmt die Umsetzung von Ornithin in Putrescin und somit die Synthese von Spermidin, das für den Redoxstoffwechsel von Trypanosomen benötigt wird. Zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies nutzen die Parasiten Trypanothion, bei dem zwei Moleküle Gluthation über Spermidin verbunden sind [50,61]. Cyrus Bacchi konnte zeigen, dass oral aufgenommenes Eflornithin bei *T.b.brucei*-infizierten Mäusen zur vollständigen Genesung führt [62]. Weitere Untersuchungen bestätigten eine hohe Wirksamkeit gegen *T.b.gambiense* [63], nicht jedoch gegen *T.b.rhodesiense*, dessen hohe Syntheserate der Ornithindecaboxylase eine langfristige Hemmung unmöglich macht. Die hohen Herstellungskosten und die hohe therapeutische Dosierung führten dazu, dass die Produktion von Eflornithin zeitweise aus wirtschaftlichen Gründen eingestellt wurde. Erst mit der Markteinführung Eflornithin-haltiger Salben (Handelsname Vaniqa®) zur Behandlung von Hirsutismus wurde die industrielle Produktion wieder

aufgenommen. Die Tatsache, dass ein Mittel, das in Afrika lebensrettend sein könnte, mangels Wirtschaftlichkeit nicht verfügbar war, während in den Industrieländern derselbe Wirkstoff gegen übermäßigen Bartwuchs intensiv beworben wurde, führte zu breiten Diskussionen in Politik und Öffentlichkeit [64].

Um 1960 wurde der Wirkstoff Nifurtimox (Handelsname Lampit®) gegen die von *Trypanosoma cruzi* verursachte Chagas-Krankheit entwickelt. Dieses wird heute in einer Kombinationstherapie mit Eflornithin (*Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy*, NECT) zur Behandlung von HAT eingesetzt [65,66].

Alle aktuell zur Verfügung stehenden Medikamente haben gravierende Nebenwirkungen, weshalb die Patienten während der Applikation ärztlich überwacht werden müssen. Da in Afrika eine stationäre Aufnahme nicht immer möglich ist, ist zudem eine schlechte *compliance* bei wiederholter Medikamentengabe zu erwarten. Die finanzielle Situation der lokalen Bevölkerung ermöglicht oftmals keine adäquate Behandlung und erschwert die Entwicklung neuer Medikamente [67]. So wird HAT zu den am meisten vernachlässigten Krankheiten (*neglected diseases*) gezählt. Bereits heute werden mehr als 90% der weltweiten Forschungsausgaben im Gesundheitswesen für Krankheiten aufgewendet, von denen nur 10% der Weltbevölkerung betroffen sind [68].

B. Trypanosoma brucei

1. Phylogenetische Einordnung

Trypanosomen sind geißeltragende einzellige Eukaryonten der Ordnung Kinetoplastea [69,70,71] (Abbildung 3). Sie besitzen ein langgestrecktes Mitochondrium, in dem sich der namensgebende Kinetoplast befindet. Dabei handelt es sich um eine Anhäufung von fibrillärer DNA (kDNA), die in ringförmige *maxi-* und *minicircles* organisiert ist. Die *maxicircles* kodieren für mitochondriale Proteine, wobei die intermediär entstehende RNA einem posttranskriptionalen *editing* [72] unterliegt, bei dem insbesondere Uridylreste inseriert oder deletiert werden. Hierfür wird die von den *minicircles* gebildete *guide* RNA benötigt, deren Expressionslevel folglich den Editierungsprozess reguliert [73]. Der Kinetoplast ist meist in der Nähe der Geißelbasis positioniert.

Je nach Anzahl der Flagellen werden die Kinetoplastea in die Unterordnungen Trypanosomatida (ein Flagellum) und Bodonida (zwei Flagellen) unterteilt (Abbildung 3). Zu den Trypanosomatida gehören die monophyletischen Gattungen *Leishmania*, *Phytomonas* und *Trypanosoma* [74]. Letztere wiederum untergliedert sich in die beiden Gattungsgruppen *Salivaria* und *Stercoraria* [75]. Die Klassifikation richtet sich nach dem Vermehrungsort im Vektor und damit nach der Übertragungsart. Trypanosomen der *Salivaria*-Gruppe vermehren sich im vorderen Teil des Verdauungstrakts des Vektors. Sie gelangen mit dem Speichel blutsaugender Insekten in den Säugerwirt. Dabei handelt es sich um die Arten *T. brucei* (HAT und Nagana), *T. congolense* (Nagana), *T. vivax* (ebenfalls Nagana), *T. evansi*

(Surra-Seuche) und *T. equiperdum* (Beschälseuche). Die Parasiten der Stercoraria-Gruppe vermehren sich im hinteren Darmabschnitt des Insektenwirts und werden durch die Faeces übertragen. Hierzu gehören mit *T. cruzi* beispielsweise die Erreger der Chagas-Krankheit in Mittel- und Südamerika, die durch Raubwanzen (*Triatoma infestans*) übertragen werden. Weitere Parasiten der Unterordnung Trypanosomatida leben ausschließlich im Darm von Arthropoden, ohne einen Wirtswechsel zu vollziehen. Dies kommt z.B. bei Crithidien vor und dürfte die ursprüngliche Vermehrungsart in der Evolution sein. Komplexe Wechsel zwischen Insekten und Wirbeltieren sind dagegen erst später (und vermutlich mehrfach) entstanden [76].

Innerhalb von *T. brucei* existieren drei Unterarten, von denen *T.b.gambiense* und *T.b.rhodesiense* humanpathogen sind. *T.b.brucei* hingegen infiziert nur Wild- (Antilopen), Nutz- und Haustiere. Auf Grund der

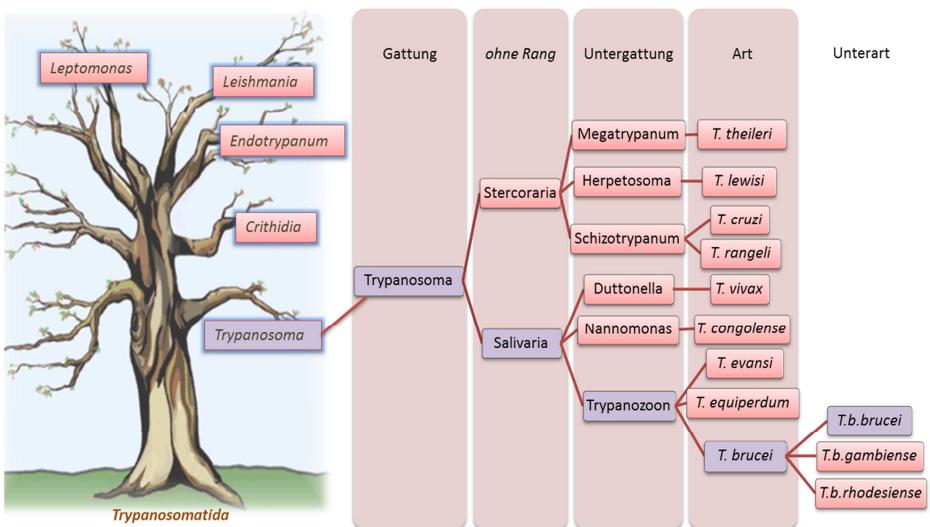


Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von *T.b.brucei*.

großen genetischen Ähnlichkeit zu den humanpathogenen Stämmen und der Infektiosität für Laborratten eignet sich dieser Stamm besonders als Modellorganismus in der Grundlagenforschung. Für diese Arbeit wurden die *T.b.brucei* Stämme AnTat 1.1 (*Antwerp Trypanozoon antigen type*), sowie MiTat 1.2 (*Molteno Institute Trypanozoon antigenic type*) verwendet. Da es sich bei AnTat 1.1 um einen pleomorphen Stamm handelt, dessen Fähigkeit zur Zelldichteregulation und Differenzierung den natürlich vorkommenden Stämmen entspricht, eignet dieser sich besonders zur Langzeitinfektion von Ratten und zur Untersuchung einer Gehirninfection. Der monomorphe Stamm MiTat 1.2 wurde hingegen durch Blutentnahme und intraperitoneale Infektion kontinuierlich von Tier zu Tier (d.h. ohne Wirtswechsel) passagiert und damit auf schnelles Wachstum selektiert. Monomorphe Trypanosomen eignen sich gut zur Kultivierung *in vitro*, „überwachsen“ ein infiziertes Tier jedoch innerhalb weniger Tage und führen somit zu dessen frühem Tod.

2. Morphologie

Afrikanische Trypanosomen sind unizelluläre Parasiten mit einem spindelförmigen Zellkörper (Abbildung 4), dessen Länge zwischen 10 und 40µm variiert. Der Zelldurchmesser beträgt in etwa 3-5µm. Die äußere Gestalt der Parasiten wird durch parallel verlaufende Mikrotubuli stabilisiert. Von den sechs Tubulin-Typen, die ein Zytoskelett ausbilden können, sind δ - und ϵ -Tubulin für Organismen mit Basalkörper und Flagellum charakteristisch [27]. Um einer immunologischen Eradikation zu entgehen, ist die Zellmembran bei Blutform-Trypanosomen von einem dichten VSG-Mantel

umgeben [77]. In prozyklischen Trypanosomen wird das Oberflächenprotein hingegen durch invariantes Procyclin ersetzt [78]. Sowohl VSG, als auch Procyclin werden über Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Moleküle an der Membran fixiert [79,80].

Je nach Ursprung des Flagellums werden trypomastigote und epimastigote Formen unterschieden (Abbildung 16a). Durch den Basalapparat ist das Flagellum im Zytoplasma verankert und entspringt dann der Flagellumtasche. Von hier aus verläuft es zum vorderen Zellende, wo es frei endet und eine Zuggeißel bildet. Dabei ist das Flagellum punktuell über *Maculae adhaerentes* an der Zellmembran befestigt, so dass lichtmikroskopisch der Eindruck einer undulierenden Membran entsteht [81]. Das Flagellum selbst ist aus einem Netzwerk von Filamenten aufgebaut (*paraflagellar rod*), die entlang des Axonems, also der typischen 9·2+2 Anordnung der Mikrotubuli, verlaufen [82]. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die Flagellumtasche der einzige Ort der Endo- und Exozytose [83]. Entsprechend sind in dieser Region zahlreiche *coated vesicles* zu finden, die

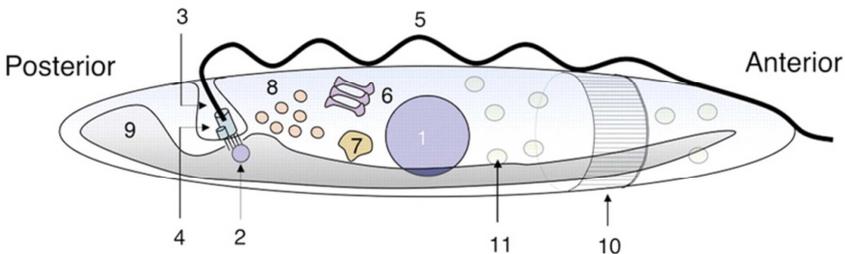


Abbildung 4: Vereinfachte morphologische Darstellung von *T. brucei*. 1=Zellkern, 2=Kinetoplast, 3=Flagellumtasche, 4=Basalkörper, 5=Axonem und *paraflagellar rod*, 6=Golgi-Apparat, 7=Lysosom, 8=Endosom, 9=Mitochondrium. 10=Zytoskelett (Ausschnitt), 11=Glykosom. Abbildung aus [81].

beispielsweise den Transport von neusynthetisiertem und abzubauenem VSG an die Plasmamembran übernehmen. Zusammen mit den VSG-Molekülen werden auf diese Weise auch gebundene Antikörper internalisiert und degradiert [84,85].

Die Parasiten besitzen lediglich ein langgestrecktes Mitochondrium, das sich über die gesamte Zelle erstreckt. In der Nähe des Basalkörpers befindet sich der Kinetoplast, ein Bereich ineinander verflochtener ringförmiger DNA-Moleküle (kDNA), den sogenannten *maxi-* und *minicircles* [86]. Da Blutform-Trypanosomen ihren Energiebedarf ausschließlich durch Glykolyse decken [87], ist ihr Mitochondrium zurückgebildet und weitgehend inaktiv. Im Mitteldarm der Tsetse-Fliege hingegen wird Energie hauptsächlich durch Aminosäureabbau gewonnen [88], weshalb das Mitochondrium in prozyklischen Trypanosomen ausdifferenziert ist und zahlreiche Cristae aufweist.

Neben den für Eukaryonten typischen Organellen besitzen Trypanosomen auf Glykolyse spezialisierte Peroxisomen (sogenannte Glykosomen, vgl. Seite 23ff), sowie Acidocalcisomen, die als Kalzium-Speicher fungieren [89].

3. Lebenszyklus

Die Transmission von Trypanosomen auf Säugetiere erfolgt über die Tsetse-Fliege (*Glossina spec.*) als Zwischenwirt. Dabei handelt es sich nicht um eine rein mechanische Übertragung, sondern einen Teil des komplexen

Lebenszyklus der Parasiten. Diese existieren in unterschiedlichen Stadien [1], um sich sowohl im Blutkreislauf, als auch im Verdauungstrakt der Fliege und schließlich deren Speicheldrüse vermehren zu können. Dabei ändern sich das äußere Erscheinungsbild, die Morphologie des Mitochondriums und zellbiologische und biochemische Eigenschaften (vgl. Seite 16 und 23ff).

Gelangen metazyklische Trypanosomen mit dem gerinnungshemmenden Speichel einer Tsetse-Fliege in den Körper des gebissenen Säugers, so kommt es zu einer lokalen Entzündung des dermalen Bindegewebes. Über diesen Trypanosomen-Schanker verbreiten sich die Parasiten im Lymph- und Blutkreislauf. Nach aktueller Lehrmeinung wandeln sie sich dort spontan in die proliferierende *long slender* Blutform (Abbildung 5A) um, die sich durch binäre Zellteilung mit geschlossener Mitose vermehrt. *Slender* Trypanosomen produzieren Prostaglandin $F_{2\omega}$, das möglicherweise als Wachstumsfaktor fungiert [90]. Gleichzeitig führen sie ein *quorum sensing* durch, indem sie einen niedermolekularen Differenzierungsfaktor sezernieren [91,92]. Ab einer bestimmten Konzentration induziert dieser eine Differenzierung in G1-arretierte *short stumpy* Formen (Abbildung 5C) [93,94]. Diese sind an die Bedingungen präadaptiert, die im Mitteldarm der Tsetse-Fliege herrschen. Sie produzieren Prostaglandin D_2 , das den apoptotischen Zelltod der *stumpy* Formen induziert [95]. Werden die Parasiten nicht innerhalb von 3-4 Tagen von einer Tsetse-Fliege aufgenommen, sterben sie ab. Im Blut verbliebene *slender* Parasiten proliferieren zwischenzeitlich erneut, so dass die Parasitämie einen oszillierenden Verlauf nimmt [21].

Innerhalb des Mitteldarms (und der *Proboscis*) des Insektenvektors entwickeln sich *stumpy* Trypanosomen innerhalb von 48-72h zum

prozyklischen Stadium (Abbildung 5D) [96]. Die Zellen treten wieder in den Zellzyklus ein und wandern nach einigen Tagen durch die peritrophische Membran in den exoperitrophen Raum [97]. Dort entstehen verlängerte mesozyklische Formen, die die peritrophische Membran erneut (diesmal vor dem Proventrikel) durchdringen und entweder über den Ösophagus oder direkt aus der Hämolymphe in die Speicheldrüse gelangen [98]. Während alle anderen Stadien trypomastigot sind, d.h. das Flagellum am Zellende (hinter dem Zellkern) entspringt, entstehen in der Speicheldrüse epimastigote

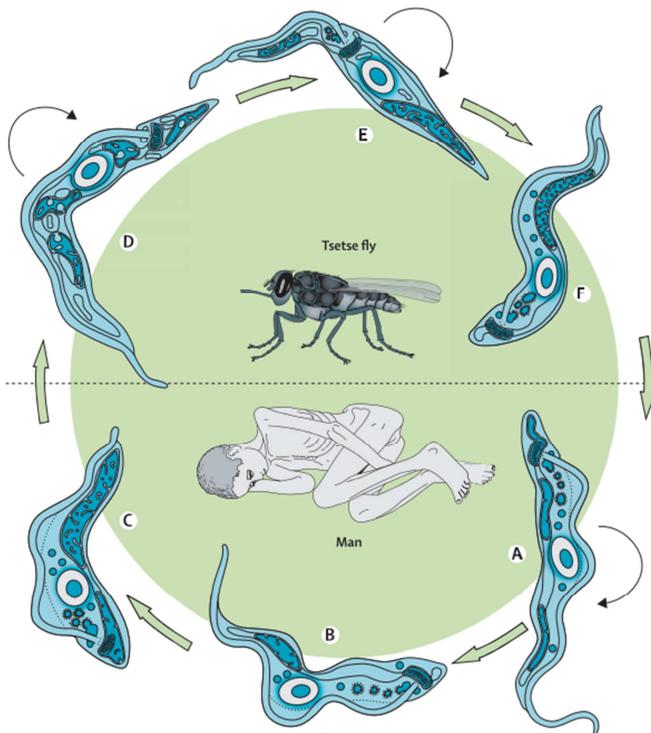


Abbildung 5: Lebenszyklus von *T. brucei*. A=*slender* Blutform, B=*intermediate* Blutform, C=*stumpy* Blutform, D=Prozyklische Mitteldarmform, E=Epimastigote Speicheldrüsenform, F=Metazyklische Form. Abbildung aus [1].

Formen (Abbildung 5E). Bei diesen liegt der Ursprung des Flagellums in der Zellmitte vor dem Zellkern. Die Parasiten heften sich nun am Speicheldrüsenepithel an und entwickeln sich zu metazyklischen Stadien (Abbildung 5F), die für den Menschen infektiös sind [99]. Insgesamt dauert der Entwicklungszyklus in der Fliege zwischen 25 und 50 Tage [33].

4. Antigenvariation

Bereits seit 1905 ist bekannt, dass anti-trypanosomale Antikörper im Blut von HAT-Patienten vorhanden sind. Da die Infektion dadurch nicht limitiert ist, wurde vermutet, dass Trypanosomen einer Antigenvariation unterliegen [100]. Der oszillierende Parasitämie-Verlauf untermauerte die Theorie, wonach jede Welle von Parasiten eines anderen Antigentyps verursacht wird [21]. 1970 konnte schließlich gezeigt werden, dass die Parasiten von einem Oberflächenmantel eines variablen Antigens geschützt sind [101]. Dieses über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Plasmamembran verankerte *variant surface glycoprotein* (VSG) wurde in den darauffolgenden Jahren charakterisiert [80,102]. Jedes Trypanosom ist von etwa 10^7 VSG-Molekülen bedeckt, wodurch invariante Membranproteine immunologisch nicht mehr zugänglich sind und die Zelloberfläche bei physiologischem pH-Wert elektrisch neutral erscheint. Während der Blutmahlzeit einer infizierten Tsetse-Fliege gelangen etwa $2 \cdot 10^4$ Parasiten mit etwa 1-20 verschiedenen VSG-Varianten in die Wunde. Nach 5-10 Tagen bildet der Säugewirt IgM-Antikörper gegen die klonal wachsenden Parasiten

aus. Da die Variationsrate bei pleomorphen Trypanosomen bei rund $2 \cdot 10^{-3}$ Variationen pro Zelle und Generation liegt, existiert zu diesem Zeitpunkt bereits eine Subpopulation, die immunologisch noch nicht erkannt wird [103]. Auf diese Weise wird eine persistierende Infektion sichergestellt, wobei die Parasiten nach konservativen Schätzungen auf ein Repertoire von 1 600 VSG-arrays zurückgreifen können [104].

Mechanistisch basiert die Antigenvariation auf einer komplexen genetischen Rekombination, für die rund 20 VSG *expression sites* (ES), mehrere stille VSG-Gene und viele inkomplette Pseudogene zur Verfügung stehen. Beim Wechsel des Oberflächenmantels muss zunächst eine ES ausgewählt und aktiviert werden. Diese liegen in (sub-) telomeren Bereichen und sind 50-60kb groß. Es handelt es sich hierbei um polycistronische Transkriptionseinheiten, so dass auch zahlreiche *expression site associated genes* (ESAG) von der Antigenvariation betroffen sind. Darunter sind membranständige Proteine im Bereich der Flagellumtasche wie z.B. ein Transferrin-Rezeptor [105]. So könnte der Wechsel einer ES gleichzeitig die Adaptation an den Wirt erleichtern [106]. Als nächstes wird im Rahmen einer Genkonversion eine Kopie eines stillen VSG-Gens in die aktive ES transferiert. Am Telomerenende kann es zusätzlich zu einem reziproken Austausch durch *crossing over* kommen [107]. Außerdem wird die Anzahl verfügbarer VSG-Typen dadurch vervielfacht, dass neue VSG-Gene mosaikartig aus Pseudogenen zusammengesetzt werden [108]. Bei alledem muss stets sichergestellt werden, dass jeweils nur ein VSG-Gen in nur einer VSG *expression site* aktiv ist [77]. Eine Vorhersage über die Reihenfolge der exprimierten VSG-Gene ist nicht möglich, so dass keine Möglichkeit der

Vakzinierung oder passiven Immunisierung infizierter Patienten besteht [109].

Die hier beschriebenen Vorgänge verlaufen nicht zufällig, sondern unterliegen einem bestimmten Muster. Während zu Beginn einer Infektion der Wechsel der ES für die Antigenvariation verantwortlich ist, dominieren in der Folge Genkonversionen von stillen VSG-Genen der Telomerregionen und danach aus internen, subtelomer-gelegenen *arrays*. Zuletzt gewinnt die Rekombination aus Pseudogenen zunehmend an Bedeutung [110]. Welche Faktoren die Antigenvariation auslösen, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass DNA-Doppelstrangbrüche die Expression eines neuen VSG-Typs begünstigen [111].

5. Energiestoffwechsel

Da im Blutsystem schwimmende Trypanosomen stets auf ein Überangebot von Glucose zugreifen können, sind sie nicht auf eine vollständige energetische Verwertung der aufgenommenen Nährstoffe angewiesen. So ist bei Blutform-Trypanosomen das Mitochondrium zurückgebildet; Enzyme des Citratzyklus und Komplexe der Atmungskette werden nicht synthetisiert. mRNA Transkripte der betreffenden Enzyme werden degradiert, bevor eine Translation initiiert wird. Folglich beruht die Energiegewinnung ausschließlich auf Glykolyse, die in spezialisierten Peroxisomen, den sogenannten Glykosomen, abläuft [87,112,113,114] (Abbildung 6). Entstehendes Pyruvat wird wieder ins Blut abgegeben und

mündet so in den Cori-Zyklus des Wirts. Zur Regeneration von NAD innerhalb der Glykosomen wird Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-Phosphat reduziert. Dieses gelangt über einen Shuttlemechanismus aus dem Glykosom und wird von einer Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase an der inneren Mitochondrienmembran zu DHAP re-oxidiert. Die Elektronen werden dabei auf Ubichinon und schließlich von einer Trypanosomen-spezifischen alternativen Oxidase auf Sauerstoff übertragen. Unter anaeroben Bedingungen kann Glycerol-3-Phosphat auch unter ATP-Gewinn in Glycerol umgewandelt werden, welches die Parasiten dann durch Aquaglyceroporine verlässt. Dabei reduziert sich die energetische Nettobilanz jedoch auf ein Molekül ATP pro Molekül Glucose.

Da die alternative Oxidase im Menschen nicht vorkommt, wurde sie lange als potentiell *drug target* angesehen [115]. Eine Inhibition ist beispielsweise mit Salicylhydroxamsäure (SHAM) oder Ascofuranon möglich. Tatsächlich wurde beschrieben, dass Trypanosomiasen in Mäusen mit Ascofuranon geheilt werden können [116].

Der Energiestoffwechsel von *stumpy* Trypanosomen, die an die Tsetse-Fliege präadaptiert sind, ist um Teile des Citratzyklus und der Atmungskette erweitert [88] (Abbildung 6). So konnte gezeigt werden, dass mRNAs respiratorischer Enzyme in *stumpy* Formen langlebiger sind und deshalb vermehrt in Proteine translatiert werden [117]. Das mitochondriale Membranpotential nimmt zu und die Produktion von Succinat kann experimentell bestätigt werden [118]. Außerdem kann der Sauerstoffverbrauch nicht mehr vollständig durch Inhibitoren der alternativen Oxidase gehemmt werden, sondern nur durch den kombinierten

Einsatz von SHAM und Cyanid [119]. In prozyklischen Fliegenformen ist das Mitochondrium schließlich voll ausgereift, so dass der Energiestoffwechsel mit Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette demjenigen anderer eukaryontischer Organismen entspricht. Prolin dient den Parasiten im Mitteldarm der Tsetse-Fliege als einzige Energiequelle.

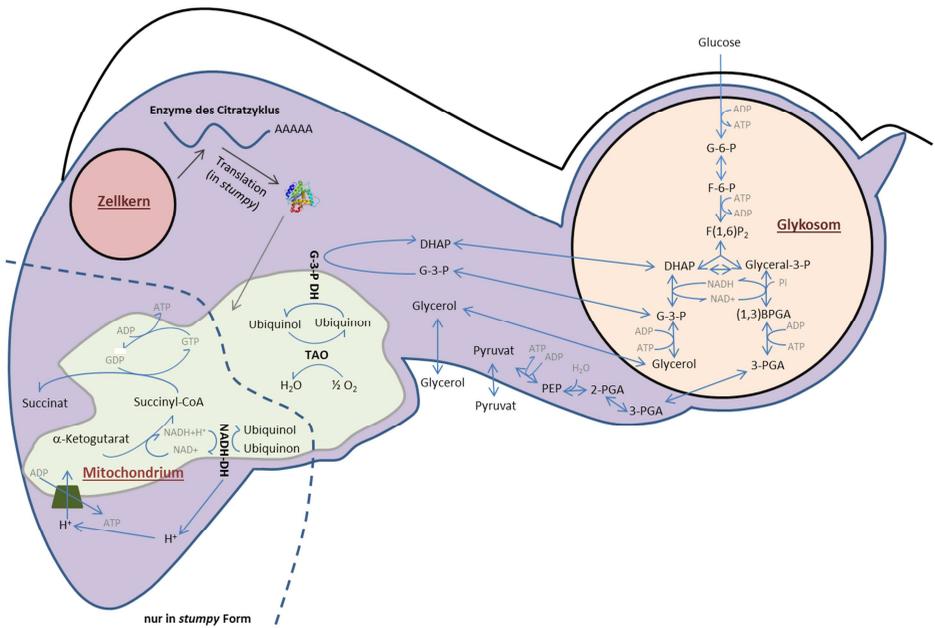


Abbildung 6: Energiestoffwechsel von Blutform-Trypanosomen. Publiziert in [50].

C. Barrieren des zentralen Nervensystems

1. Aufbau der Blut-Hirn-Schranke

Das menschliche Gehirn wird von einem Netz von mehr als 10^{11} Kapillargefäßen, deren Gesamtlänge rund 600km beträgt, durchzogen [120]. Dabei ist der *Cortex cerebri* mit 300 bis 800 Kapillaren pro Quadratmillimeter Gewebsschnitt am dichtesten vaskularisiert [121]. Dies ist nötig, da der Nährstoffbedarf des Gehirns (trotz seines geringen Anteils von 2% an der Körpermasse) rund 20% des Gesamtkörperverbrauchs beträgt. Außerdem ist eine permanente Versorgung mit Glucose und Sauerstoff lebensnotwendig, da Neuronen über keine Nährstoffreserven verfügen und obligat aerob sind. Um das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen zu schützen, bilden die Kapillaren eine physiologische Barriere aus [122,123]. Diese sogenannte Blut-Hirn-Schranke (Abbildung 7) verhindert zudem, dass Änderungen des pH-Werts oder der Kalium-Konzentration des Blutes direkte Auswirkungen auf das Membranpotential der Neuronen haben. Auch im Blut befindliche Neurotransmitter würden die Funktion des Gehirns erheblich stören. Bezüglich ihrer Permeabilität verhält sich die Blut-Hirn-Schranke ähnlich einer Plasmamembran [124,125]. Für makromolekulare, lipophobe (ionische) [126,127], Plasmaprotein-bindende [128] oder bei physiologischen pH-Wert dissoziierte Substanzen ist sie praktisch impermeabel. Aber auch viele lipophile niedermolekulare Substanzen sind nicht gehirngängig. Um die Homöostase des Gehirns dennoch aufrecht zu erhalten, werden Nährstoffe

und Stoffwechselprodukte von einer Reihe selektiver Transportmechanismen zu- bzw. abgeführt [129]. Ein Ausgleich des Wasserhaushaltes wird über Aquaporine realisiert [130]. Die Blut-Hirn-Schranke erstreckt sich auf nahezu alle Gehirnareale mit Ausnahme der Ventrikel und der zirkumventrikulären Organe [131].

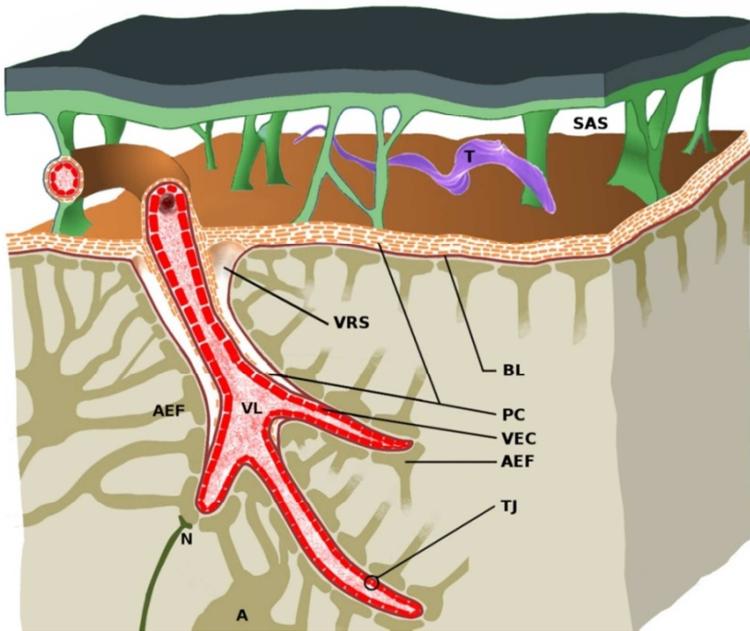


Abbildung 7: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke am Beispiel eines pialen Blutgefäßes, das in das Gehirnparenchym einwandert. Die Basallaminae der Gehirnoberfläche und des Gefäßendothels verlaufen mit dem Gefäß in tiefere Gewebsschichten, bis sie im Bereich der Blut-Hirn-Schranke verschmelzen. Zwischen den Basallaminae liegt ein perivasaler Hohlraum, der Virchow-Robin-Raum [132,133]. Innerhalb des Subarachnoidalraums wird das Gefäß von der *Pia mater* ummantelt. Diese wandert oberflächennah noch in den Virchow-Robin-Raum ein, ist in tieferen Regionen jedoch perforiert und endet mit dem Verschmelzen der Basallaminae. Die Blut-Hirn-Schranke wird von Gefäßendothelzellen, der Basallamina und Astrozytenendfüßen gebildet. A=Astrozyt, AEF=Astrozytenendfuß, BL=Basallamina, N=Neuron, PC=Piazelle, SAS=Subarachnoidalraum, T=Trypanosom, TJ=tight junction, VEC=Gefäßendothelzelle, VL=Gefäßlumen, VRS=Virchow-Robin-Raum. Publiziert in [134].

Wie in Abbildung 7 dargestellt, sind die Blutkapillaren des Gehirns nicht fenestriert. Es handelt sich um ein kontinuierliches Endothel ohne Interzellularspalten, die typischerweise in peripheren Gefäßen auftreten. Ein parazellulärer Stoffaustausch wird zusätzlich dadurch verhindert, dass mehrere Transmembranproteine (wie Occludine, Claudine und *junctional adhesion molecules*) im apikalen Bereich der lateralen Zellwände umlaufende *tight junctions* (*Zonulae occludentes*) ausbilden. Die Expression von Claudin-5 und Claudin-12 führt dabei zur netzförmigen Anordnung der *tight junctions*, wodurch eine mehrstufige Abdichtung entsteht [135]. Darüber hinaus treten weitere Proteine der Claudin-Familie wie beispielsweise Claudin-1 und Claudin-3 auf [136].

Über die aktive Barrierefunktion hinaus ist die nicht-selektive pinozytische Aufnahme von gelösten Substanzen in die Endothelien der Gehirnkapillaren sehr gering [137]. Dies wird als passive Schrankenwirkung bezeichnet. Physikalisch lässt sich die Funktion der Blut-Hirn-Schranke anhand der elektrischen Impedanz quantifizieren. Bei einer gesunden adulten Ratte liegt die Impedanz der Gehirnkapillaren bei $1500\text{-}2000 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$, in peripheren Gefäßen dagegen nur bei $30 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$ [138].

Die Endothelzellen sind polarisiert, so dass sich luminale und apikale Membranproteine deutlich unterscheiden. Durch eine relativ starke Expression von Enzymen (wie z.B. γ -Glutamyltransferase, alkalischer Phosphatase oder Monoaminoxidase) können viele Substanzen bereits vor oder während des Transports durch die Endothelien verstoffwechselt werden. Somit ist die Blut-Hirn-Schranke nicht nur eine physikalische, sondern auch eine metabolische Barriere [139].

Etwa 20% der äußeren Endothelfläche zerebraler Kapillaren ist von Perizyten bedeckt [140]. Diese besitzen kontraktile Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, den Kapillardurchmesser zu ändern und somit lokal den Blutdruck zu regulieren. Außerdem fungieren sie auf Grund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und Antigen-Präsentation als Makrophagen [141]. Zuletzt regulieren sie die Zellteilung und Differenzierung der Endothelien und sind somit eine wichtige Komponente der Angiogenese. Da Perizyten bevorzugt auf den Kontaktstellen zweier Endothelzellen liegen, korreliert der Bedeckungsgrad des Endothels mit Perizyten unmittelbar mit der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke [142].

Apikal der Endothelzellen bzw. Perizyten befindet sich die 50nm starke Basallamina (Abbildung 7) [137]. Diese besteht hauptsächlich aus Kollagen vom Typ IV, Heparinsulfatproteoglykanen, Lamininen und Fibronectin. Die Basallamina ist nur elektronenmikroskopisch sichtbar. Im Lichtmikroskop stellt sie sich zusammen mit den angrenzenden Astrozytenendfüßen als *Glia limitans* dar. Neben der *Glia limitans perivascularis*, die die Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke umgibt, liegt die *Glia limitans superficialis* unterhalb der *Pia mater* und schirmt das Gehirn nach außen (d.h. gegen die *Pia mater* und den Subarachnoidalraum) ab.

Die sternförmig verzweigten Astrozyten, die den Makroglia zugerechnet werden, versorgen die Neuronen mit Nährstoffen und regulieren die extrazelluläre Ionenkonzentration [143]. Sie synthetisieren einen Großteil des im Gehirn vorhandenen Cholesterols, das für die Myelinisierung der axonalen Nervenfasern benötigt wird. Obwohl an der *Glia limitans* liegende Astrozytenendfüße keine direkte Schrankenfunktion besitzen, sind sie für die

Differenzierung der Gefäßendothelien und die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke unabdingbar. So können sie die Permeabilität der Barriere durch Zytokin-Sekretion innerhalb weniger Minuten modulieren [143].

Der aufwändige Aufbau der Blut-Hirn-Schranke führt zwangsläufig dazu, dass eine zelluläre Transmigration äußerst komplex abläuft. So handelt es sich beispielsweise bei der Rekrutierung von T-Lymphozyten in das immunprivilegierte Gehirn um einen mehrstufigen Prozess, der mit der Attraktion über Interleukin 1 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) beginnt (*chemical attraction*). Danach binden die Lymphozyten an Selektine der Gefäßwand, wodurch sie abgebremst werden und nunmehr am Endothel entlangrollen (*rolling adhesion*). Es folgt eine Aktivierung von Integrinen auf der Lymphozytenmembran, die zu einer festen Anheftung an Rezeptoren der Endothelzellen führt (*tight adhesion*). Die T-Zellen wandern am Endothel entlang (*crawling*), bis sie eine geeignete Nische erreichen, an der es zur Diapedese kommt [144,145].

2. Aufbau der Blut-CSF-Schranke

Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) wird im *Plexus choroideus* gebildet und gelangt von dort in die Ventrikelräume (Abbildung 8). Dabei handelt es sich um einen zweistufigen Vorgang. Die Blutgefäße innerhalb des *Plexus choroideus* sind fenestriert und ermöglichen so eine Ultrafiltration des Blutes in das Bindegewebe des Stroma. Die eigentliche Blut-CSF-Schranke wird indes von den Plexusepithelzellen gebildet, die über *tight junctions* verbunden sind.

Da Plexusepithelzellen (im Gegensatz zu den Endothelien der Blut-Hirn-Schranke) eine starke Expression von Claudin-1, Claudin-2 und Claudin-11 zeigen, ergibt sich elektronenmikroskopisch ein paralleler Verlauf der *tight junctions* [146]. Daneben wurden viele weitere Proteine der Claudin-Familie (wie Claudin-6, -9, -19 und -22) in der Blut-CSF-Schranke nachgewiesen [147]. Zwischen Stroma und Plexusepithelzellen verläuft eine Basallamina, die in direkter Kontinuität zur Basallamina der *Glia limitans superficialis* steht [148]. Damit gehen die Bindegewebszellen des Stroma in die Zellen der *Pia mater* über. Eine Transmigration von Pathogenen über das Plexusepithel der Blut-CSF-Schranke wurde sowohl para- als auch transzellulär beschrieben [149,150]. Bei einer täglichen Produktion von 100 bis 150ml in einem erwachsenen Menschen wird das CSF pro Tag etwa drei- bis viermal erneuert. Dabei sind der Glucosegehalt und die Konzentrationen fast aller

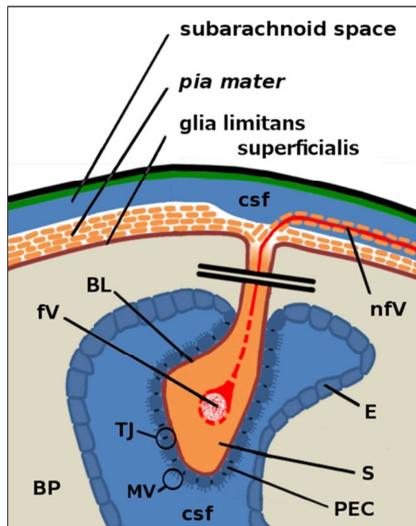


Abbildung 8: Aufbau der Blut-CSF-Schranke. BL=Basallamina, BP=Gehirnparenchym, E=Ependym, fV=fenestriertes Gefäß, MV=Mikrovilli, nFV=nicht-fenestriertes Gefäß, PEC=Plexusepithelzelle, S=Stroma, TJ=tight junction. Publiziert in [134].

Elektrolyte und Aminosäuren im CSF niedriger als im Blutplasma [151]. Eine Ausnahme bilden Magnesium- und Chloridionen, die im CSF höher konzentriert vorliegen. Daraus wird ersichtlich, dass CSF nicht nur als proteinfreies Ultrafiltrat zu verstehen ist, sondern die Zusammensetzung durch aktive Transportprozesse beeinflusst wird [152,153]. Aus den beiden Lateralventrikeln gelangt CSF über das intraventrikuläre Foramen von Monro in den dritten Ventrikel, danach über das Sylvius-Äquodukt in den vierten Ventrikel. Dieser steht über das Foramen von Magendie in Kontakt mit der *Cisterna magna*. Die Verbindung zum äußeren Liquor- bzw. Subarachnoidalraum wird sowohl über die *Cisterna magna* hergestellt, als auch über das Foramen von Luschka, das dem vierten Ventrikel entspringt [154] (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 34). Unterhalb der Schädelkalotte befinden sich *Granulationes arachnoideales*, in denen überschüssiges CSF resorbiert wird [155]. Dabei handelt es sich um gefäßfreie Ausstülpungen der *Arachnoidea mater*, die sich durch Lücken der *Dura mater* in die oberflächlichen Hirnvenen oder in den *Dura*-ummantelten Hirnsinus ziehen. Ähnlich einem Ventil ermöglichen die *Granulationes arachnoideales* einen unidirektionalen Fluss, bei dem eine CSF Absorption erst erfolgt, wenn der subarachnoidale Druck einen bestimmten Grenzwert übersteigt [156].

Die schwimmende Lagerung des Gehirns ist wohl aus mehreren Gründen notwendig. Einerseits können auf diese Weise Traumata durch plötzlich auftretende Beschleunigung oder Verzögerung verhindert werden, andererseits verhindert der entstehende Auftrieb eine Deformation des Gehirns aufgrund seines Eigengewichts. Darüber hinaus könnten geringfügige Volumenänderungen des Gehirns (beispielsweise durch entzündliche

Schwellung) leicht zur intrakraniellen Druckerhöhung führen. Dem wird durch Resorption von CSF entgegengewirkt. Als weitere Aufgaben des CSF sind die Nährstoffversorgung und Abführung von Stoffwechselprodukten zu nennen. Da in das CSF sezernierte Substanzen leicht über die gesamte Gehirnoberfläche verteilt werden können, wird diskutiert, inwieweit CSF für die hormonelle Signaltransduktion innerhalb des Gehirns benötigt wird [156].

Die Ventrikelräume werden von Ependymzellen ausgekleidet. Diese sind durch *Zonulae adhaerentes*, nicht jedoch durch *tight junctions* verbunden, [157] und besitzen keine unterliegende Basallamina (Abbildung 8). Diese zusätzliche Barriere zwischen Ventrikel und CSF ist aufgrund der Permeabilität der Blut-CSF-Schranke notwendig. Durch die Kombination von Plexusepithel und Ependym sind an die Ventrikel angrenzende Gehirnareale ähnlich gut geschützt wie durch die Blut-Hirn-Schranke.

Im medialen Teil der Ventrikelwände befinden sich die unpaarig angelegten zirkumventrikulären Organe (ZVO). Bis auf das *Organum subcommissurale* verfügen sie nicht über eine Blut-Hirn-Schranke, sondern ähneln in ihrem Aufbau der Blut-CSF-Schranke [131]. Notwendig ist dies, da sie neuroendokrine Hormone ins Blut sezernieren und eine sensorische Funktion erfüllen. So produziert die Zirbeldrüse (*Epiphyse*) im zirkadianen Rhythmus Melatonin, die *Eminentia mediana* sezerniert Neuropeptide und die Neurohypophyse das antidiuretische Hormon und Oxytocin. Andere ZVO müssen auf Stoffe reagieren, die im Blut zirkulieren. Das *Organum vasculosum laminae terminalis* ist beispielsweise an der Regulation von Durst, Hunger und Fieber beteiligt, das *Organum subfornicale* reagiert auf Angiotensin II zur Steuerung des Salz- und Wasserhaushalts. Auch für die

Funktion des Brechzentrums (*Area postrema*) ist es notwendig, potentielle Toxine im Blut zu erkennen. Um diese Aufgaben erfüllen zu können, benötigen die ZVO fenestrierte Kapillaren, wie sie auch im *Plexus choroideus* zu finden sind. Die Barriere zum angrenzenden Gehirnparenchym wird hier von spezialisierten Ependymzellen hergestellt. Dabei handelt es sich um sogenannte Tanyzyten, die durch *tight junctions* verbunden sind und die ZVO umgeben.

3. Gehirninfection von *Trypanosoma brucei*

Bereits 1903 wurden Trypanosomen im CSF HAT-infizierter Patienten nachgewiesen [13]. Passend dazu wurde 1937 erstmals eine Beteiligung des *Plexus choroideus*, der für die CSF Produktion verantwortlich ist, diskutiert [158]. Damit wurde bereits sehr früh in Betracht gezogen, dass Trypanosomen über die Blut-CSF-Schranke in das Gehirn gelangen (Abbildung 9, rechte Box). Andererseits wurde später berichtet, dass zerebrale Trypanosomiasen mit einer diffusen chronischen mononukleären Meningoenzephalitis einhergehen [159]. Außerdem wurde bei Autopsien perivaskuläres *cuffing* in tiefergelegenen Bereichen der weißen Substanz (*Substantia alba*) beschrieben [159]. Auch Gliosen [160] und Hämorrhagien [161] treten auf, ebenso wie subkortikale perivaskuläre Demyelinisierung [159]. Kernspintomographisch zeigen sich in T2-gewichteten Sequenzen hyperintense Signale in der weißen Substanz [41,42]. Dabei handelte es sich um Ödeme und Einblutungen, die typisch für eine Leukoenzephalitis sind. Darüber hinaus wurden auch Läsionen in der grauen Substanz, dem Kleinhirn

und Hirnstamm gefunden [162]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Trypanosomen die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Abbildung 9, linke Box). Alle Studien sind jedoch dadurch limitiert, dass humane Gehirnproben nur *post-mortem* untersucht werden können. Hinzu kommt, dass eine Autopsie in den Endemiegebieten (sofern sie überhaupt durchgeführt wird) unmittelbar nach Todeseintritt erfolgen müsste, um noch Parasiten *in situ* nachweisen zu können. Somit konnte der Infektionsverlauf, bzw. der Weg, über den die Parasiten in ZNS invadieren, nie eingehend anhand von Patientenmaterial untersucht werden. Es existieren praktisch keine histologischen Publikationen, die Trypanosomen im menschlichen Gehirn zeigen [160].

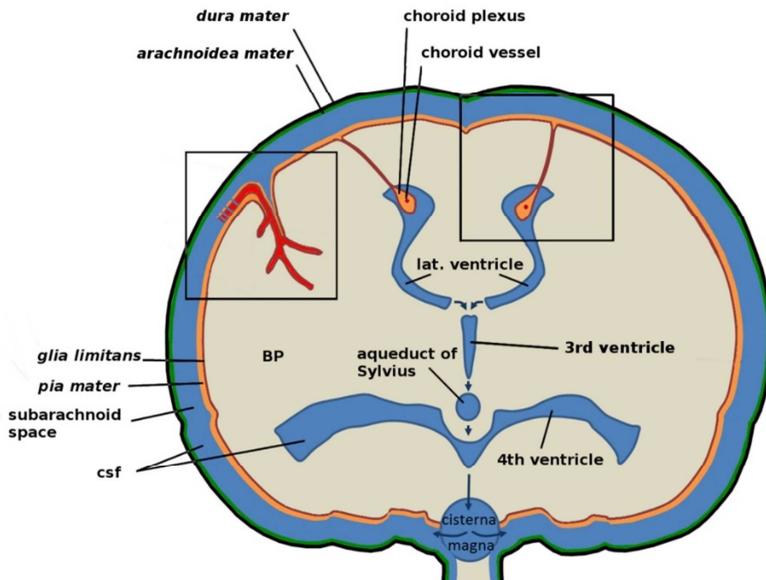


Abbildung 9: Coronale Projektion des Gehirns, bei der die Ventrikelräume in einer Ebene dargestellt sind. Die markierten Ausschnitte werden in Abbildung 7 (Blut-Hirn-Schranke) und Abbildung 8 (Blut-CSF-Schranke) vergrößert dargestellt. BP=Gehirnparenchym, Pfeile=Flussrichtung des Liquors. Publiziert in [134].

Deshalb wurden zahlreiche Versuche unternommen, Trypanosomiasen im Tiermodell zu studieren.

In der Mehrzahl der tierexperimentellen Arbeiten mit *T.b.brucei* [163], *T.evansi* [164,165] und *T.b.rhodesiense* [166] konnten Trypanosomen nach 21-63 Tagen *post-infectionem* im Gehirn nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Entwicklung topisch wirksamer (und daher nebenwirkungsarmer) Medikamente ist die entscheidende Fragestellung, ob die Parasiten gleichermaßen über die Blut-Hirn-, als auch über die Blut-CSF-Schranke migrieren. Beide Wege werden in der Literatur diskutiert.

Dafür, dass Trypanosomen über die Blut-Hirn-Schranke in das neuronale Gewebe eindringen [167,168,169] spricht, dass sich die Parasiten perivaskulär der zerebralen Blutgefäße nachweisen lassen. Dies ist vor allem in der weißen, aber auch in der grauen Substanz zu beobachten [163,170]. Wurden Ratten intravenös mit einer hohen Dosis fluoreszenzmarkierter Trypanosomen infiziert, wurden perivaskuläre Parasiten sogar innerhalb weniger Stunden detektiert [171]. Allerdings weisen die Autoren darauf hin, dass die Parasiten nicht notwendigerweise die Blut-Hirn-Schranke überwunden hatten. Stattdessen könnten sie ebenso aus dem Subarachnoidalraum stammen, und sich von dort aus über die Virchow-Robin-Räume verteilen. Andererseits könnte eine Transmigration durch das Gefäßendothel der Blut-Hirn-Schranke durch die proteolytische Öffnung der *tight junctions* erklärt werden [167]. Tatsächlich exprimieren Trypanosomen einige Enzyme, die eine Möglichkeit zur Gewebeinvasion bieten. Dazu zählen *major surface metalloproteases* (MSP) [172], Oligopeptidasen oder Cysteinproteasen wie beispielsweise Brucipain [167]. Die Permeabilität der Basalmembran

wiederum wird durch ihre Lamininzusammensetzung bestimmt. Während Trypanosomen (und Leukozyten) Laminin $\alpha 4$ überwinden können, gelingt dies nicht bei Laminin $\alpha 5$ [169]. Eine Annäherung an Gefäßendothelien könnte durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (wie ICAM-1 und VCAM-1) im Infektionsverlauf erleichtert werden. In *in vitro* Experimenten zeigte sich, dass *T.b.gambiense* Endothel-aktivierende Faktoren sezerniert [173]. Auch eine Zytokin-vermittelte Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke wurde diskutiert [163]. Dabei könnte es sich um eine Interaktionen zwischen den Parasiten, dem Immunsystem des Wirts sowie den zellulären und extrazellulären Komponenten der Blut-Hirn-Schranke handeln [163,174]. Wie für die Invasion von Leukozyten in das ZNS [145] wird auch für Trypanosomen sowohl eine trans-, als auch eine parazelluläre Migration diskutiert [175]. Zuletzt ist auch denkbar, dass die Transmigration der Parasiten zusammen mit Leukozyten erfolgt. Das Medikament Minocyclin ist als Inhibitor der Leukozyten-Passage über die Blut-Hirn-Schranke bekannt. Es wurde gezeigt, dass dieses gleichermaßen auch die Migration der Parasiten über Gefäßendothelien verhindert [173].

In *in vitro* Modellen wurde die Blut-Hirn-Schranke artifiziell nachgebildet. Dafür wurden *brain microendothelial cells* auf kollagenbeschichteten *transwell* Filtersystemen kultiviert. *T.b.gambiense* konnte die künstliche Barriere wesentlich schneller überwinden als *T.b.brucei*, wobei eine deutliche Abnahme der elektrischen Impedanz auftrat. Prozyklische Formen konnten die Barriere indes weder durchdringen, noch sind sie in der Lage, sich an das Gefäßendothel anzuheften [173,176]. Als möglicher Mechanismus der

Transmigration wurde angenommen, dass Trypanosomen Brucipain sezernieren. In der Folge soll ein Protease-aktivierbarer G-Protein gekoppelter Rezeptor das extrazelluläre Signal in die Endothelzellen transduzieren. Über Phospholipase C würde Inositoltriphosphat freigesetzt, das zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt. Die folgende Aktivierung der Proteinkinase C und der Myosin-Leichtketten-Kinase sollen zu Änderungen des Zytoskeletts führen, bei der *tight junctions* geöffnet werden. Auch eine Beteiligung der GTPase RhoA und deren Einfluss auf zelluläre Aktinfilamente wurde in diesen Zusammenhang diskutiert [174].

Doch obwohl es Anzeichen dafür gibt, dass Trypanosomen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, spricht vieles dafür, dass ins Gehirnparenchym invadierte Trypanosomen dort nicht überleben können. Um dies zu untersuchen wurden Trypanosomen entweder direkt in das Gehirnparenchym abgestillter und nicht abgestillter Mäuse injiziert [177], oder die Blut-Hirn-Schranke zuvor infizierter Tiere mechanisch zerstört [178]. Zunächst konnten die Parasiten in der Nähe des Einstichkanals (oder der traumatischen Läsion) nachgewiesen werden. In den drauffolgenden Tagen degenerierten sie jedoch und waren schließlich nicht mehr auffindbar [177].

Ein Durchtritt der Parasiten über die Blut-CSF-Schranke [179,180,181] und die Barriere der ZVO [182] wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben. So wurden CSF-Infektionen und inflammatorische Infiltrate in Ventrikelnähe in *T.rhodesiense*-infizierten grünen Meerkatzen nachgewiesen [183]. Im weiteren Infektionsverlauf traten die Trypanosomen außerdem im Subarachnoidalraum und den damit in Kontakt stehenden Virchow-Robin-Räumen auf. In Experimenten mit Ziegen wurden im Stroma des *Plexus*

choroideus Hyperämien, Ödeme und Lymphozytenakkumulationen gefunden. Lichtmikroskopisch stellte sich im Verlauf der Infektion eine Degeneration des Plexusepithels dar, bei der die Epithelzellen separiert und die *tight junctions* geöffnet waren [184].

Dies legt einen Infektionsmechanismus nahe, bei dem sich die Trypanosomen zunächst in der Blutbahn befinden, von wo aus sie in das Stroma des *Plexus choroideus* und in die ZVO gelangen [185]. Hier könnten sie eine inflammatorische Reaktion auslösen, die die Migration der Trypanosomen in CSF und in weitere zerebralen Strukturen ermöglicht [179]. Der *trypanosome lymphocyte-triggering factor* induziert die Produktion von Interferon γ (IFN- γ) im Rahmen einer Immunantwort auf eine Infektion des *Plexus choroideus* [186]. Eine Erhöhung der IFN- γ Konzentration führt daraufhin zur Aktivierung von Makrophagen, die wiederum Interleukine, TNF- α und Stickstoffmonoxid sezernieren. Tatsächlich wurden in *T.b.rhodesiense*-infizierten grünen Meerkatzen erhöhte Konzentrationen von Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- α im CSF nachgewiesen, was eine Modulation der Blut-Hirn-Schranke erklären könnte [187]. Außerdem führt IFN- γ zur Expression des Chemokinliganden CXCL-10 in perivasalen Astrozyten. Damit erleichtert es die Passage von Lymphozyten und Trypanosomen ins Gehirn. Diese Theorie wurde dadurch untermauert, dass in CXCL-10-defizienten Mäusen eine deutlich verminderte ZNS Infektion nachweisbar war [179]. In IFN- γ Rezeptor-defizienten Mäusen können Trypanosomen nicht in das ZNS invadieren [163]. Somit ist der Effekt von IFN- γ durchaus ambivalent. Einerseits aktiviert es die Immunantwort des Wirts, aber andererseits ermöglicht es erst das Auftreten einer

Gehirninfektion [169]. Auch eine erhöhte Kinin-Konzentration im Blut wurde im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität diskutiert [188,189,190].

Eine ausführliche, morphologische Beschreibung von Trypanosomen im meningoenzephalitischen Stadium erfolgte bislang nicht. Vereinzelt wurden sehr dünne, teilweise verlängerte [170] Trypanosomen beschrieben. Das Auftreten von amastigoten Formen [191] wurde in anderen experimentellen Ansätzen nicht bestätigt [180].

Die Entstehung der Krankheitssymptome des meningoenzephalitischen Stadiums durch Trypanosomen ist bis heute nicht abschließend geklärt [192]. Neurologische Symptome könnten sowohl durch sezernierte Faktoren der Parasiten, durch das Immunsystem des Wirts oder durch eine gegenseitige Modulation verursacht werden [179]. Auch für *T.b.brucei*-infizierte Ratten wurde eine Deregulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beschrieben [193,194,195]. Unmittelbar ursächlich könnte die Besiedelung der Zirbeldrüse durch Trypanosomen und deren Sekretion von Schlafinduktoren wie Prostaglandin D₂ [196,197] und Tryptophol [198,199,200] sein. Aber auch sekundäre Effekte auf die Zytokinausschüttung führen sicherlich zu Störungen der zirkadianen Rhythmik [179]. Bei Trypanosomiasen treten eine Reihe hormoneller Veränderungen auf. Betroffen sind Wachstumshormone, Kortisol- und Prolaktinspiegel, Plasmareninaktivität, und das klassische Schlafhormon Melatonin [201,202]. Die photooptische Kalibrierung des Schlaf-Wach-Rhythmus findet im *Nucleus suprachiasmaticus* des Hypothalamus statt. Über den Neurotransmitter Glutamat wird die Synthese des nukleären Phosphoproteins *c-fos* induziert. In *T.b.brucei*-infizierten

Ratten konnte eine *down*-Regulation der Glutamatrezeptoren und entsprechend eine erniedrigte *c-fos* Konzentration nachgewiesen werden [201]. Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch IFN- γ ausgelöst wird. Zusätzlich hat auch TNF- α einen Einfluss auf den Schlafrhythmus [203]. Zuletzt führt die Zytokin-vermittelte Bildung von Stickstoffmonoxid nicht nur zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch zur verstärkten Synthese schlafinduzierender Prostaglandine [159].

Das Auftreten von Verwirrungszuständen, Koordinationsschwierigkeiten und Sinnesstörungen könnte teilweise auch durch eine gesteigerte Immunantwort erklärt werden, bei der Antikörper gegen körpereigene Strukturen gebildet werden [204]. So finden sich im Liquor von HAT-Patienten Antikörper gegen Galactocerebroside und Neurofilamente, die eine Demyelinisierung des Nervengewebes zur Folge haben [159]. Ein direkter zytotoxischer Effekt der Trypanosomen ist eher unwahrscheinlich, da alle HAT Symptome nach erfolgreicher Therapie reversibel sind. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass Trypanosomen alleine keine Auswirkung auf die Funktion zentralnervöser Kulturen haben [205].

D. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Afrikanische Schlafkrankheit seit mehr als einem Jahrhundert Forschungsgegenstand ist, konnte nie abschließend geklärt werden, auf welchem Weg eine Invasion der Parasiten in das ZNS erfolgt. Bis heute werden sowohl die Transmigration über die Blut-Hirn-Schranke [171,173,206,207], als auch über die Blut-CSF-Schranke [180,183,208,209] als Möglichkeit in Betracht gezogen. In parasitologischen Lehrbüchern wird entsprechend undifferenziert das Auftreten einer Gehirninfection beschrieben [210]. Dabei wird außer Acht gelassen, dass unterschiedliche Bereiche des Gehirns von verschiedenen permeablen Barrieren geschützt sind. Besonders prominent ist die Blut-Hirn-Schranke, die das Gehirnparenchym nach außen und zu den Blutgefäßen hin abschirmt. Eine Transmigration über die Blut-CSF-Schranke würde dagegen zur Invasion der Parasiten in die Liquor-gefüllten Ventrikelräume und in den Subarachnoidalraum führen. Obwohl auch diese Kompartimente anatomisch dem Gehirn zuzuordnen sind, befinden sie sich funktional außerhalb des Gehirnparenchyms. Da die bislang vorhandenen Chemotherapeutika zur Behandlung des zweiten Infektionsstadiums die Blut-Hirn-Schranke überwinden, sind sie zwar wirksam, doch mit starken Nebenwirkungen behaftet. Eine genaue Kenntnis des Infektionsweges von Trypanosomen erscheint unabdingbar, um topische und damit schonende Medikamente und Applikationsarten zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection von *Trypanosoma brucei* im Wistar-Rattenmodell: Es sollte untersucht werden, in welchen Gehirnarealen die Parasiten bei einer natürlich verlaufenden Infektion auftreten. Außerdem sollte mittels artifiziell

gesetzter Infektionen die Überlebensfähigkeit von Trypanosomen in Gehirnparenchym und Ventrikelsystem untersucht werden. Der Infektionsweg war mittels geeigneten mikroskopischen Verfahren darzustellen. Voraussetzung hierfür war die Erprobung unterschiedlicher Detektionsmethoden mit dem Ziel, eine Aussage über Ort, Morphologie und Integrität der Parasiten zu erhalten. Ferner sollten Parasiten aus dem Gehirn isoliert und bezüglich ihrer Morphologie und ihres Schwimmverhaltens mit Trypanosomen aus dem Blut verglichen werden. Als sich abzeichnete, dass der Infektionsweg über die Blut-CSF-Schranke verlief, wurde die Fragestellung dahingehend erweitert, Parasiten durch CSF-Punktion zu erhalten und den zeitlichen Verlauf der CSF-Infektion zu charakterisieren. Außerdem sollten Methoden erprobt werden, die Transmigration durch das Plexusepithel und mögliche Wechselwirkungen mit Claudin-11 zu untersuchen. Die Fähigkeit von Trypanosomen, den Blutkreislauf zu verlassen, warf zuletzt die Frage auf, inwieweit eine Infiltration in andere Organe auftrat. Dies wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

II. Material und Methoden

A. Material

1. Tiere und Zelllinien

Tiere

Wistar Han™	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande
HsdWin:NMRI	Harlan Laboratories, Horst, Niederlande

Zelllinien

AnTat 1.1	Prof. Dr. George Cross, Rockefeller-Univ.
Astrozyten	Hertie-Institut, Tübingen
Fibroblasten (MEF)	<i>Microtus montanus embryonic fibroblasts</i>
HIBCPP	Prof. Dr. med. Horst Schroten, Mannheim
Max Efficiency® DH10Bac™	Invitrogen®, Karlsruhe
MiTat 1.2 antigenic type 221	Prof. Dr. George Cross, Rockefeller-Univ.
One Shot® Top10	Invitrogen®, Karlsruhe
PCPEC	Prof. Dr. med. Horst Schroten, Mannheim
Prozyklische Trypanosomen	Prof. Dr. George Cross, Rockefeller-Univ.
SF9 cells	Invitrogen®, Karlsruhe

2. Laborgeräte und Instrumente

Geräte

Brutschrank 37°C	Infors, Bottmingen, Schweiz
ClinScan®	Bruker, Billerica, USA
CO ₂ -Brutschrank, HERA Cell	Heraeus, Osterode
Critical point dryer CPD020	Balzers Union
Cryomicrotom HM505E	Microm International®, Walldorf
ELISA Reader MRX II	Dynex Technologies, Chantilli, USA
FACScan™	BD Biosciences®, Heidelberg
FastGene™ GelPic Imaging System	Nippon Genetics, Düren
Mikroskop BH2-RFCA	Olympus, Hamburg
Gelkammer Blue Marine 100	Serva, Heidelberg

Material und Methoden

GenePulser XCell	Bio-Rad, München
GeneQuant 1300	GE Healthcare, Chalfont St Giles, England
Hämozytometer (0.02 mm)	Brand, Wertheim
Heizblock neoBlock I	neoLab, Heidelberg
Horizontal Capillary Puller	Narishige scient. instruments, Tokyo, Japan
Invertmikroskop ID02	Zeiss, Oberkochen
Isofluran Vapor 19.1	Dräger, Lübeck
Kühlzentrifuge Sigma 3K12	Bachofer, Reutlingen
LaminAir HLB 2248 GS	Heraeus, Hanau
LightCycler 480	Roche, Mannheim
Microtom HM335E	Microm International®, Walldorf
Mikroskopkamera F-view II	Olympus® Soft Imaging System GmbH
Mikrozentrifuge HeraeusPico 17	Thermo Fisher, Waltham, USA
pH Meter	WTW, Weilheim
Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg
Pump 11 Elite	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Pyramitome 11800	LKB Ultramicrotome Laboratory
REM Stereoscan 250 Mk2	Cambridge Scientific
Schüttler DOS-10L	neolab, Heidelberg
Stereotakter	Narishige scient. instruments, Tokyo, Japan
TEM EM10	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom OM U3C	Reichert, Wien, Österreich
UnoCycler	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex Mixer	neolab, Heidelberg
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt

Instrumente

Anatomische Pinzette	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Chirurgische Pinzette	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Klemme, 30mm Länge	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Organhaltepinzette	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Skalpell Nr. 23	BBraun, Melsungen
Slight curved scissor, 18mm	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Slight curved scissor, 30mm	F.S.T.® Fine science tools, Heidelberg
Spatel, 3mm Breite	VWR International GmbH, Darmstadt
Stereotakter SR-5R	Narishige scient. instruments, Tokyo, Japan
Wundspeizer	BBraun, Melsungen

3. Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Materialien und Einwegartikel

50µl Mikroliter-Spritze	Hamilton Messtechnik GmbH, Hoechst
6/24-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
APS-Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
BEEM®-Blocks	Plano GmbH, Marburg
Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Einbettkassetten f. Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvette 2mm	BioRad Laboratories, München
Falcon tube (15ml/50ml)	Greiner, Frickenhausen
Filterpapier-Blättchen 9cm	VWR International GmbH, Darmstadt
Glaskapillare	VWR International GmbH, Darmstadt
Glastrichter	VWR International GmbH, Darmstadt
Hybond™ - ECL™ Nitrocellulose	Amersham Biosciences, Freiburg
Kanüle, 17/30 gauge	BBraun, Melsungen
Kulturflehen T-25, T-75, T-125	Greiner, Frickenhausen
Kupfergrid, 400mesh	Plano GmbH, Marburg
Küvetten 100µl	Sarstedt, Nümbrecht
Luer Lok™ Spritze (1ml/10ml)	BD Biosciences®, Heidelberg
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (immunoGrade)	Carl Roth, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer 0,02mm	Brand, Wertheim
Parafilm	Peching Plastic Packing, Menasha, USA
R7M-H Alleinfutter	ssniff Spezialitäten GmbH, Soest
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rotilabo® Impföse	Carl Roth, Karlsruhe
Sterile Pasteurpipette	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter 0,2µm	Nalge, Herford, USA
transwell-Filter, 4µm	Corning, New York, USA
Whatman®-Papier	Whatman, Maidstone, USA
Zellschaber 25cm	Greiner, Frickenhausen

Kits

HotStarTaq MasterMix	QIAGEN®, Hilden
Omniscript Rev. Transcription	QIAGEN®, Hilden
QIAprep Blood and Tissue	QIAGEN®, Hilden
QIAprep Spin miniprep	QIAGEN®, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN®, Hilden
QTracker® 605 Cell Labeling	Invitrogen®, Karlsruhe
Rat IgG total ELISA Ready-SET-GO ^d	eBioscience®, Frankfurt am Main
RNeasy Mini Kit	QIAGEN®, Hilden

Enzyme

BamHI	Fermentas, St.Leon-Rot
HindIII	Fermentas, St.Leon-Rot
NotI	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot

Chemikalien

Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich, München
Cellfectin™	Invitrogen®, Karlsruhe
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, München
CountBright™ Absolute Counting Beads	Invitrogen®, Karlsruhe
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, München
DNA Ladepuffer	Fermentas, St.Leon-Rot
Eponharz	Sigma-Aldrich, München
Ethanol, p.a.	Sigma-Aldrich, München
Formalin 10%	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen®, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma-Aldrich, München
Giemsa-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, München
Glycerol p.a.	Sigma-Aldrich, München
Hygromycin	Sigma-Aldrich, München
(in-)kompl. Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich, München
Isofluran	Sigma-Aldrich, München

Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Ketamin	Sigma-Aldrich, München
<i>Low melting</i> Agarose Typ VII	Carl Roth, Karlsruhe
Magnevist®	Schering AG, Berlin
Maxima® SYBR-Green	Thermo Fisher, Waltham, USA
Methanol p.a.	Sigma-Aldrich, München
Midori Green Advance	Nippon Genetics, Düren
Natriumhypochlorit	Sigma-Aldrich, München
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, München
Paraffin	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin-Alexa Fluor 488	Invitrogen®, Karlsruhe
Phospholipase C	Sigma-Aldrich, München
Prolong® antifade gold	Invitrogen®, Karlsruhe
Propylenoxid	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
Quecksilber-II-Chlorid	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Roti®-Load I	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Mount	Carl Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Thermo Fisher, Waltham, USA
Toluol p.a.	Sigma-Aldrich, München
Triton	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, München
Xylazin	Sigma-Aldrich, München
Xylol p.a.	Sigma-Aldrich, München

Antikörper

<i>rabbit</i> anti-Tb VSG221	Prof. Dr. Michael Duszenko, Univ. Tübingen
<i>rabbit</i> anti-Tb Prostagandin F Synthase	Prof. Dr. Bruno Kubata, Osaka Bioscience Institute, Japan
<i>rabbit</i> anti-Claudin 11	antibodies-online GmbH, Aachen
<i>donkey</i> anti- <i>rabbit</i> Alexa Fluor 594	antibodies-online GmbH, Aachen

4. Primer und Plasmide

Primer

Invitrogen®, Karlsruhe		
mCherry <i>sense</i>	5'-AAGCTTATGGTGAGCAAGGGCG-3'	52°C
mCherry <i>antisense</i>	5'-GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	56°C
RnClaudin-11 <i>sense</i>	5'-GGATCCATGGTAGCCACTTGCCGT-3'	67°C
RnClaudin-11 <i>antisense</i>	5'-AAGCTTTTAGACATGGGCACTCTTGG-3'	64°C
TbAOX <i>sense</i>	5'-AAACGGCCTCGTTGATACAC-3'	60°C
TbAOX <i>antisense</i>	5'-TGCTGAGGTTCCAGTACACG-3'	60°C

Biomol, Hamburg		
RnGAPDH <i>sense</i>	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	58°C
RnGAPDH <i>antisense</i>	5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'	58°C

Plasmide

pAAV-MCS-mCherry	Addgene, Cambridge, USA
pCR2.1	Invitrogen®, Karlsruhe
pFastBac1	Invitrogen®, Karlsruhe
pHD309-HYG-PUR	Addgene, Cambridge, USA

5. Medien, Puffer und Lösungen

blocking Lösung (Western blot)

Milchpulver	10% in 2x PBS	Sigma-Aldrich, München
-------------	---------------	------------------------

Cacodylatpuffer 2x pH 7,4 (Elektronenmikroskopie)

Natriumcacodylat	200mM	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	234mM	Sigma-Aldrich, München

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

Natriumcitrat	102mM	Sigma-Aldrich, München
Glucose	40mM	Sigma-Aldrich, München

EBSS pH 7,4 (*Earle's balanced salt solution*)

Glucose	5,6mM	Sigma-Aldrich, München
Kalziumchlorid	1,8mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	5,3mM	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat	0,8mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumbicarbonat	26mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	117mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat	1mM	Sigma-Aldrich, München

Infriermedium (Trypanosomenstabilate)

Glycerol	20% in TDB	Sigma-Aldrich, München
----------	------------	------------------------

EX-CELL® 420 Medium (SF9-Kultur)

EX-CELL® 420 serumfrei, mit L-Glutamin		Sigma-Aldrich, München
Penicillin	50mg/l	Sigma-Aldrich, München
Streptomycin	50mg/l	Sigma-Aldrich, München

Färbelösung (*Western blot*)

Natriumchlorid	150mM	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	10mM	Sigma-Aldrich, München
Tris	20mM	Sigma-Aldrich, München
Toluidin-BCIP	500µl/100ml	Sigma-Aldrich, München
NBT	1ml/100ml	Sigma-Aldrich, München

Grace's Medium, unsupplemented (Transfektion von SF9-Zellen)

Grace's Insect Medium		Invitrogen®, Karlsruhe
-----------------------	--	------------------------

HMI9-Medium pH 7,4 (Trypanosomen-Kultur)

Bathocuproinosulfonat	150µM	Sigma-Aldrich, München
Förales Kälberserum (FCS)	10%	Sigma-Aldrich, München
Hypoxanthin	1mM	Sigma-Aldrich, München
IMDM		Invitrogen®, Karlsruhe
L-Cystein	1µM	Sigma-Aldrich, München

Material und Methoden

Mercaptoethanol	1µl/100ml	Sigma-Aldrich, München
Penicillin	50mg/l	Sigma-Aldrich, München
Pyruvat	1,2mM	Sigma-Aldrich, München
Serum Plus™	10%	SAFC, Lenexa, USA
Streptomycin	50mg/l	Sigma-Aldrich, München
Thymidin	160µM	Sigma-Aldrich, München

LB-Medium (*E.coli*-Kultur)

Bacto-Trypton	20g/l	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	10g/l	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	20g/l	Sigma-Aldrich, München

PBS pH 7,4 (*Phosphate buffered saline*)

Dinatriumhydrogenphosphat	10mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	2,7mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat	1,7mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	137mM	Sigma-Aldrich, München

SDS-Acrylamid-Sammelgel

1M Tris pH 6,8	0,75ml	Sigma-Aldrich, München
<i>Aqua dest.</i>	4,20ml	
Acrylamid	1,00ml	Carl Roth, Karlsruhe
10% SDS	60µl	Sigma-Aldrich, München
10% Ammonium-peroxodisulfat	30µl	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	6µl	Sigma-Aldrich, München

SDS-Acrylamid-Trenngel (10%)

1M Tris pH 6,8	4,30ml	Sigma-Aldrich, München
<i>Aqua dest.</i>	3,30ml	
Acrylamid	3,80ml	Carl Roth, Karlsruhe
10% SDS	114µl	Sigma-Aldrich, München
10% Ammonium-peroxodisulfat	39µl	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	12µl	Sigma-Aldrich, München

Separationspuffer pH 8,0 (Aufreinigung von Trypanosomen)

Dinatriumhydrogenphosphat	57mM	Sigma-Aldrich, München
Glucose	55mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat	3mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	44mM	Sigma-Aldrich, München

SOC-Medium pH 7,0 (Transformation von *E.coli*)

Bacto-Trypton	20g/l	Sigma-Aldrich, München
Glucose	20mM	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	5g/l	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	10mM	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat	10mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	0,5g/l	Sigma-Aldrich, München

TAE-Puffer 50x, pH 8,0 (DNA-Gelelektrophorese)

Essigsäure	57,1ml/l	Sigma-Aldrich, München
EDTA	37,2g/l	Sigma-Aldrich, München
Tris	242g/l	Sigma-Aldrich, München

pH-Wert mit Essigsäure eingestellt

TBS pH 7,4 (*Tris buffered saline*)

Kaliumchlorid	2,7mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	137mM	Sigma-Aldrich, München
Tris	25mM	Sigma-Aldrich, München

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

Dinatriumhydrogenphosphat	18mM	Sigma-Aldrich, München
Glucose	20mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	5mM	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat	1mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	80mM	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat	2mM	Sigma-Aldrich, München

Transferpuffer pH 9,2 (*Western Blot*)

Tris	48mM	Sigma-Aldrich, München
Glycin	39mM	Sigma-Aldrich, München
10% SDS	3,75 ml	Sigma-Aldrich, München
20% Methanol	200 ml	Sigma-Aldrich, München

<i>Aqua dest.</i>	ad 11ml
-------------------	---------

Trypsin-Inhibitor-Lösung (Fibroblasten-Kulturen)

Trypsin	0,05% in EBSS	Sigma-Aldrich, München
EDTA	0,02% in EBSS	Sigma-Aldrich, München

Trypsin-Lösung (Fibroblasten-Kulturen)

Trypsininhibitor	0,1% in EBSS	Sigma-Aldrich, München
EDTA	0,02% in EBSS	Sigma-Aldrich, München

Waschpuffer pH 7,4 (*Western blot*)

Natriumchlorid	150mM	Sigma-Aldrich, München
Tris	10mM	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	0,1%	Sigma-Aldrich, München

Weise-Puffer pH 7,2 (Giemsa-Färbung)

Dinatriumhydrogenphosphat	67mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat	6,6mM	Sigma-Aldrich, München

Zytomix-Puffer pH 7,6 (Transfektion von Trypanosomen)

BSA	100µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	0,15mM	Sigma-Aldrich, München
EGTA	2mM	Sigma-Aldrich, München
Glucose	0,5%	Sigma-Aldrich, München
HEPES pH 7,6	25mM	Sigma-Aldrich, München
Hypoxanthin	1mM	Sigma-Aldrich, München
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,6	10mM	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	120mM	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	5mM	Sigma-Aldrich, München

6. Software

analySIS v3.1, Cell ^{AF} Build 1276	Olympus® Soft Imaging Solutions, Hamburg
AxioVision LE v4.8.2.0	Carl Zeiss, Oberkochen
BLAST2Sequences (NCBI)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DNAMAN v4.15	Lynnon Biosoft, Quebec, Kanada

Endnote X4	Thomsom Reuters, New York, USA
FastGene® Gel Pic	Nippon Genetics, Düren
GATC-Viewer v1.00	GATC Biotech AG, Konstanz
GeneDB	http://www.genedb.org
GNU Image Manipulation Program v2.8.0 (GIMP)	General Public License
ImageJ v1.44p	Public domain
JMP v10	SAS Institute, Cary, USA
LightCycler 480 v1.5.0	Roche, Basel, Schweiz
Office 2010 (x64)	Microsoft, Unterschleißheim
OriginPro v8.0773	OriginLab, Northampton, USA
Primer3 v0.4.0	http://primer3.ut.ee/
Revelation v4.22	Dynex, Chantilli, USA
Sante DICOM viewer v2.0.2	SanteSoft, Athen, Griechenland
synedra View Personal v3.1.0.3	synedra GmbH, Innsbruck, Österreich
Syngo MR B15	Siemens Healthcare, Erlangen
Vinci 64 v3.97.0.11170	http://www.nf.mpg.de/vinci3/

B. Methoden

1. Zellkulturen

II.B.1.a. Axenische Kultivierung von *T.b.brucei*

Ein Trypanosomenstabilat wurde aus dem Stickstoff-Behälter entnommen und sofort unter fließendem warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein *Falcon tube* mit 10ml kaltem HMI-9 Medium überführt und 10min bei 1500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1,5ml verworfen, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:100 ausgezählt. Eine Vorkultur wurde auf $2,5 \cdot 10^5$ pro ml angesetzt, während der die Zellen von einer *lag* in die exponentielle Wachstumsphase übergangen. Aus dieser wurde eine Hauptkultur ($1 \cdot 10^5$ /ml) gestartet, die bei

ca. $3 \cdot 10^6$ /ml die stationäre Phase erreichte und in der Folge in die Absterbephase übergang. Dauerkulturen wurden täglich verdünnt, so dass die Zelldichte stets zwischen $1 \cdot 10^5$ /ml und $1 \cdot 10^6$ /ml lag. Zur Kultivierung wurden Kulturflaschen verwendet, die über einen Sterilfilter den Gasaustausch mit der im Brutschrank herrschenden Atmosphäre gewährleisteten. Um ein optimales Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu erreichen, wurden 5-10ml (20-30ml, 50-60ml) Kulturen in T-25 (T-75, T-125) Flaschen gefüllt. 24-*well*-Platten wurden mit 1ml pro *well* beschickt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxidanteil.

II.B.1.b. Herstellung von *T.b.brucei* Stabilaten

Das Blut einer infizierten Ratte wurde steril in 15ml *Falcon tubes* überführt und 10min bei 1500g und 4°C zentrifugiert. Der *buffy coat* wurde abgenommen, über eine Diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose-Säule aufgereinigt und erneut abzentrifugiert (vgl. Abschnitt II.B.2). Das Pellet wurde in TDB aufgenommen und auf $1 \cdot 10^8$ /ml eingestellt. Unter ständiger Eiskühlung wurden die Zellen 1:1 mit Einfriermedium gemischt und à 1ml in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden mit -1K pro Minute eingefroren (d.h. 1h bei -20°C, über Nacht -80°C) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

II.B.1.c. Spezielle Kulturbedingungen für *T.b.brucei*

a) Pleomorphe Trypanosomen wurden auf semisolider Agarose kultiviert. Dazu wurde ein Teil 6,5% (w/v) *low melting* Agarose Typ VII und 10 Teile HMI-9 Medium auf 50°C erwärmt und gemischt. Je 1ml der HMI9-Agaroselösung wurde pro *well* einer 24-*well* Platte ausgebracht. Auf diese semisoliden Matrix wurden maximal 10^5 Trypanosomen in 1ml HMI-9 Medium

ausgebracht und bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxidanteil kultiviert.

b) Um den Einfluss von Gehirnparenchym auf das Wachstum von Trypanosomen zu untersuchen, wurde ein Rattenhirn 30 Tage *post-infectionem* homogenisiert und die Suspension aus Gehirnzellen und Parasiten in 1ml HMI-9 Medium (24-well Platte) bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert.

c) Zur Co-Kultivierung von Trypanosomen mit Astrozyten wurden adhärente primäre Astrozytenkulturen aus *Mus musculus* (Hertie-Institut, Tübingen) in einer 24-well Platte mit aus dem Gehirn isolierten und durch Filtration aufgereinigten Trypanosomen in 1ml HMI-9 Medium überschichtet.

d) Zur Co-Kultivierung von Trypanosomen mit immortalisierten humanen Plexusepithelzellen (HIBCPP) oder primären porcinen Plexusepithelzellen (PCPEC) einer artifiziellen Blut-CSF-Schranke (Pädiatrische Infektiologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universitätsklinik Heidelberg) wurden 24-transwell Filtersysteme verwendet. Die adhärenenten Plexusepithelzellen befanden sich dabei an der Unterseite der Filtermembran. 1,5·10⁵ monomorphe (MiTat 1.2, aus Zellkultur) oder pleomorphe Trypanosomen (AnTat 1.2, 23 Tage *post-infectionem* aus Rattenblut isoliert) wurden in 300µl HMI-9 Medium in das obere Reservoir gegeben und 16h bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert.

II.B.1.d. Markierung mit *quantum dots*

Zur Markierung von Trypanosomen und Fibroblasten wurde ein QTracker® 605 Cell Labeling Kit (Invitrogen®) benutzt. Um eine 1nM Markierungslösung herzustellen, wurden jeweils 1µl der Komponenten A und

B gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μ l HMI-9 Medium zugegeben, erneut 30s gemischt und mit $2 \cdot 10^4$ Zellen in 200 μ l HMI-9 versetzt. Die Suspension wurde 60min bei 37°C inkubiert, zweimal mit HMI-9 Medium gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

II.B.1.e. Cell shaving

20mg Trypsin, 8mg Proteinase K und 8mg Phospholipase C wurden in 1ml TDB gelöst und mit $2 \cdot 10^4$ Trypanosomen in 1ml TDB versetzt. Die Ansatz wurde zwischen 5 und 30min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit TDB gewaschen und in HMI-9 aufgenommen.

II.B.1.f. Kultivierung von Fibroblasten

Ein Fibroblastenstabilat wurde aus dem Stickstoff-Behälter entnommen und sofort unter fließendem warmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein *Falcon tube* mit 10ml kaltem HMI-9 Medium überführt und 10min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1,5ml verworfen, die Zellen resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:100 ausgezählt. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 10ml HMI-9 Medium aufgenommen und in einer T-25 Flasche bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxidanteil kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Wöchentlich wurden adhärenzte Zellen tryptisch abgelöst und neu ausgesät. Dazu wurden die Zellen in Earle's balanced salt solution (EBSS) gewaschen, mit 15ml Trypsin-Lösung überschichtet und 15-20min bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 3ml Trypsin-Inhibitor-Lösung gestoppt, die Zellen 10min bei 500g zentrifugiert und eine neue Kultur wie oben beschrieben angesetzt.

II.B.1.g. Kultivierung von SF9-Zellen

Ein Stabilat mit SF9-Zellen wurde aufgetaut, in EX-CELL® 420 Medium gewaschen und eine Adhäsionskultur aus $2 \cdot 10^6$ Zellen/10ml in einer T-25 Flasche angesetzt. Die Kultur wurde bei 27°C inkubiert, bis eine 90%ige Konfluenz erreicht war. Danach wurde das Medium verworfen und die Zellen in frischem EX-CELL® 420 Medium mit einem Zellschaber vorsichtig resuspendiert. Die Zelldichte wurde bestimmt und eine neue Adhäsionskultur wie oben beschrieben angesetzt. Nach 2 Passagen wurde eine Suspensionskultur mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml angesetzt. Es wurden dieselben Kulturflaschen wie bei Adhäsionskulturen verwendet, diese jedoch aufrecht stehend bei 27°C und 140rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer Zelldichte von $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml wurden die Zellen verdünnt und eine neue Suspensionskultur wie oben beschrieben angesetzt.

2. Arbeiten mit Versuchstieren

II.B.2.a. Stämme und Haltungsbedingungen

Die Tierversuche wurden mit Wistar Han™ Auszuchtratten und HsdWin:NMRI Mäusen (Harlan®) durchgeführt. Die Tiere wurden *ad libitum* mit R7M-H Alleinfutter für Ratten und Mäuse (ssniff Spezialitäten GmbH) gefüttert. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 2-4 Tieren in Käfigen vom Typ IV erhöht (Ratten) bzw. Typ III (Mäuse) mit Unterschlupf und Nistmaterial.

II.B.2.b. Intraperitoneale Infektion

Zur Ultrakurznaarkose wurde eine Ratte (Maus) 45s mit einem Gemisch aus 80% (v/v) CO₂ und 20% (v/v) O₂ begast. Mit einer 30 *gauge* Kanüle wurden $5 \cdot 10^7$ Trypanosomen in 1ml ($5 \cdot 10^6$ Trypanosomen in 100µl) intraperitoneal injiziert.

II.B.2.c. Intracerebrale Injektion

Eine Ratte wurde mit 100mg Ketamin und 10mg Xylazin pro kg Körpergewicht narkotisiert. Das Tier wurde in einem Stereotakter (Narishige scientific instruments) positioniert, die Kopfhaut inzidiert, der Schnitt mit einem Wundspreizer geöffnet und das Pericranium mit einem Skalpell entfernt. An der geplanten Injektionsstelle wurde ein 1mm großer Zugang durch den Schädelknochen gefräst und die *Dura mater* mit der Spitze einer Kanüle perforiert. Danach wurde eine Glaskapillare mit einem *Horizontal Capillary Puller* (Narishige scientific instruments) gezogen, über einen Schlauch mit einer 50µl-Hamilton-Spritze verbunden und mit 2000 Trypanosomen/µl gefüllt. Die Kapillare wurde in den Stereotakter eingespannt, unter Sichtkontrolle bis zum Kontakt mit der Gehirnoberfläche eingeführt, 5mm vorgeschoben und minimal zurückgezogen. Mit Hilfe einer Mikroinfusionspumpe (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus) wurden 5µl mit 250nl/min appliziert. Nach 5min wurde die Kapillare entfernt, die Wunde gereinigt und vernäht.

II.B.2.d. Schwanzspitzenbiopsie

Mit einer chirurgischen gebogenen Schere wurde die Schwanzspitze biopsiert und ein Blutropfen auf Parafilm® aufgefangen. 5µl Blut wurden

1:100 mit CGA verdünnt und enthaltene Trypanosomen oder Erythrozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

II.B.2.e. CSF Punktion

Einer Ratte wurden 400µl 50% (w/v) Chloralhydrat intraperitoneal injiziert und das Tier damit terminal narkotisiert. Das Tier wurde an Zähnen und interauraler Linie des Cranium in einem Stereotakter (Narishige scientific instruments) fixiert. Der Körper wurde dabei aufrecht gelagert, während der Kopf um 90° nach ventral abgewinkelt war. Die Einstichstelle wurde zwischen dem Schädelknochen und dem ersten Halswirbel markiert. Mit Hilfe einer 1ml *Luer Lok™* Spritze und aufgesetzter 30 *gauge* Kanüle wurde die *Cisterna magna* in einem Winkel von 15-20° nach caudal punktiert und ca. 10µl CSF entnommen.

II.B.2.f. Blutentnahme mit Perfusion und Fixierung

Einer Ratte (bzw. Maus) wurden 400µl 50% (w/v) Chloralhydrat (bzw. 10% (w/v) Chloralhydrat) intraperitoneal injiziert und das Tier damit terminal narkotisiert. Das Tier wurde ventral mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und die Haut im Bereich des Brustkorbs mit einer chirurgischen Schere entfernt. Der Thorax wurde unterhalb des *Sternums* zu den Vorderbeinen hin V-förmig geöffnet, wobei Rippen und Zwerchfell durchtrennt wurden. 1ml CGA wurde in die Brusthöhle vorgelegt und die *Vena cava* durchtrennt. Austretendes Blut wurde mit einer sterilen Pipette am *Recessus pleuralis* abgenommen und mit 2ml CGA verdünnt. Danach wurde das Herz mit einer Organhaltepinzette fixiert und der linke Ventrikel mit einer 17 *gauge* Kanüle punktiert. Das Gefäßsystem wurde mit CGA perfundiert, bis sich die Leber entfärbt hatte. Austretendes Blut wurde fortlaufend abpipettiert. Sollte das Tier für die

Elektronenmikroskopie (bzw. Lichtmikroskopie) fixiert werden, wurde die Perfusion mit 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd (bzw. nur 4% (w/v) Paraformaldehyd) durchgeführt, bis der gesamte Körper vollständig starr war.

II.B.2.g. Aufreinigung von Trypanosomen aus dem Blut

Rattenblut wurde 10min bei 2000g zentrifugiert, der *buffy coat* mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 3ml Separationspuffer resuspendiert. Enthaltene Trypanosomen wurden mittels einer Anionenaustausch-Chromatographie von den Blutzellen getrennt. Dazu wurden etwa 70ml Diethylaminoethyl-Sepharose in einer Säule mit 200ml eiskaltem Separationspuffer äquilibriert und der *buffy coat* aufgetragen. Es wurde ein Wasserstrahlvakuum angelegt und die Säule gleichzeitig mit eiskaltem Separationspuffer gespült. Die eluierten Trypanosomen wurden erneut 10min bei 1500g zentrifugiert und weiterverarbeitet.

II.B.2.h. Präparation von Gehirn und Organen

Zur Isolierung von Trypanosomen erfolgte die Gehirnpräparation aus blutfrei perfundierten, für die Mikroskopie aus fixierten Ratten. Die Tiere wurden mit einer chirurgischen Schere dekapitiert. Ausgehend vom Spinalkanal wurde ein V-förmiger Schnitt nach dorsal gesetzt, bei dem der Schädelknochen links- und rechtslateral angeschnitten wurde. Mit dem Haken einer chirurgischen Pinzette wurde der Knochen dann schrittweise (nach rostral) aufgebrochen und abgenommen. Die *Dura mater* wurde zwischen den Hemisphären mit einem Skalpell inzidiert und mit einer Pinzette zur Seite abgezogen. Das Gehirn wurde schließlich mit Hilfe eines Spatels aus dem Schädel gelöst, wobei die Gehirnnerven durchtrennt

wurden. Zuletzt wurde das Abdomen mit einer chirurgischen Schere geöffnet und die inneren Organe entnommen.

II.B.2.i. Aufreinigung von Trypanosomen aus dem Gehirn

Um Trypanosomen aus dem Subarachnoidalraum bzw. der *Pia mater* zu gewinnen, wurde ein nicht fixiertes Rattenhirn als Ganzes 20min in 30ml HMI-9 Medium bei 37°C und 100rpm geschüttelt. Danach wurden bestimmte Areale freipräpariert und mit einem Skalpell mazeriert, um tiefer im Gewebe befindliche Parasiten zu lösen. Das Mazerat wurde ebenso in 30ml HMI-9 Medium aufgenommen und 20min bei 100rpm geschüttelt. Größere Gewebsreste der Suspension wurden jeweils über einen Glastrichter mit Filterpapier entfernt und Trypanosomen im Filtrat durch Zentrifugation (10min bei 1500g) aufkonzentriert.

II.B.2.j. Immunisierung

Zur Ultrakurzarkose wurde eine Ratte 45s mit einem Gemisch aus 80% (v/v) CO₂ und 20% (v/v) O₂ begast. 100µg VSG 221 (MiTaT 1.2) wurden in 100µl PBS gelöst, mit 100µl komplettem Freund-Adjuvans gemischt und mit einer 30 *gauge* Kanüle subkutan injiziert. Nach 2 Wochen wurde das Tier erneut narkotisiert und mit 1mg VSG in 100µl PBS und 100µl inkomplettem Freund-Adjuvans geboostet. Um die Bildung von Antikörperkomplexen zu induzieren, wurde die Ratte nach 4 Wochen mit 100mg Ketamin und 10mg Xylazin pro kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Die Schwanzvene wurde mit einer 30 *gauge* Kanüle katheterisiert und 1mg VSG injiziert.

II.B.2.k. Gewinnung von Rattenserum

Einer terminal narkotisierten Ratte wurde Vollblut (wie unter „Blutentnahme mit Perfusion und Fixierung“ beschrieben) entnommen, allerdings ohne die Zugabe von CGA. Das Blut wurde bis zur vollständigen Gerinnung bei Raumtemperatur gelagert und 10min bei 2000g abzentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bei 4°C gelagert.

3. Licht- und Elektronenmikroskopie

II.B.3.a. Anfertigung von Gefrier- und Paraffinschnitten

Gefrierschnitte wurden mit einem Cryostaten vom Typ HM505E (Microm International®) hergestellt. Dazu wurde ein fixiertes Gehirn in eine Form mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) überführt, in ein n-Hexan gefülltes Becherglas gelegt, so dass die Seitenflächen der Form komplett bedeckt waren, und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde der Probenblock bei -20°C mit 30µm Schichtdicke geschnitten und die Schnitte auf APS-beschichtete Objektträger gefischt.

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde ein fixiertes Rattenhirn zugeschnitten und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 1h bei 50%, 60%, 70%, 80%, dann jeweils zweimal 20min bei 90% und 100% (v/v) Ethanol) entwässert. Die Gewebstücke wurden in organische Lösungsmittel (1h in 1:1 Ethanol/Toluol und zweimal 20min in Toluol abs.) und schließlich in Paraffin (über Nacht, dann zweimal 12h in frischem Paraffin) überführt. Danach wurden die Proben in Kunststoffhaltern eingebettet, mit 30µm Schichtdicke

geschnitten (HM335E, Microm International®), auf APS-beschichtete Objektträger gefischt und mit Xylol geklärt.

II.B.3.b. Anfertigung von Blut- oder Kulturausstrichen

Mehrere Mikroliter wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Zellen wurden 5min mit Methanol fixiert, mit Einbettmittel (Roti®-Mount) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Der Objektträger wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und danach bei 4°C gelagert.

II.B.3.c. Giemsa- und Bisbenzimidfärbung

Für eine Übersichtsfärbung wurde eine Giemsa-Lösung aus 800µl Stammlösung und 10ml Weise-Puffer angesetzt. Histologische Präparate wurden 30min angefärbt und mit abgekochtem *aqua dest.* abgespült.

Kern und Kinetoplasten wurden mit Bisbenzimid gefärbt. Dazu wurde eine 1mg/ml Stammlösung 1:1000 in PBS verdünnt, die Präparate 10min inkubiert und mit PBS gewaschen.

II.B.3.d. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem BH2-RFCA (Olympus®) und einer angeschlossenen Digitalkamera vom Typ F-view II (Olympus® Soft Imaging System GmbH) und der Software analysis v3.1 (Cell^F Build 1276, Olympus®) angefertigt.

II.B.3.e. Untersuchung der Motilität von Trypanosomen

Trypanosomen wurden mit 344x258 Pixeln und 10 Bildern/s gefilmt (BH2-RFCA mit Kamera F-view II, Olympus® Soft Imaging System GmbH). Mit GIMP Version 2.8.0 wurde die Position des hinteren Zellendes in 30 Einzelbildern

markiert, die Markierungen in einer Bildebene überlagert und zu einer Linie verbunden. Die Längen der zurückgelegten Wegstrecken wurden mit analySIS v3.1 (Cell[^]F Build 1276, Olympus[®]) kalkuliert.

II.B.3.f. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen 10min bei 1500g und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit TDB gewaschen. Nach der Fixierung mit 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd (1h bei 4°C), wurden die Zellen viermal 15min mit Cacodylatpuffer gewaschen und 1h bei 4°C mit 1,5% (w/v) Osmiumtetroxid und 70mM Quecksilber-II-chlorid kontrastiert. Anschließend wurden die Zellen erneut einmal mit Cacodylatpuffer und dreimal mit *aqua bidest.* gewaschen, und 1h bei Raumtemperatur mit 0,5% (w/v) Uranylacetat inkubiert. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 95% und zweimal 100% (v/v) Ethanol, je 10min) entwässert. Nach der kritischen Punkttrocknung unter CO₂ Atmosphäre (CPD020, Balzers Union) wurden die Proben mit Gold bedampft und in einem Cambridge Stereoscan 250 Mk2 (Cambridge Scientific) analysiert.

II.B.3.g. Transmissionselektronenmikroskopie

Rattenhirne wurden über Nacht in 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd nachfixiert und in Cacodylatpuffer (1x) gelagert. Definierte Gehirnareale wurden unter einem Binokularmikroskop (Invertmikroskop ID02, Carl Zeiss GmbH) freipräpariert, viermal mit Cacodylatpuffer gewaschen, und 1h in 1,5% (w/v) Osmiumtetroxid kontrastiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit Cacodylatpuffer und *aqua bidest.* gewaschen. Die Proben wurden 1h bei Raumtemperatur mit 0,5% (w/v) Uranylacetat

inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 95% und zweimal 100% (v/v) Ethanol, je 10min) entwässert, danach in Propylenoxid (dreimal 10min) überführt und über Nacht in 1:1 Propylenoxid/Eponharz gelagert. Die Einbettung erfolgte mit reinem Eponharz in BEEM®-Blocks (Plano GmbH) und 24h Polymerisation bei 60°C. Die Proben wurden an einem Pyramitome 11800 (LKB) zu einem Trapez mit einer Basislänge von ca. 0,5mm getrimmt. Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom OM U3C (Reichert) angefertigt und auf einem Kupfergrid (Plano GmbH) gefischt. Um die Schnitte zu kontrastieren, wurde ein Tropfen einer 5% (w/v) Uranylacetatlösung auf Parafilm gegeben, die Grids mit der Oberseite nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Kupfergrids mit *aqua bidest.* gewaschen, für 45s in eine 0,1% (w/v) Bleicitrat-Lösung gedippt, mit *aqua bidest.* abgespült, getrocknet und unter dem Elektronenmikroskop (EM10, Carl Zeiss GmbH) betrachtet.

II.B.3.h. Gefrierbruchtechnik

Trypanosomen wurden in 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert, in Cacodylatpuffer und anschließend 30min in 30% (v/v) Glycerol gewaschen, schockgefroren und bei -150°C mit $5 \cdot 10^{-6}$ mbar gebrochen. Die Proben wurden mit Platin/Carbon (10:1) kontrastiert (2nm und 45°) und mit Carbon (20nm und 90°C) stabilisiert. Danach wurden die Brüche 30min in 12% (w/v) Natriumhypochlorit inkubiert, mit *aqua bidest.* gewaschen und elektronenmikroskopisch analysiert [211].

II.B.3.i. Vermessung von Trypanosomen

Mit der Funktion „Messungen - Offene Polylinie“ der Software analySIS v3.1 Cell[^]F Build 1276 (Olympus®) wurde die Gesamtlänge des

undulierenden Flagellums von dessen Spitze bis zum hinteren Zellende in rasterelektronen- und lichtmikroskopischen Aufnahmen kalkuliert. Analog wurde der Querschnitt der Parasiten bestimmt, und zwar jeweils an der Position, die (ausgehend von der Flagellumspitze) einem Drittel der Zelllänge entspricht.

4. Molekularbiologische Arbeiten

II.B.4.a. Bioinformatik

Verwendete Sequenzen wurden aus der Genomdatenbank *Trypanosoma brucei* GeneDB bezogen. Die Daten wurden von *The Institute for Genomic Research* und *Wellcome Trust Sanger Institute* bereitgestellt und basieren auf dem Stamm TREU927. PCR Primer wurden mit dem webbasierten Interface Primer3 (v0.4.0) ausgewählt. Sequenzierungsergebnisse wurden mit BLAST2Sequences (bl2seq, NCBI) gegen die geplante Sequenz verglichen. In Bereichen geringer Sequenzierungsqualität wurden zusätzlich die entsprechenden Chromatogramme mit Hilfe der Software GATC-Viewer (v1.00) ausgewertet. Zu erwartende Fragmentlängen nach Restriktionsverdau wurden mit der Software DNAMAN (v4.15) berechnet.

II.B.4.b. Kultivierung von *E.coli*

Mit einer ausgeglühten Impföse wurden Eiskristalle aus *E.coli*-Stabilaten entnommen oder Klone einer Agarplatte gepickt und in Kulturröhrchen mit 3ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin (bzw. 50µg/ml Kanamycin, 7µg/ml

Gentamycin und 10µg/ml Tetracyclin bei DH10Bac™) inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C mit 225rpm geschüttelt.

II.B.4.c. Herstellung von *E.coli* Stabilaten

850µl einer *E. coli*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 150µl Glycerol (abs.) gemischt, in einem Cryo-Röhrchen geschüttelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

II.B.4.d. Isolierung von gDNA aus Rattenhirn

Die Isolierung von gDNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines QIAprep Blood and Tissue Kits (QIAGEN®). Dazu wurden Gehirnproben mit 180µl ATL Puffer und 20µl Proteinase K versetzt, gemischt und bis zur vollständigen Lyse bei 56°C inkubiert. Danach wurden 200µl AL Puffer und 200µl Ethanol (abs.) zugegeben, wobei die Proben nach jeder Zugabe 15s durchmischt wurden. Die Lösung wurde in eine DNeasy Mini spin Säule überführt und 1min bei 6000g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 500µl AW1 gewaschen, mit 1min bei 6000g zentrifugiert, mit 500µl AW2 gewaschen und 3min bei 18000g zentrifugiert. Genomische DNA wurde in 200µl AE Puffer (1min bei 6000g) eluiert.

II.B.4.e. Herstellung von cDNA aus Rattenhirn

Aus 30mg homogenisiertem Rattenhirn wurde *total*RNA mit Hilfe eines RNeasy Mini Kits (QIAGEN®) isoliert. Die Probe wurde in 600µl RTL Puffer resuspendiert, 3min bei 18000g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit 70% (v/v) Ethanol versetzt. Die Lösung wurde ohne erneute Zentrifugation in eine RNeasy spin Säule überführt und 15s mit 8000g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 700µl RW1 und zweimal mit

500µl RPE gewaschen, jeweils gefolgt von einem 15s Zentrifugationsschritt bei 8000g. Danach wurde die Säule 2min durch Zentrifugation (8000g) getrocknet und mit 50µl EB eluiert. Die reverse Transkription in cDNA erfolgte mittels eines Omniscript Reverse Transcription Kits (QIAGEN®). Dazu wurden 2µl RT Puffer (10x), 2µl dNTP Mix (5mM), 2µl Oligo-dT Primer (10µM), 1µl RNase Inhibitor (10U/µl), 1µl reverse Transkriptase (4U), 7µl *aqua bidest.* und 5µl *total*/RNA gemischt und 1h bei 37°C inkubiert.

II.B.4.f. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines QIAprep Spin miniprep Kits (QIAGEN®). Dazu wurden 1.5ml einer Bakterienkultur abzentrifugiert, in 250µl P1 resuspendiert und 2-3min mit 250µl P2 unter mehrmaligem Invertieren alkalisch lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 350µl N3 und erneutem Invertieren. Das entstandene Präzipitat wurde 10min bei 18000g abzentrifugiert und der Überstand in eine QIAprep spin Säule überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde die Säule mit 500µl PB und 750µl PE gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Die gebundene DNA wurde in 50µl *aqua bidest.* eluiert.

II.B.4.g. Bacmidisolierung

48h nach der Transformation von Max Efficiency® DH10Bac™ Zellen wurden weiße Kolonien gepickt, in 4ml LB-Medium (50µg/ml Kanamycin, 7µg/ml Gentamycin und 10µg/ml Tetracyclin) inokuliert und über Nacht bei 37°C mit 225rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden abzentrifugiert, in 250µl P1 (aus QIAprep Spin miniprep Kits) resuspendiert und 2-3min mit 250µl P2 unter mehrmaligem Invertieren alkalisch lysiert. Die Neutralisation erfolgte

durch Zugabe von 350µl N3 und erneutem Invertieren. Das entstandene Präzipitat wurde 10min bei 18000g abzentrifugiert und rekombinantes Baculovirus-Bacmid im Überstand mit 800µl Isopropanol gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde 15min mit 18000g zentrifugiert, die Pellets in 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets getrocknet und in 40µl *aqua bidest.* resuspendiert.

II.B.4.h. Photometrische DNA Bestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden 1:50 Verdünnungen in *aqua bidest.* hergestellt und spektrometrisch in 100µl Küvetten bei 260nm gemessen. Eine Extinktionseinheit entspricht dabei 50µg pro ml dsDNA bzw. 40 µg pro ml ssRNA. Zusätzlich wurden Proteinkontaminationen über den Quotienten E_{260nm} / E_{280nm} bestimmt, der für reine DNA theoretisch bei 1,8 bzw. für reine RNA bei 2,0 liegt. Alle Messungen wurden automatisiert gegen die Trübung bei 320nm bereinigt.

II.B.4.i. Quantitative PCR

Pro Ansatz wurde ein *well* einer Mikrotiterplatte mit 12,5µl Maxima® SYBR-Green (2x), jeweils 0,3µM *sense* und *antisense* Primer, sowie maximal 100ng *template* DNA beschickt (Gesamtvolumen 25µl). In einem LightCycler® 480 (Roche®) erfolgte eine initiale Aktivierung für 2min bei 50°C und 10min bei 95°C. Im Anschluss wurden 55 Zyklen mit 15s bei 95°C und 70s bei 59°C durchlaufen. In jedem Durchgang erfolgte eine Quantifizierung doppelsträngiger DNA durch Fluoreszenzmessung. Zuletzt wurde die Schmelzpunktanalyse 1s bei 95°C und 1min bei 40°C vorbereitet. Während einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung um 0,11K pro Sekunde wurde

die Fluoreszenz fortlaufend gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software (v1.5.0).

II.B.4.j. PCR

Die Polymerasekettenreaktionen wurden mit einer *hotstart*-fähigen Taq-Polymerase von QIAGEN® (HotStarTaq MasterMix) in einem Gesamtvolumen von 50µl angesetzt. Die 100µM Primerstammlösungen wurden vor Gebrauch 1:10 verdünnt. Für eine PCR wurden nach Herstellerangaben 25 µl MasterMix (entsprechend 1,25 U DNA Polymerase), jeweils 2,5µl verdünnte *sense* und *antisense* Primerlösung und maximal 100ng *template* DNA in PCR Reaktionsgefäße pipettiert. Im Thermocycler erfolgte eine initiale Aktivierung der Polymerase für 15min bei 95°C. Im Anschluss wurden 30 Zyklen durchlaufen, wobei jeder Temperaturschritt 1min gehalten wurde (Denaturierung bei 94°C, Hybridisierung 4°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur und Elongation bei 72°C). Zuletzt wurde ein finaler Elongationsschritt bei 72°C durchgeführt und die Proben bei 4°C gelagert.

II.B.4.k. Restriktionsverdau

In einem 20µl Ansatz wurde ein 2-facher Überverdau nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific®) bei 37°C durchgeführt. Dabei betrug die DNA Konzentration maximal 1µg/µl. Linearisierungen mit NotI erfolgten in Puffer O (1x). Für einen Doppelverdau mit BamHI und HindIII wurde BamHI Puffer (1x) eingesetzt und die dadurch verminderte Enzymaktivität von HindIII durch Erhöhung der HindIII-Konzentration um Faktor 2 kompensiert.

II.B.4.l. Agarose- Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% (w/v)-Agarosegels wurden 500mg Agarose in 50ml TAE-Puffer (1x) gelöst und mit 3µl Midori Green Advance (Nippon Genetics) gefärbt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit TAE-Puffer (1x) gefüllte Gelapparatur überführt. 20µl der DNA-Proben wurden mit 5µl Ladepuffer (5x) beschickt und 45min bei 80V (konstante Spannung) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden in einem 470nm Transilluminator visualisiert und mit Hilfe einer Gelfotoapparatur (Nippon Genetics) digitalisiert.

II.B.4.m. Gelextraktion

Für die Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen wurde ein QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) genutzt. Eine DNA-Bande wurde unter Fluoreszenzkontrolle mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und in 3µl QG-Puffer pro mg Agarosegel aufgenommen. Die Agarose wurde 10min bei 50°C geschmolzen und mit 1µl Isopropanol pro mg Gel gemischt, auf eine QIAquick Silicagelsäule aufgetragen und 1min zentrifugiert. Danach wurde jeweils mit 500µl QG- und 750µl PE-Puffer gewaschen und die Säule 1min durch Zentrifugation getrocknet. Schließlich wurde die DNA mit 50µl *aqua bidest.* eluiert.

II.B.4.n. Ligation

200ng Vektor wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss des Inserts, 2µl Ligationspuffer (10x) und 1µl T4 DNA Ligase (5U) in einem 20µl Reaktionsansatz inkubiert. Die Reaktion fand über Nacht im Thermocycler statt, wobei jeweils 1-stündige Temperaturschritte von 22°C (Temperaturoptimum der T4 DNA Ligase), 16°C und 4°C (erleichterte TA-

Anlagerung) durchlaufen wurden. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65 °C.

II.B.4.o. Transformation von *E.coli*

Ein Aliquot kompetenter One Shot® Top10 Zellen (bzw. Max Efficiency® DH10Bac™) wurde auf Eis aufgetaut und 5µl des Ligationsansatzes (bzw. 1ng Plasmid-DNA in 5µl) zugegeben. Die Zellen wurden 30min auf Eis inkubiert und exakt 30s (bzw. 45s) lang einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut 2min auf Eis gekühlt, mit 250µl (bzw. 900µl) vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 1h (4h) bei 37°C und 225rpm geschüttelt. 200µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit 50µg/ml Ampicillin und 100µg/ml X-Gal (bzw. 50µg/ml Kanamycin, 7µg/ml Gentamycin und 10µg/ml Tetracyclin, 100µg/ml X-Gal, 40µg/ml IPTG) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.B.4.p. Transfektion von *T.b.brucei*

Ein Stabilat mit pleomorphen AnTat1.1 Trypanosomen wurde aufgetaut, in 25ml Zytomix-Puffer gewaschen und 10min bei 1500g und 4°C abzentrifugiert. $2,5 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 440µl Zytomix resuspendiert. 10µl (10µg) NotI-linearisiertes pH309-HYG-*mCherry* wurden zugegeben und die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Im Abstand von 10s wurden zwei exponentielle Pulse mit $U=1.4\text{kV}$, $C=25\mu\text{F}$ und $R=\infty$ abgegeben, wobei die Pulszeit 0,3ms betrug. Die Küvette wurde sofort auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 36ml vorgewärmtes HMI-9 überführt und 22h bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Danach wurden 1,8µl Hygromycin zugegeben (Endkonzentration 2.5µg/ml) und die Kultur auf 24-well-Platten

mit semisolider Agarose verteilt (1ml pro *well*). Nach 5 Tagen wurden Trypanosomen aus den positiven *wells* entnommen und zur weiteren Anzucht intraperitoneal in Mäuse injiziert.

II.B.4.q. Transfektion von SF9

SF9-Zellen wurden entsprechend des Bac-to-Bac® Protokolls (Invitrogen®) transfiziert. Zur Herstellung von Bacmid/Cellfectin™ Komplexen wurden 4µl Bacmid-Lösung (12µg) in 100µl Grace's Medium (unsupplemented) verdünnt. Parallel dazu wurden 6µl Cellfectin™ in 100µl Grace's Medium (unsupplemented) aufgenommen. Beide Lösungen wurden vereinigt, gemischt und 45min bei Raumtemperatur inkubiert. In einer 6-*well*-Platte wurden $8 \cdot 10^5$ SF9-Zellen in 2ml EX-CELL® 420 Medium pro *well* ausgesät und 20min inkubiert. Die adhärenierten Zellen wurden mit 2ml Grace's Medium (unsupplemented) gewaschen, mit 800µl Bacmid/Cellfectin™ Lösung überschichtet und 5h bei 27°C inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde abgenommen, durch 2ml EX-CELL® 420 Medium pro *well* ersetzt und die Kulturen 120h bei 27°C inkubiert. Das Viren-enhaltende Medium (P1) wurde abgenommen, Zelltrümmer 5min bei 500g entfernt und 100µl des Überstandes zur Infektion einer 10ml Kultur ($8 \cdot 10^5$ SF9/ml) verwendet. Zur weiteren Amplifikation des Virustiters wurde nach 120h bei 27°C erneut eine Kultur aus dem Überstand (P2) infiziert. Der letztlich erhaltene Viren-*stock* (P3) wurde dunkel bei 4°C gelagert.

II.B.4.r. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der GATC Biotech AG (Konstanz) in Auftrag gegeben. Hierfür wurden 100µl Plasmidlösung mit 30-100ng/µl bereitgestellt.

Zur Sequenzierung von pCR[®]2.1-Konstrukten wurden M13 *forward* und *reverse* Primer verwendet.

5. Immunologische Nachweisverfahren

II.B.5.a. Immunfluoreszenz

Zellkulturen wurden 10min bei Raumtemperatur in 3,7% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern ausgestrichen. Alternativ wurden fixierte Gefrierschnitte auf Objektträger gefischt. Die Präparate wurden 5min mit PBS gewaschen, 5min in 0,1% (v/v) Triton/PBS permeabilisiert und 20min in 1% (w/v) BSA/PBS geblockt. Der Primärantikörper wurde in 1% (w/v) BSA/PBS aufgetragen. Nach 1h wurde dreimal je 5min mit 1% (w/v) BSA/PBS gewaschen. Die Präparate wurden 30min mit Sekundärantikörper, Phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:250) und Bisbenzimid (1µg/ml) inkubiert und 5-mal in 1% (w/v) BSA/PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger mit Einbettmittel (Prolong[®] antifade gold, Invitrogen[®]) überschichtet, mit einem Deckglas versehen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und danach bei 4°C gelagert.

II.B.5.b. Western Blot

100ng VSG 221 wurden 5min bei 100°C mit reduzierendem Probenpuffer (Roti[®]-Load I, Carl Roth) denaturiert und mittels SDS-PAGE (10% (w/v) Acrylamid) bei konstanter Spannung (200V) unter Wasserkühlung aufgetrennt. Um das Gel zu blotten, wurden drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman[®]-Papier auf die Anodenplatte gelegt und mit

Nitrocellulosemembran, Gel und weiteren drei Lagen Whatman®-Papier bedeckt. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und mit einer Masse von 2kg beschwert. Das *blotting* wurde 1h bei $U \leq 12V$ durchgeführt und die Membran über Nacht bei 4°C in *blocking* Lösung abgesättigt. Am nächsten Tag wurde die Membran 5-mal je 5min mit Waschpuffer gewaschen und 1h bei Raumtemperatur mit 1:1000 TBS-verdünntem Rattenserum (naïv oder immunisiert) inkubiert. Es wurde erneut 5-mal gewaschen und 1h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper inkubiert (*Donkey* anti-Ratten IgG AP, antibodies-online GmbH, 1:15000). Danach wurde 5-mal in TBS gewaschen, mit Färbelösung entwickelt und die Reaktion mit PBS gestoppt.

II.B.5.c. IgG Nachweis

Gesamt-Immunglobulin G wurde in CSF und Serum mit Hilfe eines Rat IgG total ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience®) Kits nachgewiesen. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 100µl/*well Capture Antibody* in *Coating Buffer* über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Detektion von spezifischen anti-VSG 221 Antikörpern in CSF und Serum wurde statt des *Capture Antibodies* isoliertes VSG verwendet. Die *wells* wurden zweimal mit *Wash Buffer* gewaschen und 2h bei Raumtemperatur mit 250µl *Blocking Buffer* abgesättigt. Danach wurde erneut zweimal gewaschen und eine Verdünnungsreihe des IgG-Standards in *Assay Buffer A* aufgetragen. 25µl der verdünnten Proben (CSF 1:20, Serum 1:100-1:10000) wurden mit 75µl *Assay Buffer A* gemischt und aufgetragen. Nach 2h wurde 4-mal gewaschen und 1h mit 100µl *Detection Antibody* inkubiert. Erneut wurde 4-mal gewaschen, 15min mit 100µl *Substrate Solution* entwickelt und mit 100µl *Stop Solution* gestoppt. Die

Mikrotiterplatten wurden im ELISA-Reader (MRX II, Dynex Technologies) bei 450nm analysiert.

6. Kernspintomographie

Eine Ratte wurde initial mit 5% (v/v), fortlaufend mit 1,2% (v/v) Isofluran inhalativ narkotisiert. Zur Kontrastmittelapplikation wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung vorgefüllter Katheter (30 *gauge*, 90cm) in die Schwanzvene gelegt. Danach wurde das Tier in einem 7 Tesla ClinScan® (Bruker®) mit entsprechender Kopfspule zentriert. Mittels kurzer *Localizer* Messungen wurde die Position kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Die Planung und Durchführung der Sequenzen erfolgte mit der Software Syngo MR (Siemens Healthcare®). Zuerst wurden native T2-gewichtete *turbo spin echo* Sequenzen mit TR=3000ms, TE=205ms, *field of view* 35x57mm, Schichtdicke 0,22mm, *number of averages* 1, Auflösung 161x256Px und Pixel-Bandbreite 575Hz aufgenommen. Zur Messung der Kontrastmittelverteilung wurden danach 20µl Magnevist® (0,5mmol/ml) mit 55µl Kochsalzlösung verdünnt und im Bolus appliziert. Post-KM Messungen erfolgten als T1-gewichtete *spin echo* Sequenzen mit TR=123ms, TE=10ms, *field of view* 28x39mm, Schichtdicke 1mm, *number of averages* 3, Auflösung 136x192Px, Pixel-Bandbreite 205Hz und Fettsättigung. Die Auswertung wurde mit Sante DICOM free viewer v2.0.2 (SanteSoft) durchgeführt.

7. Durchflusszytometrie

Um die Barrierefunktion artifizierlicher Blut-CSF-Schranken zu verifizieren, wurden $5 \cdot 10^4$ CountBright™ Absolute Counting Beads (LifeTechnologies™) in das obere Reservoir der mit immortalisierten humanen Plexusepithelzellen (HIBCPP) oder primären porcinen Plexusepithelzellen (PCPEC) beschickten *transwell* Filtersysteme gegeben. Nach 16h wurde das Medium im unteren Reservoir abgenommen und enthaltene *beads* mit einem FACScan™ (BD Biosciences®) nachgewiesen.

III. Ergebnisse

A. Isolierung von Trypanosomen aus dem Gehirn

1. Ausbeute und Reinheit

Laut Literatur können Trypanosomen im Gehirn infizierter Ratten nach rund 20 Tagen beobachtet werden [178,180,183]. Abweichend davon beschreiben Frevert *et al.* [171] das sehr frühe Auftreten (innerhalb von Stunden) einzelner extravasaler Parasiten für den Fall, dass durch retrobulbäre (intravenöse) Applikation hoher Trypanosomen-Dosen die natürlicherweise benötigte Zeit bis zum Erreichen eines Blutpeaks übersprungen wird.

Es sollte nun untersucht werden, nach welchem Infektionszeitraum lebende Trypanosomen aus dem Gehirn isoliert werden können. Hierzu wurden Ratten intraperitoneal mit $5 \cdot 10^7$ pleomorphen Trypanosomen (AnTat 1.1) infiziert und nach 4, 6, 8 und 30 Tagen getötet. Der Thorax wurde geöffnet, die *Vena cava* durchtrennt und das Gefäßsystem mit 50ml Citrat-Glucose-Antikoagulans (CGA) perfundiert. Die Tiere wurden dekapitiert und der Schädelknochen, sowie die *Dura mater* entfernt. Danach wurden die Gehirne entnommen und 20min in 30ml HMI-9 Medium bei 37°C und 100rpm geschüttelt, um Trypanosomen aus dem Subarachnoidalraum und der *Pia mater* herauszuspülen. Anschließend wurde das Gehirn frontal in Scheiben geschnitten und daraus Gewebsblöcke des *Cortex cerebri* präpariert. Diese parenchymalen Blöcke enthielten weder Anteile der Meningen, noch der Blut-CSF-Schranke. Sowohl Cortex als auch das restliche Gewebe wurden mit einem Skalpell mazeriert und 20min in HMI-9 bei

100rpm schwach geschüttelt. Das Gewebe wurde abfiltriert und ausgewaschene Trypanosomen im Filtrat durch Zentrifugation angereichert. Nach dieser Methode ließen sich Parasiten sowohl aus dem Bereich der Meningen (d.h. insbesondere dem Subarachnoidalraum), als auch aus dem Gesamtmazerat isolieren. Aus dem Cortex wurden dagegen keine Trypanosomen erhalten.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurden nach 4 Tagen $2,5 \cdot 10^3$ Parasiten aus dem Gesamtmazerat isoliert. Diese stammten jedoch aus Blutresten, die nach der Perfusion in den Gefäßen verblieben. Das zerebrale Blutvolumen (ZBV) beträgt im Menschen ca. 100ml und damit 2% des Gesamtblutvolumen (5 Liter). Für eine Ratte mit 10ml Blutvolumen liegt das ZBV bei

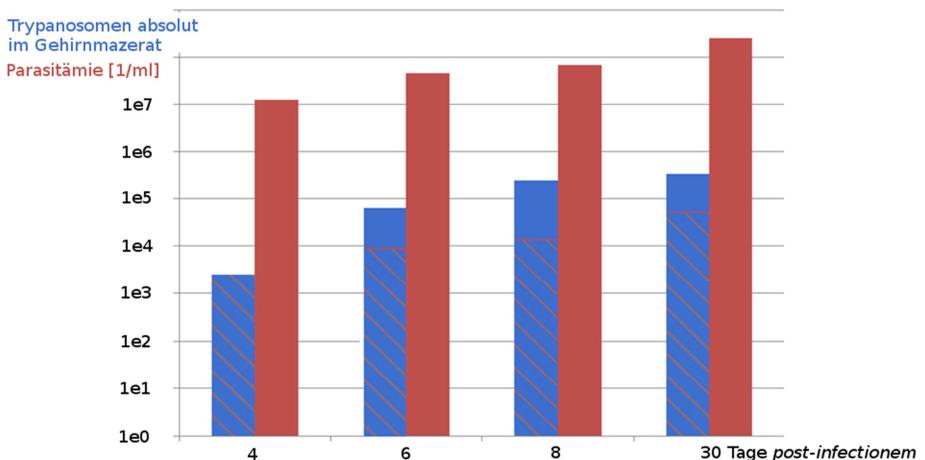


Abbildung 10: Ausbeute an Trypanosomen (AnTat 1.1) nach unterschiedlichen Infektionszeiten in logarithmischer Darstellung. Ratten wurden 4, 6, 8 und 30 Tage *post-infectionem* perfundiert, das Gehirn mazeriert, in HMI-9 Medium geschüttelt und ausgewaschene Parasiten gezählt. Gestreift: Absolute Parasitenzahl, die nach der Perfusion in den zerebralen Blutgefäßen verblieben (0,1% der Parasiten aus 200µl zerebralem Blut). Blau: Absolute Parasitenzahl im Gehirnmazerat, die nicht aus den Blutgefäßen stammten. Rot: Parasitämie [Trypanosomen/ml].

200µl. Die Erythrozytenkonzentration wird für Ratten mit $7,7 \cdot 10^9$ Erythrozyten pro ml Blut angegeben [212], entsprechend $7,7 \cdot 10^{10}$ Erythrozyten absolut. $1,5 \cdot 10^9$ Erythrozyten befinden sich folglich innerhalb der zerebralen Blutgefäße einer Ratte. Die Gesamtzahl der Erythrozyten im Isolat betrug $1,5 \cdot 10^6$, so dass das Isolat rechnerisch mit einem Blutanteil von 0,1% verunreinigt war. Bei einer Parasitämie von $1,25 \cdot 10^7$ Parasiten pro ml (Abbildung 10, 4 Tage *post-infectionem*) und damit $2,5 \cdot 10^6$ Parasiten im ZBV enthielt das Gehirnmazerat folglich $2,5 \cdot 10^3$ Trypanosomen aus dem Blut (Abbildung 10, gestreifte Balken). In das Gehirn invadierte (extravasale) Trypanosomen (blaue Balken) ließen sich demzufolge zwar erst nach 6 Tagen, damit aber immer noch deutlich früher als erwartet isolieren.

2. Rasterelektronenmikroskopische Vermessung

In früheren Publikationen wurden im Gewebe des zentralen Nervensystems sowohl amastigote Trypanosomen [191], als auch verlängerte, schlanke Parasiten beschrieben [177,180]. Alle im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Trypanosomen waren ausschließlich Flagellenträgend; amastigote Formen traten nicht auf. Verlängerte Parasiten hingegen wurde von uns im Rahmen einer Kooperation mit Monika Meinert (Institut für Evolution und Ökologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen) gefunden. Im Folgenden sollten die Längen von Trypanosomen aus Blut und Gehirn verglichen werden. Dazu wurden rasterelektronenmikroskopische (und lichtmikroskopische) Aufnahmen unterschiedlicher Populationen erstellt und die Gesamtlängen entlang des undulierenden Flagellums von dessen Spitze

bis zum hinteren Zellende kalkuliert (analySIS v3.1 Cell[^]F Build 1276, Olympus®) (Abbildung 11, gelb). Zusätzlich wurde der Querschnitt der Parasiten bestimmt (Abbildung 11, rot), und zwar jeweils an der Position, die (ausgehend von der Flagellumspitze) einem Drittel der Zelllänge entspricht.

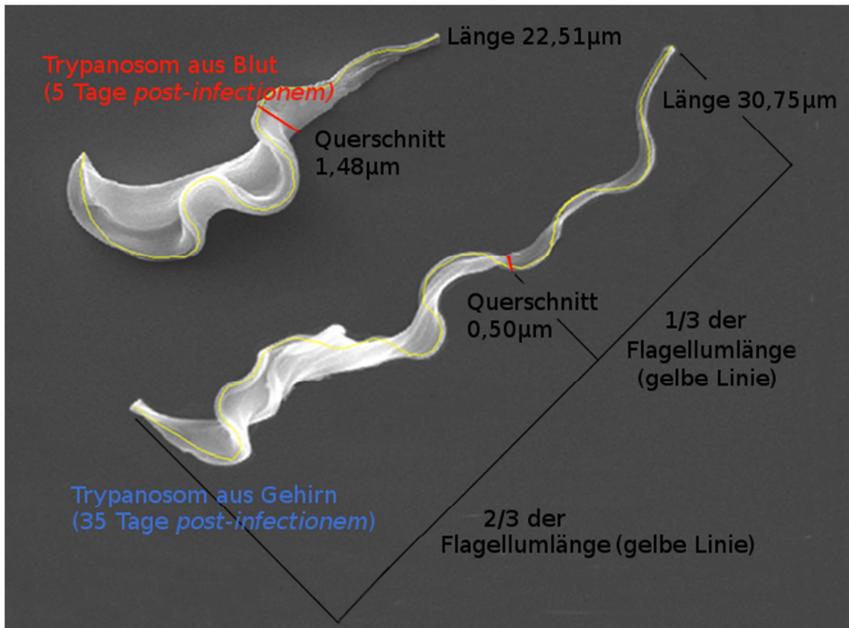


Abbildung 11: Vermessung von Trypanosomen (AnTat 1.1, 5 Tage *post-infectionem* aus Rattenblut und 35 Tage *post-infectionem* aus Gehirnisolat) in Länge (von der Flagellumspitze bis zum hinteren Zellende) und Durchmesser (jeweils nach einem Drittel der Zelllänge, ausgehend von der Flagellumspitze).

Da sehr lange Trypanosomen stets auch auffällig schlank waren, wurde der Quotient beider Werte (Länge dividiert durch Durchmesser an der genannten Position) gebildet. Somit ergab sich ein umso höherer Wert, je länger (und dünner) die Parasiten waren. Die statistische Analyse des Längen-Durchmesser-Verhältnisses lieferte ähnliche Daten wie eine reine Längenanalyse. Dies zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen beiden

Parametern besteht: je länger die Parasiten waren, desto geringer war ihr Durchmesser. Aus Gründen der Anschaulichkeit beziehen sich alle nachfolgend gezeigten Daten jedoch ausschließlich auf die Zelllänge.

Initial wurden jeweils 96 Trypanosomen aus dem Blut 4 Tage infizierter Ratten mit 96 Parasiten aus dem Gehirn 35 Tage infizierter Tiere verglichen (Abbildung 12). Die Anzahl der Trypanosomen, deren Länge größer als $23\mu\text{m}$ betrug, war im Gehirnisolat stets höher als im Blut. Dennoch fanden sich Stadien aller Größen in beiden Organen. Aufgrund der Verteilung wurde als Arbeitshypothese angenommen, dass das Gehirn teilweise (wenn auch nicht ausschließlich) von morphologisch distinkten Formen besiedelt wird, die möglicherweise aufgrund ihrer Gestalt besser an dieses Habitat adaptiert sind.

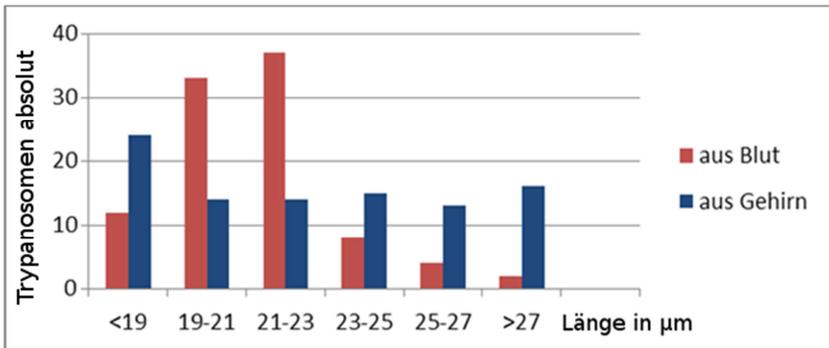


Abbildung 12: Vergleich der Längen von Trypanosomen (AnTat 1.1) aus Blut (rot, 4 Tage, $n=96$) und Gehirn (blau, 35 Tage *post-infectionem*, $n=96$). Publiziert in [208]

Da die Vergleichbarkeit von Daten unterschiedlich lange infizierter Tiere nicht zwangsläufig gegeben ist, wurden im Folgenden die Längen der im Blut befindlichen Trypanosomen im Infektionsverlauf untersucht (Abbildung 13).

Hier zeigte sich, dass mit zunehmender Infektionsdauer auch im Blut sehr lange, schlanke Trypanosomen ($>26\mu\text{m}$) auftraten. Dabei schienen die Trypanosomen im Laufe der Infektionsdauer kontinuierlich länger zu werden. Dieses Phänomen wurde allerdings durch den bekannten Wechsel zwischen kurzen Zellzyklus-arretierten *stumpy* und längeren proliferativen Formen überlagert, der für die Zelldichteregulation notwendig ist [213]. Während sich teilende Trypanosomen im Blut (d.h. solche, die während einer ansteigenden Parasitämie auftreten) in der Literatur meist als *slender* bezeichnet werden, ergibt sich aus Abbildung 13, dass es sich hierbei in Wirklichkeit um *intermediates* handelt. Dagegen stieg die Anzahl an langen Formen (*slender*)

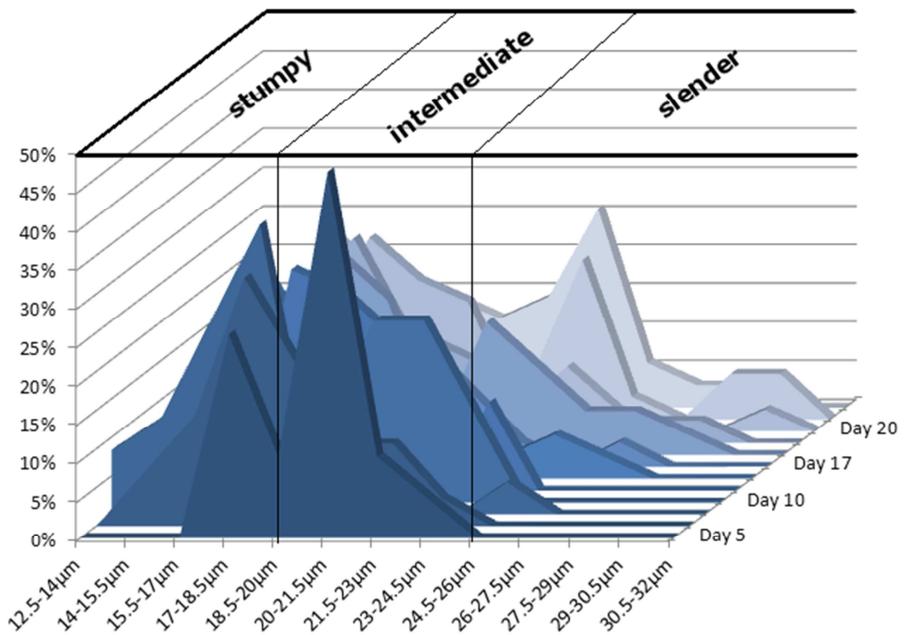


Abbildung 13: Längenverteilung von Trypanosomen aus dem Blut (AnTat 1.1) während des Infektionsverlaufs (n=35 pro Tag). Publiziert in [214]

erst im Laufe der Infektion, was möglicherweise zeitlich mit dem Auftreten einer Gehirninfection in Verbindung steht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass zwar alle Trypanosomen potentiell in das Gehirn invadieren können, *slender* Formen dort jedoch einen Selektionsvorteil besitzen. Entsprechend könnten sich diese bevorzugt im Gehirn entwickeln und im Sinne eines *relapse* ins Gefäßsystem zurückwandern. Obwohl die kontinuierliche Zunahme der Zelllängen eine solche Selektion vermuten lässt, könnten die *slender* Formen ebenso durch eine Signal-abhängige Differenzierung im Gehirn entstehen. Tatsächlich bestimmen Differenzierungen den kompletten Lebenszyklus von Trypanosomen, beispielsweise bei der Zelldichteregulation [91,92,213] oder der Umwandlung von Blutformtrypanosomen in prozyklische Formen [215,216].

Falls es sich bei *slender* Parasiten um Formen zerebraler Genese handelt, sollte ihr Anteil dort stets höher sein als im Blut. Es war deshalb notwendig, Parasiten aus beiden Kompartimenten zum selben Infektionszeitpunkt zu vergleichen. 16 Tage *post-infectionem* wurden darum Trypanosomen gleichzeitig aus dem Blut und aus dem Gehirn eines Tieres isoliert. In diesem Fall erfolgte dies durch CSF-Punktion, um verbleibende Blutkontaminationen bei der Gewebemazeration sicher ausschließen zu können. Die Auswertung (Abbildung 14) ergab, dass auch in diesem Fall die Längenverteilung im Gehirn deutlich zu längeren Formen verschoben war. Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass vereinzelte *slender* Formen auch zu Beginn der Infektion im Blut präsent sind (Abbildung 12), ihr Anteil im Gehirn zu einem gegebenen Zeitpunkt aber höher ist (Abbildung 14).

Theoretisch können die Ergebnisse durch den Umstand beeinflusst werden, dass eine CSF Infektion mit kurzem zeitlichem Versatz zur Parasitämie im Blut erfolgt (vgl. Seite 124ff). Dadurch könnte im Blut bereits eine Zelldichte-abhängige Differenzierung in *stumpy* Formen eingetreten sein, während dies im Gehirn noch nicht der Fall war.

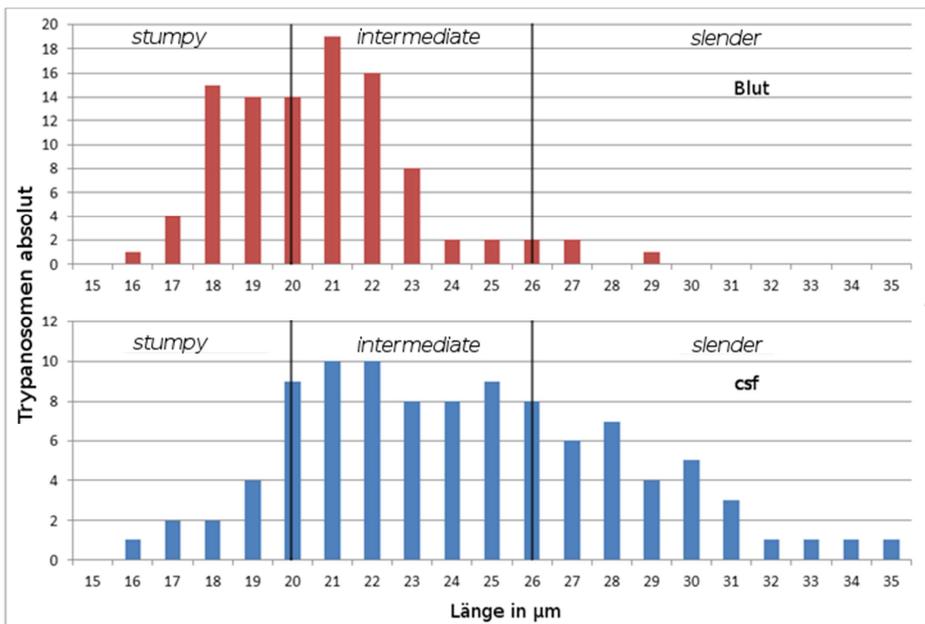


Abbildung 14: Längenverteilung unterschiedlicher Trypanosomenpopulationen (AnTat 1.1), die aus demselben Tier (16 Tage *post-infectionem*) gewonnen wurden. Rot (oben): Trypanosomen aus Blut (n=100). Blau (unten): Trypanosomen aus CSF (n=100).

3. Motilität

Aus dem Gehirn isolierte Trypanosomen unterschieden sich neben ihrer Länge und schlanken Gestalt auch bezüglich ihrer Motilität von Formen, die

während der frühen Infektionsphase aus dem Blut gewonnen wurden. Sie waren auffällig agil und wiesen eine deutlich höhere Frequenz des Flagellumschlages auf als prozyklische Fliegenformen und Parasiten aus dem Blut kurz infizierter Tiere. Zwei Bewegungsmuster konnten dabei lichtmikroskopisch unterschieden werden: eine schnelle kreisförmige Bewegung oder ein gerichtetes Schwimmen [217,218]. Um die Motilität unterschiedlicher Trypanosomen-Stadien zu analysieren, wurden monomorphe Blutparasiten (MiTat 1.2, Antigentyp 221), aus dem Gehirn isolierte pleomorphe Trypanosomen und aus einer Kultur isolierte prozyklische Trypanosomen (beide AnTat 1.1) mit 10 Bildern pro Sekunde gefilmt. Abbildung 15 zeigt die Fortbewegung über ein Zeitfenster von 30 Einzelbildern hinweg. In einem Bildbearbeitungsprogramm (GIMP v2.8.0) wurde die Position des hinteren Zellendes in jedem Einzelbild markiert, die Markierungen überlagert und zu einer Linie verbunden. Die Längen der zurückgelegten Wegstrecken wurden mit dem Programm *analyzeSIS* v3.1 (Cell[^]F Build 1276, Olympus[®]) kalkuliert. Monomorphe Trypanosomen erreichten dabei im Rahmen einer ungerichteten Kreisbewegung eine Geschwindigkeit von $19\mu\text{m/s}$. Dagegen bewegten sich prozyklische Trypanosomen und solche aus dem Gehirn gerichtet fort, wobei sie im Mittel $27\mu\text{m/s}$ beziehungsweise $47\mu\text{m/s}$ zurücklegten. Die Bewegung selbst erfolgte jeweils in Richtung der Zuggeißel.

Obwohl sich das Schwimmverhalten von prozyklischen und den aus dem Gehirn isolierten Parasiten sehr ähnelte, konnten sie morphologisch klar unterschieden werden. Dies gelang sowohl rasterelektronenmikroskopisch als auch durch Bisbenzimid-Färbung. In den Gehirnisolaten traten eindeutig

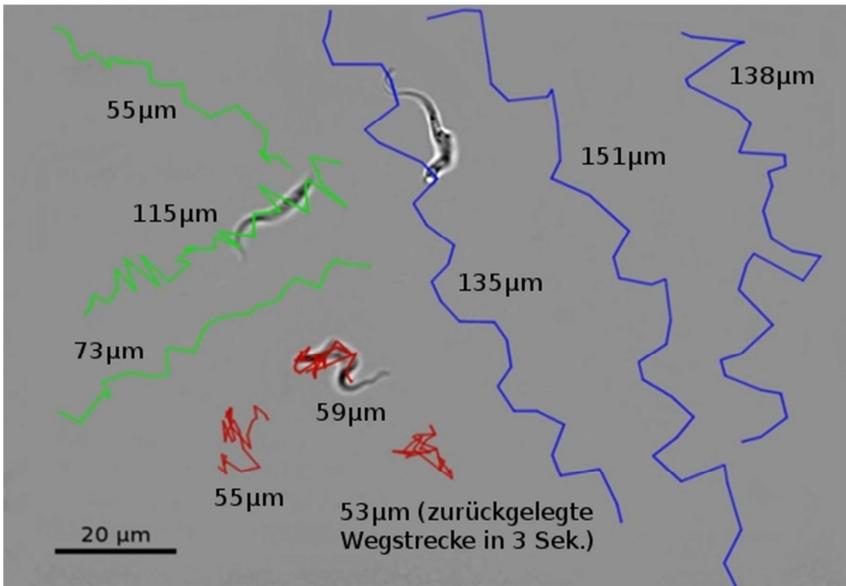


Abbildung 15: Vergleich der Bewegungsmuster unterschiedlicher Trypanosomen-Stadien. Die nachbearbeitete Zusammenstellung aus phasenmikroskopischen Videoaufnahmen (10 Bilder pro Sekunde, 3s) zeigt die innerhalb von 3s zurückgelegte Wegstrecke unterschiedlicher Trypanosomen-Formen. Rot: monomorphe Blutformen (MiTat 1.2, Zelllänge 22µm, *intermediate*), grün: prozyklische Fliegenformen, blau: pleomorphe Formen aus dem Gehirn (AnTat 1.1, Zelllänge 29µm, *slender*).

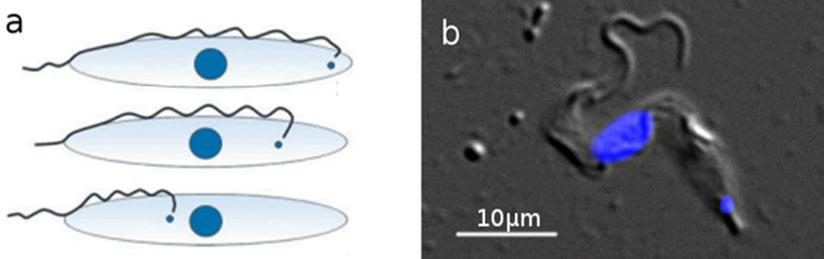


Abbildung 16: Position von Kern und kDNA. a) von oben nach unten: trypomastigote Blutform, trypomastigote prozyklische Form, epimastigote Form. Abbildung aus [81]. b) Trypanosom aus Gehirn, 32 Tage *post-infectionem*, *overlay* aus Differenzialinterferenzkontrast und Bisbenzimid-Färbung (blau)

trypomastigot differenzierte Parasiten auf, deren Kinetoplasten-DNA (kDNA) nahe des Zellpoles lokalisiert war (Abbildung 16) [219,220]. Für prozyklische Trypanosomen hingegen war die kDNA deutlich sichtbar in Richtung Zellmittelpunkt verschoben [81].

4. Rekultivierung

Monomorphe Laborstämme sind auf eine kurze Generationszeit selektiert und töten den Wirt wenige Tage nach einer intraperitonealen Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ Parasiten. Um eine Langzeitinfektion von Säugetieren zu untersuchen, müssen daher pleomorphe Trypanosomen-Stämme genutzt werden, die natürlicherweise einen oszillierenden Parasitämie-Verlauf verursachen [213,221]. Allerdings sind pleomorphe Trypanosomen nur schwer *in vitro* zu kultivieren. Beschriebene Verfahren stellen den Zellen eine (für die Proliferation notwendige) feste Matrix zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um axenische Kulturen unter Zugabe von Methylcellulose [222], Agarose [223,224] oder Co-Kultivierungen mit Fibroblasten aus *Microtus montanus* als *feeder* Zellen [225,226]. Hier sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen aus dem Gehirn isolierte Trypanosomen kultiviert werden können und welchen Einfluss das Gehirngewebe auf die Entwicklung der Parasiten hat.

30 Tage *post-infectionem* wurden Trypanosomen (wie auf Seite 79ff beschrieben) aus dem Gehirn isoliert. Bei 24% der so erhaltenen Parasiten handelte es sich um *slender* Formen, die länger als $26\mu\text{m}$ waren. 10^3 Trypanosomen wurden auf semisoliden HMI-9-Agarose-Platten ausplattiert

und eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis mit bloßem Auge sichtbare Kolonien entstanden. Allerdings revertierten die *slender* Formen während der Kultivierung zu *intermediates*. Während allgemein davon ausgegangen wird, dass Trypanosomen nicht über chemotaktische Eigenschaften verfügen, verteilten sich die Parasiten trotz ihrer Eigenbewegung nicht auf den Agaroseplatten. Vielmehr kehrten auswandernde „Sentinellen“ stets zu den Kolonien (Abbildung 17) zurück. Aufgrund solcher Beobachtung wurden Trypanosomen in früheren Publikationen als „soziale Parasiten“ beschrieben [227,228].

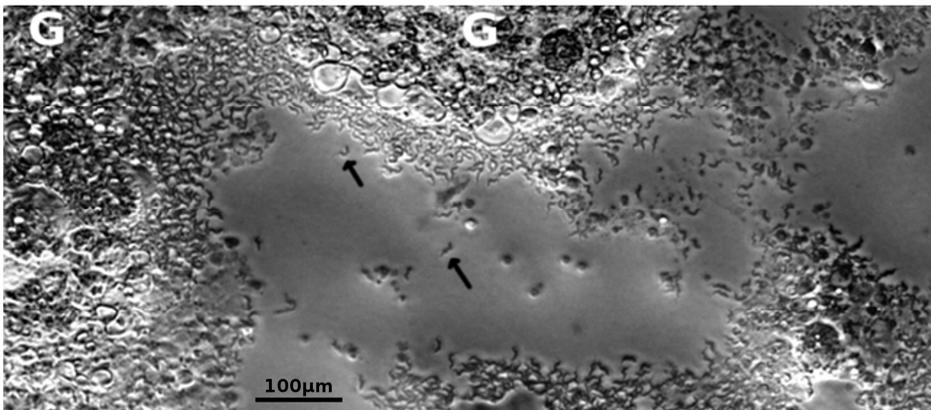


Abbildung 17: Aus Gehirn isolierte Trypanosomen (AnTat 1.1) wurden 1 Woche auf semisoliden HMI-9-Agarose-Platten bei 37°C und 5% CO₂ rekultiviert. G: Gewebereste, Pfeile: Trypanosomen ausserhalb der Kolonie.

Um den Einfluss von Gehirngewebe auf die Kultivierung zu untersuchen, wurden Rattengehirne 30 Tage *post-infectionem* homogenisiert und die Suspension aus Gehirnzellen und Parasiten in HMI-9 Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten aus dem Gehirn isolierte Trypanosomen, die filtriert und daher weitgehend frei von Geweberesten

waren (Seite 79ff). Das vorhandene Gehirngewebe führte zu einem Absterben der Kulturen nach ca. 40 Stunden (Abbildung 18, grün), während aufgereinigte Trypanosomen ca. 80 Stunden überlebten (Abbildung 18, rot). In beiden Fällen konnte keine signifikante Vermehrung der Parasiten beobachtet werden.

In weiteren Versuchen wurden aus dem Gehirn isolierte und durch Filtration aufgereinigte Trypanosomen auf einem *feeder* Zelllayer aus adhärenzten Astrozyten (*Mus musculus*) kultiviert. Diese starben ebenfalls schneller ab (Abbildung 18, blau) als axenische Kontrollen.

Generell wirkte sich also eine Co-Kultivierung mit Zellen des Gehirnparenchyms negativ auf die Überlebensfähigkeit der Trypanosomen aus. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Tatsache, dass artifiziell ins Gehirnparenchym gespritzte Parasiten nicht überlebensfähig sind (vgl. Seite

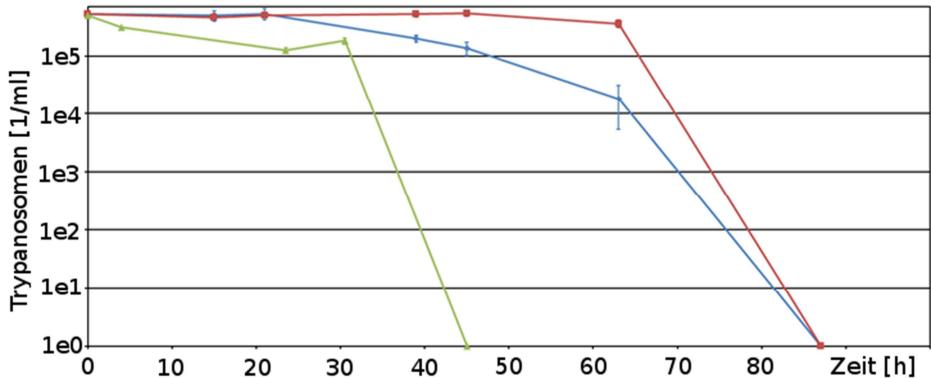


Abbildung 18: Wachstumskurven von Trypanosomen, die 30 Tage *post-infectionem* aus dem Gehirn isoliert wurden (in HMI-9 Medium). Grün: Gehirnmazerat, das nicht abfiltriert wurde und folglich noch Gewebe enthielt. Blau: aus dem Gehirnmazerat abfiltrierte Parasiten (mit Astrozyten aus *Mus musculus*). Rot: aus dem Gehirnmazerat abfiltrierte Parasiten (ohne *feeder* Zellen).

108ff) und dort natürlicherweise nur selten vorzukommen scheinen. So konnten keine Trypanosomen aus dem Cortex isoliert (vgl. Seite 79ff) und nur einzelne (phagozytierte) Parasiten elektronenmikroskopisch im Gehirnparenchym nachgewiesen werden (vgl. Seite 114ff).

5. Gefrierbruchtechnik

Trypanosomen, die aus dem Gehirn isoliert wurden, zeigten eine ausgeprägte *slender* Morphologie (vgl. Seite 81ff). Diese trat im späteren Infektionsverlauf auch im Blut auf. Sollte es sich dabei um eine Adaptation handeln, könnten neben der Änderung von Länge und Motilität auch andere morphologische Unterschiede zu Parasiten der frühen Infektionsphase bestehen. Dies wurde mittels Gefrierbruchtechnik untersucht. Bei diesem Verfahren werden die beiden *leaflets* der Lipiddoppelschicht einer Plasmamembran getrennt. Auf diese Weise kann sowohl die Innenseite des äußeren *leaflets* (*E-face*), als auch die des inneren *leaflets* (*P-face*) betrachtet werden.

Da sich nach Mazeration von infizierten Gehirnen nicht genügend Trypanosomen zur Probenvorbereitung auswaschen lassen, wurden Parasiten aus dem Blut isoliert. Eine Ratte wurde 27 Tage *post-infectionem* ausgeblutet und die Trypanosomen über eine Diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose-Säule aufgereinigt. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil von *slender* Formen im Blut über 40% [208,214]. Die Zellen wurden in 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert, zunächst Cacodylatpuffer und anschließend in 30% (v/v) Glycerol gewaschen, schockgefroren und bei -150°C mit $5 \cdot 10^{-6}$

mbar gebrochen. Die Proben wurden mit Platin/Carbon kontrastiert und elektronenmikroskopisch analysiert [211]. Dabei zeigten sich zahlreiche über die gesamte Plasmamembran verteilte Caveolae (Abbildung 19).

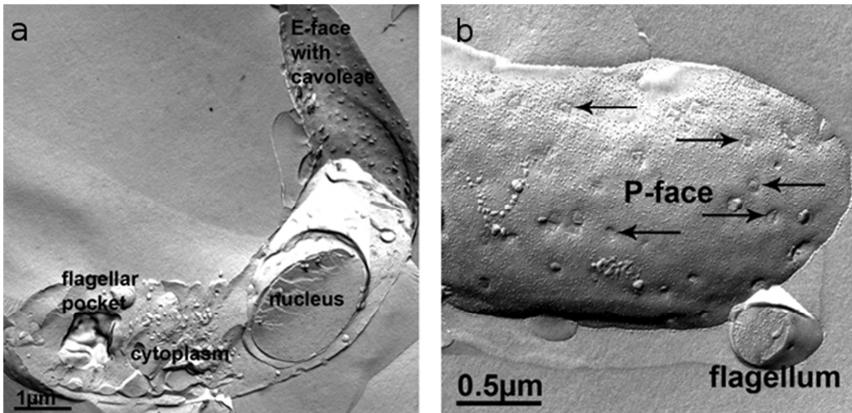


Abbildung 19: Gefrierbrüche von Trypanosomen (AnTat 1.1), die 27 Tage *post-infectionem* aus dem Blut isoliert wurden. In beiden *leaflets* befinden sich zahlreiche Caveolae (Pfeile), die über die gesamte Zelloberfläche verteilt auftreten. a) *E-face*. b) *P-face*.

Trypanosomen weisen eine außergewöhnlich hohe Rate Clathrin-vermittelter Endozytose auf [229,230,231]. Allerdings wurde Endozytose bisher nur im Bereich der Flagellumtasche beobachtet [83]. Die restliche Plasmamembran wird in älteren Publikationen als sehr gleichmäßige Struktur ohne Caveolae beschrieben [232].

Sollte sich bestätigen, dass im Gehirn entstehende *slender* Parasiten auf der kompletten Zelloberfläche endozytotische Invaginationen ausbilden, würde dies bedeuten, dass der Lebenszyklus von Trypanosomen um eine weitere –bisher unbekannte– Gehirnform erweitert werden muss.

Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen Trypanosomen-infizierter Augen (vgl. Seite 147ff) lieferten weitere Hinweise auf eine

atypisch ablaufende Endozytose. Hier war das Zytosol extravasaler Parasiten mit vesikulären Strukturen gefüllt, bei denen es sich um Endosomen handeln könnte, die aus Caveolae hervorgingen. Diese Analysen wurden bislang allerdings noch nicht genügend häufig reproduziert, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

B. Lokalisation infizierter Areale mittels qPCR

Über eine quantitative PCR wurde eine niederaufgelöste Kartierung des Lokaltopismus von Trypanosomen im Gehirn erstellt [220]. Hierzu wurde eine Ratte 23 Tage *post-infectionem* unter Narkose mit Citrat-Puffer perfundiert und das Gehirn des Tieres entnommen. Die rechte Großhirnhemisphäre (ohne den *Bulbus olfactoris*) wurde sowohl dorsoventral, als auch lateromedial halbiert. Die so erhaltenen Gewebsblöcke wurden von rostral nach caudal in jeweils fünf Segmente zerschnitten. Insgesamt wurden somit 20 Proben erhalten, aus denen unmittelbar genomische DNA isoliert wurde.

Der Gehalt an trypanosomaler DNA wurde mit Trypanosomen-spezifischen Primern gegen die alternative Oxidase (TbAOX, Genidentifikationsnummer Tb427.10.7090) ermittelt, also einem Enzym, das in höheren Wirbeltieren nicht vorkommt. Um die unterschiedliche Größe der Gewebeproben rechnerisch kompensieren zu können, wurde zusätzlich der Gehalt an Ratten-DNA mit Primern gegen Ratten-spezifische Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (RnGAPDH, Genidentifikationsnummer 24383) bestimmt.

Tabelle 1: Kalibrierung der quantitativen PCR ausgehend von bekannten Konzentrationen (Nachweis von RnGAPDH aus Ratten-DNA) und Verdünnungsreihen (Nachweis von TbAOX aus Trypanosomen-DNA)

RnGAPDH		TbAOX	
Konzentration [ng/ μ l]	cp	Ratten-DNA und Trypanosomen-DNA	cp
Ratten-DNA (photometrisch bestimmt)			
43	9,18	Verd. Faktor 100	32,94
75	7,75	Verd. Faktor 10	29,44
112	6,09	Verd. Faktor 1	25,73

Zur Kalibrierung des RnGAPDH-Nachweises wurden photometrisch bestimmte DNA-Konzentrationen aus Rattengehirn eingesetzt (Tabelle 1). Analog dazu erfolgte die Kalibrierung für TbAOX mit einem unverdünnten, sowie mit einem 10-fach und 100-fach verdünntem Gemisch aus Ratten- und Trypanosomen-DNA (Tabelle 1). Die *crossing points* (c_p), d.h. die Anzahl an PCR-Zyklen, die benötigt werden, um eine bestimmte Zahl von Amplimeren zu erhalten, wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen der nachzuweisenden Gene aufgetragen (Abbildung 20) und eine Kalibrierungsgerade berechnet. Die aus den Steigungen ermittelten

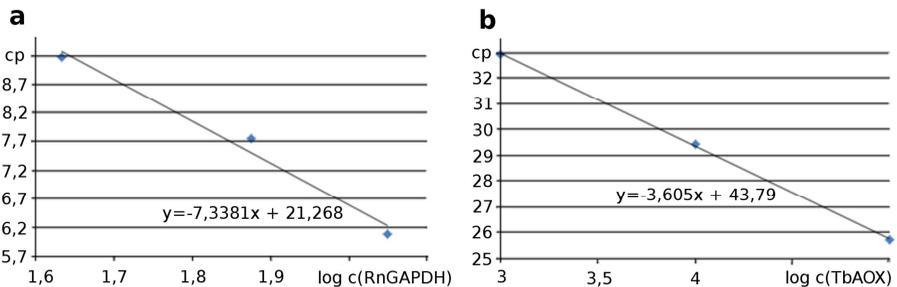


Abbildung 20: Kalibrierung der qPCR. a) Nachweis von Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus *Rattus norvegicus*. b) Nachweis von alternativer Oxidase aus *Trypanosoma brucei*

Amplifikationseffizienten betragen für TbAOX 1,37 und für RnGAPDH 1,89. Die PCR Produkte wurden im Anschluss mittels Schmelzpunktanalyse auf ihre Reinheit untersucht.

Die Auswertung (Tabelle 2) erfolgte basierend auf der Methode von Pfaffl [233]. Mit Hilfe der Kalibrierungsgeradengleichung wurden die c_p -Werte in

Tabelle 2: Berechnung der Trypanosomendichte in einzelnen Gehirnnarealen mittels qPCR.

		RnGAPDH		TbAOX		normiert
Amplifikationseffizienz		$10^{\frac{1}{10^{7,3381}}} = 1,37$		$10^{\frac{1}{10^{3,605}}} = 1,89$		
		cp	Konzentration [ng/ μ l]	cp	Konzentration [AU]	[AU]
		$c = 10^{\frac{cp-21,268}{-7,3381}}$		$c = 10^{\frac{cp-43,79}{-3,605}}$		$= \frac{c(TbAOX)}{c(RnGAPDH)}$
dorsal/medial	rostral	10,09	33,4	30,23	5774	173
	2. v. rostral	6,09	117,1	28,12	22220	190
	3. v. rostral	7,75	69,5	25,73	102261	1471
	4. v. rostral	8,50	54,9	31,72	2229	41
	5. v. rostral	8,81	49,9	29,11	11807	237
dorsal/lateral	rostral	7,48	75,7	29,52	9086	120
	2. v. rostral	8,92	48,2	30,08	6354	132
	3. v. rostral	8,50	54,9	30,11	6233	113
	4. v. rostral	8,81	49,9	30,07	6395	128
	5. v. rostral	9,43	41,0	30,94	3669	89
ventral/medial	rostral	8,81	49,9	29,04	12346	248
	2. v. rostral	8,56	53,9	30,31	5486	102
	3. v. rostral	8,38	57,1	31,22	3068	54
	4. v. rostral	8,15	61,3	28,73	15050	245
	5. v. rostral	8,32	58,1	30,63	4472	77
ventral/lateral	rostral	9,44	40,9	30,97	3599	88
	2. v. rostral	9,17	44,5	30,74	4168	94
	3. v. rostral	8,77	50,5	29,19	11218	222
	4. v. rostral	9,00	47,0	29,95	6904	147
	5. v. rostral	9,33	42,3	31,77	2159	51

Konzentrationsangaben umgerechnet. Da die Kalibrierung von TbAOX nur auf relativen Werten einer Verdünnungsreihe basierte, wurden die TbAOX-Konzentrationen als arbiträre Einheit [AU] angegeben. Zuletzt wurden die relativen Trypanosomen-DNA- durch die Ratten-DNA-Konzentrationen dividiert. Dadurch wurden alle Gewebsblöcke auf einheitliche Anteile von Rattengewebe normiert. Die erhaltenen Relativwerte [AU] stellen ein Maß für die Trypanosomendichte des Gewebes dar.

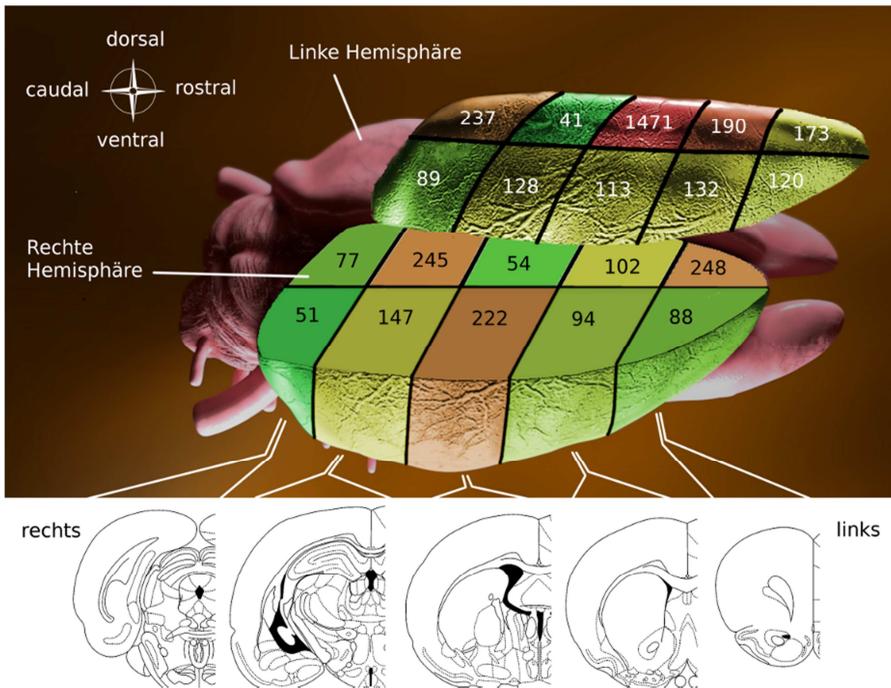


Abbildung 21: qPCR. Die angegebenen Werte zeigen den relativen Anteil von Trypanosomen-DNA in dem jeweiligen auf Ratten-DNA normierten Gewebsblock in willkürlicher Einheit (*arbitrary unit*, [AU]). Zur Veranschaulichung wurden die untersuchten Gehirnareale farblich markiert, wofür die Werte in ein Spektrum (grün-rot) übersetzt wurden. Quellen: 3D-Modell des Rattenhirns verändert nach [234]. Schnittbilder aus [235].

Wie in Abbildung 21 dargestellt, korreliert die Verteilung von Trypanosomen-DNA im Großhirn weitestgehend mit dem Verlauf des Ventrikelsystems. So finden sich im ersten Segment (von rostral nach caudal) im Bereich des medial/ventral auslaufenden Lateralventrikels erhöhte Werte (248 AU), die auch im Bereich des zweiten und dritten Segments nach medial/dorsal erhöht bleiben bzw. ansteigen. Die höchste Konzentration (1471 AU) liegt innerhalb des Gebiets der maximalen Ausdehnung des Lateralventrikels. Im vierten und fünften Segment konzentriert sich die Verteilung erneut auf die medialen Bereiche, in denen der dritte Ventrikel lokalisiert ist.

C. Intracerebrale Injektion und Detektion

1. Intracerebrale Injektion

Um die Überlebensfähigkeit von Trypanosomen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns beurteilen zu können, sollte eine definierte Menge der Parasiten artifiziell in Gehirnparenchym oder Ventrikel injiziert werden.

In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Lazarus (International Institute for Integrative Sleep Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan) wurden Ratten mit 100mg Ketamin pro kg Körpergewicht und 10mg Xylazin pro kg Körpergewicht narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde bis zum Ausbleiben von Schutz- (Lidrand- und Kornealreflex) und Schmerzreflexen (Bauchdecken- und Zwischenzehenreflex) kontrolliert. Zum Schutz vor Austrocknung wurde eine Augensalbe aufgetragen. Danach wurden die Tiere in einem Stereotakter

positioniert, die Kopfhaut inzidiert und der Schnitt mit einem Wundspreizer vorsichtig geöffnet (Abbildung 22a). Das Pericranium wurde mit einem Skalpell entfernt. Als Orientierungspunkt diente nun das Bregma, d.h. derjenige Punkt des Schädels, an dem *Sutura coronalis* (Kranznaht) und *Sutura sagittalis* (Pfeilnaht) zusammentreffen (Abbildung 22b). Anhand eines Rattenhirn-Atlas [235] wurde die geplante Injektionsstelle relativ zum Bregma vermessen und angezeichnet. Mit einer Knochenfräse wurde ein 1mm großer Zugang durch den Schädelknochen gesetzt und die *Dura mater* mit der Spitze einer Kanüle perforiert. Danach wurde eine mit Trypanosomen-Suspension vorgefüllte gezogene Glaskapillare unter Sichtkontrolle bis zum Kontakt mit der Gehirnoberfläche eingeführt. Die Kapillare wurde dann bis zum Zielareal (gemäß Gehirnatlas) vorgeschoben und wieder minimal zurückgezogen.

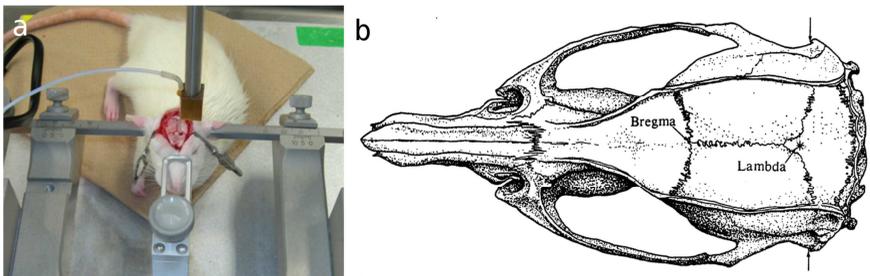


Abbildung 22: a) stereotaktische intracerebrale Injektion an einer narkotisierten Ratte. b) Darstellung des Rattenschädels mit den charakteristischen Orientierungspunkten Bregma und Lambda. Abbildung aus [235]

Die Injektion erfolgte mit Hilfe einer Mikroinfusionspumpe, wobei 10^4 Parasiten in $5\mu\text{l}$ PBS über einen Zeitraum von 20min appliziert wurden. Nach weiteren 5min wurde die Kapillare entfernt und, sofern ein Wiedererwachen des Tieres erwünscht war, die Wunde gereinigt und vernäht.

Zur Präparation des Gehirns wurden die Tiere gegebenenfalls erneut narkotisiert (400µl 50% (w/v) Chloralhydrat), der Thorax eröffnet und die *Vena cava* durchtrennt. Die linke Herzkammer wurde punktiert und das Gefäßsystem mit 50ml 4% (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (für Immunfluoreszenz) oder 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd (für Elektronenmikroskopie, nach [236]) perfundiert. Die Tiere wurden dekapitiert und der Schädelknochen mit einer chirurgischen Pinzette entfernt. Die *Dura mater* wurde entlang der Hemisphären durchtrennt und zur Seite abgezogen. Danach wurde das Gehirn entnommen.

Die Methode erlaubte eine sehr präzise Platzierung von Trypanosomen in definierte Gehirnareale, ohne dass dabei neurologische Schäden beobachtet werden konnten. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber früher beschriebenen Vorgehensweisen dar, bei denen die Schädeldecke neugeborener Mäuse ohne Positionskontrolle zur Injektion durchstoßen wurde [177]. Um sicherzustellen, dass sich die Parasiten während der Injektion nicht großflächig verteilen (z.B. als Folge von Verschleppung beim Entfernen der Kapillare oder durch einen Fluss in umliegendes Gewebe), wurden Gewebeproben nach einem Tag aus dem Injektionsbereich und der gegenüberliegenden Hemisphäre entnommen. Aus diesen wurde genomische DNA isoliert und ein Trypanosomen-Nachweis mittels PCR (Primer gegen TbAOX, Genidentifikationsnummer Tb427.10.7090) durchgeführt. Wie in Abbildung 23 dargestellt konnten Trypanosomen lediglich im Bereich der Applikation nachgewiesen werden.

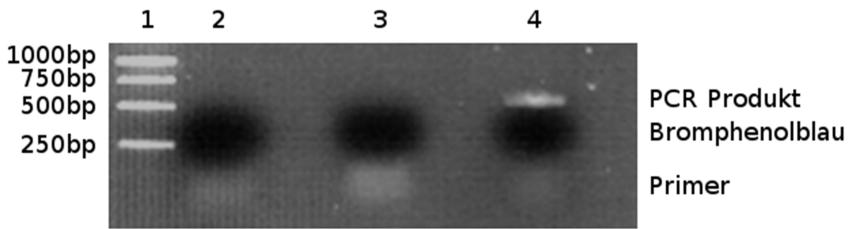


Abbildung 23: Nachweis von injizierten Trypanosomen mittels PCR (Primer gegen TbAOX). 1) GeneRuler® 1kb, 2) Biopsiematerial aus naïvem Gehirn, 3) Biopsiematerial der nicht-infizierten Hemisphäre, 4) Biopsiematerial der infizierten Hemisphäre

2. Fluoreszenzbasierte Bildgebung

Die Überlebensfähigkeit ins Gehirn injizierter Trypanosomen sollte nun mit Hilfe geeigneter mikroskopischer Verfahren näher untersucht werden. Hierzu wurden unterschiedliche Markierungs- und Detektionsmethoden auf ihre Eignung hin geprüft.

In einfacher Phasen- oder Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie von Giemsa-gefärbten Gefrier- und Paraffinschnitten des Injektionsareals ist die Morphologie und Integrität der Parasiten praktisch nicht beurteilbar (Daten nicht gezeigt). Gängige Verfahren zur immunhistochemischen Markierung von Trypanosomen verwenden Antikörper gegen die exponierten *variant surface antigen* Moleküle des Oberflächenmantels (Abbildung 24a). Diese unterliegen jedoch einer kontinuierlichen Variation [103,110] um einer immunologischen Eradikation zu entgehen. Injizierte Trypanosomen bekannten Antigentyps könnten auf diese Art zwar angefärbt werden, doch handelt es sich dabei in der Regel um monomorphe Stämme, die nicht geeignet sind, eine natürliche Infektion zu simulieren (vgl. Seite 89ff). Für den

Nachweis von pleomorphen Trypanosomen während einer Langzeitinfektion (deren Verlauf mehr als einen Parasitämie-Peak beinhaltet) kann eine anti-VSG-Nachweisreaktion nicht verwendet werden, da der aktuelle Antigentyp nicht vorherzusagen ist. Aus diesem Grund wurden von uns konstitutiv rot-fluoreszierende monomeres *cherry*-Protein (MCP) exprimierende pleomorphe Trypanosomen kloniert [219]. Als Donor des MCP-Gens fungierte das Plasmid pAAV-MCS-*mCherry*. Mittels Polymerasekettenreaktion wurde das Gen amplifiziert und durch geeignetes Primerdesign 5'-terminal mit einer HindIII und 3'-terminal mit einer BamHI Schnittstelle versehen. Das PCR-Produkt wurde durch TA-Ligation in den pCR®2.1-Vektor subkloniert, in chemisch kompetente One Shot® Top10 Zellen transformiert und positive Klone über Kolonie-PCR bestimmt. Nach Plasmidisolierung wurde das Konstrukt sequenziert und enthielt eine konservative Punktmutation. Sowohl das Subklonierungsplasmid, als auch der Zielvektor pHD309-HYG-PUR [237] wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut, und *mCherry* sowie das pHD309-*backbone* gelelektrophoretisch aufgereinigt. Insert und Vektor wurden im Verhältnis 3:1 ligiert, transformiert und das erhaltene pHD309-HYG-*mCherry* reisoliert. Nach Linearisierung mit NotI wurden $2,5 \cdot 10^7$ pleomorphe AnTat1.1 Trypanosomen aus einem Stabilat mit 10µg Plasmid elektroporiert (2 exponentielle Pulse mit je 1,4kV und 25µF). Der Elektroporationsansatz wurde in 36ml HMI-9 Medium aufgenommen und für 22 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine Integration durch homologe Rekombination und Expression der Hygromycin-B Phosphotransferase zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen auf *wells* mit semisolider HMI-9-Agarose verteilt und unter Zugabe von Hygromycin

selektiert. Nach fünf Tagen wurden rekombinante Trypanosomen intraperitoneal in eine Maus injiziert, um größere Zellmengen anzuzüchten.

Auf diese Art wurden erfolgreich rot fluoreszierende Trypanosomen (Anregung von *mCherry* bei 587nm, Emission bei 610nm) hergestellt (Abbildung 24b). Leider erwies sich deren Einsatz zur Untersuchung von im Gehirn befindlichen Trypanosomen auf unterschiedliche Art als problematisch: Erstens inseriert pHD309 in das trypanosomale Tubulin-*array* und wird als *read-through* transkribiert. Dadurch ist die Expression zwangsläufig deutlich schwächer als z.B. beim Einsatz eines T7 *promotors*. Die Wahl des Vektors war jedoch insofern gerechtfertigt, dass keine pleomorphen T7 Polymerase-exprimierenden Trypanosomen-Stämme verfügbar sind. Zweitens besteht die Gefahr, die rekombinante DNA während einer Langzeitinfektion ohne Selektionsdruck zu verlieren, da in Mäusen und Ratten bereits eine Einmaldosis von Hygromycin zum Tode führt [238].

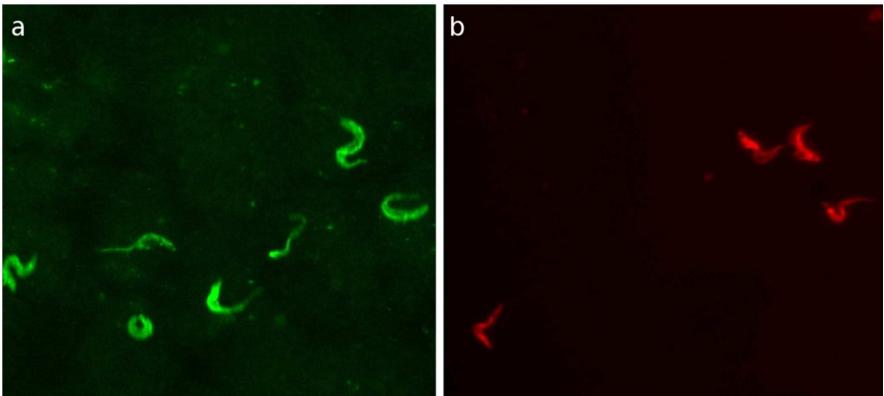


Abbildung 24: a) Monomorphe Trypanosomen (MiTat 1.1, Antigentyp 221) mit *rabbit* anti-221 und *goat* anti-*rabbit*-FITC. b) *mCherry* exprimierende pleomorphe Trypanosomen (AnTat1.2)

Zuletzt zeigte sich, dass die Fluoreszenzeigenschaften sehr empfindlich gegenüber Aldehydfixierung des Gewebes waren, die jedoch zur Präparation zwingend erforderlich ist.

Zur kurzzeitigen Markierung von Trypanosomen (vor allem hinsichtlich der intracerebralen Injektion mit fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle innerhalb weniger Stunden oder Tage) bieten sich kommerziell erhältliche Nanopartikel an. Hierfür wurden *quantum dots* (QDot® 605, Invitrogen®) eingesetzt. Diese sind aus einer mehrere hundert Cadmiumselenid-Atome umfassenden halbleitenden Hülle aufgebaut, die von einer Zinksulfid-Schicht umlagert wird [239]. Ein so gebildeter Nanokristall weist einen Durchmesser von 10-20nm auf und kann in einem breiten Spektralbereich zur Fluoreszenz angeregt werden (Anregung bei 405-565nm, Emission bei 605nm). Da es sich um ein anorganisches Fluorophor handelt, sind solche Nanopartikel sehr photostabil. Die Aufnahme von QDots® in Zellen erfolgt nach Herstellerangaben innerhalb von wenigen Minuten bis maximal einer Stunde und ist nicht enzyspezifisch. Daher sei eine Anwendung nicht auf bestimmte Zelltypen beschränkt [240].

Während Fibroblasten (*Microtus montanus*) und prozyklische Trypanosomen mit *quantum dots* markiert werden konnten (Abbildung 25), gelang dies weder mit monomorphen, noch pleomorphen Blutform-Trypanosomen. Untersucht wurden dabei Inkubationszeiten bis zu 24 Stunden bei 37°C. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da *T. brucei* eine sehr hohe Endozytoserate im Bereich der Flagellumtasche aufweist [229,230,231] und andere Nanopartikel leicht aufgenommen werden [241]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen prozyklischen Fliegenformen und

Blutform-Trypanosomen besteht jedoch in der Beschaffenheit des Oberflächenmantels: das *variant surface glycoprotein* der Blutformen bildet eine sehr dichte (und bei physiologischem pH elektrisch neutrale) Barriere aus, um invariable membranständige Proteine vor immunologischer Erkennung zu schützen [101,110]. Diese Barrierefunktion ist bei Fliegenformen, deren VSG-Mantel durch Procyclin ersetzt ist, nicht gegeben.

Um zu untersuchen, welche Rolle der Oberflächenmantel bei der Aufnahmehemmung von *quantum dots* spielt, wurde ein *cell shaving* [242] mit Proteinase K, Trypsin und Phospholipase C durchgeführt. Die Beladung mit *quantum dots* konnte dadurch allerdings nicht verbessert werden. Außerdem eignen sich derart modifizierte Trypanosomen nicht zur Infektion von Tieren oder zur Injektion in das Gehirn, da sie vor immunologischen Abwehrreaktionen nicht geschützt sind.

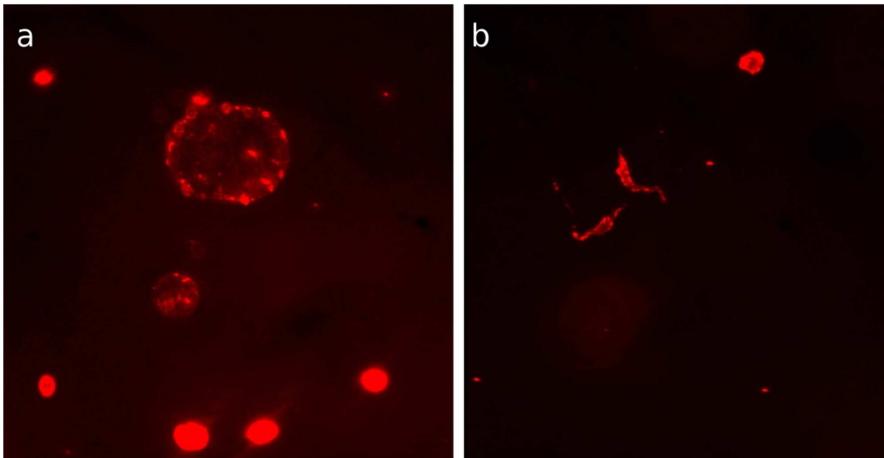


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopie mit *quantum dots* (QDot® 605) beladener Zellen.
a) Fibroblasten aus *Microtus montanus*. b) prozyklische Trypanosomen (MiTat 1.2)

Eine weitere Methode, Parasiten im Gehirnparenchym nachzuweisen, stellt die immunhistochemische Färbung Trypanosomen-spezifischer Proteine dar. Die trypanosomale Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ (PGF)-Synthase unterscheidet sich strukturell grundlegend von PGF-Synthasen in Säugetieren [90], so dass keine Kreuzreaktivität von eingesetzten Primärantikörpern zu erwarten ist. Nachzuweisende Trypanosomen wurden artifiziell in das Striatum injiziert. Hierzu wurden narkotisierte Ratten (100mg/kg Ketamin, 10mg/kg Xylazin) in einem Stereotaxter fixiert und die Injektionsstelle 3mm links lateral des Bregma festgelegt. 10^4 Parasiten in 5 μ l PBS wurden mit 250 μ l pro Minute 5mm tief ins Gewebe injiziert. Nach 15min wurde der Thorax eröffnet, die *Vena cava* durchtrennt, die linke Herzkammer punktiert und das Gefäßsystem mit 50ml 4% (w/v) Paraformaldehyd-Lösung perfundiert. Das fixierte Gehirn wurde in eine Form mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) überführt und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur besseren Wärmeübertragung zwischen Probe und Stickstoffatmosphäre befand sich die Einbettform dabei in einem Becherglas, das soweit mit n-Hexan aufgefüllt wurde, dass die Seitenflächen der Form komplett bedeckt waren. Danach wurde der Probenblock mit Hilfe eines Cryostaten bei -20°C geschnitten (30 μ m Schichtdicke). Die Schnitte wurden auf APS-beschichtete Objektträger gefischt, gewaschen (PBS), 30min in 0,1% (v/v) Triton/PBS permeabilisiert, und mit *rabbit* anti-PGF-Synthase (1:500 in 3% Kälberserum/PBS) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Präparat 90min bei Raumtemperatur mit anti-*rabbit* Alexa Fluor 594 gefärbt (1:1000 in 3% Kälberserum/PBS).

Trypanosomen, die lichtmikroskopisch nicht zu erkennen waren

(Abbildung 26a), konnten im Bereich des Injektionsareals immunhistochemisch klar detektiert werden (Abbildung 26c). Allerdings ist eine Aussage zu ihrer morphologischen Integrität nur schwer möglich. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn ein biotinylierter anti-*rabbit* Sekundärantikörper verwendet wurde, der nachfolgend von einem Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex gebunden wurde (Vectastain® Elite ABC Kit). Die Entwicklung des Präparats erfolgte in diesem Fall unter Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin und wurde lichtmikroskopisch ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall konnten Trypanosomen zwar lokalisiert, ihre Morphologie jedoch nicht beurteilt werden.

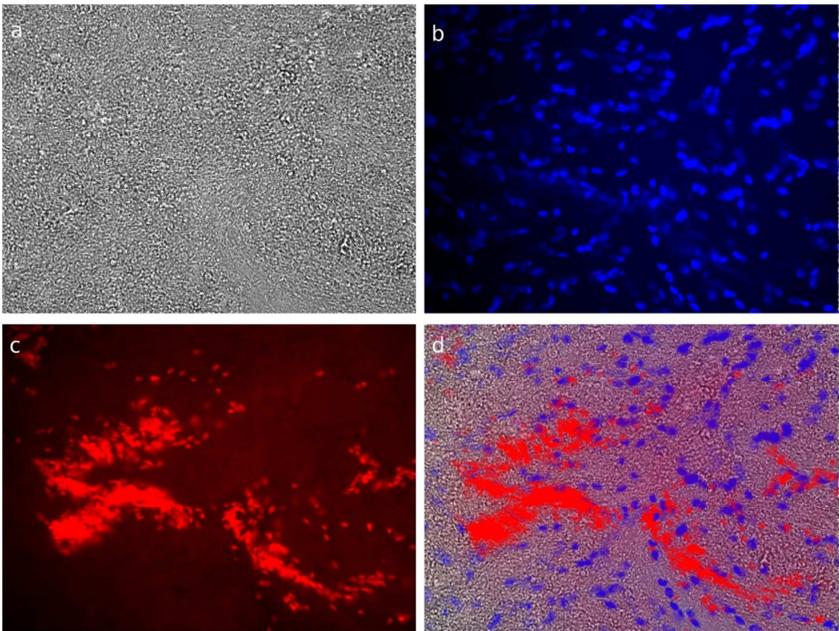


Abbildung 26: Nachweis ins Striatum injizierter Trypanosomen mittels Immunfluoreszenz. a) *brightfield*, b) Bisbenzimid-Färbung, c) *rabbit* anti-trypanosomale Prostaglandin-F-Synthase und anti-*rabbit* Alexa Fluor 594, d) *overlay*

3. Transmissionselektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde es möglich, die Integrität von Trypanosomen im Gehirn exakt zu untersuchen. Hierzu wurden erneut 10^4 Trypanosomen (MiTat 1.2) ins Striatum von 4 Ratten injiziert und die Tiere nach einer Stunde, 1, 2 und 3 Tagen fixiert. Die Gehirne wurde entnommen, 24h bei 4°C nachfixiert, das betroffene Areal ausgeschnitten und für die Elektronenmikroskopie eingebettet (Abbildung 27). Dabei zeigte sich, dass die Parasiten bereits nach einem Tag geschädigt waren und im weiteren Verlauf desintegrierten. Nach 72 Stunden konnten keine intakten Trypanosomen mehr gefunden werden [209].

In Abbildung 27 sind der Stichkanal, injizierte Trypanosomen und durch nicht vermeidbare Einblutung vorhandene Erythrozyten deutlich zu erkennen (nach 1 Stunde). Die folgende Eradikation erfolgte vermutlich apoptotisch [243]. Es konnte keine Phagozytose durch Makrophagen bzw. Mikrogliazellen beobachtet werden. Die Parasiten wiesen teilweise eine dilatierte Kernmembran auf und das Zytoplasma stellte sich weniger elektronendicht dar als in intakten Trypanosomen. Außerdem waren Anzeichen von *blebbing* zu sehen (1. Tag). Nach zwei Tagen hatten die Zellen ihren *variant surface glycoprotein* Oberflächenmantel verloren. Danach konnten keine Trypanosomen mehr gefunden werden [209].

Damit konnte gezeigt werden, dass die Parasiten im Gehirnparenchym (hier am Beispiel des Striatums) nicht überlebensfähig waren. Frühere Arbeiten, bei denen artifizielle Gehirninfectionen verursacht wurden, legen denselben Schluss nahe [177,178], wengleich eine Platzierung dabei sehr

viel ungenauer (d.h. nicht stereotaktisch) erfolgte. Aus den Ergebnissen kann jedoch nicht zwingend geschlossen werden, dass nicht im späteren Infektionsverlauf adaptierte Trypanosomen auftreten könnten, die in der Lage sind, im Gehirnparenchym zu überleben.

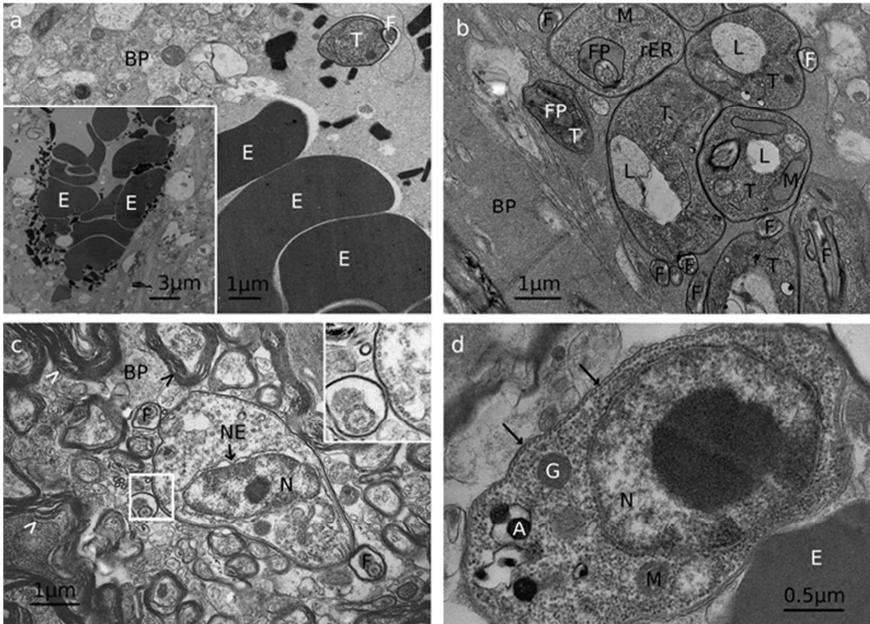


Abbildung 27: Nachweis ins Striatum injizierter Trypanosomen mittels Elektronenmikroskopie. a) und b) 1h post-infectionem, c) 1 Tag post-infectionem, d) 2 Tage post-infectionem. A=Azidocalcisom, BP=Gehirnparenchym, E=Erythrozyt, F=Flagellum, FP=Flagellumtasche, G=Glycosom, L=Lysosom, M=Mitochondrium, N=Nucleus, rER=raues endoplasmatisches Retikulum, Pfeil=Myelinscheiden. Publiziert in [209].

Weitere Tiere wurden nach erfolgter Injektion in Striatum oder Ventrikel daraufhin untersucht, ob postoperativ eine Blutinfektion auftrat. Interessanterweise entwickelten 6 von 7 Tieren, denen Trypanosomen in den Lateralventrikel injiziert wurden, innerhalb von 14 Tagen eine Parasitämie. Im

Gegensatz dazu erkrankte jedoch keines der Tiere, bei denen Parasiten in das Gehirnparenchym appliziert wurden [208,209]. Auch wurden keine neurologischen Ausfälle beobachtet. Damit konnte einerseits bestätigt werden, dass eine Entwicklung der Trypanosomen im Parenchym selbst nicht möglich ist. Dies gelingt jedoch im Bereich der Ventrikel, die in direkter Verbindung zum Subarachnoidalraum liegen, und sich damit physiologisch gesehen außerhalb des Gehirns befinden. Andererseits zeigt dieses Ergebnis, dass bei der beschriebenen Injektionsmethode keine nennenswerten Gefäßverletzungen auftreten, die einen Übertritt der Parasiten in den Blutkreislauf erlauben würden.

D. Kernspintomographische Untersuchung

Aufgrund der fortlaufend angeordneten *tight junctions* zwischen den Gefäßendothelzellen verhält sich die Blut-Hirn-Schranke bezüglich ihrer Permeabilität ähnlich einer Plasmamembran [124,125]. Lipophobe (ionische) [126,127], Plasmaprotein-bindende [128] oder bei physiologischen pH-Wert dissoziierte Substanzen überwinden diese Barriere praktisch nicht. Dies gilt ebenso für computertomographische (Iodid) und magnetresonanztomographische (Gadolinium-Diethylentriaminpentaacetat) Kontrastmittel (KM) [123,244].

Im Bereich der Blut-CSF-Schranke müssen unterschiedliche Bereiche differenziert betrachtet werden: Gefäße innerhalb des *Plexus choroideus* sind fenestriert und daher für hydrophile Substanzen permeabel. Folglich ist in CT/MRT eine Kontrastmittelanreicherung innerhalb des Stroma zu beobachten [244,245]. Die eigentliche Barrierefunktion wird von Plexusepithelzellen übernommen, deren *tight junctions* [246] so organisiert sind, dass ein Einstrom von Gd-DTPA in die Ventrikelräume verhindert wird [124]. Die Ventrikelwände selbst erscheinen nach Kontrastmittelgabe jedoch schwach hyperintens, möglicherweise durch eine KM-Aufnahme im Bereich des *Nucleus caudatus* über subependymale Venen [245]. Eine weitere Abgrenzung des Liquorraumes erfolgt innerhalb der Leptomeningen. Vaskuläre Endothelien der *Dura mater* sind fenestriert, wodurch es zu einer interstitiellen KM-Einlagerung kommt. Allerdings schirmt die äußere, über *tight junctions* verbundene Zellschicht der angrenzenden *Arachnoidea mater* den Subarachnoidalraum gegen hydrophile Substanzen aus dem Blut ab [125,246].

Bei dem hier verwendeten Kontrastmittel Gd-DTPA handelt es sich um paramagnetische chelatierte Gadoliniumionen, die aufgrund ihrer sieben ungepaarten Elektronen einen besonders starken verkürzenden Einfluss auf longitudinale Protonenspin-Relaxationszeiten (T1) haben [247]. Gleichzeitig ist der Verteilungskoeffizient von Gd-DTPA sehr gering [248], so dass die stark hydrophile Substanz die intakte Blut-Hirn-Schranke und Blut-CSF-Schranke nicht überwinden kann. In Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Wiehr (Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Eberhard Karls Universität, Tübingen) wurden fünf nicht-infizierte Ratten kernspintomographisch ohne pathologischen Befund voruntersucht. Die Tiere wurden intraperitoneal mit pleomorphen Trypanosomen (AnTat 1.1) infiziert und nach 25 Tagen eine Verlaufskontrolle durchgeführt. Native T2-gewichtete Sequenzen (7 Tesla, *turbo spin echo*, TR=3000ms, TE=205ms), auf denen Wasser hell und Fett

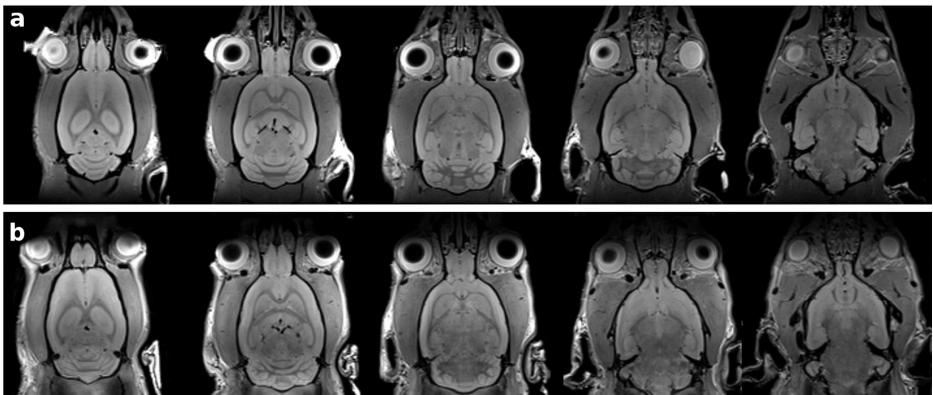


Abbildung 28: Native Magnetresonanztomographie des Rattengehirns 25 Tage *post-infectionem* als transversale T2-gewichtete *turbo spin echo* Sequenz (7 Tesla, TR=3000ms, TE=205ms). a) naïve Kontrolle (Fensterzentrum 100, Fensterbreite 200). b) 25 Tage *post-infectionem* (Fensterzentrum 100, Fensterbreite 200).

dunkel erscheint, waren unauffällig und stellten das Gehirn regelrecht dar (Abbildung 28). Es konnten keine Hinweise auf Ödembildungen oder Enzephalitiden gefunden werden. Nach intravenöser Kontrastmittelapplikation war der *Plexus choroideus* in T1-gewichteten Sequenzen (7 Tesla, *spin echo*, TR=123ms, TE=10ms) mit Fettsättigung (nur Kontrastmittel erscheint hell) deutlich zu erkennen und von dem Ventrikel als Ganzem abgrenzbar. Darüber hinaus zeichneten sich die Lateralventrikel bei zwei von fünf Ratten hyperintens ab (Abbildung 29). Normalerweise nicht CSF-gängiges Kontrastmittel konnte in diesem Fall in die Ventrikel einströmen. Somit wurde gezeigt, dass sich bei diesen Tieren im Verlauf der Infektion eine Funktionsstörung der Blut-CSF-Schranke im Bereich der Plexusepithelzellen entwickelte.

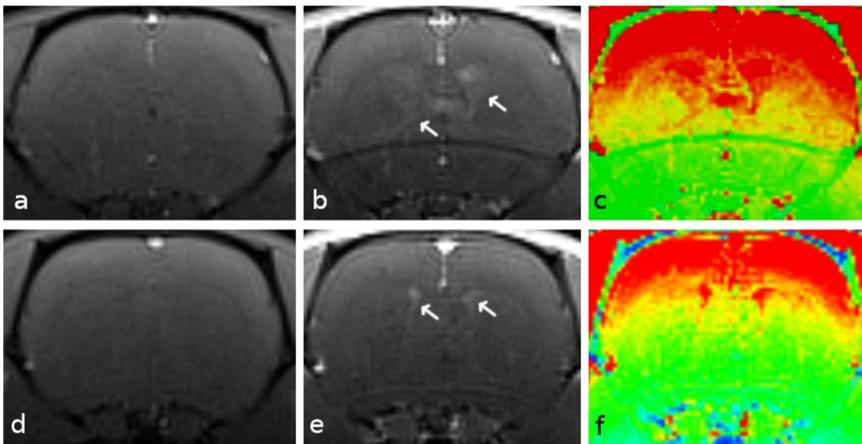


Abbildung 29: Magnetresonanztomographie des Rattengehirns 25 Tage *post-infectionem* als coronale T1-gewichtete *spin echo* Sequenz mit Fettsättigung (7 Tesla, TR=123ms, TE=10ms). a-c) Ratte 4 von 5, d-f) Ratte 5 von 5. a) und d) nativ (Fensterzentrum 100, Fensterbreite 200). b) und e) Post-KM (Gd-DTPA, Fensterzentrum 100, Fensterbreite 200). c) und f) Post-KM in Falschfarbendarstellung. Pfeile: Kontrastmittelanreicherung im Bereich der Lateralventrikel.

E. Elektronenmikroskopische Aufklärung des Infektionsweges

1. Blut-Hirn-Schranke

Das zweite Krankheitsstadium der afrikanischen Schlafkrankheit ist als meningoenzephalitische Phase definiert, bei der Trypanosomen aus Blut und Lymphflüssigkeit in das zentrale Nervensystem übertreten [1,2]. Mögliche Infektionswege stellen die Blut-Hirn-Schranke (vgl. Seite 26ff) und die Blut-CSF-Schranke (vgl. Seite 30ff) dar. Beide Wege wurden in der Literatur beschrieben [183,206,207], ohne dass die tatsächliche Route und die molekularen Mechanismen des Trypanosomen-Durchtritts abschließend geklärt werden konnten.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hartwig Wolburg (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen) wurde untersucht, welcher theoretisch mögliche Infektionsweg für *T. brucei brucei* infizierte Wistar-Ratten relevant ist. Hierzu wurden Ratten intraperitoneal infiziert, die Gehirne nach 20-30 Tagen fixiert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Während die dargestellten Blutgefäße regelmäßig Trypanosomen enthielten, fanden sich zu allen Zeitpunkten nahezu keine Parasiten extravasal im Gehirnparenchym (Abbildung 30a). Im sehr seltenen Fall, dass einzelne Parasiten die Blut-Hirn-Schranke überwunden hatten, wurden sie in unmittelbarer Nähe des Blutgefäßes von

Mikrogliazellen phagozytiert (Abbildung 30b). Eine Anhäufung proliferierender Trypanosomen konnte nicht beobachtet werden.

Dies bedeutet, dass die Blut-Hirn-Schranke (zumindest innerhalb der untersuchten Infektionsdauer) für Trypanosomen nahezu impermeabel ist. Darüber hinaus waren die Parasiten im Gehirnparenchym nicht überlebensfähig. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der intracerebralen Injektion (vgl. Seite 108ff). Der Blut-Hirn-Schranke kann somit nur eine untergeordnete Rolle bei der Genese eines meningoenzephalitischen Stadiums beigemessen werden. Tatsächlich konnte im untersuchten Modellsystem keine Infektion des von der Blut-Hirn-Schranke geschützten Gehirnbereichs festgestellt werden. Dazu gehören alle Strukturen, die von der *Glia limitans (perivascularis und superficialis)* umgeben und damit nach außen und zu den Blutgefäßen hin abgeschirmt sind.

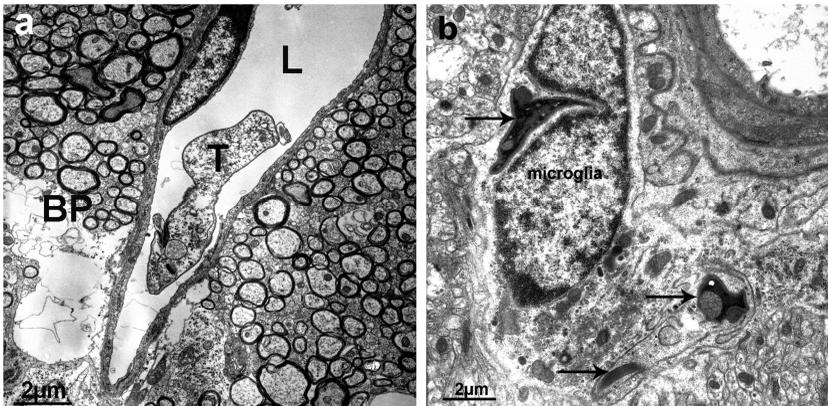


Abbildung 30: Elektronenmikroskopie der Blut-Hirn-Schranke. a) Trypanosomen (AnTat 1.1) im Lumen eines Blutgefäßes. Publiziert in [208]. b) extravasale Trypanosomen (Pfeile) werden von einer Mikrogliazelle phagozytiert. BP=Gehirnparenchym, L=Gefäßlumen, T=Trypanosom.

2. Blut-CSF-Schranke

Die Blut-CSF-Schranke des *Plexus choroideus* dient der Produktion des Liquors im Ventrikelsystem (vgl. Seite 30ff). Die Blutgefäße des *Plexus choroideus* werden von fenestrierten Endothelzellen gebildet. Sie liegen innerhalb des Stroma, das aus Bindegewebe besteht und nach apikal von Plexusepithelzellen begrenzt wird. Diese sind über *tight junctions* verknüpft und stellen somit die eigentliche Barriere der Blut-CSF-Schranke dar.

Die Ventrikelwände werden von Ependymzellen ausgekleidet und gegenüber dem Gehirnparenchym abgegrenzt. Der innere Liquorraum der Ventrikel steht in Verbindung mit dem äußeren subarachnoidalen Liquorraum. Die Abgrenzung zum Gehirnparenchym wird hier von der (unterhalb der *Pia mater* liegenden) Basallamina und den Astrozytenendfüßen gebildet, die zusammen als *Glia limitans superficialis* bezeichnet werden.

Somit liegen *Plexus choroideus*, Ventrikel und die Meningen zwar räumlich innerhalb, jedoch funktional außerhalb des Gehirns.

a) Extravasale Trypanosomen im Stroma des Plexus choroideus

Im Stroma des *Plexus choroideus* intraperitoneal infizierter Ratten wurden zahlreiche extravasale Trypanosomen gefunden (Abbildung 31). Obwohl die Gefäßendothelien Fenestrierungen aufweisen, erscheint ein rein passiver zellulärer Durchtritt unwahrscheinlich. So traten zu keinem

Zeitpunkt Erythrozyten innerhalb des Stroma auf. Da die Parasitämie bei Trypanosomiasen wellenförmig verläuft, bilden sich im Blut regelmäßig hohe Konzentrationen von Antikörper-Antigenkomplexen. Wird der Oberflächenmantel einer Trypanosomenpopulation immunologisch erkannt, führt dies zum Absterben der jeweiligen Population und zur Neubesiedelung mit Parasiten eines anderen VSG-Typs. Für Schlafkrankheit [168,180] und andere Erkrankungen [249] wurde diskutiert, ob die Bildung von Antikörperkomplexen das Gefäßendothel schädigen und permeabilisieren, und somit eine Plexusinfektion beschleunigen könnte. Um dies zu untersuchen wurden Ratten subkutan mit 100 μ g VSG 221 (MiTaT 1.2, in komplettem Freund-Adjuvans) immunisiert. Nach 2 Wochen wurde mit 1000 μ g VSG desselben Antigentyps in inkomplettem Freund-Adjuvans geboostet. 4 Wochen später wurden die gebildeten anti-VSG 221 Antikörper dann mittels *Western blot* nachgewiesen (Abbildung 32).

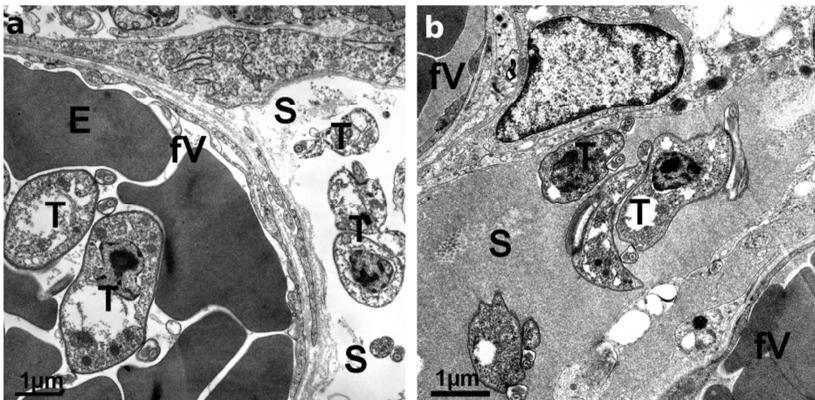


Abbildung 31: Elektronenmikroskopie extravasaler Trypanosomen (AnTat 1.1) im Stroma des *Plexus choroideus*. a) Intakter Oberflächenmantel bei intravasalen Trypanosomen; kein VSG bei Parasiten im Stroma. b) Trypanosomen im Stroma mit intaktem VSG. E=Erythrozyt, fV=fenestriertes Gefäßendothel, S=Stroma, T=Trypanosom. Publiziert in [208].

Den narkotisierten Tieren wurden schließlich 1mg VSG 221 intravenös injiziert, um die Komplexbildung zu induzieren. Gleichzeitig wurden die Tiere mit Trypanosomen eines anderen VSG-Typs (AnTat 1.1) intraperitoneal infiziert. Bei der elektronenmikroskopischen Analyse des Plexus (6 Tage *post-infectionem*) wurden keine Trypanosomen im Stroma oder Ventrikel gefunden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Immunkomplexen eine Infiltration der Blut-CSF-Schranke nicht beschleunigt oder verstärkt.



Abbildung 32: Western blot zum Nachweis von anti-VSG 221 in immunisiertem Rattenblut. Links: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific®). Mitte: Negativkontrolle mit naïvem Serum. Rechts: Probe mit immunisiertem Serum.

Ein anderer Mechanismus könnte die Expression einer trypanosomalen Metalloprotease darstellen, mit deren Hilfe die vasale Basallamina geöffnet wird, wie dies beispielsweise für metastasenbildende Tumorzellen [250] und bei neuroinflammatorischen Krankheiten [251] bekannt ist. Während der Differenzierung von Blut- in prozyklische Formen im Mitteldarm der Tsetse-Fliege exprimieren Trypanosomen die *major surface metalloprotease* MSP-B [172,252] (Genidentifikationsnummer Tb927.8.1610). Dadurch spalten sie ihren Oberflächenmantel ab, um ihn gegen Procyclin zu ersetzen. Tatsächlich waren im Stroma des *Plexus choroideus* Parasiten ohne Oberflächenmantel

lokalisiert (Abbildung 31a), von denen einige durch Makrophagen aufgenommen wurden. Es ist zu beachten, dass nach bisherigem Wissensstand nur *stumpy* Formen zur Expression von MSP-B in der Lage sind, die an die Tsetse-Fliege präadaptiert sind. Diese sterben im Blut einen Prostaglandin D₂-induzierten altruistischen Zelltod, um ein Überwachsen des Wirts zu verhindern [213].

Da die Konzentration von Trypanosomen im CSF erst gegen Ende eines Blut-*peaks* ansteigt (vgl. Seite 124ff), sollten zum Zeitpunkt der Plexus-Infiltration besonders viele *stumpy* Formen im Blut vorhanden sein. Diese könnten den Oberflächenmantel durch MSP-B Expression abspalten, bevor sie im Rahmen einer Zelldichteregulation apoptotisch sterben. Gleichzeitig würde die Expression von MSP-B die Permeabilität der Gefäßendothelien und der darunterliegenden Basallamina erhöhen, so dass *slender* Trypanosomen in das Stroma des *Plexus choroideus* invadieren können.

b) *Liquor*

Erwachsene Menschen haben 120-200ml Liquor. Dieser wird an den Plexusepithelzellen vorwiegend durch Ultrafiltration gebildet und 3-5mal pro Tag erneuert. Das Plexusepithel verfügt über *tight junctions* und stellt die eigentliche Barriere der Blut-CSF-Schranke dar.

Im Rattenmodell konnten Trypanosomen innerhalb der Lateralventrikel nachgewiesen werden, die in direktem Kontakt zu den Epithelzellen oder Epiplexuszellen (Kolmer-Zellen) standen (Abbildung 33). Damit sind die Parasiten nicht nur in der Lage, über das fenestrierte Gefäßendothel ins

Stroma des *Plexus choroideus* zu invadieren, sondern auch über das Plexusepithel in die Lateralventrikel. Von hier aus können sie über das interventrikuläre Foramen von Monro in den dritten Ventrikel gelangen (Abbildung 34), danach über das Sylvius-Äquadukt in den vierten Ventrikel. Über das Foramen von Magendie besteht Kontakt zur *Cisterna magna*, aus der durch CSF-Punktion Trypanosomen isoliert werden konnten (vgl. Seite 124ff). Aus der *Cisterna magna* (oder über das Foramen von Luschka, das dem vierten Ventrikel entspringt) gelangen die Parasiten in den äußeren Liquor- bzw. Subarachnoidalraum. Hier wurden sowohl intakte, als auch phagozytierte Trypanosomen gefunden (Abbildung 35).

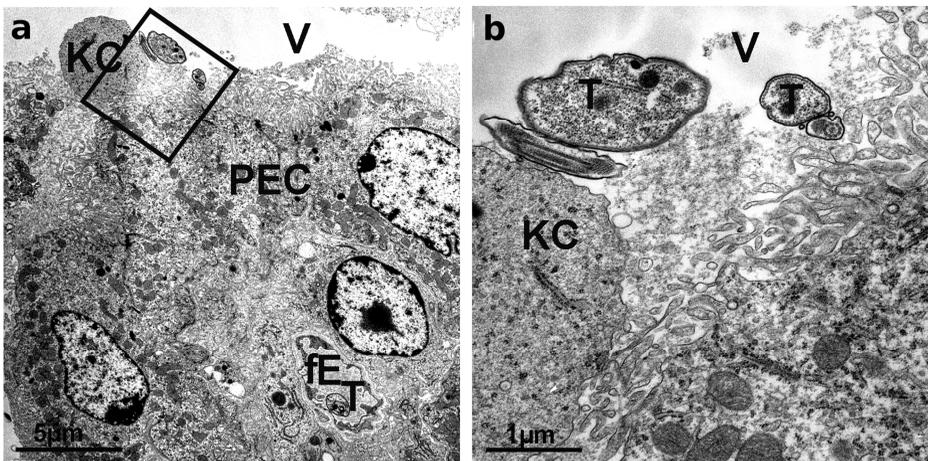


Abbildung 33: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat1.1) im Liquorraum des Lateralventrikels. a) Schwache Vergrößerung des *Plexus choroideus* mit Trypanosomen innerhalb eines Blutgefäßes und innerhalb des CSF. b) Ausschnittsvergrößerung aus a), in der zwei Trypanosomen neben einer Kolmer-Zelle und den Mikrovilli der Plexusepithelzellen lokalisiert sind. fE=fenestriertes Gefäßendothel, KC=Kolmer-Zelle, PEC=Plexusepithelzelle, T=Trypanosom, V=Ventrikel. Publiziert in [208].

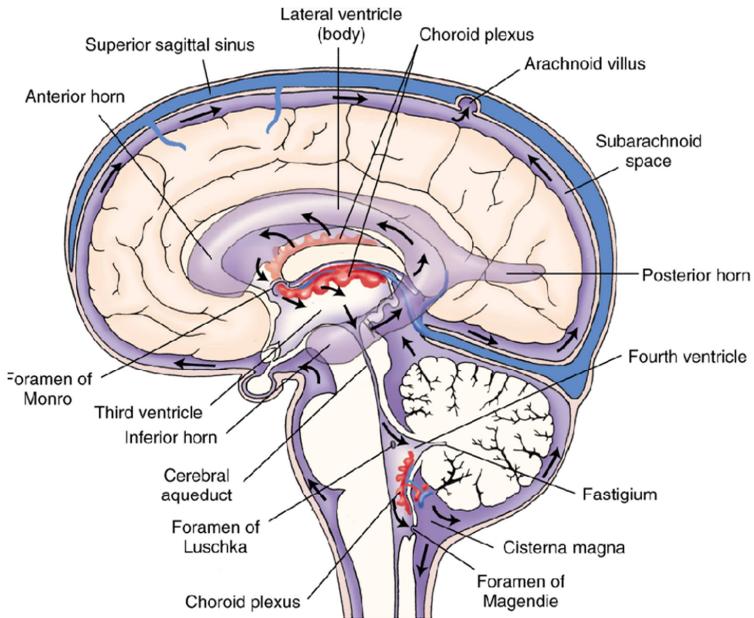


Abbildung 34: Darstellung des Liquorflusses. Abbildung aus [154].

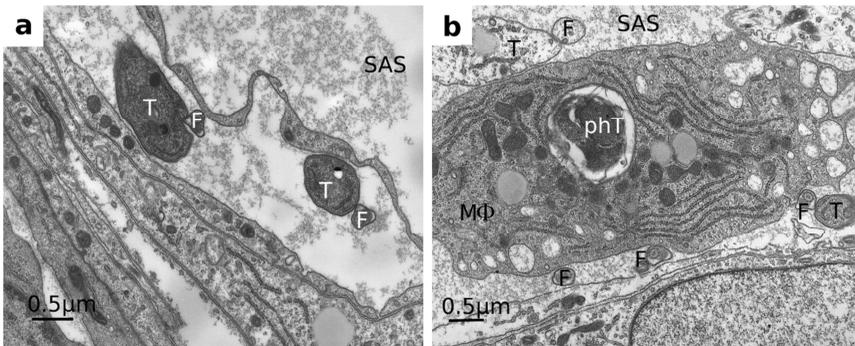


Abbildung 35: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat 1.1) im Subarachnoidalraum. a) intaktes Trypanosom. b) intaktes (unten) und degradiertes (oben) Trypanosom in direkter Nachbarschaft eines Makrophagen. F=Flagellum, MΦ=Makrophage, phT=phagozytiertes Trypanosom, SAS=Subarachnoidalraum, T=Trypanosom. Publiziert in [209].

c) *Pia mater*

Die *Pia mater* stellt die innere der drei Gehirnhäute dar und besteht aus langen abgeflachten Zellen und kollagenreicher extrazellulärer Matrix. In Ratten liegen typischerweise bis zu sechs Zellschichten übereinander [253]. 20-30 Tage *post-infectionem* konnten Anhäufungen morphologisch intakter Trypanosomen zwischen den pialen Zellen gefunden werden. Dies war auch dann der Fall, wenn die Trypanosomen-Konzentration im CSF niedrig war. Phagozytierte Parasiten traten innerhalb der *Pia mater* nicht auf (Abbildung 36).

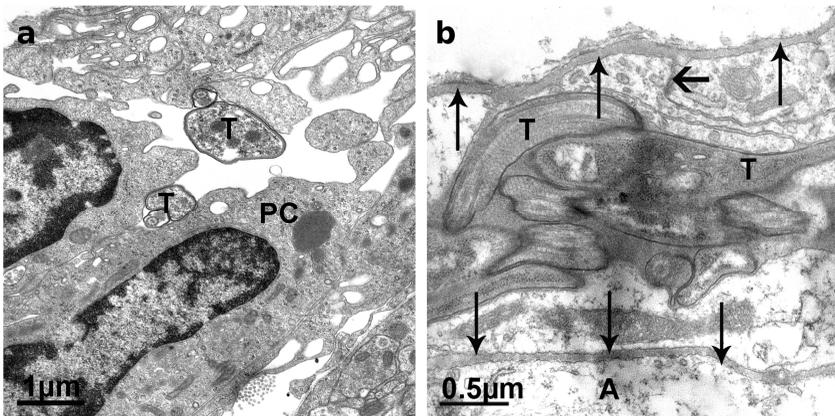


Abbildung 36: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat 1.1) in der *Pia mater*. a) Ein Parasit des Subarachnoidalraums dringt zwischen piale Zellen vor. b) Die Parasiten liegen im Bereich zwischen Mesothel (obere vertikale Pfeile) und *Glia limitans* (untere vertikale Pfeile). A=Astrozyt, PC=Piazelle, T=Trypanosom, horizontaler Pfeil=tight junction. Publiziert in [208].

Die permanente Infektion dieses immunprivilegierten Raumes könnte evolutionär eine bedeutsame Errungenschaft der Trypanosomen darstellen. Sie würde es ermöglichen, immunologische oder chemotherapeutische

Eradikationen im Blut zu überdauern. Entsprechend treten nach Medikation der meningoenzephalitischen Trypanosomiasis mit nicht gehirngängigen Substanzen wie Suramin rezidivierende Blutinfektionen auf [254,255,256]. Es wäre möglich, dass die Parasiten über die Fähigkeit verfügen, die *Pia mater* lange Zeit zu besiedeln, ohne klinisch in Erscheinung zu treten.

Andererseits können die letztlich auftretenden Symptome (wie die Deregulation des Schlaf-Wach-Zyklus) durch eine piale Infektion erklärt werden: Um ein begrenztes Raumangebot zu besiedeln, ohne den Wirt vorzeitig zu töten, verfügen Trypanosomen über die Fähigkeit zur Zelldichteregulation. Proliferierende Parasiten sezernieren einen *stumpy induction factor*, der bei einem Teil der Population die Differenzierung in Zellzyklus-arretierte *stumpy* Formen induziert. *Stumpy* Formen wiederum produzieren Prostaglandin D₂, d.h. das Signal, einen altruistischen Zelltod einzuleiten [95,196,213,257].

Prostaglandin D₂ würde auf diese Art zwangsläufig mit dem CSF verteilt werden und physiologische Abläufe des Wirts demodulieren. Ratten, denen Prostaglandin D₂ ins Gehirn injiziert wurde, begannen augenblicklich zu schlafen [258,259]. Damit würde die Infektion der *Pia mater* das namensgebende Phänomen der afrikanischen Schlafkrankheit erklären.

Zu keinem Zeitpunkt wurden Trypanosomen gefunden, die die *Glia limitans superficialis* überwunden hatten. Damit führte auch der Weg über die Blut-CSF-Schranke in unserem Modellsystem nicht zu einer Infektion des Gehirnparenchyms.

F. Untersuchungen des *Liquor cerebrospinalis*

1. Zyklischer Infektionsverlauf des CSF

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben darüber, nach welchem Zeitraum eine Gehirninfection bei Ratten auftritt. Obwohl meist von einer 20-tägigen Latenzphase ausgegangen wird [178,180,183], konnte mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Trypanosomen gezeigt werden, dass einzelne Parasiten bereits nach sehr kurzer Zeit Gefäßendothelien überwinden [171]. Hier sollte nun untersucht werden, wann erstmals Trypanosomen im CSF nachweisbar sind und wie sich der Titer im weiteren Infektionsverlauf verändert.

Dazu wurden Ratten intraperitoneal mit $2,5 \cdot 10^7$ pleomorphen Trypanosomen (AnTat 1.1) infiziert und die Parasitämie jeder Ratte an fünf verschiedenen Tagen bestimmt, beginnend 4 Tage vor der CSF-Entnahme. Um die Parasitenkonzentrationen im CSF zu ermitteln, wurden die Tiere terminal narkotisiert und an Zähnen und interauraler Linie des Cranium in einem Stereotaxer fixiert. Der Körper wurde dabei aufrecht gelagert, so dass der Kopf um 90° nach ventral abgewinkelt war (Abbildung 37). Die Einstichstelle wurde zwischen dem Schädelknochen und dem ersten Halswirbel markiert. Mit Hilfe einer 30 gauge Kanüle wurde die *Cisterna magna* in einem Winkel von $15-20^\circ$ nach caudal punktiert und ca. $10\mu\text{l}$ CSF entnommen [260,261]. Die Trypanosomenlast im CSF wurde mikroskopisch bestimmt. Gleichzeitig wurde kontrolliert, dass das CSF blutfrei war, also

keine Erythrozyten enthielt. Abbildung 38 zeigt den erhaltenen Infektionsverlauf.

Überraschenderweise konnten bereits nach 6 Tagen Trypanosomen im CSF nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt kommen nur vereinzelt *slender* Trypanosomen im Blut vor (vgl. Seite 81ff). Folglich handelte es sich initial (neben wenigen *slender*) hauptsächlich um *intermediate* oder *stumpy* Formen, die die Blut-CSF-Schranke überwinden. *Slender* Formen könnten jedoch wegen ihrer höheren Motilität (vgl. Seite 86ff) das trypanozide CSF (vgl. Seite 129ff) schneller wieder verlassen. Gelangen sie über die *Granula meningea* ins Blut zurück, führt dies im Laufe der Infektion zur Zunahme der *slender* Population (vgl. Seite 81ff).

Danach zeichnete sich die CSF Infektion durch einen zyklischen Verlauf aus [209]. Der maximale Titer wurde jeweils 1-2 Tage nach einem *peak* im

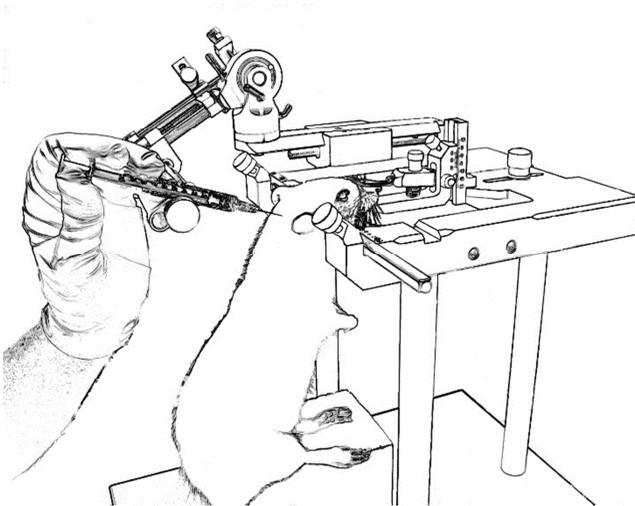


Abbildung 37: Schematische Darstellung der atlanto-occipitalen CSF-Entnahme. Eine narkotisierte Ratte wurde in einem Stereotaxter fixiert und die *Cisterna magna* punktiert.

Blut erreicht, wenn die Blutparasiten bereits zur *stumpy* Form differenziert waren [262]. Das untermauert die Hypothese, dass *stumpy* Trypanosomen an der Öffnung von Blut-Organ-Schranken beteiligt sind. Während der Differenzierung zu Fliegenformen exprimieren diese Metalloproteasen, um ihren Oberflächenmantel abzuspalten. Das scheint vereinzelt auch im *Plexus choroideus* der Fall zu sein (vgl. Seite 116ff) und könnte eine Voraussetzung zur Permeabilisierung des Plexusepithels darstellen. Der Trypanosomentiter

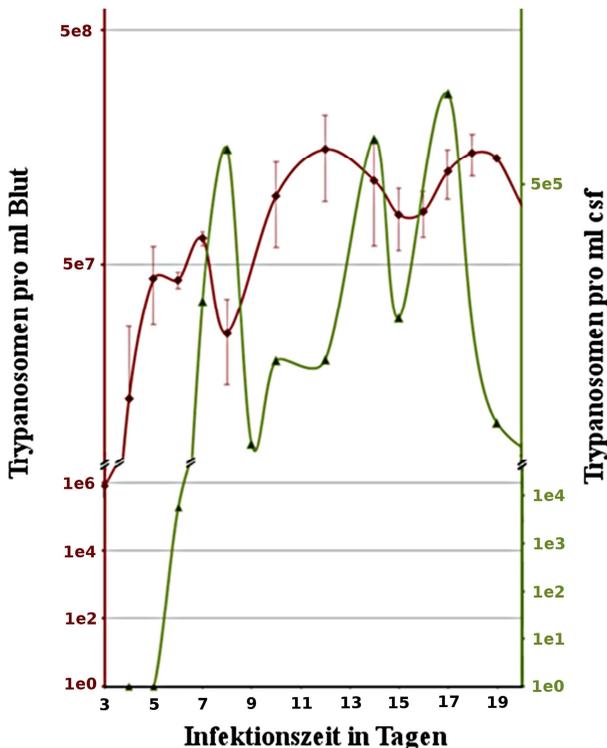


Abbildung 38: Zyklische Blut- und CSF-Infektion (AnTat 1.1). Die Parasitämie jeder Ratte wurde an fünf verschiedenen Tagen bestimmt, beginnend 4 Tage vor der terminalen CSF-Entnahme. Für jeden Zeitpunkt ist der Mittelwert aus fünf Tieren aufgetragen (rote Kurve). Der Trypanosomentiter im CSF wurde jeweils einfach bestimmt (grüne Kurve). Publiziert in [209].

im CSF blieb während der gesamten Beobachtungsdauer um den Faktor 100 geringer als im Blut. Die Parasiten können sich hier also nicht vermehren. Eine CSF-Infektion trat auch auf, wenn Ratten mit monomorphen Trypanosomen (MiTat 1.2) infiziert wurden. Diese Parasiten haben die Fähigkeit zur Zelldichte-abhängigen Differenzierung weitestgehend verloren. Generell wird davon ausgegangen, dass monomorphe Stämme keine Gehirninfection verursachen können. Dennoch konnte auch im diesem Fall eine beginnende CSF Infektion nachgewiesen werden (ca. 10^3 Parasiten pro ml CSF), wenn die Tiere 4 Tage *post-infectionem* eine letale Parasitämie von $>10^9$ Trypanosomen pro ml erreichten.

2. Immunglobulin G im Liquor

Das Ventrikelsystem stellt (wie auch das Gehirnparenchym) einen immunprivilegierten Raum dar. Während einer Trypanosomiasis konnten hier nur vereinzelte Makrophagen und Epilexuszellen nachgewiesen werden. Es ist unwahrscheinlich, dass der zyklische Verlauf einer CSF-Infektion durch spezifische Immunreaktionen verursacht wird. Dazu wäre es notwendig, dass eine Vielzahl von B-Lymphozyten die Blut-CSF-Schranke überqueren würde. Nur so könnte ein ausreichend breites Spektrum an Epitopen (und damit der VSG-Typ der aktuellen Trypanosomenpopulation) erkannt werden. Andererseits könnte die Barrierefunktion der Blut-CSF-Schranke infektionsbedingt für Immunglobuline durchlässig werden, was zur Opsonierung von Trypanosomen im CSF führen würde. Deshalb sollte untersucht werden, ob im Verlauf einer Gehirninfection eine erhöhte

Immunglobulin G-Konzentration im CSF auftritt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob dabei spezifische anti-trypanosomale Antikörper nachgewiesen werden können.

0, 6 und 21 Tage *post-infectionem* wurden CSF-Proben infizierter Ratten entnommen und mittels ELISA untersucht. Das eingesetzte Kit (Rat IgG total ELISA Ready-Set-Go®, eBioscience®) basierte auf anti-Ratten-IgG Antikörpern, die auf einer 96 *well*-Mikrotiterplatte adsorbiert wurden. Auf dieser wurde CSF inkubiert und gebundenes Ratten-IgG mit einem Peroxidasegekoppeltem anti-Ratten-IgG Antikörper detektiert. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, das nachfolgend bei 450nm im ELISA-reader gemessen wurde. Wie in Abbildung 39 (links) dargestellt stieg die Gesamt-IgG-Konzentration von 1mg/l im naiven Tier auf 11mg/l nach 21 Tagen. Diese Werte liegen innerhalb des Referenzbereichs, der für Menschen mit bis zu 40mg/l angegeben wird [263]. Eine Aussage darüber, ob es sich um einen IgG-Influx über eine geschädigte Blut-CSF-Schranke oder

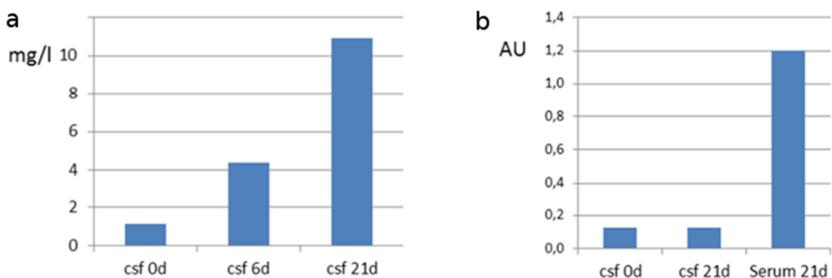


Abbildung 39: Immunglobuline im CSF. a) Gesamt-IgG-Konzentration 0, 6 und 21 Tage *post-infectionem* (mg/l). b) Konzentration spezifischer anti-VSG Antikörper im CSF nach 0 und 21 Tagen, sowie in Serum nach 21 Tagen (*arbitrary unit* [AU]). Publiziert in [209].

eine Neusynthese innerhalb des Liquorraums handelt, kann ohne eine Messung der Albumin-Konzentration im CSF nicht getroffen werden, die experimentell aber nicht zugänglich war.

Die Messung Trypanosomen-spezifischer Antikörper erfordert Kenntnis über den VSG-Typ der Parasiten. Da dieser einer regelmäßigen Variation unterliegt, wurden 2 Ratten mit demselben Stabilat infiziert. Mit dem Erreichen des ersten *peaks* im Blut wurde ein Tier getötet, Parasiten-VSG isoliert und an Mikrotiterplatten adsorbiert. Das zweite Tier diente 21 Tage *post-infectionem* der Gewinnung von CSF und Serum. Die Proben wurden auf den vorbereiteten *wells* inkubiert und gebundenes anti-VSG IgG mittels Peroxidase-gekoppeltem anti-Ratten-IgG detektiert. Abbildung 39 (rechts) zeigt keine Erhöhung Trypanosomen-spezifischer Antikörper im CSF nach 21 Tagen gegenüber naïvem CSF. Im Serum konnten erwartungsgemäß anti-VSG Antikörper nachgewiesen werden. Eine spezifische Immunreaktion im Liquorraum konnte somit ausgeschlossen werden.

3. CSF als Kulturmedium

Da Trypanosomen im CSF einerseits nicht immunologisch erkannt werden, und die Parasitenkonzentration andererseits nicht hoch genug ist, um eine Zelldichte-abhängige Regulation zu erklären, könnte die CSF-Zusammensetzung selbst für den zyklischen Infektionsverlauf verantwortlich sein [264]. Dabei war zu eruieren, ob hierfür ein vermindertes Nährstoffangebot oder toxische Faktoren innerhalb des CSF verantwortlich sind.

Pleomorphe Trypanosomen wurden 11 Tage *post-infectionem* aus Rattenblut isoliert und auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Parasiten pro ml eingestellt. Wachstumskurven wurden in HMI-9 Medium, CSF, sowie in 1:1 Verdünnungen von HMI-9 in NaCl und HMI-9 in CSF aufgenommen (Abbildung 40). Dabei zeigte sich, dass die Parasiten in reinem CSF kaum proliferierten und nach ca. 30 Stunden abstarben. In HMI-9 Medium hingegen setzte während der ersten 50 Stunden eine Proliferationsphase ein; erst nach ca. 70 Stunden waren alle Parasiten abgestorben.

CSF und Serum enthalten dieselben für Trypanosomen essentiellen Nährstoffe wie beispielsweise Glucose und Aminosäuren, allerdings in unterschiedlicher Konzentration [151]. Ein denkbarer Nährstoffmangel der CSF Kulturen könnte durch Supplementierung mit HMI-9 Medium kompensiert werden. So sind alle Komponenten des Mediums im Überschuss vorhanden: Trypanosomenkulturen in einer 1:1 Verdünnung aus HMI-9 und NaCl zeigen einen vergleichbaren Wachstumsverlauf wie Kulturen in reinem HMI-9 Medium. Dennoch überlebten Parasiten, die in 1:1 Verdünnungen aus HMI-9 und CSF kultiviert wurden nur 45 Stunden. Damit konnte gezeigt werden, dass nicht etwa ein Nährstoffmangel zum Absterben der Trypanosomen im Liquor führte. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass dieser trypanozide Substanzen enthält. Dabei handelt es sich jedoch nicht um den humanen trypanolytischen Faktor [24,265,266], da die Experimente sowohl in humanem, als auch in Ratten-CSF reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Ferner konnten reaktive Sauerstoffspezies als Ursache ausgeschlossen werden. Durch Zugabe von reduzierenden Substanzen wie N-Acetylcystein

konnte die Überlebenszeit der Parasiten in CSF nicht verlängert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise verhindern stattdessen im Liquor vorhandene Neuropeptide eine dauerhafte Besiedlung dieses Habitats [267,268]. So wurde beschrieben, dass beispielsweise Urocortin (LD_{50} $1,1\mu M$) und Adrenomedullin (LD_{50} $1,8\mu M$) antiparasitisch wirksam sind [268].

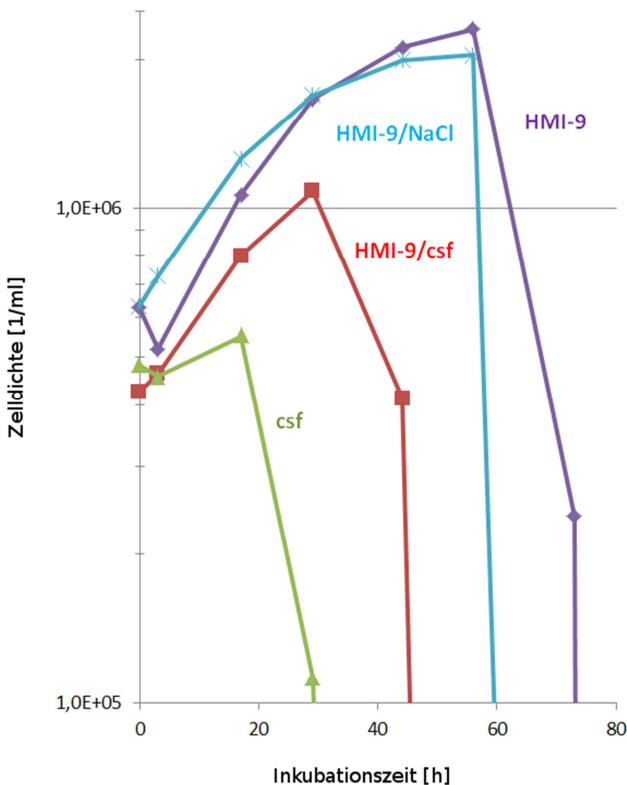


Abbildung 40: Wachstumskurven pleomorpher Trypanosomen (AnTat 1.1) in humanem CSF und HMI-9 Medium, sowie in 1:1 Verdünnungen aus HMI-9 und physiologischer Kochsalzlösung bzw. HMI-9 und humanem CSF. Publiziert in [208].

Im Rahmen einer natürlich verlaufenden Gehirninfection müssen die Parasiten die lebensfeindliche Umgebung des Liquorraums offensichtlich zügig wieder verlassen. Nur so kann es zu einer Infektion der *Pia mater* kommen, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird. Dies würde auch das veränderte Schwimmverhalten der aus dem Gehirn isolierten Trypanosomen erklären (vgl. Seite 86ff). Zwar können alle Formen in den Liquorraum vordringen (vgl. Seite 81ff), doch würden nur besonders schnell und gerichtet schwimmende *slender* Formen die *Pia mater* rechtzeitig erreichen.

Die Tatsache, dass Trypanosomen im CSF nicht lange überlebensfähig sind steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bei diagnostisch durchgeführten Lumbalpunktionen kaum Trypanosomen nachgewiesen werden können. Stattdessen wird von der *World Health Organization* empfohlen, eine Gehirninfection auch dann anzunehmen, wenn die Leukozytenkonzentration im Patientenliquor mehr als 5 Zellen pro μl beträgt [39].

G. Interaktion mit Plexusepithelzellen

1. Artificielle Blut-CSF-Schranke

Artificielle Blut-CSF-Schranken wurden beschrieben, um bakterielle Gehirninvasionen (Meningokokken und Streptokokken [149]) und die Transmigration von Immunzellen (neutrophilen Granulozyten und Monozyten [150]) zu untersuchen. Diese Systeme basieren auf immortalisierten humanen Plexusepithelzellen (HIBCPP) oder primären porcinen Plexusepithelzellen (PCPEC), die an der Unterseite eines *transwell*-Filters

angebracht sind (Abbildung 41). Durch diese inverse Anordnung repräsentiert die Oberseite des Filters das Stroma des *Plexus choroideus*. Die Filtermembran simuliert die Basallamina und sorgt für die Ausbildung der Polarität des adhärenierten Zelllayers. Der Bereich unterhalb des *transwell*-Filters entspricht dem CSF-gefüllten Ventrikelraum. Das System ähnelt der Blut-CSF-Schranke in wesentlichen Punkten wie der Expression von Occludinen bzw. Claudinen und der Ausbildung von *tight junctions*. Die Barrierefunktion lässt sich durch die hohe elektrischen Impedanz (ca. $1\text{ k}\Omega$) und den sehr geringen makromolekularen Fluss nachweisen [149,150].

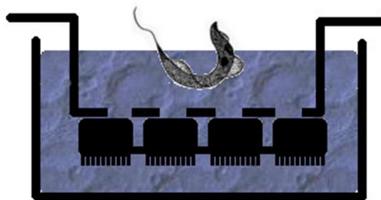


Abbildung 41: Schematischer Aufbau der inversen artifiziellen Blut-CSF-Schranke. An der Unterseite einer *transwell*-Filtermembran adhärenieren über *tight junctions* verbundene Plexusepithelzellen. Im oberen Reservoir befinden sich Trypanosomen.

In Kooperation mit Prof. Dr. med. Horst Schrotten (Pädiatrische Infektiologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universitätsklinik Heidelberg) wurden $1,5 \cdot 10^5$ Trypanosomen (entsprechend einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Parasiten pro ml) in das obere Reservoir der artifiziellen Blut-CSF-Schranke gegeben. Dabei handelte es sich entweder um monomorphe Parasiten aus Zellkulturen (MiTat 1.2), oder um pleomorphe Trypanosomen (AnTat 1.2), die 23 Tage *post-infectionem* aus Rattenblut isoliert wurden. Die Kulturen wurden 16h bei 37°C und 5% (v/v) CO_2 inkubiert. Danach wurde die Anzahl der transmigrierten Parasiten im unteren Reservoir mit einer Neubauer-

Zählkammer bestimmt. Bei einer Porengröße von $4\mu\text{m}$ stellte die Filtermembran selbst kein Hindernis für die Parasiten dar. Dies zeigte sich dadurch, dass die Parasiten beim Einsatz von Filtern ohne Plexusepithelzellen vollständig ins untere Reservoir absanken.

Im eigentlichen Versuch wurden Filter mit adhärennten Plexusepithelzellen benutzt, deren elektrische Impedanz zwischen 800Ω und $1,5\text{k}\Omega$ betrug. Nach 16 Stunden transmigrierten 25% der monomorphen Trypanosomen (MiTat 1.2) durch das Plexusepithel. Bei pleomorphen Trypanosomen, die 23 Tage *post-infectionem* aus Rattenblut isoliert wurden, erhöhte sich der Anteil transmigrierter Trypanosomen auf 56% (Abbildung 42a). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass monomorphe Trypanosomen die Blut-CSF-Schranke im Rattenmodell in geringerer Zahl überqueren als pleomorphe (vgl. Seite 124ff).

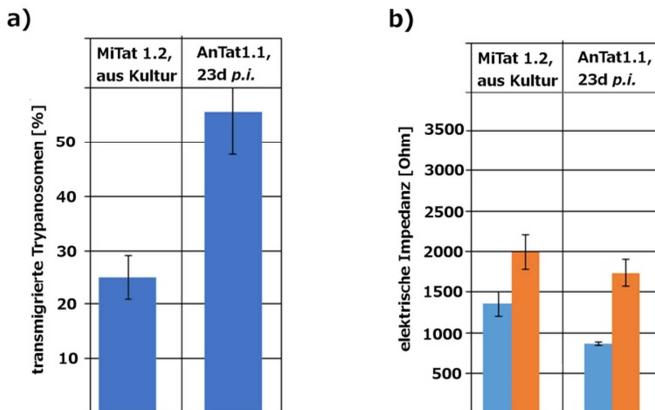


Abbildung 42: a) Prozentuale Transmigration von monomorphen (MiTat 1.2) Trypanosomen aus Zellkultur ($n=3$) und pleomorphen (AnTat 1.1) Trypanosomen aus dem Blut einer 23 Tage infizierten Ratte ($n=3$). b) Elektrische Impedanz der artifiziellen Blut-CSF-Schranke vor Versuchsbeginn (blau, $n=3$) und nach 16 Stunden (orange, $n=3$).

Die Filter wurden im Anschluss mit 4% (w/v) Formaldehyd und 4% (w/v) Glutaraldehyd fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie eingebettet. In der folgenden Untersuchung wurden Veränderungen der Plexusepithelzellen, die mit Trypanosomen im oberen Reservoir co-kultiviert wurden, festgestellt. Verglichen mit Plexusepithelzellen ohne Trypanosomenzugabe stellten sich atypisch zerfurchte Zellkerne und zahlreiche multivesikuläre Strukturen dar. Da dies in der Ratte jedoch nicht verifiziert werden konnte, handelt es sich dabei vermutlich um Artefakte.

Die elektrische Impedanz zwischen oberem und unterem Reservoir der artifiziellen Blut-CSF-Schranke wurde vor Versuchsbeginn und nach 16 Stunden gemessen (Abbildung 42b). Diese erhöhte sich von durchschnittlich $1,3\text{k}\Omega$ auf $2,0\text{k}\Omega$ (Experimente mit MiTat1.2), bzw. von 860Ω auf $1,7\text{k}\Omega$ (Experimente mit AnTat1.1). Folglich blieb die Barrierefunktion während des Versuchszeitraums intakt. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Parasiten-Transmigration um einen spezifischen Vorgang handelte, wurden $5 \cdot 10^4$ FACS *beads* (LifeTechnologies™, CountBright™ Absolute Counting Beads [269]), die eine vergleichbare Größe wie Trypanosomen aufwiesen, ins obere Reservoir gegeben. Erwartungsgemäß konnten nach 16 Stunden im unteren Reservoir mittels Durchflusssytometrie keine *beads* nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Parasiten para- oder transzellulär durch das Plexusepithel migrieren [145], wurden $1,5 \cdot 10^5$ Trypanosomen (MiTat 1.2) ins obere Reservoir gegeben, die Filter nach 16 Stunden mit 4% (w/v) Formaldehyd fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 43a). Außerdem wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Oberfläche der Plexusepithelzellen angefertigt (Abbildung 43b). Dabei zeigte

sich, dass nur vereinzelte Trypanosomen in Kontakt mit dem Plexusepithel fixiert waren. Vermutlich ist der Durchtritt ein sehr schnell verlaufender Prozess, bei dem sich die Parasiten auf Grund des Flagellumschlages aktiv durch die Epithelzellen bewegen und dann sofort ins untere Reservoir absinken. Somit befinden sich im Moment der Fixierung nur wenige Trypanosomen zwischen den Epithelzellen. Zudem lagen diese häufig in Bereichen, in denen das Epithel nicht mehr vollständig intakt war. Es ist unklar, ob die beobachteten Beschädigungen des Zelllayers durch Wechselwirkung mit den Parasiten entstanden sind, oder ob es sich um ein Präparationsartefakt handelte. Da die Parasiten stets außerhalb der Plexusepithelzellen lokalisiert waren, konnte eine transzelluläre Migration ausgeschlossen werden.

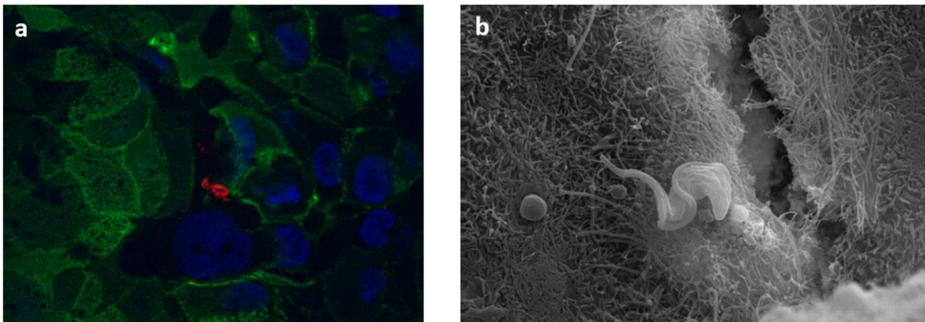


Abbildung 43: Nachweis von Trypanosomen (MiTat 1.2, VSG 221) in künstlicher Blut-CSF-Schranke. a) Immunfluoreszenzaufnahme. Rot: Trypanosomen (*rabbit* anti-VSG 221 und anti-*rabbit*-Alexa Fluor 594). Grün: Aktinfärbung (Phalloidin-Alexa Fluor 488). Blau: Zellkerne (Bisbenzimid). b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der apikalen Plexusepithelseite mit transmigriertem Trypanosom.

2. Wechselwirkung mit Claudin-11

Claudine stellen neben Occludinen die wichtigste Komponente epithelialer *tight junctions* dar. Bislang sind 27 unterschiedliche Claudine bekannt. Sowohl N-, als auch C-Terminus sind im Zytosol lokalisiert und werden von 4 Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen verbunden. Die Interaktion zwischen Claudinmolekülen ist noch nicht abschließend untersucht, es ist jedoch bekannt, dass sowohl homophile, als auch heterophile Bindungen zwischen bestimmten Claudinen möglich sind [270]. Die entstehenden Zell-Zellverbindungen bilden eine parazelluläre Barriere, die von Ionen und Molekülen nicht frei passiert werden kann. Einige Claudine können dabei ladungsselektive Ionenkanäle ausbilden, deren Ionenspezifität von den extrazellulären Domänen bestimmt wird. Das Expressionsmuster in unterschiedlichen Organen ist Gegenstand der aktuellen Forschung [271].

Die charakteristische parallele Anordnung der *tight junctions* innerhalb der Plexusepithelzellen ist auf die Expression von Claudin-11 zurückzuführen [146]. Diese unterscheidet sich grundlegend vom netzförmigen Aufbau der *tight junctions* innerhalb der Blut-Hirn-Schranke, die kein Claudin-11 enthalten. Sollte eine Attraktion oder Interaktion von Trypanosomen mit Claudin-11 bestehen, könnte das die hier beschriebene Transmigration der Parasiten über die Blut-CSF-Schranke begünstigen.

Um potentielle Wechselwirkungen zwischen Trypanosomen und Claudin-11 exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde Ratten-Claudin-11 heterolog in SF9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) exprimiert. Hierzu wurde mRNA aus naïvem Rattenhirn isoliert und ausgehend von einem

Oligo-dT Primer revers transkribiert. Die erhaltene cDNA diene als *template* für eine Polymerasekettenreaktion mit Primern gegen Claudin-11 (Genidentifikationsnummer NM_053457), die um Restriktionsstellen für BamHI (*upstream*) und HindIII (*downstream*) ergänzt wurden. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt, durch TA-Ligation in den pCR[®]2.1-Vektor subkloniert, in chemisch kompetente One Shot[®] Top10 Zellen transformiert und positive Klone über Kolonie-PCR bestimmt. Nach Plasmidisolierung wurde das Konstrukt fehlerfrei sequenziert. Sowohl das Subklonierungsplasmid, als auch der Zielvektor pFastBac[™]1 wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut, und Claudin-11 sowie das pFastBac[™]1-*backbone* gelelektrophoretisch aufgereinigt. Insert und Vektor wurden im Verhältnis 3:1 ligiert und in chemisch kompetente Zellen transformiert, das Plasmid reisoliert und erneut in DH10Bac[™] transformiert. DH10Bac[™] beinhaltet ein baculovirales Bacmid mit einer Rekombinationsstelle für pFastBac[™]1. Die Insertion erfolgte durch Transposase, die auf einem Helferplasmid in DH10Bac codiert war. Durch blau/weiß-Selektion wurden rekombinante Kolonien bestimmt, das Bacmid isoliert und in SF9-Zellen lipofiziert. Die entstehenden Baculoviren wurden sequentiell in zwei weiteren SF9-Zellkulturen nach Herstellerangaben amplifiziert [272].

Schließlich wurden SF9 Adhäsionskulturen mit 4 PFU der Baculoviren-Stammlösung infiziert und 72 Stunden bei 27°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und die Expression von Claudin-11 immunhistochemisch bestätigt. Abbildung 44 (links) zeigt mit *rabbit* anti-Claudin-11 und anti-*rabbit* Alexa Fluor 594 gefärbte infizierte SF9-Zellen. Eine

Negativkontrolle wurde mit SF9-Zellen durchgeführt, die kein rekombinantes Claudin-11 exprimierten (Abbildung 44 rechts).

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Trypanosomen und Claudin-11 wurden erneut SF9 Adhäsionskulturen infiziert und das Insektenzellmedium nach 72h durch HMI-9 ersetzt. Trypanosomen wurden in einer Endkonzentration von 10^6 Parasiten pro ml zugegeben. Nach 6 Stunden

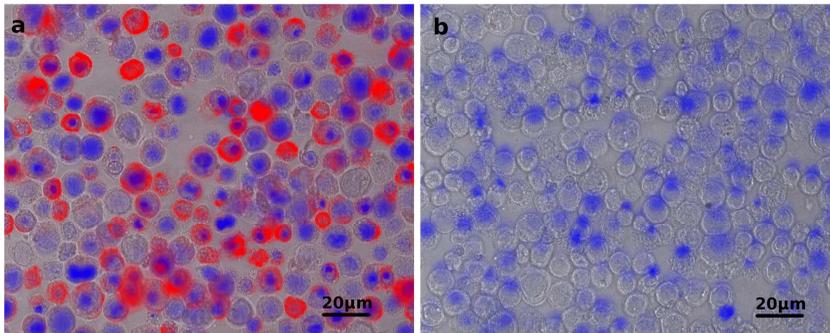


Abbildung 44: Immunfluoreszenz von SF9-Zellen, die rekombinantes Ratten-Claudin 11 exprimierten (a) und SF9-Kontrollzellen ohne Claudin-11 (b). Rot: *rabbit* anti-Claudin 11 und anti-*rabbit* Alexa Fluor 594. Blau: Kernfärbung (Bisbenzimid).

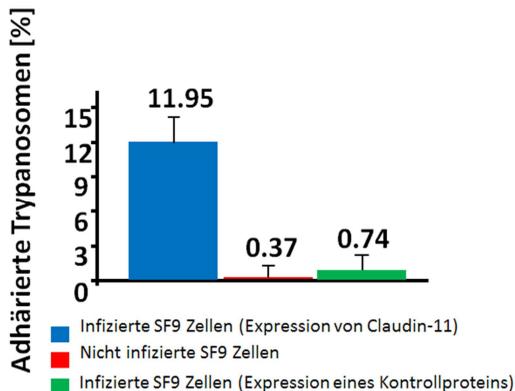


Abbildung 45: Statistische Auswertung der Wechselwirkung zwischen Trypanosomen und Claudin-11 exprimierenden SF9 Zellen (blau), nicht infizierten SF9 Zellen (rot) und SF9 Zellen, die mit einem Kontrollvirus infiziert wurden (grün).

bei 37°C wurde das Medium abgenommen und der SF9 *monolayer* mehrfach vorsichtig mit PBS gewaschen. Im Lichtmikroskop wurden dreimal 100 SF9 Zellen dahingehend untersucht, ob anhaftende Trypanosomen vorhanden waren. In ca. 12% aller SF9 Zellen konnte eine Interaktion mit den Parasiten beobachtet werden. In nicht infizierten Insektenzellen, sowie in SF9 Zellen, die mit einem Kontrollvirus infiziert wurden, lag die Zahl adhärerter Trypanosomen unter 1% (Abbildung 45).

Weitere Claudin-11 SF9 Zellen wurden nach 6-stündiger Co-Kultivierung mit Trypanosomen für Rasterelektronenmikroskopie eingebettet. Hier konnte veranschaulicht werden, wie die Parasiten an Zellausläufer der Insektenzellen adhärten (Abbildung 46). Eine ähnliche Interaktion war bislang nur von epimastigoten Fliegenformen bekannt: diese heften sich in Tsetse-Fliegen am Speicheldrüsenepithel an, bevor sie in metazyklische Formen differenzieren [99].

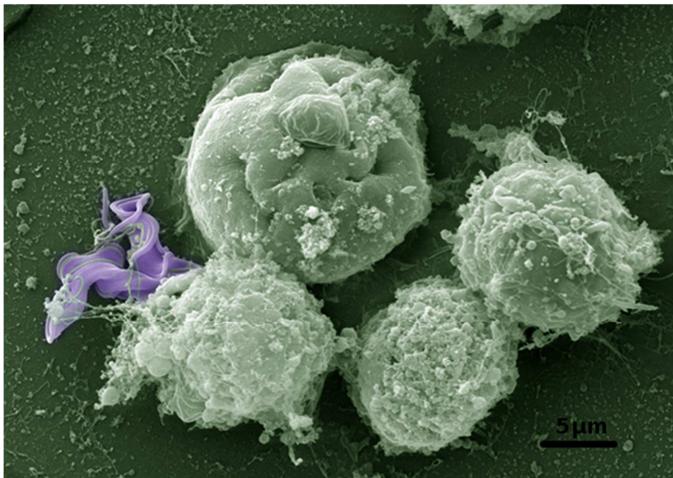


Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopie von Trypanosomen (MiTat 1.2, VSG 221) und Claudin-11 exprimierenden SF9 Zellen nach 6-stündiger Co-Kultivierung (Falschfarbendarstellung).

H. Organinfektion

Trypanosomiasis ist nicht auf eine Blutinfektion beschränkt. Vielmehr sind die Parasiten in der Lage, Gefäßgrenzen mit unterschiedlicher Effizienz zu überwinden. Im Gehirnparenchym selbst treten nur vereinzelt Trypanosomen auf, die sich dort zudem nicht entwickeln können (vgl. Seite 114ff). Die Parasiten können die Blut-CSF-Schranke jedoch in Abhängigkeit der Parasitämie durchqueren, was letztlich zu einer permanenten Infektion der *Pia mater* führt [208,209].

Die meisten Blut-Organ-Schranken sind wesentlich permeabler, weshalb Trypanosomen die inneren Organe sehr leicht infiltrieren können [188,273]. Laut Literatur führt dies zur Rekrutierung von Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und polymorphonukleären Leukozyten [273]. Letztlich kommt es zur Degeneration organspezifischer Zellen und der Ausbildung fokaler Nekrosen [273]. Insbesondere in Herz und Augen wurden schwere Läsionen bei Trypanosomiasis beschrieben [273], so dass der Tod oftmals durch Herzversagen eintritt [188,274]. Im Folgenden sollte die Fähigkeit von Trypanosomen untersucht werden, in unterschiedliche Gewebe vorzudringen. Dabei zeigte sich, dass das Habitat der Parasiten bei weitem nicht nur den Blutkreislauf umfasst.

Infizierte Ratten wurden frühestens nach 5 Tagen *post-infectionem* durch Herzpunktion mit 4% (w/v) Glutaraldehyd / 4% (w/v) Paraformaldehyd perfundiert. Herz, Hoden, Nebenhoden, Nieren, Milz und Augen wurden entnommen, repräsentative Organbereiche präpariert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Die anschließende Untersuchung zeigte,

dass invadierte Parasiten in Herz (Abbildung 47) und Hoden (Abbildung 48) intakt waren, während sie in Augen (Abbildung 52) und roter Pulpa der Milz (Abbildung 50) degradierten. In Milz und Nebenhoden (Abbildung 51) fanden sich viele von Makrophagen phagozytierte Trypanosomen. Einzig in der Niere konnten keine Parasiten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ähnlich den Plexusepithelzellen der Blut-CSF-Schranke bilden Sertoli-Zellen im Hoden [275] und retinale Pigmentepithelzellen im Auge [276] *tight junctions* aus. Allen drei Barrieren ist gemeinsam, dass ihre *tight junctions* Claudin-11 enthalten [146], was zu einer charakteristischen parallelen Anordnung der anatomischen Strukturen führt [277]. Andere *tight junctions* (z.B. innerhalb der Blut-Hirn-Schranke) weisen hingegen netzförmig angeordnete Fibrillen auf. Experimentell konnten zwar extravasale Trypanosomen in Auge und Hoden gefunden werden; im Gegensatz zur Blut-CSF-Schranke schienen sie jedoch die eigentliche Blut-Hoden- bzw. Blut-Retina-Schranke nicht zu überwinden.

1. Morphologisch intakte Trypanosomen

Ähnlich wie in der *Pia mater* zeichneten sich Trypanosomen in Herz (Abbildung 47) und Hoden (Abbildung 48) durch eine intakte Plasmamembran, elektronendichtes Zytoplasma und einen unversehrten *variant surface glycoprotein* Oberflächenmantel aus.

Im Herz traten sie bei allen untersuchten Ratten im (extravasalen) interstitiellen Raum zwischen den Kardiomyozyten auf (Abbildung 47). Es handelte sich dabei stets um einzelne Parasiten. Ferner konnte keine

Proliferation beobachtet werden, so dass unklar bleibt, ob hier tatsächlich eine wachsende Population entsteht.

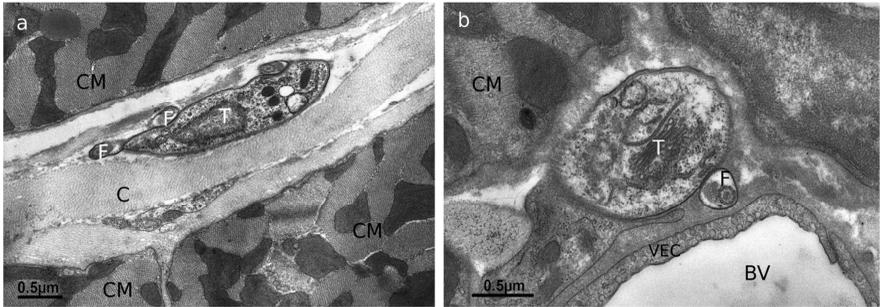


Abbildung 47: Elektronenmikroskopie intakter Trypanosomen (AnTat 1.1) zwischen Herzmuskelzellen. C=Kollagen, CM=Kardiomyozyt, F=Flagellum, T=Trypanosom, VEC=Gefäßendothelzelle. Publiziert in [209].

Wie auch in früheren Studien [278] wurden Trypanosomen im Hodenparenchym gefunden (Abbildung 48). Der Durchtritt durch das Gefäßendothel stellt jedoch nur den ersten Schritt bei der Überwindung der Blut-Hoden-Schranke dar und entspricht somit der Invasion des Stroma des *Plexus choroideus*. Die eigentliche Barriere wird von den *tight junctions* der Sertoli-Zellen gebildet (analog den Plexusepithelzellen). Obwohl die *tight*

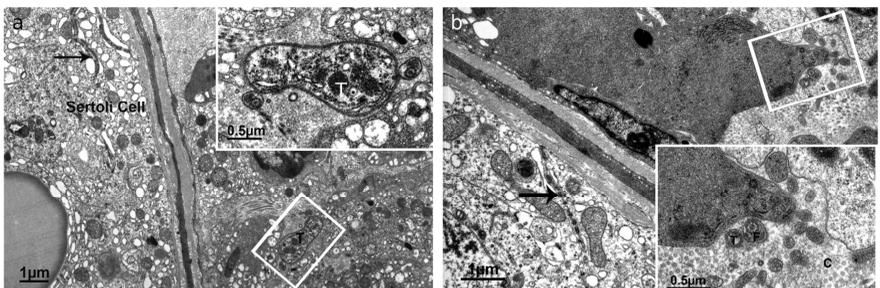


Abbildung 48: Elektronenmikroskopie intakter Trypanosomen (AnTat 1.1) im Hoden. Die Parasiten liegen außerhalb der Blutgefäße, ohne in die Samenkanäle vorzudringen. C=Kollagen, F=Flagellum, T=Trypanosom, Pfeil=*tight junction*. Publiziert in [209].

junctions in Hoden und Blut-CSF-Schranke ähnlich organisiert sind, konnten die Parasiten diese Schranke jedoch nicht überwinden. In den Samenkanälen konnten entsprechend keine Trypanosomen nachgewiesen werden.

2. Degenerierte oder phagozytierte Trypanosomen

Im Verlauf einer Trypanosomiasis kommt es bereits nach kurzer Zeit, d.h. mit dem Auftreten des ersten Parasitämie-*peaks*, zu einer pathologischen Vergrößerung der Milz. Dies führt mit zunehmender Infektionsdauer zur Genese einer massiven Splenomegalie mit einem Massezuwachs von bis zu 600% nach 28 Tagen (Abbildung 49).

Allerdings konnten in der Milz elektronenmikroskopisch nur vereinzelte Trypanosomen im Bereich der roten Pulpa nachgewiesen werden (Abbildung 50). Dabei ist zu berücksichtigen, dass viele Parasiten möglicherweise während der Perfusion mit Fixativ ausgewaschen wurden. Interessanterweise

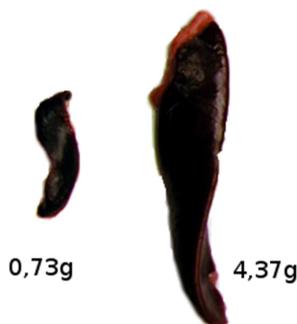


Abbildung 49: Splenomegalie im Rahmen einer Trypanosomiasis. Links: Milz aus naïvem Kontrolltier. Rechts: Milz 28 Tage *post-infectionem*.

befanden sich alle Trypanosomen bereits im Stadium der Desintegration. Sowohl der Oberflächenmantel, als auch große Teile des Zytoskeletts waren bereits abgebaut. Dies war zu erwarten, da eine wesentliche Aufgabe der Milz darin besteht, mit Antikörpern opsonierte Zellen (wie z.B. Mikroorganismen), deformierte Erythrozyten, Immunkomplexe, Fibrinmonomere oder kolloidale Partikel aus dem Blut zu entfernen. Insofern ist es wahrscheinlich, dass die Parasiten bereits geschädigt waren, bevor sie im retikuloendothelialen System der Milz zurückgehalten wurden.

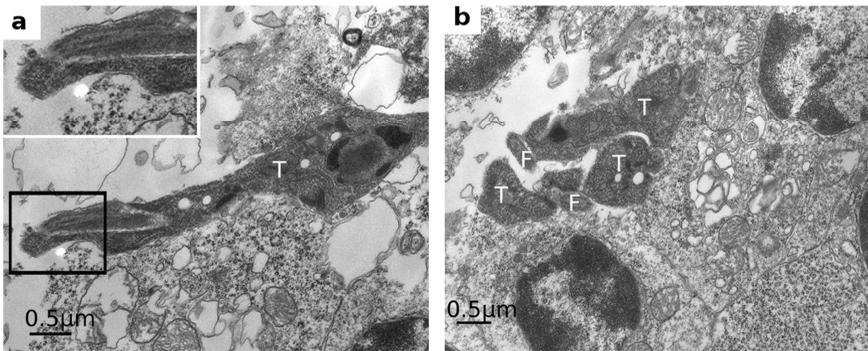


Abbildung 50: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat 1.1) in der roten Pulpa der Milz. Sowohl der Oberflächenmantel, als auch das Zytoskelett sind degeneriert. F=Flagellum, T=Trypanosom. Publiziert in [209].

Im Nebenhoden wurden sowohl morphologisch intakte, als auch phagozytierte Trypanosomen gefunden.

Abbildung 51 zeigt unterschiedliche Stadien der Phagozytose, von der Anlagerung an Makrophagen über die aktive Aufnahme und schließlich den Verdau in Phagolysosomen.

Es scheint, als würden nur Herz und *Pia mater* permanent infiltriert. In den anderen Organen variierte die Besiedlungsdichte je nach Präparationszeitpunkt. Vermutlich werden Parasiten in den meisten Organen

immunologisch erkannt und abgebaut, oder leiten selbst einen apoptotischen Zelltod ein. Hintergrund könnte sein, dass die Parasiten den Durchtritt durch das Gefäßendothel und die darunterliegende Basallamina durch Sekretion von Metalloproteasen bewerkstelligen. Dieser Mechanismus ist beispielsweise von metastasenbildenden Tumorzellen bekannt [250]. Ein Kandidat hierfür wäre die *major surface metalloprotease* MSP-B (Genidentifikationsnummer Tb927.8.1610). Während der Differenzierung von Blutformen in prozyklische Formen exprimieren Trypanosomen MSP-B [172], wobei sie (wie bereits auf Seite 116ff diskutiert) ihren VSG Oberflächenmantel verlieren und in der Folge durch Procyclin ersetzen [279]. Sollte ein Durchtritt durch die Basallamina proteolytisch erleichtert werden, so könnte dies ebenfalls zum VSG-Verlust führen. Dies würde die Parasiten immunologisch angreifbar machen und dazu führen, dass Organinfektionen (ähnlich wie CSF-Infektionen) einen zyklischen Verlauf nehmen.

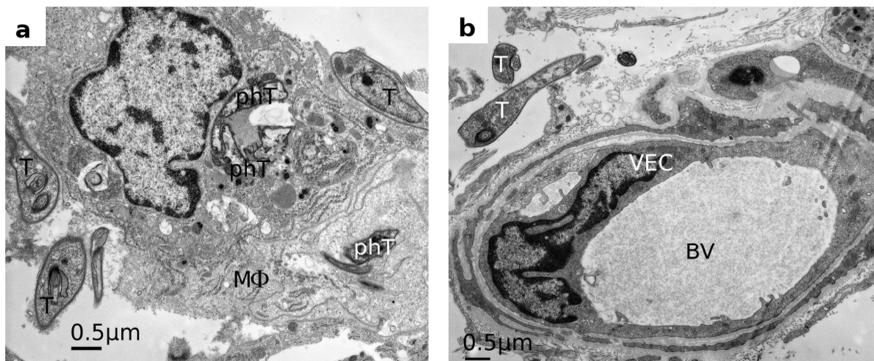


Abbildung 51: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat 1.1) im Nebenhoden.

a) Makrophage mit mehreren Trypanosomen in verschiedenen Stadien der Phagozytose. b) Intaktes Trypanosom neben einem Blutgefäß. BV=Blutgefäß, MΦ=Makrophage, phT=phagozytirtes Trypanosom, T=Trypanosom, VEC=Gefäßendothelzelle. Publiziert in [209].

3. Augeninfektion

Die auffälligste Gewebsschädigung ereignete sich in den Augen 28 Tage infizierter Ratten (Kooperation mit Prof. Dr. Ulrich Schraermeyer, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Eberhard Karls Universität, Tübingen). Zahlreiche Trypanosomen befanden sich in der Aderhaut (Abbildung 52). Dabei waren die meisten Parasiten nur noch anhand ihrer charakteristischen Form (Zellkörper mit angrenzendem Flagellum) identifizierbar, während der Oberflächenmantel, intrazelluläre Strukturen, sowie das Zytoskelett bereits abgebaut waren.

Innerhalb des Photorezeptorepithels waren keine Trypanosomen auffindbar. Dies deutet darauf hin, dass die Parasiten (ähnlich wie im Hoden) zwar Gefäßendothelien der Aderhaut durchqueren können, die Bruch-Membran jedoch nicht überwinden. Somit ist auch hier kein Durchtritt durch

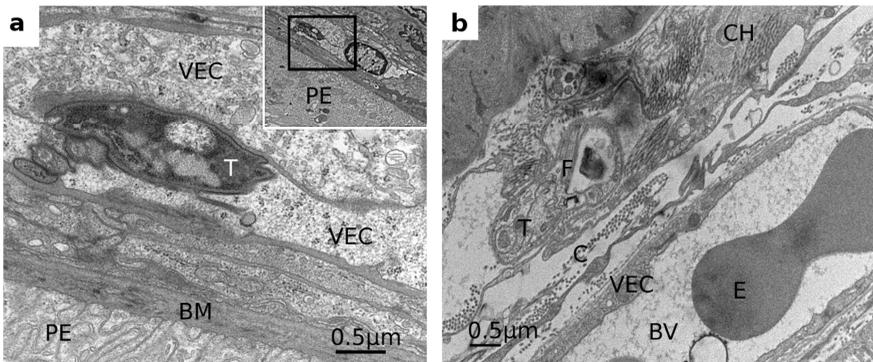


Abbildung 52: Elektronenmikroskopie von Trypanosomen (AnTat 1.1) im Auge. a) Intaktes Trypanosom innerhalb eines Blutgefäßes der Aderhaut (Übersichtsaufnahme rechts oben). b) Degeneriertes extravasales Trypanosom in der Aderhaut. Der VSG Mantel ist bereits abgebaut, das Zytoskelett noch intakt. BV=Blutgefäß, C=Kollagen, CH=Aderhaut (Choroidea), E=Erythrozyt, F=Flagellum, PE=Photorezeptorepithel, T=Trypanosom, VEC=Gefäßendothelzelle. Publiziert in [209].

die epitheliale (dem Plexusepithel der Blut-CSF-Schranke entsprechende), Blut-Retina-Schranke möglich. Dies gilt ebenso für die endotheliale Blut-Retina-Schranke der intraretinalen (nicht-fenestrierten) Gefäße, deren Endothelzellen über *tight junctions* verknüpft sind.

Besonders auffällig war, dass viele Blutgefäße pathologische Veränderungen zeigten. Dies reichte von leichten Deformationen bis hin zu vollständig kollabierten Gefäßen. Dadurch sollte es zu einer deutlichen Einschränkung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung infizierter Augen kommen. Eine solche Mangelversorgung würde erklären, dass innerhalb der Retina nur 4 bis 5 Photoepithelzellschichten gefunden wurden. Bei gesunden Ratten finden sich hingegen 10 bis 12 Zellschichten. Sowohl das Auftreten von Trypanosomen in der Aderhaut, als auch die Entstehung einer Retinopathie wurde in älteren Publikationen beschrieben [185,280].

Das Zytosol einiger Parasiten in der Aderhaut war komplett mit vesikulären Strukturen gefüllt (Abbildung 53). Möglicherweise besteht hierbei

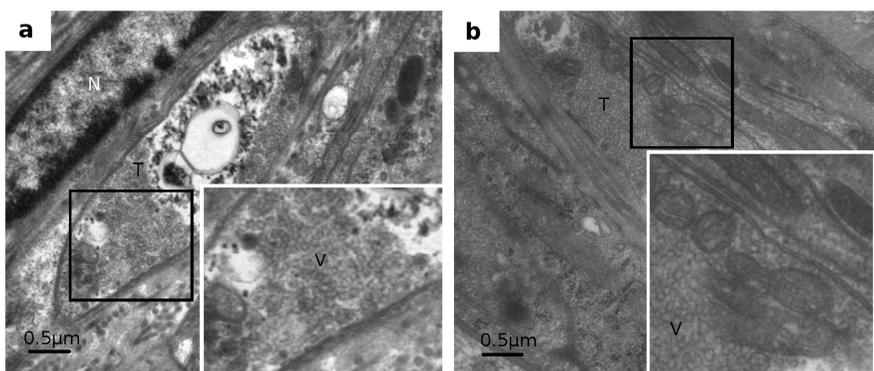


Abbildung 53: Elektronenmikroskopie zytosolischer Vesikel in Trypanosomen (AnTat 1.1) der Aderhaut. T=Trypanosom, V=Vesikel.

ein Zusammenhang zu den Caveolae, die auf der Plasmamembran aus dem Gehirn isolierter Trypanosomen nachgewiesen wurden (vgl. Seite 92ff). Es ist jedoch nicht klar, ob es sich um ein Charakteristikum einer bislang unbekannten Form handelt, die aus dem Gehirn ins Blut zurückkehrt. Diese könnte auf der gesamten Zelloberfläche Endozytose betreiben. Andererseits ist denkbar, dass Trypanosomen im Auge einen programmierten Zelltod sterben und die intrazellulären Vesikel hierbei entstehen.

Experimentell konnte ausgeschlossen werden, dass eine Anhäufung von endozytotischen Vesikeln im Zytosol allein durch Sauerstoffmangel induziert werden kann. Ein Unterangebot an Nährstoffen wiederum führt zwar zur Bildung von Autophagosomen, die jedoch anhand ihrer Doppelmembran von den hier auftretenden Vesikeln unterschieden werden können [281].

IV. Diskussion

Die erste, sogenannte hämolympathische Phase der afrikanischen Schlafkrankheit äußert sich klinisch in einem allgemeinen Krankheitsgefühl, Lymphknotenschwellungen (*Winterbottom's sign*), Kopf-, Gelenk-, Muskelschmerzen, Fieber und Schüttelfrost, endokrinen Symptomen, Störung der Herzfunktion, Gewichtsverlust, Anämie und Thrombozytopenie [1]. Nach mehreren Monaten (*T.b.gambiense*) oder Wochen (*T.b.rhodesiense*) schließt sich die zweite, meningoenzephalitische Phase an, bei der die krankheitsverursachenden Trypanosomen ins zerebrale Nervensystem invadieren. Sie ist gekennzeichnet durch Verwirrungszustände, Koordinationsschwierigkeiten, Sinnesstörungen, Deregulation der Schlaf-/Wachzyklen, epileptiformen Krämpfen, Apathie, Abmagerung und finalem Koma [1]. Weg und Mechanismus, über den die Blutparasiten ins ZNS gelangen, sind noch immer umstritten. Diskutiert wurde einerseits eine Invasion über die Blut-Hirn-Schranke [171,173,206,207] und andererseits über die Blut-CSF-Schranke [180,183,208,209]. Um die exakte Route der Parasiten aufklären zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Markierungs- und Detektionsmethoden untersucht, mittels derer Trypanosomen im Gehirn nachgewiesen und beurteilt werden können. Dabei erwiesen sich immunhistochemische Färbungen (Abbildung 24a und Abbildung 26), die Markierung mit *quantum dots* (Abbildung 25) und die Herstellung mCherry-exprimierender Trypanosomen (Abbildung 24b) als nur bedingt geeignet, um die Morphologie und Integrität der Parasiten zu beurteilen. In zahlreichen Publikationen, in denen lichtmikroskopische

Untersuchungen der Gehirninfection von *T. brucei* beschrieben werden [177,180,183], ist dementsprechend eine solche Beurteilung nur schwer möglich. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit hochaufgelöste elektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Gehirnareale angefertigt, um die Gehirninfection am Wistar-Rattenmodell (*Rattus norvegicus*) mit *T.b.brucei* zu untersuchen.

In der Literatur werden extravasale Trypanosomen im Gehirnparenchym beschrieben, wenn Ratten mit unnatürlich hohen Trypanosomendosen infiziert werden [171]. Es ist allerdings ungeklärt, ob es sich dabei tatsächlich um Parasiten handelte, die die Blut-Hirn-Schranke überwunden hatten, oder ob diese aus dem Subarachnoidalraum stammten und sich über die Virchow-Robin-Räume verteilten. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Trypanosomen bei natürlich verlaufenden Infektionen die Blut-Hirn-Schranke nur selten überwinden (Abbildung 30a) [208,209]. Des Weiteren wurden einzelne extravasal vorkommende Parasiten von Mikrogliazellen phagozytiert (Abbildung 30b). Es wurde berichtet, dass artifiziiell ins Gehirnparenchym injizierte Trypanosomen nicht überlebensfähig waren [177,178]. Dies konnte in dieser Arbeit durch Injektionen in das Striatum bestätigt werden. Im Gegensatz zu früheren Publikationen zeichnete sich die Injektionsmethode durch eine exakte Positionierung aus (Abbildung 22), bei der keine großflächige Verteilung des gespritzten Materials im Gehirn erfolgte (Abbildung 23). Die Parasiten begannen bereits nach einem Tag zu desintegrieren und waren nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar (Abbildung 27) [209]. Die Tiere entwickelten entsprechend keine Parasitämie innerhalb des 14-tägigen Beobachtungszeitraums. Demgegenüber führte die

Injektion in den Lateralventrikel bei 6 von 7 Tieren zu einer Blutinfektion [208]. Daraus wird geschlossen, dass in unserem Modell keine Infektion des Gehirnparenchyms auftritt, selbst dann nicht, wenn die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke gelegentlich durchdringen. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass keine Trypanosomen aus dem Cortex isoliert werden konnten, während eine Isolierung aus Meningen und dem gesamten Gehirn (inklusive Ventrikelsystem) möglich war (Abbildung 10). Umgekehrt konnten die isolierten Trypanosomen nicht mit Astrozyten (*Mus musculus*) als *feeder* Zellen co-kultiviert werden, vielmehr führte die Präsenz von Zellen des zentralen Nervensystems gegenüber der axenischen Kultivierung zu einer Verkürzung der Überlebenszeit (Abbildung 18).

Mit Hilfe von quantitativer *real time* PCR (Abbildung 21) konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Parasiten besonders im Bereich des Ventrikelsystems lokalisiert sind. Obgleich die Methode durch mögliche Verschleppung während der Präparation fehleranfällig ist und nur eine grobe räumliche Auflösung liefert, bestätigt sie frühere Beobachtungen von Schmidt [183], der in *T. rhodesiense*-infizierten grünen Meerkatzen CSF-Infektionen und inflammatorische Infiltrate in Ventrikelnähe und im weiteren Infektionsverlauf im Bereich der Meningen gefunden hat. Analog dazu wurde für *T. brucei*-infizierte Mäuse eine Infektion des *Plexus choroideus* beschrieben [180]. Alle vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Infektionsweg über die Blut-CSF-Schranke verläuft. Tatsächlich konnten Trypanosomen elektronenmikroskopisch im *Plexus choroideus* (Abbildung 31), dem Ventrikelsystem (Abbildung 33), dem Subarachnoidalraum (Abbildung 35) und in der *Pia mater* (Abbildung 36) nachgewiesen werden.

Um über die Blut-CSF-Schranke zu gelangen, müssen die Parasiten das fenestrierte Gefäßendothel des *Plexus choroideus* durchqueren. Es konnten sowohl intra-, als auch extravasale Trypanosomen im Plexus gefunden werden (Abbildung 31). Einige der Parasiten im Stroma hatten ihren Oberflächenmantel verloren (Abbildung 31a) oder wurden von Makrophagen eliminiert. Durch die wiederholte Eradikation von Trypanosomenteilpopulationen, die bei einer zyklisch verlaufenden Parasitämie auftritt [21,282], entstehen Immunkomplexe. Diese sind an der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten beteiligt [249]. Es wurde diskutiert, ob Immunkomplexe auch die Plexus-Permeabilität bei Trypanosomiasen erhöhen könnten [168,183]. Dies konnte hier jedoch experimentell ausgeschlossen werden. Dafür wurden Ratten mit VSG 221 immunisiert (Abbildung 32), die Immunkomplexbildung durch intravenöse Injektion von VSG ausgelöst und die Tiere mit Trypanosomen eines anderen Oberflächenantigen-Typs infiziert. Hierbei zeigte sich keine Änderung des Infektionsverlaufs [208]. Die über *tight junctions* verbundenen Plexusepithelzellen, die das Stroma gegen die CSF-gefüllten Ventrikel abgrenzen, bilden die eigentliche Barriere der Blut-CSF-Schranke [283]. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung von Trypanosomen mit Claudin-11 der *tight junctions* des Plexusepithels [146] besteht (Abbildung 45, Abbildung 46) [209]. Dafür wurden mit einem Baculovirussystem [272] transgene SF9 Zellen hergestellt, die Ratten-Claudin-11 heterolog exprimierten (Abbildung 44). Eine Interaktion der Parasiten mit Claudin-11 könnte die Anlagerung und den Durchtritt in die Ventrikel erleichtern. In artifiziellen Blut-CSF-Schranken, die aus humanen

(HIBCPP) oder porcinen (PCPEC) Plexusepithelzellen in einem *transwell* Filtersystem (Abbildung 41) [149,150] aufgebaut waren, wurden Hinweise darauf erhalten, dass eine Transmigration der Parasiten über das Epithel parazellulär erfolgt (Abbildung 43). Da eine solche Transmigration durch den Flagellumschlag sehr schnell verlaufen sollte, konnten keine Parasiten zwischen den Plexusepithelzellen nachgewiesen werden. Transmigrierte Trypanosomen wurden jedoch apikal des Plexusepithels im Ventrikelraum gezeigt (Abbildung 33).

Kernspintomographische Untersuchungen 25 Tage infizierter Ratten zeigten, dass die Blut-CSF-Schranke bezüglich des verwendeten Kontrastmittels im Verlauf einer Trypanosomiasis durchlässig werden kann (Abbildung 29). Für einige wenige Erkrankungen wird eine solche Gadolinium-Diethylentriaminpentaacetat (Gd-DTPA) Anreicherung im Liquor beschrieben (z.B. Meningeomatose [284]), ist jedoch als seltenes Phänomen einzustufen [244]. Gleichwohl konnten in unserem Modellsystem im Untersuchungszeitraum keine anderweitigen Veränderungen des Gehirns (wie entzündliche Wassereinlagerungen) beobachtet werden (Abbildung 28). Dies steht im Widerspruch zu Fallstudien bei HAT-Patienten [41,42], wird jedoch gestützt von Publikationen, in denen MRT-Untersuchungen an infizierten Mäusen durchgeführt wurden: Rodgers et al. [285,286] fanden die höchsten Kontrastmittelkonzentrationen ebenfalls in den Ventrikeln, zusätzlich den Meningen, und deutlich schwächer in anderen Gehirnarealen. Allerdings unterscheiden die Autoren nicht zwischen Blut-Hirn- und Blut-CSF-Schranke. Auch für die Trypanosomiasis wurde ein Funktionsverlust der Blut-CSF-Schranke diskutiert [287].

Bereits 1912 wurden Trypanosomen erstmals entsprechend ihrer Länge in die unterschiedlichen morphologischen Stadien *short stumpy*, *intermediate* und *long slender* eingeteilt [288]. Allgemein wird davon ausgegangen, dass *slender* Trypanosomen die proliferierende Teilpopulation darstellen. Diese sezernieren einen niedermolekularen Differenzierungsfaktor [213], der in rund 80% einer Parasitenpopulation eine Zelldichte-abhängige Differenzierung in Zellzyklus-arretierte *stumpy* Formen auslöst. Ein solches *quorum sensing* verhindert, dass eine für den Wirt letale Parasitämie erreicht wird. Während *slender* Trypanosomen ein zurückgebildetes Mitochondrium besitzen und Energie ausschließlich durch Glykolyse gewinnen [289] (Abbildung 6), exprimieren *stumpy* Formen Enzyme des Citratzyklus und das Mitochondrium enthält bereits Teile der Atmungskette [118]. Durch diese Präadaptation sind sie in der Lage, im Verdauungstrakt einer blutsaugenden Tsetse-Fliege zu überleben und dort in prozyklische Formen zu differenzieren [290]. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Trypanosomen, die nach 35 Tagen aus dem Gehirn (d.h. vornehmlich aus den Ventrikeln und der *Pia mater*) infizierter Ratten isoliert wurden, signifikant länger und schlanker waren als nach 4 Tagen aus dem Blut erhaltene proliferierende Parasiten (Abbildung 11 und Abbildung 12). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der Literatur beschrieben [170]. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei proliferierenden Formen im Blut in Wirklichkeit um *intermediates* handelt. *Slender* Parasiten scheinen indes erst im Ventrikelsystem zu entstehen. So konnte gezeigt werden, dass die Längenverteilung der Trypanosomen 16 Tage *post-infectionem* im CSF gegenüber dem Blut deutlich zu längeren Formen verschoben war (Abbildung

14). *Slender* Trypanosomen, die stets eine Teilpopulation pleomorpher Trypanosomen-Stämme stellen (Abbildung 12) können sich möglicherweise besser im Gehirn etablieren. Beispielsweise könnten über das verlängerte Flagellum Zell-Zell-Wechselwirkungen vermittelt werden, ähnlich wie z.B. epimastigote Formen Kontakte zu den Epithelien der Tsetse-Speicheldrüsen ausbilden [99]. Aus dem Gehirn könnten *slender* Formen im Sinne eines *relapse* (wie nach chemotherapeutischer Eradikation einer Parasitämie) in den Blutkreislauf zurückkehren [254,255,256,291]. Dass der Anteil an *slender* Parasiten sowie die Maximallänge der Parasiten auch im Blut während des Infektionsverlaufs kontinuierlich zunahm (Abbildung 13) [214], deutet darauf hin, dass längere Parasiten im Gehirn einen Selektionsvorteil besitzen. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass aus dem Gehirn isolierte *slender* Formen auf semisoliden Agarose-/HMI-9-Platten zwar proliferieren konnten, jedoch mit zunehmender Kultivierungsdauer zu *intermediates* revertierten (Abbildung 17). Andererseits wäre es ebenso denkbar, dass ins Gehirn invadierte Trypanosomen eine Signal-abhängige Differenzierung durchlaufen, wie dies für die Differenzierung in *stumpy* Formen [91,92,213,292] oder prozyklische Formen [96,216] der Fall ist. Sollte das Auftreten sehr langer Trypanosomen mit einer Gehirninfection korrelieren, könnte die Parasitenlänge als neuer diagnostischer Marker in Betracht kommen.

Es wurde beschrieben, dass eine höhere Zelllänge aufgrund eines anderen Strömungsverhaltens eine schnellere Fortbewegung ermöglicht [218]. Tatsächlich zeichneten sich die *slender* Trypanosomen durch sehr schnelle Bewegung und ein gerichtetes Schwimmverhalten aus, ähnlich

demjenigen prozyklischer Fliegenformen (Abbildung 15). Beide Formen müssen sich im Gewebe fortbewegen, was ein ähnliches Bewegungsmuster plausibel erscheinen lässt. Für Trypanosomen im Blut ist die Fähigkeit gerichtet zu schwimmen nicht erforderlich, da hier eine passive Verteilung durch den vorhandenen Fluss erfolgt. Außerdem könnte die unterschiedliche Viskosität verschiedener Habitate eine Anpassung der Trypanosomenform erklären [217,293]. Bezüglich der Lage von Kern und kDNA waren Gehirn-Trypanosomen eindeutig trypomastigot differenziert und ließen sich somit klar von prozyklischen Formen unterscheiden (Abbildung 16).

Durch atlanto-occipitale CSF-Entnahme aus der *Cisterna magna* (Abbildung 37) konnte gezeigt werden, dass eine Infektion des Ventrikelsystems in Wistar-Ratten deutlich früher auftritt als bisher angenommen. So waren bereits 6 Tage *post-infectionem* Parasiten im CSF nachweisbar (Abbildung 38) [209], während laut Literatur eine Gehirninfection erst nach rund 20 Tagen zu erwarten ist [178,180,183]. Die CSF-Infektion verlief zyklisch und folgte damit der Parasitämie mit einem zeitlichen Versatz von 1-2 Tagen. Dabei blieb der Trypanosomen-Titer im CSF stets um den Faktor 100 geringer als im Blut. Da die Parasiten-Konzentration somit zu gering war, um eine trypanosomale Zelldichteregulation zu erklären, stellte sich die Frage, weshalb keine permanente CSF-Besiedelung beobachtet werden konnte. Publikationen, die eine trypanozide Wirkung von CSF beschreiben [264], wurden in Zellkultur bestätigt (Abbildung 40) [208]. Ein Nährstoffmangel im CSF lag nicht vor, da die Parasiten auch bei einer Supplementierung mit HMI-9 Medium schneller abstarben als in reinem oder mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem HMI-9 Medium (Abbildung

40). Die trypanozide Wirkung war weder auf reaktive Sauerstoffspezies (die mit N-Acetylcystein abgefangen wurden, Daten nicht gezeigt), noch auf humanen trypanolytischen Faktor [24] zurückzuführen. So wurden vergleichbare Wachstumskurven mit humanem wie mit Ratten-CSF erhalten (Daten nicht gezeigt). Ferner konnte die Eradikation nicht auf eine spezifische Immunantwort zurückgeführt werden, da die Gesamt-Immunglobulin G Konzentration im CSF im Normbereich [263] lag (Abbildung 39a) [209]. Spezifische anti-VSG Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 39b). Möglicherweise verhindern stattdessen im CSF vorhandene Neuropeptide wie Urocortin und Adrenomedullin die Entwicklung der Parasiten [268]. Da Trypanosomen im CSF nicht überlebensfähig sind, könnten schnell und gerichtet schwimmende *slender* Formen im Ventrikel einen Selektionsvorteil haben. So würden diese bevorzugt den Subarachnoidalraum und letztlich die *Pia mater* erreichen (Abbildung 34). Mittels Gefrierbruchtechnik wurden Hinweise darauf gefunden, dass *slender* Trypanosomen in der Lage sind, über die gesamte Zelloberfläche Endozytose zu betreiben (Abbildung 19). Für alle bisher bekannten Stadien findet Endozytose dagegen nur im Bereich der Flagellumtasche statt [83].

Im Subarachnoidalraum wurden sowohl intakte als auch degradierte Trypanosomen gefunden, die von Makrophagen abgebaut wurden (Abbildung 35) [209]. Schließlich wurden zahlreiche intakte Parasiten zwischen den Zellen der *Pia mater* nachgewiesen (Abbildung 36) [208,209]. Innerhalb dieses immunprivilegierten Raumes sind die Parasiten vermutlich vor trypanoziden Substanzen im CSF geschützt und könnten so zu einer permanenten Infektion der *Pia mater* führen. Allerdings müsste die piale

Parasitendichte reguliert werden, um den Wirt nicht vorzeitig zu töten. Dies erfolgt einerseits durch die Sekretion eines Differenzierungsfaktors [91], der in einem Teil der Population eine Umwandlung in Zellzyklus-arretierte *stumpy* Formen induziert. Andererseits sezernieren *stumpy* Formen Prostaglandin D₂, das als altruistisches Apoptosesignal fungiert [213]. Tatsächlich wurde beschrieben, dass sich die Prostaglandin-Konzentration im CSF während einer Trypanosomiasis erhöht [197]. Da Prostaglandin D₂ schlafinduzierend wirkt [258,259] ist die charakteristische Deregulation des Schlaf-/ Wachzyklus somit durch eine Trypanosomeninfektion zu erklären [201].

Aus der *Pia mater* könnten die Parasiten schließlich wieder in den Subarachnoidalraum austreten und durch die *Granula meningeae* in den Blutkreislauf zurückkehren. Dies würde erklären, weshalb im Gehirn entstandene *slender*-Formen auch im Blut auftreten.

Eine Transmigration über die *Glia limitans superficialis* wurde nicht beobachtet. Somit scheint eine Infektion des Gehirnparenchyms auch über den Weg der Blut-CSF-Schranke nicht stattzufinden. Zusammenfassend ist damit festzuhalten, dass (entgegen der Lehrbuchmeinung [1,2]) für *T. brucei brucei* infizierte Wistar-Ratten zu keinem Zeitpunkt eine echte Gehirninfection auftrat. Während der *Plexus choroideus*, die Ventrikel und Meningen zwar anatomisch innerhalb des Gehirns liegen, sind sie durch die *Glia limitans perivascularis* und *superficialis* vom Gehirnparenchym abgeschirmt. Alle beobachteten überlebensfähigen Trypanosomen befanden sich funktional außerhalb des Gehirns. Dies ist vor allem hinsichtlich der Entwicklung und Applikation neuer Chemotherapeutika relevant.

Beispielsweise müssten anti-trypanosomale Medikamente nicht die Blut-Hirn-Schranke, sondern lediglich die Blut-CSF-Schranke überqueren. Mit Hilfe therapeutischer Lumbalinjektionen könnte die Bioverfügbarkeit nicht gehirngängiger Medikamente (z.B. Pentamidin [254,255]) im Bereich des Ventrikelsystems erhöht werden. Für andere Erkrankungen sind solche intrathekalen Injektionen gängige Praxis [294,295,296].

Es ist anzumerken, dass einer pialen Infektion nicht zwangsläufig eine CSF-Infektion zugrunde liegen muss. Die Basallamina der *Pia mater* steht in direkter Kontinuität zur Basallamina des *Plexus choroideus* (Abbildung 8). Folglich könnten Trypanosomen aus dem Stroma auch ohne Umweg über das Ventrikelsystem in die *Pia mater* gelangen.

Der Aufbau der Blut-CSF-Schranke des *Plexus choroideus* ähnelt demjenigen der zirkumventrikulären Organe (ZVO). Diese besitzen ebenfalls fenestrierte Gefäßendothelien, während die Abgrenzung zum Gehirn von Tanyzyten gebildet wird. Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch hier Trypanosomen beschrieben wurden [185]. Störungen der *Area postrema*, die Teil des Brechzentrums ist, sowie der für zirkadiane Rhythmik verantwortlichen Zirbeldrüse (beides Bereiche der ZVO) könnten ebenfalls Auslöser von Krankheitssymptomen sein.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Blutgefäße zu verlassen, infizieren Trypanosomen auch zahlreiche innere Organe [188,273]. Elektronenmikroskopisch konnten morphologisch intakte Trypanosomen im Herz nachgewiesen werden (Abbildung 47) [209], wo sie schwere Läsionen hervorrufen können [273]. Entsprechend stellt Herzversagen eine häufige Todesursache bei Trypanosomiasen dar [188,274]. Im Hoden wurden

ebenfalls extravasale, intakte Trypanosomen gefunden (Abbildung 48), die die Sertoli-Zellen der Blut-Hoden-Schranke jedoch nicht überwandern [209]. In der roten Pulpa der Milz fanden sich degradierte Trypanosomen (Abbildung 50). Dabei handelte es sich möglicherweise um geschädigte Parasiten aus dem Blut, die im retikulohistiozytären Phagozytensystem zurückgehalten wurden [209]. Gleichzeitig entwickelten infizierte Ratten eine ausgeprägte Splenomegalie (Abbildung 49). Im Nebenhoden wiederum kamen sowohl intakte als auch phagozytierte Trypanosomen vor (Abbildung 51) [209], während eine Infektion der Augen (Abbildung 52) [209] zu Angio- und Retinopathien [185,273,280] führte. Ähnlich wie im Hoden (Sertoli-Zellen) überwandern die Parasiten im Auge die epitheliale Blut-Retina-Schranke nicht. Stattdessen desintegrierten extravasale Trypanosomen oder zeigten eine massive Anhäufung von intrazellulären Vesikeln (Abbildung 53). Möglicherweise besteht hierbei ein Zusammenhang zu der atypisch verlaufenden Endozytose, die bei Trypanosomen aus dem Gehirn in Gefrierbrüchen beobachtet wurde (Abbildung 19).

Metastasierende Tumorzellen nutzen Metalloproteasen zur Öffnung vasoendothelialer Basallaminae [250]. Für Trypanosomen wurde beschrieben, dass die *major surface metalloprotease* MSP-B während der Differenzierung von *stumpy* in prozyklische Formen exprimiert wird [172,252]. Sollten *stumpy* Parasiten MSP-B auch im Blut sezernieren, könnte eine Organinvasion erst erfolgen, wenn eine ausreichend große Zahl der Trypanosomen in *stumpy* Formen differenziert ist. Dies ist kurz nach dem Auftreten eines Parasitämie-*peaks* der Fall. Dies würde erklären, weshalb eine CSF-Infektion zeitlich versetzt zur Blutinfektion auftritt (Abbildung 38)

[209]. Gleichzeitig würden *stumpy* Parasiten dabei ihren Oberflächenmantel verlieren, wie dies z.B. im *Plexus choroideus* (Abbildung 31a) beobachtet wurde. *Intermediate* und *slender* Trypanosomen könnten danach durch die geöffnete Basallamina in die jeweiligen Organe invadieren.

Der in dieser Arbeit beschriebene Infektionsverlauf in Wistar-Ratten wirft die Frage auf, ob die bisher beschriebene Einteilung der Afrikanischen Schlafkrankheit in ein hämolympathisches und eine meningoenzephalitisches Stadium weiter differenziert werden muss. In unserem Modell konnten keine Anzeichen für eine Infektion des Gehirnparenchyms gefunden werden. Außerdem zeigten infizierte Ratten keine Enzephalitis. Die beobachtete Gehirninfection könnte treffend als (ventrikulär-) meningeales Stadium beschrieben werden. Es ist zu vermuten, dass ein solches Stadium auch im Menschen existiert. Erst danach führen Entzündungsreaktionen mit Zytokinausschüttung (IFN- γ , Interleukine und TNF- α) eventuell zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke [188]. Dadurch könnten Trypanosomen auch in das Gehirnparenchym vordringen, was zu einer terminalen Enzephalitis führt.

V. Zusammenfassung

Die Afrikanische Schlafkrankheit wird von Trypanosomen verursacht, die die Tsetse-Fliege während einer Blutmahlzeit auf den menschlichen Wirt überträgt. Initial besiedeln die Parasiten Blut und Lympflüssigkeit, bevor sie im 2. Krankheitsstadium in das zerebrale Nervensystem invadieren. Diese Phase äußert sich klinisch in Koordinationsstörungen, verwaschener Sprache und einer Deregulation des Schlaf-Wach-Zyklus. Auf Grund der Symptome erschien es lange Zeit plausibel, dass Trypanosomen unter Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirnparenchym vordringen. Dazu müssten sie die *Glia limitans* überqueren, die das Gehirn komplett umgibt und nach außen und zu den Blutgefäßen hin abschirmt. Für Immunzellen sind solche Migrationen über die Blut-Hirn-Schranke beschrieben, doch handelt es sich dabei um sehr komplexe Mechanismen, die spezifische Zell-Zell-Interaktionen erfordern. Bei Trypanosomen sind solche Mechanismen in Säugetieren nicht bekannt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Trypanosomen innerhalb des Gehirnparenchyms nicht wie bisher angenommen überleben können. So führt beispielsweise eine artifizielle Parasiten-Injektion in das Striatum nicht zu einer Infektion. Des Weiteren traten intraperitoneal gespritzte Parasiten (*T. brucei brucei*) nur selten innerhalb des Gehirnparenchyms von Wistar-Ratten auf, wo sie von Mikrogliazellen phagozytiert wurden. Diese Beobachtungen stellen die bisherige Lehrmeinung in Frage, Trypanosomen überwinden die Blut-Hirn-Schranke und besiedelten das Gehirn. Stattdessen scheint der Durchtritt durch die Blut-CSF-Schranke für die Krankheitsentwicklung viel entscheidender zu sein. Tatsächlich konnte

gezeigt werden, dass die Blut-CSF-Schranke im Laufe einer Infektion für kernspintomographische Kontrastmittel durchlässig wird. Wichtigste Komponente der Blut-CSF-Schranke ist der *Plexus choroideus*, der für die Liquor-Bildung verantwortliche Teil der Ventrikelauskleidung. Dieser befindet sich anatomisch gesehen außerhalb des Gehirns und steht über das Ventrikelsystem in direkter Verbindung zu den Gehirnhäuten. Wie mittels *real-time* PCR und Elektronenmikroskopie gezeigt, infizieren Trypanosomen den *Plexus choroideus*, den Liquor und letztlich die *Pia mater*. Letztere könnte dabei als immunprivilegiertes Habitat fungieren, von wo aus es zu einer Reinfektion des Blutes (einem sogenannten *relapse*) kommen kann.

Da CSF offensichtlich trypanozid wirksame Substanzen enthält, ist es für die Parasiten lebenswichtig, die Ventrikel so schnell wie möglich zu durchqueren. Wie erwartet schwimmen aus dem Gehirn isolierte Trypanosomen auffallend schnell und gerichtet, während sich Blutparasiten der frühen Infektionsphase vergleichsweise langsam und stationär bewegen. Darüber hinaus unterscheiden sie sich signifikant in ihrer Länge und sind möglicherweise auch anderweitig adaptiert (z.B. gibt es Hinweise darauf, dass sich Endosomen nicht nur im Bereich der Flagellumtasche abschnüren). CSF Infektionen erfolgen zyklisch und folgen damit dem Verlauf der Parasitämie. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass dies nicht Folge Antikörper-vermittelter Immunreaktionen ist, da kein anti-trypanosomales Immunglobulin G im Liquor nachgewiesen werden konnte.

Auf ihrem Weg über die Blut-CSF-Schranke müssen Trypanosomen die Epithelzellen des *Plexus choroideus* überqueren. Diese nutzen unter anderem Claudin-11 zur Ausbildung von *tight junctions*. Es konnte gezeigt werden, dass

eine Wechselwirkung zwischen Trypanosomen und heterolog exprimiertem Claudin-11 besteht. Zuletzt wurde die Fähigkeit von Trypanosomen analysiert, andere Organe zu infiltrieren.

Diese Ergebnisse lassen die Gehirninfection afrikanischer Trypanosomen in einem völlig neuen Licht erscheinen und eröffnen neue Ansätze der Medikamenten-Entwicklung und -Applikation.

VI. Abstract

African trypanosomes induce sleeping sickness. They are transmitted during a blood meal of the tsetse fly and appear primarily in the blood and lymphatic system, before they enter the central nervous system. During this 2nd stage, the parasite induces a deregulation of the sleep-wake-cycles (hence the name) and some additional phenomena like coordination problems and disturbance of speech. It was thus a logical assumption that trypanosomes cross the blood-brain barrier and nestle somewhere between the brain cells. The brain, however, is completely covered by a dense barrier, the so-called *glia limitans* that surrounds the brain and covers the blood vessels, with the latter being the literal blood-brain barrier. It is known that some immune cells are able to cross this barrier, but this needs a sophisticated mechanism and very specific cell-cell interactions that were never observed for trypanosomes within the mammalian host. In this work we show that trypanosomes cannot develop inside the brain parenchyma. Indeed, injecting parasites directly into the brain parenchyma led not to an infection. Likewise, after an intraperitoneal infection of Wistar rats, *T. brucei brucei* could be observed very rarely inside the brain parenchyma, where the parasites were readily phagocytized by microglia. These observations make it necessary to reconsider the common opinion that the parasites cross the blood-brain barrier and settle inside the brain, whereas factually crossing the blood-CSF barrier seems much more important for pathogenesis. In fact, during prolonged infection the blood-CSF barrier was found to be leaky for contrast agents used in magnet resonance tomography. The blood-CSF

barrier is formed by the choroid plexus, i.e. the part of the ventricles where cerebrospinal fluid is formed. Anatomically, the ventricle system lies outside the brain and extends to the meninges, which surround the brain next to the *glia limitans*. As shown in this work by real-time PCR mapping and electron microscopy, trypanosomes infiltrate the choroid plexus, CSF and finally the *pia mater*, the innermost one of the meninges. This habitat might function as a refuge, from where reinfections of the blood (so-called relapses) could easily occur.

CSF itself has been proven to be toxic for trypanosomes, which would make it necessary for them to cross the ventricle's hostile environment as fast as possible. In fact, trypanosomes isolated from brain show a very rapid movement of their flagellum and swim in a much more directed manner compared to trypanosomes found at an early infection stage in blood. Moreover, they are significantly longer and might have evolved some other adaptations to survive in the brain (probably endocytosis which is not restricted to the flagellar pocket as in bloodstream forms). Furthermore, it is demonstrated that CSF infections occur periodically, following the parasite titer in blood. However, this process seems to be independent of antibody-mediated immune response, as anti-trypanosomal immunoglobulin G could not be found in CSF. For crossing the blood-CSF barrier, trypanosomes have to overcome the plexus epithelial cells. These cells are connected by claudin-11 containing tight junctions. It is shown in this work that trypanosomes interact with heterologously expressed claudin-11. Finally, infiltration of trypanosomes into other organs has been analyzed.

These results put new lights on the infection strategy and will open new avenues for treatment and drug development.

VII. Literaturverzeichnis

1. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. *The Lancet* 375: 148-159.
2. WHO (April 2014) African trypanosomiasis (sleeping sickness). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.
3. Cecchi G, Paone M, Franco JR, Fèvre EM, Diarra A, et al. (2009) Towards the Atlas of human African trypanosomiasis. *International Journal of Health Geographics* 8: 15.
4. Moll-Merks C, Werner H, Donges J (1988) Suitability of in-vitro xenodiagnosis: development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* depending on larval stage of bugs and number of trypomastigotes taken during in-vitro blood meal. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 268: 74-82.
5. Institute of Tropical Medicine Antwerp (Juli 2014) Winterbottom sign. http://itg.content-e.eu/Generated/pubx/173/mm_files/do_2731/co_67555/cd_1002_013c.jpg
6. YaleScientific (Juli 2014) Nagana. <http://www.yalescientific.org/wp-content/uploads/2013/05/Cattle.jpg>
7. Slane Bd (1968) *Histoire Des Berbères et des Dynasties Musulmanes de l'Afrique Septentrional* - Traduction de le Baron de Slane, nouvelle édition de Paul Casanova. Librairie Orientaliste Paul Geuthner.
8. Leak SGA (1999) *Tsetse biology and Ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis. Tsetse challenge and its relationship to trypanosome prevalence in cattle.* CABI Publishing.
9. Atkins J (1978) *Sleeping Sickness.* In: Kean B.H., Mott K.E., Russel A.J. (eds). *Tropical Medicine and Parasitology, Classic Investigations.* Cornell University Press, Ithaca, New York.
10. Winterbottom TM (1803) *An account of the native Africans in the neighbourhood of Sierra Leone.* London, C. Whittingham.
11. 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.*
12. Dutton JE (1902) Preliminary note upon a trypanosome occurring in blood of man. *Thomson Yates Laboratory Reports*, 4, 455-467.
13. Castellani A (1903) On the discovery of a species of *Trypanosoma* in the cerebrospinal fluid of cases of sleeping sickness. *Proceedings of the Royal Society London*, 71, 501-508.
14. Castellani A (1903) *Trypanosoma* in sleeping sickness. *British Medical J.*, 1218, May 23.
15. Davies JNP (1962) The cause of sleeping sickness? *East African Medical Journal*, 39.
16. Taute M (1911) Experimentelle Studien über die Beziehungen der *Glossina morsitans* zur Schlafkrankheit. *Medical Microbiology and Immunology* 69: 553-558.
17. Kleine F (1943) Mit Robert Koch in Afrika und in der Heimat. *Medical Microbiology and Immunology* 125: 265-286.

18. Fischer W (1912) Beitrag zur Kenntnis der Trypanosomen. *Medical Microbiology and Immunology* 70: 93-103.
19. Davies JN (1968) Informed speculation on the cause of sleeping sickness 1898-1903. *Medical history* 12: 200-204.
20. Stephens J, Fantham H (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*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* 83: 28-33.
21. 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.
22. Taute M, Huber F (1919) Die Unterscheidung des *Trypanosoma rhodesiense* von *Trypanosoma brucei*. Beobachtungen und Experimente aus dem Kriege in Ostafrika. *Arch. für Schiffs- u. Trop. Hyg.*, xxiii, 211.
23. Rickman L, Robson J (1970) The blood incubation infectivity test: a simple test which may serve to distinguish *Trypanosoma brucei* from *T. rhodesiense*. *Bulletin of the World Health Organization* 42: 650.
24. Wheeler RJ (2010) The trypanolytic factor-mechanism, impacts and applications. *Trends in Parasitology* 26: 457-464.
25. Rifkin MR (1978) Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 3450-3454.
26. Haag J, O'HUigin C, Overath P (1998) The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and biochemical parasitology* 91: 37-49.
27. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin Ge, Ile, Renauld H, et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.
28. Hide G (1999) History of sleeping sickness in East Africa. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 112.
29. Winkle S (2003) Zur Geschichte der Trypanosomiasen. <http://www.collasius.org/WINKLE/04-HTML/trypanosomiasen.htm>
30. Cox F (2004) History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infectious disease clinics of North America* 18: 231.
31. Steverding D (2008) The history of African trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* 1: 3.
32. Sahlas DJ, MacLean JD, Janevski J, Detsky AS (2002) Clinical problem-solving. Out of Africa. *The New England journal of medicine* 347: 749-753.
33. Despommier D, Gwadz R, Hotez P, Knirsch C, Miller L (1995) *Parasitic diseases*: Springer-Verlag New York.
34. Kennedy PGE (2006) Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. *International journal for parasitology* 36: 505-512.
35. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N (1978) A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. B. gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 58: 169-176.

36. Steverding D (2006) A new initiative for the development of new diagnostic tests for human African trypanosomiasis. *Kinetoplastid biology and disease* 5: 1.
37. Simarro P, Jannin J, Cattand P (2008) Eliminating Human African Trypanosomiasis: Where Do We Stand and What Comes Next. *PLoS medicine*, DOI: 10.1371/journal.pmed.0050055
38. Wastling SL, Welburn SC (2011) Diagnosis of human sleeping sickness: sense and sensitivity. *Trends in parasitology* 27: 394-402.
39. 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.
40. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, et al. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480.
41. Spinazzola F, D'Amato C, De Felici A, Giannuzzi R, Paglia MG, et al. (1989) Plasmapheresis for late-stage trypanosomiasis. *Lancet* 1: 1200.
42. Braakman HM, van de Molengraft FJ, Hubert WW, Boerman DH (2006) Lethal African trypanosomiasis in a traveler: MRI and neuropathology. *Neurology* 66: 1094-1096.
43. Radwanska M (2010) Emerging trends in the diagnosis of human African Trypanosomiasis. *Parasitology* 137: 1977-1986.
44. Homann M, Lorgler M, Engstler M, Zacharias M, Goring HU (2006) Serum-stable RNA aptamers to an invariant surface domain of live African trypanosomes. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 9: 491-499.
45. Sullivan L, Wall SJ, Carrington M, Ferguson MA (2013) Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for human African trypanosomiasis and generation of a prototype lateral flow immunodiagnostic device. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2087.
46. Tiberti N, Hainard A, Lejon V, Courtioux B, Matovu E, et al. (2012) Cerebrospinal Fluid Neopterin as Marker of the Meningo-Encephalitic Stage of *Trypanosoma brucei* gambiense Sleeping Sickness. *PLoS One* 7: e40909.
47. Schofield CJ, Maudlin I (2001) Trypanosomiasis control. *International journal for parasitology* 31: 614-619.
48. Vreysen MJ (2001) Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Medecine Tropicale* 61: 397-411.
49. Geerts S, Holmes PH (1998) Drug Management and Parasite Resistance in Bovine Trypanosomiasis in Africa: Programme against African Trypanosomiasis. Technical and Scientific Series 1. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
50. 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.
51. Boyce R (1907) The Treatment of Sleeping Sickness and Other Trypanosomiasis by the Atoxyl and Mercury Method. *British medical journal* 2: 624-625.
52. Prull CR (2003) Part of a scientific master plan? Paul Ehrlich and the origins of his receptor concept. *Medical history* 47: 332-356.
53. Goldmann E (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh K Preuss Akad Wiss Phys Med* 1: 1-60.

54. Fourneau E, Tréfouël J, Tréfouël T, Vallée J (1924) Sur une nouvelle série de médicaments trypanocides. *C R Séances Acad Sci* 178: 675.
55. Jacobs RT, Nare B, Phillips MA (2011) State of the art in African trypanosome drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 11: 1255-1274.
56. Riethmiller S (2005) From Atoxyl to Salvarsan: searching for the magic bullet. *Chemotherapy* 51: 234-242.
57. Friedheim EA (1949) Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29: 173-180.
58. Lutje V, Seixas J, Kennedy A (2010) Chemotherapy for second-stage Human African trypanosomiasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;6:CD006201.
59. Nok AJ (2003) Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitology research* 90: 71-79.
60. Balasegaram M, Harris S, Checchi F, Ghorashian S, Hamel C, et al. (2006) Melarsoprol versus eflornithine for treating late-stage Gambian trypanosomiasis in the Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization* 84: 783-791.
61. Krauth-Siegel R, Comini M (2008) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1780: 1236-1248.
62. Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A (1980) Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 210: 332-334.
63. Milord F, Pepin J, Loko L, Ethier L, Mpia B (1992) Efficacy and toxicity of eflornithine for treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Lancet* 340: 652-655.
64. McNeil DG (2001) Cosmetic Saves a Cure for Sleeping Sickness *New York Times*, <http://www.nytimes.com/2001/02/09/world/cosmetic-saves-a-cure-for-sleeping-sickness.html>
65. Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, et al. (2009) Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet* 374: 56-64.
66. 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.
67. Fairlamb AH (2003) Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology* 19: 488-494.
68. Wikipedia (Juni 2014) 10/90 gap. http://en.wikipedia.org/wiki/10/90_gap
69. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451.
70. Maslov D, Podlipaev S, Lukes J (2001) Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 397-402.
71. Simpson A, Stevens J, Lukes J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology* 22: 168-174.

72. Benne R, Van den Burg, J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom, J H, et al. (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46: 819--826.
73. Sloof P, Benne R (1997) RNA editing in kinetoplastid parasites: what to do with U. *Trends Microbiol* 5: 189-195.
74. Vickerman K (1994) The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International journal for parasitology* 24: 1317-1331.
75. Hoare C (1964) Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 11: 200-207.
76. Lake JA, de la Cruz VF, Ferreira PC, Morel C, Simpson L (1988) Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 4779-4783.
77. Cross GA, Wirtz LE, Navarro M (1998) Regulation of *vsg* expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 91: 77-91.
78. Roditi I, Schwarz H (1989) Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 108: 737--746.
79. Homans SW, Edge CJ, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW (1989) Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochemistry* 28: 2881-2887.
80. Ferguson MA, Low MG, Cross GA (1985) Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 260: 14547-14555.
81. Matthews KR (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118: 283-290.
82. Schlaepfli K, Deflorin J, Seebeck T (1989) The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. *The Journal of cell biology* 109: 1695-1709.
83. Overath P, Engstler M (2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Molecular microbiology* 53: 735-744.
84. 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.
85. 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.
86. Klingbeil MM, Englund PT (2004) Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4333-4334.
87. 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.

88. Flynn IW, Bowman IB (1973) The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes. *Comp Biochem Physiol B* 45: 25-42.
89. Vercesi AE, Grijalba MT, Docampo R (1997) Inhibition of Ca²⁺ release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 328 (Pt 2): 479-482.
90. Kubata BK, Duszenko M, Kabutu Z, Rawer M, Szallies A, et al. (2000) Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med* 192: 1327-1338.
91. Hesse F, Selzer PM, Muhlstadt K, Duszenko M (1995) A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro. *Molecular and biochemical parasitology* 70: 157-166.
92. 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.
93. 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.
94. Seed JR, Black SJ (1997) A proposed density-dependent model of long slender to short stumpy transformation in the African trypanosomes. *The Journal of parasitology* 83: 656-662.
95. 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.
96. Czichos J, Nonnengaesser C, Overath P (1986) *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. *Experimental parasitology* 62: 283-291.
97. Vickerman K, Tetley L, Hendry KA, Turner CM (1988) Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 64: 109-119.
98. Van Den Abbeele J, Claes Y, van Bockstaele D, Le Ray D, Coosemans M (1999) *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 118 (Pt 5): 469-478.
99. Tetley L, Vickerman K (1985) Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *Journal of Cell Science* 74: 1-19.
100. Franke E (1905) Therapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 52: 2059-2060.
101. Vickerman K (1970) Functional aspects of the cytology of trypanosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 64: 180-181.
102. Cross GA (1975) Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71: 393-417.
103. Turner CM (1997) The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiology Letters* 153: 227-231.

104. Marcello L, Barry JD (2007) Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome research* 17: 1344.
105. Bitter W, Gerrits H, Kieft R, Borst P (1998) The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 391: 499-502.
106. Young R, Taylor JE, Kurioka A, Becker M, Louis EJ, et al. (2008) Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC genomics* 9: 385.
107. Pays E, Guyaux M, Aerts D, Van Meirvenne N, Steinert M (1985) Telomeric reciprocal recombination as a possible mechanism for antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 316: 562-564.
108. Thon G, Baltz T, Giroud C, Eisen H (1990) Trypanosome variable surface glycoproteins: composite genes and order of expression. *Genes & development* 4: 1374.
109. Morrison LJ, Majiwa P, Read AF, Barry JD (2005) Probabilistic order in antigenic variation of *Trypanosoma brucei*. *International journal for parasitology* 35: 961-972.
110. Morrison LJ, Marcello L, McCulloch R (2009) Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cellular Microbiology* 11: 1724-1734.
111. Boothroyd CE, Dreesen O, Leonova T, Ly KI, Figueiredo LM, et al. (2009) A yeast-endonuclease-generated DNA break induces antigenic switching in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 459: 278-281.
112. Parsons M (2004) Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular microbiology* 53: 717-724.
113. Hannaert V, Michels P (1994) Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastida. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26: 205-212.
114. Bakker BM, Mensonides FI, Teusink B, van Hoek P, Michels PA, et al. (2000) Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2087-2092.
115. Nihei C, Fukai Y, Kita K (2002) Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochimica et biophysica acta* 1587: 234-239.
116. Minagawa N, Yabu Y, Kita K, Nagai K, Ohta N, et al. (1997) An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 84: 271-280.
117. Priest JW, Hajduk SL (1994) Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26: 179-191.
118. Bienen EJ, Saric M, Pollakis G, Grady RW, Clarkson AB, Jr. (1991) Mitochondrial development in *Trypanosoma brucei brucei* transitional bloodstream forms. *Molecular and biochemical parasitology* 45: 185-192.
119. Bienen EJ, Hammadi E, Hill GC (1981) *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. *Experimental parasitology* 51: 408-417.
120. Fagerholm U (2007) The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity. *Drug discovery today* 12: 1076-1082.

121. Wolf S (1996) Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems. *Naturwissenschaften* 83: 302-311.
122. Brenner PU (2006) Die Struktur der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke - eine Literaturstudie. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät
123. Sage MR (1982) Blood-brain barrier: phenomenon of increasing importance to the imaging clinician. *AJR American journal of roentgenology* 138: 887-898.
124. Krogh A (1946) The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 133: 140-200.
125. Crone C (1965) The permeability of brain capillaries to non-electrolytes. *Acta physiologica Scandinavica* 64: 407-417.
126. Klein JR, Hurwitz R, Olsen NS (1946) Distribution of intravenously injected fructose and glucose between blood and brain. *The Journal of biological chemistry* 164: 509-512.
127. Davson H (1976) Review lecture. The blood-brain barrier. *The Journal of physiology* 255: 1-28.
128. Brodie BB, Hogben CA (1957) Some physico-chemical factors in drug action. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 9: 345-380.
129. Ohtsuki S (2004) New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biological & pharmaceutical bulletin* 27: 1489-1496.
130. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Quondamatteo F, Herken R, et al. (2001) Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *Journal of Cell Science* 114: 1297-1307.
131. Duvernoy HM, Risold PY (2007) The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews* 56: 119-147.
132. Kwee RM, Kwee TC (2007) Virchow-Robin spaces at MR imaging. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 27: 1071-1086.
133. Zhang ET, Inman CB, Weller RO (1990) Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *Journal of anatomy* 170: 111-123.
134. Mogk S, Meiwes A, Boßelmann C, Wolburg H, Duszenko M (2014) The lane to the brain: How African trypanosomes invade the CNS. *Trends in parasitology* Epub ahead of print. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.
135. Matter K, Balda MS (2003) Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *The Journal of cell biology* 161: 459-460.
136. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE (2014) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects. *Cell & Developmental Biology, Special edition "Blood-Brain Barrier"*. Submitted.
137. Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* 57: 173-185.
138. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology* 429: 47-62.
139. el-Bacha RS, Minn A (1999) Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cellular and molecular biology* 45: 15-23.

140. Pardridge WM (2005) Molecular biology of the blood-brain barrier. *Molecular biotechnology* 30: 57-70.
141. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE (2000) Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain research bulletin* 51: 363-369.
142. Abbott NJ (1987) Neurobiology. Glia and the blood-brain barrier. *Nature* 325: 195.
143. Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* 200: 629-638.
144. Muller WA (2013) Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary pathology* 50: 7-22.
145. Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European journal of immunology* 34: 2955-2963.
146. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001) Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neuroscience letters* 307: 77-80.
147. Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, et al. (2012) Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier. *Histochemistry and cell biology* 138: 861-879.
148. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR (2001) Development of the choroid plexus. *Microscopy research and technique* 52: 5-20.
149. Schwerk C, Papandreou T, Schuhmann D, Nickol L, Borkowski J, et al. (2012) Polar Invasion and Translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a Novel Human Model of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *PLoS One* 7: e30069.
150. Wewer C, Seibt A, Wolburg H, Greune L, Schmidt MA, et al. (2011) Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*. *Journal of neuroinflammation* 8: 51.
151. Lentner C (1981) Geigy Scientific Tables. Ciba-Geigy, Basle 1.
152. Ernst SA, Palacios JR, 2nd, Siegel GJ (1986) Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁺-ATPase catalytic polypeptide in mouse choroid plexus. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 34: 189-195.
153. Lindsey AE, Schneider K, Simmons DM, Baron R, Lee BS, et al. (1990) Functional expression and subcellular localization of an anion exchanger cloned from choroid plexus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 5278-5282.
154. Siegel A, Sapru H (2010) *Essential Neuroscience: Lippincott Williams and Wilkins*.
155. Kapoor KG, Katz SE, Grzybowski DM, Lubow M (2008) Cerebrospinal fluid outflow: an evolving perspective. *Brain research bulletin* 77: 327-334.
156. Siegel G, Agranoff B, Albers R (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition.: Lippincott-Raven.
157. Linß W, Fanghänel J (1998) *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie.*: Walter de Gruyter.
158. Calwell HG (1937) The pathology of the brain in rhodesian trypanosomiasis. *TransroySoctropMedHyg* 30: 611-624.

159. Enanga B, Burchmore RJS, Stewart ML, Barrett MP (2002) Sleeping sickness and the brain. *Cellular & Molecular Life Sciences* 59: 845-858.
160. Poltera AA, Owor R, Cox JN (1977) Pathological aspects of human African trypanosomiasis (HAT) in Uganda. A post-mortem survey of fourteen cases. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology* 373: 249-265.
161. Kennedy PG (2004) Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of clinical investigation* 113: 496-504.
162. Kager PA, Schipper HG, Stam J, Majoie CB (2009) Magnetic resonance imaging findings in human African trypanosomiasis: a four-year follow-up study in a patient and review of the literature. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80: 947-952.
163. Masocha W, Robertson B, Rottenberg ME, Mhlanga J, Sorokin L, et al. (2004) Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei* penetration of the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation* 114: 689-694.
164. Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CS (2009) Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Veterinary pathology* 46: 251-258.
165. Tuntasuvan D, Mimapan S, Sarataphan N, Trongwongsa L, Intraraksa R, et al. (2000) Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. *Veterinary parasitology* 87: 223-230.
166. Bafort JM, Schmidt H (1983) Experimental chronic *Trypanosoma brucei* rhodesiense infection in *Microtus montanus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 32: 968-975.
167. Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ (2002) Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. *Trends in parasitology* 18: 17-19.
168. Lambert PH, Berney M, Kazyumba G (1981) Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. *The Journal of clinical investigation* 67: 77-85.
169. Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K (2007) Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiol Behav* 92: 110-114.
170. Schmidt H, Bafort JM (1987) African trypanosomiasis: haematogenic brain parasitism early in experimental infection through bypassing the blood-brain barrier, with considerations on brain trypanosomiasis in man. *Parasitology research* 73: 15-21.
171. Frevert U, Movila A, Nikolskaia OV, Raper J, Mackey ZB, et al. (2012) Early invasion of brain parenchyma by African trypanosomes. *PLoS One* 7: e43913.
172. Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME, Donelson JE (2007) A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. *PLoS Pathogens* 3: 1432-1445.
173. Grab DJ, Kennedy PGE (2008) Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *Journal of Neurovirology* 14: 344-351.
174. Grab DJ, Garcia-Garcia JC, Nikolskaia OV, Kim YV, Brown A, et al. (2009) Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e479.

175. Elsheikha HM, Khan NA (2010) Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* 34: 532-553.
176. Grab DJ, Nikolskaia O, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Ito S, et al. (2004) African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Journal of Parasitology* 90: 970-979.
177. Bafort JM, Schmidt H, Molyneux DH (1987) Development of *Trypanosoma brucei* in suckling mouse brain following intracerebral injection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 487-490.
178. Schmidt H, Bafort JM (1985) African trypanosomiasis: treatment-induced invasion of brain and encephalitis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34: 64-68.
179. 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.
180. 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.
181. Ormerod WE, Venkatesan S (1970) The choroid plexus in African sleeping-sickness. *Lancet* 2: 777.
182. Mhlanga JD, Bentivoglio M, Kristensson K (1997) Neurobiology of cerebral malaria and African sleeping sickness. *Brain research bulletin* 44: 579-589.
183. Schmidt H (1983) The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in *trypanosoma rhodesiense* infected vervet monkeys. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology* 399: 333-343.
184. Moulton J (1986) Relapse infection after chemotherapy in goats experimentally infected with *Trypanosoma brucei*: Pathological changes in central nervous system. *Veterinary Pathology Online* 23: 21.
185. 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.
186. Bakhiet M, Hamadien M, Tjernlund A, Mousa A, Seiger Å (2002) African trypanosomes activate human fetal brain cells to proliferation and IFN- γ production. *NeuroReport* 13: 53.
187. Nyawira Maranga D, Kagira JM, Kinyanjui CK, Muturi Karanja S, Wangari Maina N, et al. (2013) IL-6 is upregulated in late-stage disease in monkeys experimentally infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Clinical & developmental immunology* 2013: 320509.
188. Kreier J (1977) Parasitic Protozoa. 1: 205-208.
189. Richards WH (1965) Pharmacologically Active Substances in the Blood, Tissues and Urine of Mice Infected with *Trypanosoma Brucei*. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 24: 124-131.
190. Boreham PF (1970) Kinin release and the immune reaction in human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma rhodesiense*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 394-400.

191. Ormerod WE, Venkatesan S (1971) Amastigotes of the sleeping sickness trypanosomes found in the choroid plexus and their transformation to trypomastigotes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 14.
192. Bruzzone R, Dubois-Dalcq M, Grau GE, Griffin DE, Kristensson K (2009) Infectious diseases of the nervous system and their impact in developing countries. *PLoS Pathogens* 5: e1000199.
193. Darsaud A, Bourdon L, Mercier S, Chapotot F, Bouteille B, et al. (2004) Twenty-four-hour disruption of the sleep-wake cycle and sleep-onset REM-like episodes in a rat model of African trypanosomiasis. *Sleep* 27: 42-46.
194. Grassi-Zucconi G, Harris JA, Mohammed AH, Ambrosini MV, Kristensson K, et al. (1995) Sleep fragmentation, and changes in locomotor activity and body temperature in trypanosome-infected rats. *Brain research bulletin* 37: 123-129.
195. Seke Etet PF, Palomba M, Colavito V, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M, et al. (2012) Sleep and rhythm changes at the time of *Trypanosoma brucei* invasion of the brain parenchyma in the rat. *Chronobiology international* 29: 469-481.
196. 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.
197. Pentreath VW, Rees K, Owolabi OA, Philip KA, Doua F (1990) The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D2 is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 795-799.
198. Cornford EM, Bocash WD, Braun LD, Crane PD, Oldendorf WH, et al. (1979) Rapid distribution of tryptophol (3-indole ethanol) to the brain and other tissues. *The Journal of clinical investigation* 63: 1241-1248.
199. Cornford EM, Crane PD, Braun LD, Bocash WD, Nyerges AM, et al. (1981) Reduction in brain glucose utilization rate after tryptophol (3-indole ethanol) treatment. *Journal of neurochemistry* 36: 1758-1765.
200. Seed JR, Seed TM, Sechelski J (1978) The biological effects of tryptophol (indole-3-ethanol): hemolytic, biochemical and behavior modifying activity. *Comparative biochemistry and physiology C: Comparative pharmacology* 60: 175-185.
201. Lundkvist GB, Kristensson K, Bentivoglio M (2004) Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* 19: 198-206.
202. Kristensson K, Claustrat B, Mhlanga JD, Moller M (1998) African trypanosomiasis in the rat alters melatonin secretion and melatonin receptor binding in the suprachiasmatic nucleus. *Brain research bulletin* 47: 265-269.
203. Rodgers J (2010) Trypanosomiasis and the brain. *Parasitology* 137: 1995-2006.
204. Galvao-Castro B, Hochmann A, Lambert PH (1978) The role of the host immune response in the development of tissue lesions associated with African trypanosomiasis in mice. *Clinical and experimental immunology* 33: 12-24.
205. Stoppini L, Buchs PA, Brun R, Muller D, Duport S, et al. (2000) Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei*. *Ijmm International Journal of Medical Microbiology* 290: 105-113.

206. Masocha W, Kristensson K (2012) Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence* 3: 202-212.
207. 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.
208. Wolburg H, Mogk S, Acker S, Frey C, Meinert M, et al. (2012) Late stage infection in sleeping sickness. *PLoS One* 7: e34304.
209. 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.
210. Paniker CKJ (2007) *Textbook of Medical Parasitology*: Jaypee Brothers, Medical Publishers. 235 p.
211. Wolburg H, Liebner S, Lippoldt A (2003) Cerebral endothelial tight junctional structure as revealed by freeze-fracture. Editor: Nag. S. *Methods in molecular biology The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*: Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 51-66.
212. SysmexAmericaInc. (2014) *An Atlas of Laboratory Animal Haematology*, Rat edition. <https://www.sysmex.com/us/en/Company/News/Winter2014/Pages/Knowledge.aspx>
213. Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC (2006) Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* 22: 536-542.
214. 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.
215. Brun R, Jenni L, Schonenberger M, Schell KF (1981) In vitro cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, and *T. gambiense*. *The Journal of protozoology* 28: 470-479.
216. Overath P, Czichos J, Haas C (1986) The effect of citrate/cis-aconitate on oxidative metabolism during transformation of *Trypanosoma brucei*. *European journal of biochemistry / FEBS* 160: 175-182.
217. 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.
218. 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.
219. Acker S (2011) Inaugural-Dissertation "Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv monomeres Cherry Protein exprimierenden *Trypanosomen* zur Lokalisierung und morphologischen Charakterisierung von *Trypanosoma brucei brucei* im Gewebe des zentralen Nervensystems". Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
220. Frey C (2012) Inaugural-Dissertation "Analyse der Gehirninfection bei Schlafkrankheit". Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.

221. Vickerman K (1965) Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature* 208: 762--766.
222. Hirumi H, Hirumi K (1989) Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *The Journal of parasitology* 75: 985-989.
223. Carruthers VB, Cross GA (1992) High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form *Trypanosoma brucei* on agarose plates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8818-8821.
224. 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.
225. Hirumi H, Doyle JJ, Hirumi K (1977) African trypanosomes: cultivation of animal-infective *Trypanosoma brucei* in vitro. *Science* 196: 992-994.
226. Hirumi H, Hirumi K, Doyle JJ, Cross GA (1980) In vitro cloning of animal-infective bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 80: 371-382.
227. Oberholzer M, Lopez MA, McLelland BT, Hill KL (2010) Social motility in african trypanosomes. *PLoS Pathogens* 6: e1000739.
228. Lopez MA, Nguyen HT, Oberholzer M, Hill KL (2011) Social parasites. *Current opinion in microbiology* 14: 642-648.
229. Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ (1988) Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 6753-6757.
230. Webster P, Griffiths G (1994) A Novel Method for Mean Cell-Volume Estimation. *Journal of Microscopy-Oxford* 174: 85-92.
231. Grunfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, et al. (2003) Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2029-2040.
232. Smith DS, Njogu AR, Cayer M, Jarlfors U (1974) Observations on freeze-fractured membranes of a *Trypanosome*. *Tissue & cell* 6: 223-241.
233. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
234. TurboSquid (Dezember 2013) Rat Mause Brain.
<http://www.turbosquid.com/3d-models/maya-rat-mouse-brain/696016>
235. Paxinos GeW, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press
236. Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137.
237. Cross GA (Dezember 2013) pHD309-HYG-PUR.
http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_plasmids.html
238. Aubrecht J, Goad ME, Simpson EM, Schiestl RH (1997) Expression of *hygR* in transgenic mice causes resistance to toxic effects of hygromycin B in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 281: 992-997.
239. LifeTechnologies (April 2014) Qdot Nanocrystals.

- <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/ultrasensitive-detection-technology/qdot-nanocrystal-technology.html>.
240. LifeTechnologies (April 2014) Qtracker® 605 Cell Labeling Kit.
<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/Q25001MP>
 241. Belot C, Stein J, Reinhard B, Wieder T, Duszenko M (2014) Maghemite nanoparticles induce autophagy in African trypanosomes after endocytosis mediated by biocompatible surface modifications. Manuscript submitted.
 242. Solis N, Larsen MR, Cordwell SJ (2010) Improved accuracy of cell surface shaving proteomics in *Staphylococcus aureus* using a false-positive control. *PROTEOMICS* 10: 2037-2049.
 243. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-752.
 244. Sage MR, Wilson AJ, Scroop R (1998) Contrast media and the brain. The basis of CT and MR imaging enhancement. *Neuroimaging clinics of North America* 8: 695-707.
 245. Naidich TP, Pudlowski RM, Leeds NE, Naidich JB, Chisolm AJ, et al. (1977) The normal contrast-enhanced computed axial tomogram of the brain. *Journal of computer assisted tomography* 1: 16-29.
 246. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology* 40: 648-677.
 247. Schima W, Mukerjee A, Saini S (1996) Contrast-enhanced MR imaging. *Clinical radiology* 51: 235-244.
 248. Chang CA (1993) Magnetic resonance imaging contrast agents. Design and physicochemical properties of gadodiamide. *Investigative radiology* 28 Suppl 1: S21-27.
 249. Patzold U, Haller P, Baruth B, Liman W, Deicher H (1980) Immune complexes in multiple sclerosis: relation to clinical pattern. *Journal of neurology* 222: 249-260.
 250. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 43 Suppl: S42-51.
 251. Yang Y, Hill JW, Rosenberg GA (2011) Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. *Progress in molecular biology and translational science* 99: 241-263.
 252. de Sousa KP, Atouguia J, Silva MS (2010) Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *The protein journal* 29: 283-289.
 253. Morse DE, Low FN (1972) The fine structure of the pia mater of the rat. *The American journal of anatomy* 133: 349-367.
 254. Wilkinson SR, Kelly JM (2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11.
 255. Schlitzer M (2009) Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. Im letzten Jahrhundert entwickelt. *Pharmazie in unserer Zeit* 38: 552-558.
 256. Jennings FW, Whitelaw DD, Holmes PH, Chizyuka HG, Urquhart GM (1979) The brain as a source of relapsing *Trypanosoma brucei* infection in mice after chemotherapy. *International journal for parasitology* 9: 381-384.
 257. Kubata BK, Duszenko M, Martin KS, Urade Y (2007) Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol* 23: 325-331.

258. Urade Y, Hayaishi O (2011) Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep medicine reviews* 15: 411-418.
259. Hayaishi O, Urade Y, Eguchi N, Huang ZL (2004) Genes for prostaglandin d synthase and receptor as well as adenosine A2A receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep. *Archives italiennes de biologie* 142: 533-539.
260. Frankmann S (1987) A new approach to repeated sampling of csf from the anesthetized rat. David Kopf Instruments, Tujunga, California 16.
261. van den Berg MP, Romeijn SG, Verhoef JC, Merkus FW (2002) Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity. *Journal of neuroscience methods* 116: 99-107.
262. Denninger V, Figarella K, Schonfeld C, Brems S, Busold C, et al. (2007) Troglitazone induces differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Experimental cell research* 313: 1805-1819.
263. Thomas L (2012) Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik: TH-Books; 8., Aufl.
264. Pentreath VW, Owolabi AO, Doua F (1992) Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid. *Annals of tropical medicine and parasitology* 86: 29-34.
265. Hager K, Hajduk S (1997) Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* 385(6619):823-6.
266. Shiflett AM, Faulkner SD, Cotlin LF, Widener J, Stephens N, et al. (2007) African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 18-21.
267. 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.
268. 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.
269. LifeTechnologies (Juni 2014) CountBright Absolute Counting Beads
<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-calibration/flow-cytometer-cell-counting-beads.html>
270. Angelow S, Yu AS (2007) Claudins and paracellular transport: an update. *Current opinion in nephrology and hypertension* 16: 459-464.
271. Hwang I, Yang H, Kang HS, Ahn CH, Lee GS, et al. (2014) Spatial expression of claudin family members in various organs of mice. *Molecular medicine reports* 9: 1806-1812.
272. Invitrogen (April 2014) Bac-to-Bac Expression System.
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bactobac_topo_exp_system_man.pdf
273. Morrison WI, Murray M, Sayer PD, Preston JM (1981) The pathogenesis of experimentally induced *Trypanosoma brucei* infection in the dog. I. Tissue and organ damage. *The American journal of pathology* 102: 168-181.
274. Greenwood BM, Whittle HC (1980) The pathogenesis of sleeping sickness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 716-725.
275. Pelletier RM (2011) The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 46: 49-127.

276. Rizzolo LJ (2007) Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *International review of cytology* 258: 195-234.
277. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular pharmacology* 38: 323-337.
278. 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.
279. Gruszynski AE, van Deursen FJ, Albareda MC, Best A, Chaudhary K, et al. (2006) Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology* 147: 211-223.
280. Ikede BO (1974) Ocular lesions in sheep infected with *Trypanosoma brucei*. *Journal of comparative pathology* 84: 203-213.
281. Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ (2006) Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* 2: 107-118.
282. Barry JD, McCulloch R (2001) Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Advances in parasitology* 49: 1-70.
283. Redzic Z (2011) Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and barriers of the CNS* 8: 3.
284. Berger B, Ortiz O, Gold A, Hilal SK (1992) Total cerebrospinal fluid enhancement following intravenous Gd-DTPA administration in a case of meningiomatosis. *AJNR American journal of neuroradiology* 13: 15-18.
285. 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.
286. Rodgers J, Jones A, Gibaud S, Bradley B, McCabe C, et al. (2011) Melarsoprol cyclodextrin inclusion complexes as promising oral candidates for the treatment of human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1308.
287. Waitumbi JN, Sayer PD, Gould SS (1988) Evidence of blood cerebrospinal fluid barrier permeability impairment in *Trypanosoma rhodesiense* infection in vervet monkeys. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales* 81: 502-505.
288. Bruce D, Harvey D, Hamerton AE, Davey JB, Bruce L (1912) The Morphology of the Trypanosome Causing Disease in Man in Nyasaland. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* 85: 423-433.
289. Clarkson AB, Bienen EJ, Pollakis G, Grady RW (1989) Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J Biol Chem* 264: 17770-17776.
290. Simpson AM, Hughes D, Simpson L (1985) *Trypanosoma brucei*: differentiation of in vitro-grown bloodstream trypomastigotes into procyclic forms. *The Journal of protozoology* 32: 672-677.

291. Jennings FW, Gray GD (1983) Relapsed parasitaemia following chemotherapy of chronic *T. brucei* infections in mice and its relation to cerebral trypanosomes. *Contributions to microbiology and immunology* 7: 147-154.
292. Szoor B, Wilson J, McElhinney H, Taberner L, Matthews KR (2006) Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *The Journal of cell biology* 175: 293-303.
293. 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.
294. Mercadante S, Intravaia G, Villari P, Ferrera P, Riina S, et al. (2007) Intrathecal treatment in cancer patients unresponsive to multiple trials of systemic opioids. *The Clinical journal of pain* 23: 793-798.
295. Yoshida S, Morii K (2005) Intrathecal chemotherapy for patients with meningeal carcinomatosis. *Surgical neurology* 63: 52-55; discussion 55.
296. Zagouri F, Sergentanis TN, Bartsch R, Berghoff AS, Chrysikos D, et al. (2013) Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review and pooled analysis. *Breast cancer research and treatment* 139: 13-22.

Kooperationspartner

Prof. Dr. Hartwig Wolburg, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland, Transmissionselektronenmikroskopie und Gefrierbruchtechnik

Dr. Michael Lazarus, International Institute for Integrative Sleep Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, Intracerebrale Injektionen

Prof. Dr. Bernd Pichler und Dr. Stefan Wiehr, Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland, Kernspintomographie

Monika Meinert, Institut für Evolution und Ökologie, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland, Rasterelektronenmikroskopie

Prof. Dr. med. Horst Schrotten und PD Dr. Christian Schwerk, Pädiatrische Infektiologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universitätsklinik Heidelberg, Mannheim, Deutschland, Artifizielle Blut-CSF-Schranke

Prof. Dr. Ulrich Schraermeyer, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Eberhard Karls Universität, Tübingen, Deutschland, Transmissionselektronenmikroskopie der Augen

Prof. Dr. Bruno Kubata, New Partnership for Africa's Development / African Research for Health Initiative, Nairobi, Kenya

Prof. Dr. Christian Betzel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland

Vordiplom:

Anatomie:	Prof. Dr. Klaus Reutter
Botanik:	Prof. Dr. Helga Ninnemann
Physik:	Prof. Dr. Martin Weitz
Zoologie:	Prof. Dr. Christian Bardele
Anorganische Chemie:	Prof. Dr. Ekkehard Lindner
Organische Chemie:	Prof. Dr. Thomas Ziegler
Physikalische Chemie:	Prof. Dr. Günter Gauglitz
Biochemie:	Prof. Dr. Bernd Hamprecht

Diplom:

Biochemie:	Prof. Dr. Michael Duszenko
Organische Chemie:	Prof. Dr. Thomas Ziegler
Virologie:	Prof. Dr. Thomas Iftner

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Dipl. Biochem. Stefan Boris Mogk,
geboren am 16. Oktober 1980 in Esslingen am Neckar

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**, 2014, Epub ahead of print, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.002>.

Mogk S*, Meiwes A*, Shtopel S, Schraermeyer U, Lazarus M, Kubata B, Wolburg H and Duszenko M. *Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS*. **PLoS ONE**, 2014, 9(3): e91372. (* co-first author)

Barth T, Bruges GA, Meiwes A, Mogk S, Mudogo CN and Duszenko M. *Staurosporine-induced cell death in Trypanosoma brucei and the role of Endonuclease G during apoptosis*. **Open Journal of Apoptosis**, 2014, 3(2): 16-31.

Gati C, Bourenkov G, Klinge M, Rehders D, Stellato F, Oberthür D, Yefanov O, Sommer BP, Mogk S, Duszenko M, Betzel C, Schneider T, Chapman HN, Redecke L. *Serial crystallography on in vivo grown microcrystals with synchrotron radiation*. **Int. Union of Crystallography**, 2014, 1(2):87-94.

Stein J, Mogk S, Mudogo CN, Sommer BP, Scholze M, Meiwes A, Huber M, Gray A, Duszenko M. *Drug development against sleeping sickness: old wine in new bottles?* **Current Medicinal Chemistry**, 2014, 21(15):1713-27.

Barth T, Stein J, Mogk S, Schönfeld C, Kubata BK, Duszenko M. *Life and death of T. brucei: New perspectives for drug development*. **Wiley-Blackwell**. Jäger, Koch, Flohé (eds.) *Trypanosomatid Diseases, Molecular Routes to Drug Discovery*, 2013.

Redecke L, Nass K, Deponte DP, White TA, Rehders D, Barty A, Stellato F, Liang M, Barends TR, Boutet S, Williams GJ, Messerschmidt M, Seibert MM, Aquila A, Arnlund D, Bajt S, Barth T, Bogan MJ, Caleman C, Chao TC, Doak RB, Fleckenstein H, Frank M, Fromme R, Galli L, Grotjohann I, Hunter MS, Johansson LC, Kassemeyer S, Katona G, Kirian RA, Koopmann R, Kupitz C, Lomb L, Martin AV, Mogk S, Neutze R, Shoeman RL, Steinbrener J, Timneanu N, Wang D, Weierstall U, Zatsepin NA, Spence JC, Fromme P, Schlichting I, Duszenko M, Betzel C, Chapman HN. *Natively Inhibited Trypanosoma brucei Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser*. **Science**, 2013, 339(6116): 227-30.

Wolburg H*, Mogk S*, Acker S, Frey C, Meinert M, Schönfeld C, Lazarus M, Urade Y, Kubata BK, Duszenko M. *Late Stage Infection in Sleeping Sickness*. **PLoS ONE**, 2012, 7(3): e34304. (* co-first author)

Mogk S, Wolburg H, Frey C, Kubata BK, Duszenko M. *Brain infection by African trypanosomes during sleeping sickness*. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, 2012, 18(2): p.49-51.

Vorträge

Young Scientist Symposium, „Brain infection of *T. brucei*“, Blaubeuren, September 2013

European Cooperation in Science & Technology, Posterpräsentation, Mailand, Januar 2012

Young Scientist Symposium, Deutsche parasitologische Gesellschaft, „The Role of Endonuclease G“, Hamburg, März 2011

Young Scientist Symposium, „Sleeping Sickness and the Brain“, Blaubeuren, Juni 2010

Stipendien

Stipendium der Takeda Science Foundation, Japan

Stipendium der Studienstiftung Gerhard Rösch, Tübingen

Fortbildungen

Tutorenschulung am Kompetenzzentrum für Hochschuldidaktik in Medizin, Oktober 2013

„Einführung in mikrochirurgisches Arbeiten“, Berliner Kompaktkurse, Berlin, März 2010

„Anästhesie bei Labortieren“, Charles River, Frankfurt, Juni 2009

„Versuchstierkundliches Privatissimum zur Erlangung tierschutz und versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach §9 Abs. 1 (TSchG)“, *Dr. Franz Iglauer*, Tübingen, 2006-2007

Diplomarbeit

„Etablierung eines induzierbaren knockdown des autophagy related gene 8 in *Trypanosoma brucei* mittels RNA Interferenz“, Prof. Dr. Michael Duszenko, Note 1.0, 2008-2009

Diplomprüfungen

Biochemie, Prof. Dr. Michael Duszenko, Prof. Dr. Doron Rapaport, 08.04.2008, **Note 1.7**

Schwerpunktfach Virologie, Prof. Dr. Thomas Iftner 10.10.2007, **Note 1.0**

Schwerpunktfach Organische Chemie, Prof. Dr. Thomas Ziegler, 29.06.2007, **Note 1.3**