

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- $\beta$ -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 semisoliden 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>quantum 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

---

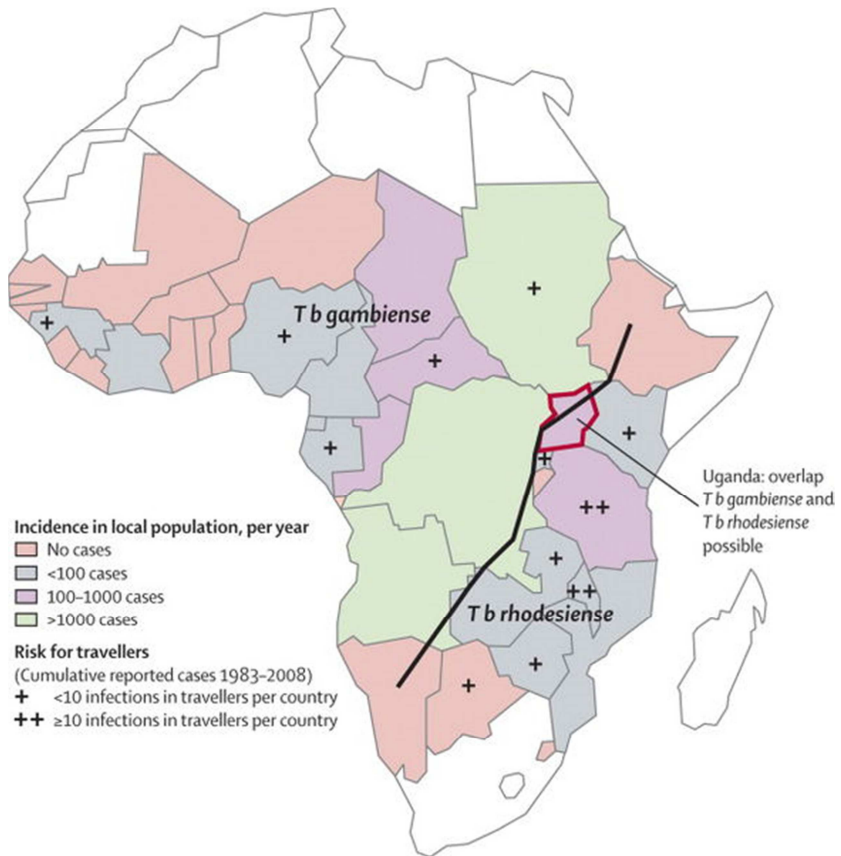
## A. Afrikanische Schlafkrankheit

---

### 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 Trypanosomenschanter) 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





































































































































































































































































































































































































































