

E DISKUSSION

Tiere dienen als Reservoirwirte für die humaninfektiösen Trypanosomen-Subspezies *Trypanosoma brucei rhodesiense* (akute Schlafkrankheit) und *T. b. gambiense* (chronische Schlafkrankheit) (DENECKE, 1941; HEISCH et al., 1958; ONYANGO et al., 1966; GIBSON et al., 1978; MEHLITZ et al., 1982 und 1985; GIBSON und GASHUMBA, 1983). Da diese beiden Subspezies in Tieren jedoch weder aufgrund von Morphologie, noch von Wirtsspektrum, Infektiosität, Wachstums-Eigenschaften oder geographischem Vorkommen von der allein tierinfektiösen Subspezies *T. b. brucei* unterscheidbar sind (GIBSON, 2001), benötigt man eine Methode, um die Humaninfektiosität von aus Tieren isolierten Trypanosomen schnell und zuverlässig zu bestimmen. Um Menschen infizieren zu können, müssen Trypanosomen sich an das Überleben in diesem Wirt anpassen und Humanserumresistenz erlangen. Diese Information muss in der Population verankert werden, um eine erfolgreiche Übertragung der Parasiten zu gewährleisten.

Die bereits bestehenden Tests zur Identifizierung der Humanserumresistenz von Trypanosomen wie der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT) (RICKMANN und ROBSON, 1970a/b) und der *in vitro*-Humanserum-Resistenztest (HSRT) (JENNI und BRUN, 1982) sind zum einen sehr zeit- und kostenaufwendig, zum anderen benötigt man zu ihrer Durchführung große Mengen an Trypanosomen und beim BIIT auch an Versuchstieren. Mittels biochemischer oder molekularbiologischer Methoden gelingt es jedoch nur teilweise, die Humaninfektiosität von Feldisolaten zu bestimmen. So kann man *T. b. gambiense*-Stämme von nicht-*gambiense*-Stämmen durch Isoenzymelektrophorese (BAGSTER und PARR, 1973; GODFREY und KILGOUR, 1976; GIBSON et al., 1978 und 1980; MEHLITZ et al. 1982; TAIT et al., 1984; GODFREY et al., 1987 und 1990; MIHOK et al., 1990; STEVENS et al., 1992), Restriktions-Enzymanalyse (RFLP) (PAINDAVOINE et al., 1986 und 1989; HIDE et al., 1994), DNA-Sondenhybridisierung (PAINDAVOINE et al., 1986; HIDE et al., 1991; SCHARES und MEHLITZ, 1996) und zufällig amplifizierte polymorphe DNA (RAPD-PCR) (WAITUMBI und MURPHY, 1993; KANMOGNE et al., 1996; MELMS, 1996) abgrenzen.

In bestimmten Schlafkrankheitsgebieten können sogar *T. b. rhodesiense*-Stämme anhand ihrer spezifischen RFLP-Muster identifiziert werden (HIDE et al., 1994). Eindeutige, auf andere

Schlafkrankheitsgebiete übertragbare Aussagen über die Humaninfektiosität von *T. brucei*-Isolaten kann man mit dieser Methode bisher allerdings nicht treffen.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Genome von Referenzstämmen und -klonen aus Nigeria, Kenia, Somalia, der Elfenbeinküste, Liberia, Zaire, Uganda und Tansania sowie von Feldstämmen und -klonen aus Tieren und Menschen in Bulutwe, einem Schlafkrankheits-Endemiegebiet im Südosten Ugandas, durch die Pulsfeld-Gelelektrophorese (SCHWARTZ und CANTOR, 1984) charakterisiert und anhand ihrer Karyotypen Rückschlüsse auf die Humanserumresistenz der Stämme gezogen werden. Dazu wurde ihre Humanserumresistenz zunächst mit Hilfe des *in vitro*-Humanserum-Resistenztests (JENNI und BRUN, 1982) bestimmt. Bei 8 ausgewählten Feldisolaten wurde zusätzlich der Blutinkubations-Infektiositätstest (RICKMANN und ROBSON, 1970a/b; modifiziert von HAWKING, 1976b und MEHLITZ, 1978) durchgeführt.

E.1 Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)

Zur Bestimmung der Humanserumresistenz von Referenz- und Feldstämmen bzw. -klonen wurde der *in vitro*-Humanserum-Resistenztest (HSRT) (JENNI und BRUN, 1982) ausgewählt. Dass man zu seiner Durchführung Erfahrung in der Kultivierung von Trypanosomen und Nährzellen sowie ein dafür ausgestattetes Labor benötigt, ist sicherlich ein Nachteil. Der grosse Vorteil dieses Tests ist jedoch die Möglichkeit, Trypanosomen und ihre Reaktion auf das Humanserum täglich unter dem Mikroskop beobachten und bewerten zu können. Zusätzlich ist der Verbrauch von Versuchstieren bei diesem Test stark eingeschränkt, da man sie lediglich zur Anzucht der Trypanosomen-Stabilate benötigt.

Die Interpretation der HSRT-Ergebnisse wird durch die un stabile Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* jedoch eingeschränkt. *T. b. rhodesiense* können ihre Humanserumresistenz nach Passagen durch Labortiere oder längerer Kultivierung ohne Humanserum verlieren und sich sensitiv zeigen (YORKE et al., 1930; FAIRBAIRN, 1933; MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973; RICHNER und JENNI, 1986; BRUN und JENNI, 1987). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist die Zusammensetzung eines Trypanosomen-Stammes aus vielen unterschiedlichen Individuen. Bei einer Probennahme wird folglich immer selektiert, und der „Verlust“ der Resistenz von *T. b. rhodesiense* nach Tierpassagen ohne Humanserum wäre ein zufälliges Auswählen ausschliesslich sensibler Individuen eines

Stammes, der eigentlich eine Mischung aus sensiblen und resistenten Individuen ist (HAWKING, 1976b). Da subresistente sich jedoch in hochresistente Stämme umwandeln, wenn sie über längere Zeit Humanserum ausgesetzt sind (VAN MEIRVENNE et al., 1976), und umgekehrt, werden resistente Individuen wahrscheinlich durch Humanserum selektiert und stimuliert, bzw. bei seiner Abwesenheit von schnell teilungsfähigen, sensitiven Individuen überwuchert (HAWKING, 1977). Ein negatives HSRT-Ergebnis muß deswegen mit Vorsicht beurteilt werden, ein positives macht die Humaninfektiosität allerdings wahrscheinlich (MEHLITZ, 1985). Man sollte resistente Populationen als "fast sicher infektiös", subresistente Populationen als "potentiell infektiös" und sensible Populationen als "wahrscheinlich nicht infektiös" für den Menschen beurteilen (HAWKING, 1976a).

E.1.1 Diskussion der HSRT-Ergebnisse

E.1.1.1 Referenzstämme und -klone

Zunächst wurden die Referenzstämme und -klone im HSRT getestet, um die Sensitivität und Stabilität des Testsystems zu überprüfen. Alle 5 *T. b. brucei*-Referenzen verhielten sich erwartungsgemäß sensitiv gegenüber Humanserum. Die 3 im HSRT getesteten *T. b. gambiense*-Referenzen zeigten eine nach Literaturangaben zu erwartende Resistenz. Von den 2 *T. b. rhodesiense*-Referenzen verhielt sich STIB 704, wie auch bei RICHNER-JAISLI (1987) und MELMS (1996), ausgeprägt resistent. EATRO 174 reagierte dagegen sensitiv gegenüber Humanserum. Diese Tatsache muß jedoch nicht überraschen, denn *T. b. rhodesiense* können, wie schon erwähnt, ihre Resistenz nach Maus-Passagen oder längerer Kultivierung ohne Humanserum verlieren (YORKE et al., 1930; FAIRBAIRN, 1933; MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973; RICHNER und JENNI, 1986; BRUN und JENNI, 1987). Bei Abwesenheit des Humanserums werden die resistenten Individuen eines Trypanosomenstammes von schnell teilungsfähigen, sensitiven Individuen überwuchert (HAWKING, 1977). Da EATRO 174 bereits 1959 in Uganda aus einem Menschen isoliert (STEVENS et al., 1992) und seit damals in Laboratorien kultiviert wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass er seine Resistenz auf diesem Wege eingebüßt hat. Auch existieren keine Literaturangaben über sein Verhalten im HSRT oder BIIT.

Anhand der Untersuchungsergebnisse der Referenzstämme und -klone konnte also davon ausgegangen werden, dass das HSR-Testsystem aussagefähig ist.

E.1.1.2 Aus Tieren isolierte Feldstämme

Von den 18 aus Tieren isolierten ugandischen Feldstämmen verhielten sich 3 resistent, 6 subresistent und 9 sensitiv im HSRT. Die 7 Klone verhielten sich ebenfalls sensitiv, genau wie ihre Mutterstämme. Nur zum Teil waren diese Ergebnisse identisch mit BIIT-Ergebnissen von MANGENI (1994) oder TIETJEN (persönliche Auskunft).

Abweichend von diesen BIIT-Ergebnissen verhielten sich die aus dem Feldstamm SUS/BU 83/9 (Schwein) gewonnenen Klone 1, 4 und 5, sowie die aus dem Feldstamm SUS/BU 319/7 (Schwein) gewonnenen Klone 2 und 3 und der Stamm BOT/BU 483/2 (Rind), die sich allesamt bei meinen Untersuchungen sensitiv zeigten, bei MANGENI jedoch subresistent. Die Stämme SUS/BU 139/2 (Schwein) und BOT/BU 623/7 (Rind) verhielten sich bei mir subresistent im HSRT, bei MANGENI bzw. TIETJEN jedoch resistent. SUS/BU 169/4 (Schwein) verhielt sich bei mir ebenfalls subresistent, bei TIETJEN dagegen sensitiv. Die aus Schweinen isolierten Feldstämme SUS/BU 319/7 und SUS/BU 561/3 verhielten sich bei meinen Untersuchungen und denen von TIETJEN sensitiv, während sie bei MANGENI subresistent gegenüber Humanserum waren. Der Stamm BOT/BU 602/7 (Rind) wiederum zeigte sich bei mir und bei TIETJEN resistent, bei MANGENI dagegen subresistent. Der aus einem Rind isolierte Feldstamm BOT/BU 1845/7 schließlich zeigte sich bei meinen Untersuchungen subresistent, während er sich bei TIETJEN resistent gegenüber Humanserum verhielt.

Diese voneinander abweichenden Ergebnisse im HSRT und BIIT der aus Tieren isolierten Feldstämme lassen sich wie folgt erklären: da sich Bulutwe in einem Rhodesiense-Schlafkrankheitsendemiegebiet befindet, kann man annehmen, dass es sich bei den Humanserum-resistenten und -subresistenten Feldisolaten um *T. b. rhodesiense* handelt. *T. b. rhodesiense* weisen jedoch, wie schon oben beschrieben, keine stabile Humanserumresistenz auf, da sie diese nach Mauspassagen oder längerer Kultivierung ohne Humanserum verlieren können (YORKE et al., 1930; FAIRBAIRN, 1933; MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973; RICHNER und JENNI, 1986; BRUN und JENNI, 1987). Bei Abwesenheit des Humanserums werden die resistenten Individuen eines Trypanosomenstammes von schnell teilungsfähigen, sensitiven Individuen überwuchert (HAWKING, 1977). Die meisten der aus Tieren in Bulutwe isolierten Feldstämme wurden ohne Humanserum 2 bis 24 mal durch Labormäuse passagiert, bevor sie zur Untersuchung im HSRT gelangten. So ist es nicht verwunderlich, dass diese Stämme an Humanserumresistenz

verloren. Die beiden Stämme SUS/BU 347/7 (Schwein) und BOT/BU 602/7 (Rind) wurden dagegen zusammen mit Humanserum passagiert und zeigten bei mir erwartungsgemäß einen höheren Resistenzgrad als bei den vorherigen Untersuchern, da resistente Individuen durch Humanserum selektiert und stimuliert werden (HAWKING, 1977). Weitere Erklärungen liefert FEDDERSEN (1988), die ebenfalls abweichende Ergebnisse von HSRT und BIIT desselben Trypanosomenisolates beobachtete. Der HSRT könnte z.B. nicht sensitiv genug sein, geringe Mengen von humanserumresistenten Trypanosomen anzureichern. Wenn man ein Trypanosomenisolat nach HAWKING (1976b) als Ansammlung von Individuen betrachtet, die unterschiedliche Resistenzgrade aufweisen können, und Passagen ohne Humanserum die sensitiven Individuen stimulieren, so können bei meinen sensitiv getesteten Isolaten die sensitiven Individuen nach 2 bis 24 Passagen ohne Humanserum inzwischen überwiegen. Mit dem HSRT könnte es dann unmöglich sein, die wenigen resistenten Individuen anzureichern. Meine für die Stämme SUS/BU 347/7 (Schwein) und BOT/BU 602/7 (Rind) gemachten Beobachtungen eines höheren Resistenzgrades als bei früheren Untersuchungen können auf die Stimulation der resistenten Individuen durch Passagen mit Humanserum zurückgeführt werden, die dann in genügender Menge für den HSRT vorhanden waren. Gegen diese Überlegungen spricht allerdings die von BRUN und JENNI (1982) gemachte Aussage, dass man mit dem HSRT sehr wohl eine Minderheit von resistenten Trypanosomen, nämlich einen einzigen humanserumresistenten Trypanosom aus einer künstlichen Mischpopulation mit 10^5 humanserumsensiblen Trypanosomen, herausfiltrieren kann, was sie durch künstlich hergestellte Mischpopulationen resistenter und sensitiver Individuen herausfanden.

Ein weiterer, von FEDDERSEN (1988) angeführter Grund ist, dass der BIIT bei der Identifizierung von humanserumresistenten Trypanosomen nicht zuverlässig genug sein könnte. Die Zeit der Einwirkung des Humanserums könnte zu kurz sein, um alle humanserumsensiblen Trypanosomen zu inaktivieren, was dann falsch positive Ergebnisse zur Folge hätte. RICKMAN und ROBSON (1972) sowie HAWKING (1973) belegen jedoch, dass die Hauptaktivität des Humanserums erst in der Maus entfaltet wird und man deswegen Trypanosomen zusammen mit Humanserum auch sofort, ohne Aussageverlust des BIIT, inokulieren kann. Diese These unterstützen meine Beobachtungen einer eindeutigen Resistenz der Stämme SUS/BU 347/7 (Schwein) und BOT/BU 602/7 (Rind) beim HSRT, die zuvor im BIIT lediglich subresistent getestet worden waren.

Ein negatives HSRT-Ergebnis muß also mit Vorsicht beurteilt werden, ein positives macht die Humaninfektiosität wahrscheinlich (MEHLITZ, 1985). Bei der Beurteilung der Humanserumresistenz der aus Tieren isolierten Feldstämme und -klone ist es daher ratsam, ihren höchsten jemals bestimmten Resistenzgrad als Merkmal anzunehmen.

E.1.1.3 Aus Menschen isolierte Feldstämme

Die 4 aus Menschen isolierten Stämme verhielten sich, wie zu erwarten, im HSRT resistent. 3 dieser Stämme wurden nur 1 mal passagiert, und zwar zusammen mit Humanserum. Für den Stamm 2602 Babalande wurde die Anzahl der Passagen nicht dokumentiert.

E.2 Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)

Bei 8 ausgewählten Feldisolaten wurde zusätzlich der Blutinkubations-Infektiositätstest (RICKMANN und ROBSON, 1970a/b; modifiziert von HAWKING, 1976b und MEHLITZ, 1978) durchgeführt. 5 Stämme waren aus Tieren isoliert und zuvor mit dem BIIT (MANGENI, 1994; TIETJEN, persönliche Auskunft) als resistent oder subresistent eingestuft, 3 Stämme waren aus Menschen isoliert worden. Der BIIT wurde hauptsächlich durchgeführt, um die Humanserumresistenz der Stämme nach Mauspassagen durch gleichzeitige Injektion von Humanserum zu erhalten (s.o.). Bei den übrigen Isolaten verzichtete man darauf, um den Verbrauch an Versuchstieren so gering wie möglich zu halten.

Schwierig wird jedoch auch die Interpretation des BIIT durch die instabile Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* (s.o.).

E.2.1 Diskussion der BIIT-Ergebnisse

E.2.1.1 Aus Tieren isolierte Feldstämme

Von den aus Tieren isolierten Stämmen verhielten sich SUS/BU 347/7 (Schwein) und BOT/BU 1845/7 (Rind) bei mir im BIIT subresistent, während sie zuvor von TIETJEN (persönliche Auskunft) als resistent eingestuft worden waren. Da TIETJEN die Stämme jedoch direkt im Anschluß an ihre Isolierung testen konnte und sie bei meinen Untersuchungen bereits 4 Passagen durchlaufen hatten, kann man davon ausgehen, dass sie

auf diesem Wege etwas an Humanserumresistenz einbüßten (s.o.). Die aus Rindern isolierten Stämme BOT/BU 602/7 und BOT/BU 623/7, sowie der aus einem Schwein isolierte Stamm SUS/BU 373/7 waren sowohl bei mir als auch bei TIETJEN im BIIT resistent. Von MANGENI (1994) wurde nur BOT/BU 602/7 getestet, welcher sich dort subresistent verhielt.

Mit den BIIT-Ergebnissen entsprachen 3 der Stämme auch ihren HSRT-Ergebnissen. SUS/BU 347/7 (Schwein) verhielt sich bei mir im BIIT jedoch subresistent, während er im HSRT resistent war, und BOT/BU 623/7 verhielt sich bei mir im BIIT resistent, während er im HSRT subresistent war. Diesen nur in ihrem Grad der Resistenz abweichenden Ergebnissen sollte meiner Ansicht nach nicht zuviel Bedeutung beigemessen werden. Sie können ihre Ursache z.B. in den Versuchsablauf beeinflussenden Faktoren wie minimaler Kontamination des *in vitro*-Testsystems oder unterschiedlicher Ausprägung des Immunsystems der Versuchsmäuse haben.

E.2.1.2 Aus Menschen isolierte Feldstämme

Die 3 aus Menschen isolierten Stämme verhielten sich im BIIT erwartungsgemäß resistent. Er wurde mit Direktstabilaten aus menschlichem Blut durchgeführt.

E.3 Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Da die Humanserumresistenz von einer Trypanosomengeneration an die nächste vererbt wird, muss sich diese zusätzliche Information zwangsläufig im Genom der Parasiten verankern. Einen eventuellen Nachweis der Verankerung galt es aufzufinden.

Zur Untersuchung des Trypanosomen-Genoms wurde die Pulsfeld-Gelelektrophorese nach SCHWARTZ und CANTOR (1984) ausgewählt. Es wurde die ROFE (Rotierendes Feld während der Elektrophorese) benutzt, da die Ergebnisse der unterschiedlichen PFGE-Methoden vergleichbar gut sind und ein solcher Apparat vorhanden war. Für eine Auftrennung von großen Molekülen ist nämlich nicht die Anordnung der Elektroden von Bedeutung, sondern eine der Anordnung zugrunde gelegte physikalische Symmetrie (CARLE et al., 1986; BIRREN et al., 1989). Bei der ROFE werden während der Elektrophorese zwei Elektroden rotiert und dadurch zwei homogene, unterschiedlich ausgerichtete elektrische Felder produziert (VOLLRATH, 1992). Je nach Elektrophorese-Konditionen kann man kurze (0,5kbp) oder sehr lange (10Mbp) DNA-Moleküle exzellent auftrennen (ZIEGLER und VOLZ, 1992), in der vorliegenden Arbeit gelang dies von 95kbp bis 3Mbp. Für jeden

Trypanosomen-Stamm entsteht so ein charakteristisches Bandenmuster, welches sich mit den Mustern anderer Stämme vergleichen läßt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, beim Vergleich der Karyotypen bestimmte Wiederholungen aufzuzeigen, die sich mit der Humanpathogenität der Stämme in Verbindung bringen lassen.

E.3.1 Durchführung der PFGE

E.3.1.1 Test verschiedener Puffer zur Herstellung der PFGE-Blöcke

Beim Test 3 verschiedener Puffer zur Herstellung der PFGE-Blöcke zeigte sich, dass nur die in PSG- und PS-Puffer suspendierten Trypanosomen in der PFGE ein deutlich abgesetztes Bandenmuster, die in PS-Puffer suspendierten im Vergleich jedoch etwas schwächere Banden erzeugten. Die in 1xTBE-Puffer ohne MgCl suspendierten Trypanosomen stellten sich komplett als sogenannte Schmierspür (*smear*) dar, die in 1xTBE-Puffer mit MgCl suspendierten Trypanosomen zeigten immerhin eine breite Bande bei ca. 3Mb und feinen, über den Rest der Spur verteilten *smear*. Bereits nach dem Waschen zeigte sich mikroskopisch (Objekträger mit Deckglas, 400-fache Vergrößerung, Okular 10x, Objektiv F 40/0,65), dass die Trypanosomen nur noch im PSG-Puffer lebten, sowohl im PS- als auch im 1xTBE-Puffer mit oder ohne MgCl waren ihre Zellmembranen wahrscheinlich durch suboptimale Ionenkonzentrationen zerstört und keine Zellstrukturen mehr erkennbar. Möglicherweise wurden dadurch zelleigene Enzyme frei und spalteten das Genom in Fragmente unterschiedlicher Größe, die sich im Gel auf der gesamten Spurlänge verteilten. Auch VAN DER PLOEG et al. (1984b) und MAJIWA et al. (1985) suspendieren die Trypanosomen in einem PSG-Puffer, da seine Ionen-Konzentration ein optimales Milieu für die Trypanosomen schafft, und diese zusätzlich durch den Anteil an Glukose über längere Zeit ernährt und somit am Leben hält. KANMOGNE et al. (1997) benutzen lediglich PS-Puffer, also ohne Zusatz von Glukose. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen beschreibt GIBSON (persönliche Auskunft) eine erfolgreiche Einbettung der Trypanosomen mit TBE-Puffer.

E.3.1.2 Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration pro PFGE-Block

Die Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration pro PFGE-Block ergab, dass man 1,5 bis 2×10^9 Trypanosomen pro ml Puffer für eine zufriedenstellende Intensität der Banden benötigt.

Diese Beobachtung deckt sich mit der Aussage von VAN DER PLOEG (1992), der 2×10^9 Trypanosomen pro ml Puffer verwendet.

E.3.1.3 Test unterschiedlicher Proteinase K-Mengen bzw. Längen des Verdaus

Beim Test unterschiedlicher Proteinase K-Mengen bzw. Längen des Verdaus zeigte sich, dass lediglich die verwendete Menge des Enzyms eine Auswirkung auf die Qualität der PFGE-Blöcke hat. So waren $100 \mu\text{g/ml}$ NDS-Puffer nicht ausreichend, sie ergaben nur schwache Banden und über die gesamte Spur verteilten *smear*. Eine Erklärung hierfür wäre, dass wegen der geringen Proteinase K-Menge die zelleigenen Enzyme der Trypanosomen nach deren Absterben einen Teil der DNA bereits spalten konnten. Dadurch würde einerseits der *smear* entstehen, andererseits würden entsprechend weniger Chromosomen zur Auftrennung übrig bleiben und so schwächere Banden ausgebildet werden.

1mg Proteinase K pro ml NDS-Puffer ergab jedoch gute Ergebnisse, egal ob 48 oder 78h lang verdaut. Der Grund für gleiche Ergebnisse bei verschiedenen Inkubationszeiten könnte z.B. sein, dass die Proteinase K nach einer bestimmten Zeit aufgebraucht ist und der Verdau an dieser Stelle zum Erliegen kommt. Jedoch selbst ein Wechsel des Puffers nach 48h, erneute Zugabe von 1mg/ml Proteinase K und wiederholte 48-stündige Inkubation hatten keinen Einfluss auf das Ergebnis. Deswegen muss die Ursache im genetischen Material liegen, welches bei dieser Enzymmenge nach einer bestimmten Zeit (mindestens 48h) komplett verdaut ist. Während WAITUMBI und YOUNG (1994) $100 \mu\text{g}$ Proteinase K pro ml NDS-Puffer verwenden, setzen VAN DER PLOEG et al. (1984b) sowie MELVILLE et al. (1998) 2mg/ml , ein. Alle Autoren verdauen die Blöcke allerdings 48h lang.

E.3.1.4 Einfluss der Laufgel-Höhe auf das PFGE-Ergebnis

Unterschiedliche Laufgel-Höhen hatten einen Einfluss auf die Qualität der PFGE-Ergebnisse. So trennten sich die Banden bei einem 7mm hohen Gel schlecht auf und zeigten sich nur unscharf, während mit einem $4,5 \text{mm}$ hohen Gel optimale Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Ursache einer schlechteren Auftrennung liegt wahrscheinlich daran, dass die DNA leicht schräg gestellt im Gel wandert. Bei einem höheren Gel ist diese Schrägstellung natürlich ausgeprägter und so erscheinen die Ränder der Bande verschwommen. Die Unschärfe der Banden könnte auch durch Auflage einer dickeren Gelmasse auf der zu fotografierenden DNA erklärt werden.

E.3.1.5 Ermittlung der Parameterlisten

Da die Bandbreite der Chromosomengrößen (30kbp bis 5,7Mbp) keine Darstellung aller Chromosomen durch einen einzigen PFGE-Lauf ermöglichte, wurden insgesamt 4 verschiedene Läufe durchgeführt. Folgende Faktoren beeinflussen die optimale Auftrennung bei der PFGE: Spannung, Pulszeit, Temperatur, Pufferzusammensetzung und Agarosekonzentration. Alle Parameter sollten konstant gehalten werden, damit ein Vergleich verschiedener Läufe möglich wird (BURMEISTER, 1992; GARDINER; 1992). Grundsätzlich gilt, je geringer die Agarose-Konzentration und die Feldstärke, bzw. je größer das Intervall, je weiter der Winkel und je stärker der Laufpuffer, desto besser lassen sich große Moleküle auftrennen (und umgekehrt).

Eine hohe Agarose-Konzentration bewirkt einen stärkeren Siebeffekt auf die Moleküle, zu Lasten der größeren. Die Länge des Intervalls zwischen den Rotorbewegungen bestimmt die Zeit die das Molekül hat, um sich im Gel neu zu orientieren, wobei große Moleküle länger brauchen. Der Winkel wiederum bewirkt den Grad an Neuorientierung und muss deswegen für große Moleküle weiter gewählt werden, damit sie sich im Gel genügend weit ausrichten. Dabei muss aber gleichzeitig eine ausreichend lange Elektrophoresedauer gewährleistet sein. Da große Moleküle mehr Ladungen tragen, werden bei ihrer Auftrennung auch mehr Ionen des Laufpuffers verbraucht. Deswegen muss dieser dann konzentrierter zubereitet werden. Das bewirkt jedoch gleichzeitig einen Anstieg der Feldstärke, und je höher diese ist, desto niedriger muss die Kühl-Temperatur gewählt werden, um die anfallende Wärme abzuführen. Große Moleküle lassen sich bei höheren Temperaturen allerdings besser auftrennen. Die Feldstärke steigt zudem auch mit der angelegten Spannung. Je höher letztere jedoch ist, desto schneller werden die Moleküle aufgetrennt.

In den Zusammenhang all dieser Parameter galt es sich einzuarbeiten und optimale Listen für die verschiedenen Läufe zu erstellen.

Mit **Lauf 0** konnten die Mini-Chromosomen ab 95kbp und die Inermediär-Chromosomen bis 450kbp aufgetrennt werden. Die hohe Spannung von 10V/cm, verbunden mit einem sehr kurzen Intervall von 15s und einem relativ spitzen Winkel von 110°, ermöglichte die schnelle Auftrennung (innerhalb von 24h) dieser sehr kurzen Moleküle. Wegen der hohen Spannung wurde nur ein 0,25x TBE-Laufpuffer benutzt, um die Feldstärke so gering wie möglich zu halten. Unter 95kbp waren die Banden bei den meisten Stämmen aufgrund ihrer großen

Anzahl nur schlecht voneinander zu unterscheiden. Die Chromosomen über 450kbp blieben als breite Bande (Kompressionszone) unmittelbar unterhalb den Geltaschen stecken.

Lauf I ermöglichte die Auftrennung der Intermediär-Chromosomen von 300 bis 840kbp innerhalb von 24h durch eine hohe Spannung von 10V/cm, verbunden mit einem relativ kurzen Intervall von 50s und einem etwas weiteren Winkel von 120°. Auch hier wurde 0,25x TBE-Laufpuffer benutzt, um die Feldstärke gering zu halten. Unter 300kbp lagen die Banden so nahe beieinander, dass sie nicht ausgewertet werden konnten. Die Chromosomen über 840kbp blieben als breite Bande (Kompressionszone) unmittelbar unter den Geltaschen stecken.

Mit **Lauf II** konnten Chromosomen von 450kbp (Intermediäre) bis 1,6Mbp (Große) innerhalb von 36h aufgetrennt werden. Hier wurde die Spannung während des Laufes in linearen Schritten von 10V/cm auf 9V/cm und das Intervall logarithmisch von 100 auf 10s verringert. Für diese z.T. sehr großen Moleküle wurde also der Anfangswert des Intervalls hoch gewählt. Durch die stufenweise Verringerung der Werte von Spannung und Intervall wurden zunächst die größeren Moleküle und anschließend die kleineren aufgetrennt. Der in logarithmischen Schritten von 100 auf 125° erweiterte Winkel ermöglichte eine effektivere Ausrichtung der größeren Moleküle bei immer kürzer werdenden Intervallen zwischen den Rotorbewegungen. Auch hier wurde wegen der hohen Spannung 0,25x TBE-Laufpuffer verwendet. Die Chromosomen <450kbp wanderten bei diesem Lauf am unteren Ende aus dem Gel heraus. Die Banden über 1,6Mbp bildeten eine etwas schlankere Kompressionszone unmittelbar unter den Geltaschen.

Lauf III ermöglichte die Auftrennung der großen Chromosomen zwischen 1 und 3Mbp innerhalb von 84h. Um die optimale Ausrichtung dieser massigen Chromosomen im Gel zu ermöglichen, wurden bei einer niedrigen Agarosekonzentration von nur 0,7 lange Intervallzeiten von 350 bis 50s (logarithmisch) gewählt. Benötigt wurde der konzentriertere 0,5x TBE-Puffer, deswegen musste die Spannung niedrig gehalten werden und wurde von 6 auf 2,5V/cm in linearen Schritten verringert. Die Chromosomenbanden zwischen 1 und 3Mbp stellten sich breit und verschwommen dar. Das erschwerte ihre genaue Berechnung. Eine Erklärung hierfür wäre die enorme Menge an DNA, welche in den großen Chromosomen vorhanden ist und inter- bzw. intramolekulare Bindungen begünstigt. Diese dreidimensionale Struktur behindert die Wanderung im Gel. Unter 1Mbp trennte sich der Marker *Saccharomyces cerevisiae* schlecht auf, so dass diese Banden nicht ausgewertet werden

konnten. Die Chromosomen über 3Mbp bildeten eine schmale Kompressionszone unmittelbar unter den Geltaschen.

E.3.2 Stabilität des Karyotypes von Trypanosomen

Um zu zeigen, dass die mit der PFGE gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar und aussagekräftig sind, wurden verschiedene Untersuchungen zur Stabilität des Karyotyps von Trypanosomen durchgeführt.

E.3.2.1 Karyotyp von Blutstrom- und prozyklischen Formen

In allen 4 PFGE-Läufen (Lauf 0-III) stellten sich die Chromosomenmuster der Blutstrom- und prozyklischen Formen von Klon 3 des Feldstammes SUS/BU 319/7 (Schwein) genau gleich dar. Damit wird die Aussage von VAN DER PLOEG et al. (1984b, 1989 und 1992), WELLS et al. (1987) sowie ESHITA et al. (1999) bestätigt, dass Trypanosomen während ihres Lebenszyklus keine Änderung des Karyotypes erfahren.

E.3.2.2 Karyotyp von frühen und späten Antigenvarianten

Die während einer chronischen Infektion aus einer Maus isolierten 5 verschiedenen Antigenvarianten vom Klon 3 des Feldstammes SUS/BU 319/7 (Schwein) stellten sich in allen 4 PFGE-Läufen (Lauf 0-III) genau gleich dar. Damit wird bestätigt, dass der Karyotyp von Trypanosomen nach Änderung ihres Oberflächenantigen-Typen stabil bleibt. Diese Tatsache beschreiben auch VAN DER PLOEG et al. (1984b und 1989).

E.3.2.3 Karyotyp zweier Feldisolate und aus diesen gewonnener Klone

Da ein Trypanosomen-Feldisolat als eine Population von Individuen betrachtet werden muss (s.o.; HAWKING, 1976b), wurden, um die Aussagefähigkeit der Untersuchung von Feldisolaten zu bestätigen, zwei aus Schweinen gewonnene Feldstabilate zunächst in der Maus angezüchtet und anschließend mehrmals von PELLMANN (1999) geklont. Im Gegensatz zu den Aussagen von ESHITA et al. (1999) sowie ALSFORD et al. (2001), deren untersuchte Klone sich in ihrem Mini-Chromosomenmuster geringfügig unterschiedlich zeigten, stellten sich die Chromosomenmuster der Klone 1, 2, 4 und 5 und ihres Ausgangs-Feldisolates SUS/BU 83/9, sowie der Klone 1, 2 und 3 und ihres Ausgangs-Feldisolates

SUS/BU 319/7 bei mir in allen 4 PFGE-Läufen (Lauf 0-III) identisch dar. Eine Erklärung könnte sein, dass Unterschiede der Klone sich ausserhalb meines Auswertungsbereiches im Muster der Mini-Chromosomen <95kbp befinden. Jedoch auch die Dichte der Banden <95kbp, die von mir nicht differenziert werden konnten, scheint in den vorliegenden Untersuchungen bei allen Klonen sowie ihren Ausgangsstabilaten vergleichbar. Eine andere Erklärung wäre, dass ESHITA et al. (1999) ein Direktstabilat geklont haben, während in der vorliegenden Arbeit ein bereits durch Mäuse passagiertes Stabilat zur Klonierung verwendet wurde. Bei der Anzucht in der Maus findet sicherlich eine Selektion statt, da sich anpassungsfähige Trypanosomen schneller entwickeln und die anderen, nur langsam adaptierenden, überwachsen können. Bei VAN DER PLOEG et al. (1984b und 1989) stellten sich Klone in ihrem Karyotyp ebenfalls identisch dar. Der Rückschluss, dass die in einem passagierten Feldisolat vereinten Individuen den gleichen Karyotyp und Aussagen, die mit Hilfe der PFGE über ein passagiertes Feldisolat gemacht werden, für jedes der darin enthaltenen Trypanosomen-Individuum Gültigkeit haben, kann also, wenn man die Untersuchungen von ESHITA et al. (1999) und ALSFORD et al. (2001) einbezieht, nur bedingt gezogen werden.

E.3.3 Diskussion der PFGE-Ergebnisse

Die Untersuchung der Karyotypen von Referenz- und Feldstämmen ergab eine große Verschiedenheit der Bandenmuster, wobei die Karyotypen der Feldstämme untereinander ähnlicher waren. Diese Beobachtung wurde schon von mehreren Autoren gemacht (MELVILLE, 1997; ERSFELD et al., 1999; TOALDO et al., 2001) und hat ihre Ursache in den enormen Größenunterschieden, die sowohl zwischen den zwei Homologen eines Chromosomenpaares als auch zwischen vergleichbaren Chromosomenpaaren verschiedener Trypanosomen-Isolate auftreten können (MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998 und 2000; ALSFORD et al., 2001). Sie entstehen aufgrund immer wieder vorkommender Rearrangements von VSG-Genen und Expressions-Stellen, Vergrößerung bzw. Verkleinerung von bestimmten Sequenz-Regionen, Tandem-ähnlich angeordneten Haushalts-Genen, subtelomerischen und telomerischen Wiederholungen, anderen repetitiven Sequenzen und weiteren intergenetischen Sequenz-Änderungen (VAN DER PLOEG et al., 1984b; EL-SAYED et al., 2000).

Homologe lassen sich also nicht allein aufgrund ihrer Größe definieren. Deswegen ist ein Nomenklatur-System der Chromosomen eines Trypanosomenstammes nicht übertragbar auf andere Stämme, vor allem wenn man unterschiedliche PFGE-Parameter benutzt (MELVILLE

et al., 1998 und 2000). Am effektivsten wäre ein einziger PFGE-Lauf, der alle Größenklassen von Chromosomen ausreichend auftrennt, um verschiedene Trypanosomenstämme optimal miteinander vergleichen zu können. MELVILLE et al. (2000) erwähnen in ihrer Publikation, dass sie ein solches Manuskript vorbereiten. Leider ergaben die meisten Protokolle anderer Untersucher bei mir unbefriedigende Ergebnisse, weshalb die Parameterlisten nur in Anlehnung an verschiedene Veröffentlichungen (VAN DER PLOEG et al., 1989 und 1992) ermittelt werden konnten. Zum erleichterten Vergleich der Chromosomenbanden der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme wurden, wie auch bei ERSFELD et al. (1999), die Mini-Chromosomen mit „MC“, die Intermediär-Chromosomenbanden mit „IC“ und die großen Chromosomenbanden mit „MBC“ (= Mega-Basenpaar-Chromosomen) abgekürzt und jeweils durchnummeriert, mit der kleinsten (auswertbaren) Bande eines Stammes beginnend.

E.3.3.1 Referenzstämme und -klone

Die Karyotypen der Referenzstämme und -klone waren sehr unterschiedlich voneinander, und es ließen sich keine verbindenden Gemeinsamkeiten ausmachen. Die Tatsache, dass die genaue Anzahl der Chromosomen nicht nur innerhalb der Subspezies variiert, sondern von Isolat zu Isolat, wurde schon von mehreren Autoren berichtet (GIBSON und BORST, 1986; VAN DER PLOEG et al., 1984b; MELVILLE, 1997; ERSFELD et al., 1999; GIBSON, 2001) und konnte auch durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. In den Bereichen der Mini- und großen Chromosomen zeigten alle Referenzen allerdings ungefähr vergleichbar viele Chromosomenbanden (durchschnittlich 4-7 MC, außer DAL 72 mit 2 und TH 152 mit 8 MC, und 3-7 MBC). Nur von den Intermediär-Chromosomenbanden besaßen die *T. b. gambiense*-Stämme durchschnittlich weniger (0-4 IC) als die nicht-*gambiense*-Stämme (3-6 IC). Die Feststellung, dass *T. b. gambiense* weniger Mini-Chromosomen und ein beständiges, spezifisches DNA-Muster haben, während *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* höchst unterschiedliche Bandenmuster aufweisen (PAINDAVOINE et al., 1986; MELVILLE, 1997), konnte mit den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Allerdings war es mir auch nur möglich, die Mini-Chromosomen ab 95kbp sauber aufzutrennen, obwohl VAN DER PLOEG et al. (1984b) sowie GIBSON und BORST (1986) von ca. 100-200 Stück linearen Mini-Chromosomen zwischen 50kb und 150kb bei *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* berichten, während die von ihnen untersuchten *T. b. gambiense* durchschnittlich nur etwa 10 MC aufweisen (siehe auch KANMOGNE et al., 1997). Jedoch auch die Dichte der Banden

<95kbp, die von mir nicht differenziert werden konnten, scheint in den vorliegenden Untersuchungen sowohl bei *gambiense* als auch bei nicht-*gambiense* vergleichbar. Lediglich die von der Elfenbeinküste stammenden DAL 69, DAL 72 Cl. A und TH 152, sowie der aus Liberia stammende G. DOLO zeigten kaum Banden <95kbp, wobei man für eine eindeutige Aussage mit einer zusätzlichen Parameterliste genau diesen Bereich untersuchen müsste. Die Aussagen von KANMOGNE et al. (1997) könnten sich allerdings nur auf *gambiense*-Stämme einer bestimmten Region beziehen, da sie hauptsächlich aus Kamerun (7) isolierte Populationen und nur jeweils 2 aus dem Kongo, Uganda und der Elfenbeinküste untersuchten. Ein von ESHITA et al. (1999) untersuchter *T. b. g.*-Stamm besaß zudem ebenfalls viele Mini- und Intermediär-Chromosomen. Zumindest läßt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen feststellen, dass *gambiense*-Stämme aus der Elfenbeinküste und Zaire vergleichbar viele Mini-, jedoch weniger Intermediär-Chromosomenbanden als die nicht-*gambiense*-Stämme aufweisen. Allerdings könnte man eine unterschiedliche Darstellung von *gambiense* und nicht-*gambiense* in der PFGE erwarten, da *T. b. g.* nachweislich einen anderen Resistenzmechanismus haben als *T. b. rh.* (DE GREEF et al., 1989; ORTIZ-ORDONEZ und SEED, 1995; HAGER und HAJDUK, 1997).

Zwei *T. b. gambiense*-Referenzen aus der Elfenbeinküste (DAL 487 Cl. A und A0 83) konnten nicht mit der PFGE untersucht werden, da es selbst unter Zugabe von Aconit- und Zitronensäure nicht möglich war, sie in Prozyklische zu transferieren und genügend Trypanosomen zu erhalten. Die Schwierigkeit und zuweilen Unmöglichkeit, *T. b. gambiense* zu transferieren, ist allerdings bekannt (BRUN und JENNI, 1983).

Eine Einteilung der Referenzen in humanserumresistent bzw. -sensitiv aufgrund von PFGE-Ergebnissen war nicht möglich. Auch konnten die drei Subspezies *Trypanosoma brucei brucei*, *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* nicht eindeutig durch die PFGE differenziert werden. Ein Grund liegt sicherlich in den unterschiedlichen Herkunftsgebieten. Es ist immer einfacher, Stämme eines Schlafkrankheitsgebietes miteinander zu vergleichen und zu gruppieren. So wurden die meisten Aussagen über eine Subspezies-Differenzierung für Stämme eines bestimmten Gebietes getroffen (PAINDAVOINE et al., 1989; HIDE et al., 1994). Als gebietsübergreifende Methode zur Identifizierung humanpathogener Trypanosomen kann die PFGE, zumindest so wie sie in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt wurde, also nicht eingesetzt werden.

E.3.3.2 Feldisolate

Die aus Tieren und Menschen isolierten Feldstämme stellten sich in ihren Bandenmustern sehr viel homogener dar als die Referenzen, was sich durch ihre gemeinsame Herkunft erklären läßt. Alle Stämme kommen aus demselben Dorf, Bulutwe in Südost-Uganda, und wurden innerhalb einer relativ kurzen Periode isoliert (1990-92). Dass in einem bestimmten Gebiet zirkulierende Stämme über Jahre hinweg ähnliche Karyotypen aufweisen, wurde schon von WAITUMBI und YOUNG (1994) sowie GIBSON (2001) beschrieben. Anhand ihrer Karyotypen konnten die Feldstämme 5 Grundmustern zugeordnet werden, denen sich nur 3 Stämme nicht zuordnen ließen: die aus Schweinen isolierten Stämme SUS/BU 132/2 und SUS/BU 561/3, sowie der aus einem Rind isolierte Stamm BOT/BU 623/7. Ausgehend von dieser Musterzuordnung ließen sich jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die Humanserumresistenz der Stämme ziehen. Die Grundmuster 1, 3 und 4 enthielten nahezu alle Resistenzgrade. Lediglich die Muster 2 und 5 vereinigten subresistente bzw. resistente Stämme, mit der Ausnahme von Klon 1 des Feldstammes SUS/BU 319/7 (Muster 2), der sich im Gegensatz zu seinem Mutterstamm Humanserum-sensitiv verhielt. Die Bandenmuster der hauptsächlich aus Menschen isolierten Stämme mit Muster 5 waren jedoch unterschiedlicher voneinander als die Bandenmuster der Stämme, welche einem der restlichen Grundmuster zugeordnet wurden. Das überrascht insoweit, da HIDE et al. (2000) feststellten, dass die Karyotypen von Trypanosomen-Isolaten aus Tieren untereinander uneinheitlicher sind als diejenigen von Human-Isolaten. Als Gemeinsamkeiten der Stämme mit dem gleichen Grundmuster konnten sonst nur der Isolierungszeitraum bzw. das Isolierungstier festgestellt werden. So stammen alle Stämme mit dem Muster 1 aus demselben Schwein Nr. 83 und wurden zwischen März und Juli 1992 isoliert. Die Stämme mit dem Muster 2 stammen zur Hälfte aus dem Schwein Nr. 319 und wurden im April 1992 isoliert, bis auf den Stamm SUS/BU 132/4 (Schwein), der bereits im August 1991 isoliert worden war. Nahezu alle Stämme mit dem Muster 3 wurden im März 1991 isoliert, außer SUS/BU 347/7, der erst im April 1992 aus einem Schwein isoliert wurde. Nur die 3 Stämme mit dem Muster 4 wurden im August 1991 (SUS/BU 169/4), im April 1992 (SUS/BU 932/7) und im Juli 1992 (SUS/BU 319/9) aus unterschiedlichen Schweinen isoliert.

Von dem Karyotyp eines Feldstammes konnte also nur bedingt (Grundmuster 2 und 5) auf seine Humanserumresistenz geschlossen werden. Auch konnte keine einzelne Bande identifiziert werden, die sich mit Humanserumresistenz oder -sensitivität eines Feldstammes in Verbindung bringen ließ. Das steht im Gegensatz zu der Aussage von HIDE et al. (1994

und 1996), die in der Tororo-Region, Ostafrika, *T. b. rhodesiense*-Stämme über mehrere Jahre anhand ihres DNA-Musters, allerdings mit Hilfe der RFLP untersucht, eindeutig von den in Rindern zirkulierenden *T. b. brucei* unterscheidenden konnten. Das bedeutet, dass die beiden Gruppen nebeneinander existieren und kein genetischer Austausch zwischen ihnen stattfindet. Auch GIBSON (2001) beschreibt, dass *T. b. rhodesiense*-Isolate zwar genotypisch innerhalb und zwischen Schlafkrankheitsgebieten variieren, jedoch jeder Focus seine eigene Ansammlung von zusammenhängenden Genotypen besitzt. Geht man aber von dieser Tatsache aus, so müsste bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanserumresistenten Feldstämmen eigentlich eine gewisse Homogenität zu erkennen sein.

E.3.4 Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse

Durch den Einsatz der drei Marker Lambda phage ladder (FMC BioProducts, Rockland, USA), *Saccharomyces cerevisiae* (Biometra, Göttingen, D) und *Schizosaccharomyces pombe* (Biometra, Göttingen, D) (siehe C.4.1.4.2) konnten die Banden- und damit die Chromosomengrößen berechnet werden. Da die kleinste Bande des kleinsten auf dem Markt befindlichen Markers (Lambda phage ladder) 48,5bp groß ist und die größte Bande des größten Markers (*Schizosaccharomyces pombe*) 5,7Mb, war man bei der Auswertung auf diesen Bereich beschränkt. Dass in der vorliegenden Arbeit nur Chromosomen im Bereich von 80-2900kbp dargestellt werden konnten, liegt an einer Verdichtung der Banden außerhalb dieses Bereiches. Durch ihre große Anzahl (Mini-Chromosomen) bzw. ihre Molekülgröße (große Chromosomen) konnten sie nicht eindeutig voneinander getrennt, geschweige denn ihre genaue Anzahl bestimmt werden.

Die vom Computer errechneten Werte derselben Bande unterschieden sich von Auswertung zu Auswertung, z.T. beträchtlich. Selbst den identischen Banden von VATs und Klonen des Stammes SUS/BU 319/7 (Schwein) eines Geles wurden vom Computer leicht abweichende Werte zugeordnet. Ursachen sind z.B., dass aufgrund des elektrischen Feldes identische Proben in zwei verschiedenen PFGE-Geltaschen, vor allem in innen oder außen liegenden, leicht unterschiedliche Bandenmuster ergeben können (VAN DER PLOEG et al., 1984; CHU et al., 1986). Deswegen wurden mehrere Läufe mit unterschiedlicher Positionierung der Proben durchgeführt. Die Wanderung der DNA ist zusätzlich abhängig von der relativen aufgetragenen Menge (MELVILLE et al., 2000). Je mehr DNA-Material also in einer Bande vorhanden war (bedingt durch die absolute Anzahl der Chromosomen dieser Größe), desto

größer und unschärfer wurde sie und damit ungenauer auszumessen. Untersuchungen von identischen, in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragenen Stämmen zeigten außerdem, dass bei hohen DNA-Konzentrationen 2-3 Banden zusammenfallen und eine einzige, große Bande bilden können. Beide Phänomene lassen sich aus Molekülbindungen zwischen den DNA-Molekülen (intermolekular) erklären. Bei einer großen Menge an Molekülen können sich viele solcher Bindungen ausbilden und die exakte Auftrennung verhindern.

Erschwerend kam hinzu, dass die Chromosomen sich umso schlechter auf einen exakten Wert festlegen ließen, je größer bzw. massiger sie waren, da die relative Intensität der PFGE-Banden mit zunehmender Molekülgröße zunimmt (SCHWARTZ and CANTOR, 1984b). Eine Erklärung hierfür wäre die enorme Menge an DNA, welche in diesen Chromosomen vorhanden ist und neben inter- auch intramolekulare Bindungen begünstigt. Letztere ändern die räumliche Struktur des Moleküls und erschweren die Auftrennung dadurch ebenfalls.

Diese Tatsachen machte die Auswertung der Banden durch den Computer unmöglich, sie geschah deshalb in Anlehnung an BIRREN et al. (1989) von Hand, durch den optischen Vergleich der Fotos und Zuhilfenahme eines Lineals. Für diese Art der Auswertung errechneten die Autoren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 1%.

Für die Datenmatrix, bei der jeder vorhandenen Bande eine Zeile zugeordnet wurde, benutzte man die Mittelwerte der vom Computer errechneten Werte für die jeweilige Bande. Die Mittelwerte sollten nur als Schätzwerte betrachtet werden, die lediglich eine adäquate Einordnung der Banden durch Dokumentation ihres Abstandes zueinander erleichterten. Für die Cluster-Analyse wurden diese Werte jedoch wieder unwichtig, da man eine binäre Matrix verwendete mit der Information „1“ für „Bande vorhanden“ und „0“ für „Bande nicht vorhanden“. Die Cluster-Analyse basiert also vollkommen auf der optischen Auswertung der Gele.

E.3.5 Die Cluster-Analyse

E.3.5.1 Der Jaccard-Koeffizient

Zur Bestimmung der Distanzen zwischen den Trypanosomen-Karyotypen wurde der binäre Ähnlichkeits-Koeffizient nach JACCARD (1908) ausgewählt. Dieser Koeffizient vergleicht 2 Objekte auf alle ihre Variablen und bewertet dabei alle Variablen gleich. „0,0“-Variablen, die bei keinem der beiden Objekte vorkommen, werden nicht bewertet, genauso wenig wie die Anzahl der Variablen insgesamt. Dieser Koeffizient hat den Vorteil, dass er nur tatsächlich vorhandene Gemeinsamkeiten bewertet. Sein Nachteil liegt allerdings darin, dass er die insgesamte Anzahl der Banden vernachlässigt. Hat ein Stamm z.B. teilweise identische Banden wie ein anderer, jedoch insgesamt viel weniger als dieser, so wird der JACCARD-Koeffizient die beiden Stämme trotzdem als „sehr ähnlich“ einordnen.

E.3.5.2 Die UPGMA

Für die Berechnung der Verwandtschaftsgrade wurde die UPGMA (unweighted pair-group using arithmetic averages; SNEATH und SOKAL, 1973) ausgewählt. Diese Methode nimmt an, dass genetische Veränderungen in einheitlichen Abständen auftreten, was den natürlichen Bedingungen zwar nicht genau entspricht, ihnen jedoch sehr nahe kommt. Die Schwierigkeit, Evolutionsgeschichte zu reproduzieren, liegt allerdings in der Einzigartigkeit und Unberechenbarkeit von sogenannten evolutionären Sprüngen. Bei einem solchen Sprung bilden wenige Individuen einer Gruppe neue Merkmale aus, welche sie nun von ihrer Gruppe unterscheiden und zu einer neuen, mit der alten jedoch verwandten Gruppe zusammenschließen. Diese Sprünge können in unterschiedlichen Abständen und Ausmaßen passieren. Außerdem können gebildete Charaktere durch erneute Änderung ihrer Merkmale wieder auf die Stufe ihrer Vorfahren zurückkehren, der identische Charakter-Status von Organismen kann auf getrenntem evolutionären Weg erreicht worden sein, oder die ähnlichen Eigenschaften verschiedener Organismen können sich auf unterschiedlichem Wege entwickelt haben (MORRISON, 1996).

Als hierarchische Methode zur Analyse von Ähnlichkeits-Daten und Erstellung eines Baumdiagrammes (Dendrogrammes) wendet man die UPGMA vor allem dann an, wenn die Anzahl der Merkmale der zu untersuchenden Objekte groß ist (SOURDIS und KRIMBAS, 1987). Im Vergleich mit anderen Methoden ermittelt UPGMA die zu erwartenden Astlängen

des Baumdiagrammes am genauesten (NEI et al., 1983). Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass, wenn nur eine einzige Annahme der Verwandtschaft von Objekten falsch ist, die davon abhängigen Annahmen zwangsläufig auch falsch sein werden (MORRISON, 1996).

E.3.5.3 Das Dendrogramm

Als Darstellungsform der UPGMA-Ergebnisse wurde das Baumdiagramm (Dendrogramm) gewählt. Bei dieser übersichtlichen Darstellungsform kann man den Ähnlichkeits-Koeffizienten eines Objekte-Paares direkt an der x-Achse auf Höhe der „Wurzel“ des Clusters, der vertikalen Verbindung beider Objekte, ablesen. Zusätzlich lassen sich die verwandschaftlichen Beziehungen der Objekte und Objektgruppen aus den Verzweigungen des Baumes entnehmen.

Man darf die Ergebnisse einer solchen Analyse von molekularen Daten jedoch auf keinen Fall mit der Aussage eines Spezies-Stammbaumes vergleichen, welcher die tatsächlichen evolutionären Pfade darstellt. Dendrogramme sind reine Hypothesen der Evolutionsgeschichte von Organismen, und jede Berechnungsmethode kann eine andere Hypothese über die phylogenetische Geschichte der zu untersuchenden Organismen entwickeln (MORRISON, 1996).

E.3.5.3.1 Diskussion des Dendrogrammes von Referenz- und Feldstämmen

Die augenscheinliche Verschiedenheit der Referenzen spiegelte sich auch im Dendrogramm wieder, da ihre Ähnlichkeits-Koeffizienten sehr gering ausfielen. Am ähnlichsten wurden die *T. b. gambiense*-Stämme H1 ZR, H2 ZR und H1 CI eingestuft, die zusammen mit G. DOLO in einem Hauptast des Dendrogrammes abgegliedert und als Gruppe IV eingeteilt wurden. Die 3 *T. b. brucei*-Referenzstämme bzw. -klone ILTat 1.4 Cl., CP 547 und CP 2469 wurden, zusammen mit dem resistenten Feldstamm BOT/BU 623/7, in Gruppe V zusammengefasst. Alle übrigen Referenzen (*T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*) wurden der Gruppe I zugeordnet, zusammen mit resistenten und subresistenten Feldstämmen. Dabei wurden sowohl die beiden Rhodesiense-Stämme als auch die Gambiense-Stämme TH 152 und DAL 69 als Cluster zusammengefasst, der Gambiense-Cluster sogar mit einem Ähnlichkeits-Koeffizienten von ca. 0,590.

Die Feldstämmen aus Rindern und Schweinen in Bulutwe wurden als sehr ähnlich, z.T. sogar identisch eingestuft. Die Human-Isolate waren jedoch, nach ihren geringen

Ähnlichkeitskoeffizienten zu urteilen, genau so unterschiedlich untereinander wie die Referenzen und wurden mit einigen von diesen (s.o.) in Gruppe I eingeordnet. Diese Aussage steht im Gegensatz zu der von HIDE et al. (2000), deren Human-Isolat-Karyotypen untereinander viel einheitlicher waren als diejenigen von Tier-Isolaten. Die Gruppen II und III bildeten hauptsächlich resistente und subresistente (Gruppe II) bzw. hauptsächlich sensitive (Gruppe III) Feldstämme aus Schweinen und Rindern in Bulutwe. In beiden Gruppen waren jedoch auch einige Vertreter des jeweils anderen Resistenzgrades vorhanden. Auch aus dieser Gruppeneinteilung konnte also nur bedingt auf die Humanserumresistenz bzw. -sensitivität eines Trypanosomenstammes oder -klones geschlossen werden. Gruppe IV beinhaltet als einzige nur resistente *T. b. gambiense*-Referenzen, während alle anderen Gruppen sowohl resistente bzw. subresistente als auch sensitive Stämme enthalten.

E.4 Beurteilung der PFGE bezüglich ihrer Anwendung zur Identifizierung humaninfektiöser Trypanosomen

Eine Methode zur Überwachung des Schlafkrankheits-Reservoirs muss nach CATTAND et al. (2001) einfach, sensitiv, spezifisch, anpassungsfähig, reaktiv, effizient und kosteneffektiv sein. Diese Attribute besitzt die PFGE, sie müssen jedoch im Zusammenhang mit der Fragestellung der vorliegenden Arbeit betrachtet werden.

Die PFGE ist an sich eine einfache Methode, zu deren Durchführung man nur eine kurze Einarbeitungszeit benötigt. Trypanosomen-Stämme können mit ihr spezifisch charakterisiert werden und liefern höchst unterschiedliche Bandenmuster, an sich ein großer Vorteil bei der Suche nach Unterscheidungskriterien und/oder Gemeinsamkeiten (HIDE und TILLEY, 2001). Vom PFGE-Karyotyp eines Referenz- oder Feldstammes bzw. -klones konnte in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht auf seine Humanserumresistenz geschlossen werden. Auch konnte keine einzelne Bande identifiziert werden, die sich mit Humanserumresistenz oder -sensitivität eines Feldstammes in Verbindung bringen ließ. Eine Möglichkeit wäre höchstens, dass das gesuchte Merkmal außerhalb der untersuchten Chromosomen-Bandbreite liegt, auf Mini-Chromosomen <95kbp oder großen Chromosomen >3Mbp.

Die PFGE ist als anpassungsfähig und reaktiv zu bezeichnen, da man mit ihr selbst geringgradige Änderungen des Genotyps von Trypanosomen und damit evolutionäre Sprünge nachweisen kann. So teilen MAJIWA et al. (1985) z.B. mit Hilfe der PFGE *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* in zwei unterschiedliche Karyotyp-Gruppen ein und WAITUMBI

und YOUNG (1994) identifizieren mit ihrer Hilfe Medikamenten-resistente *Trypanosoma evansi*-Stämme.

Die Sensitivität der PFGE liegt dabei allerdings auf der Ebene der Größenänderungen von Chromosomen, sie ist also relativ gering. Zusätzlich entstehen diese Größenänderungen bei Trypanosomen sehr häufig, und zwar aufgrund von immer wieder auftretenden Gen-Rearrangements, und nicht nur bei evolutionären Sprüngen. Eine Sensitivität auf dieser Ebene ist im Hinblick auf die Fragestellung eher von untergeordneter Bedeutung.

Die Kosteneffektivität der PFGE ist fragwürdig. Zum einen benötigt man relativ hohe Anschaffungskosten, zum anderen werden die für die Untersuchung benötigten Mengen an Trypanosomen über Prozyklische in der logarithmischen Wachstumsphase erreicht, für deren Kultivierung man ein ausgestattetes Labor, Erfahrung in der Kultivierung sowie mindestens 10 Tage Vermehrungszeit benötigt. Als Methode für Felduntersuchungen – und Überwachung des Schlafkrankheitsreservoirs findet in erster Linie dort statt – ist die PFGE aufgrund dieser Vorbereitungszeit in einem qualifizierten Labor also eher ungeeignet. Ihre Stärke liegt vielmehr in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (sofern man gleiche Geräte und Parameterlisten verwendet) und der Möglichkeit, die Genotypen vieler Stämme gleichzeitig untersuchen zu können. Diese Eigenschaften ermöglichen ihre Anwendbarkeit zur Erforschung epidemiologischer Zusammenhänge und eines epidemiologischen Trends, was wiederum Voraussetzung für die Bekämpfung der Schlafkrankheit ist.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die PFGE zur Identifizierung humaninfektöser Trypanosomen aufgrund ihrer geringen Sensitivität eher ungeeignet ist, jedoch einen wichtigen Beitrag zur Erforschung epidemiologischer Zusammenhänge liefern kann.

E.5 Ausblick

Eine sensitivere Form der PFGE ist die Methode, anstatt intakte Chromosomen aufzutrennen, diese zunächst an definierten Schnittstellen durch Restriktionsenzyme in Chromosomen-Bruchstücke zu schneiden. Da die Restriktionsenzyme spezifisch reagieren, arbeitet man nicht auf der Grundlage von immer wieder auftretenden Gen-Rearrangements, sondern auf einem sensitiveren Niveau. Diese Methode wenden z.B. ARBEIT et al. (1990) erfolgreich an, um *Escherichia coli*-Isolate voneinander zu unterscheiden, die zuvor phenotypisch und mit den konventionellen molekularbiologischen Methoden nicht voneinander getrennt werden konnten. Gleiches beschreiben GOERING und DUENSING (1990) für *Staphylococcus-*

Stämme, MURRAY et al. (1990) für *Enterococcus faecalis*-Stämme, LEFEVRE et al. (1993) für *Streptococcus pneumoniae*-Stämme, sowie CAMERON et al. (1994) für *Vibrio cholerae* O1-Stämme.

Am effektivsten wäre jedoch eine Methode, die sehr sensitiv und schnell ist, aber nur wenig Test-Material benötigt. Diese Forderungen erfüllen die PCR-Methoden, bei denen das genetische Material angereichert werden kann. Gleichzeitig besteht bei ihrer Durchführung allerdings eine hohe Kontaminationsgefahr, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Als neueste Methode auf diesem Gebiet präsentieren HIDE und TILLEY (2001) die sogenannte MGE-PCR. MGEs sind Mobile genetische Elemente, die man in großer Anzahl im Trypanosomen-Genom findet und die sich sowohl durch hohe Variabilität als auch durch viele Wiederholungen auszeichnen. Spezielle Primer können an die terminalen Wiederholungssequenzen der MGEs binden. Damit können die Autoren *T. b. rhodesiense*-Isolate von *T. b. brucei* aus dem Busoga-Focus und Sambia unterscheiden. Was diese Methode jedoch für eine groß angelegte Subspezies-Differenzierung bringt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Erfolgsversprechend scheint auch die soeben von RADWANSKA et al. (2001) vorgestellte PCR, deren Primer aus dem SRA-Gen hergestellt wurden. Mit dieser PCR gelingt es ihnen, *T. b. rhodesiense*-Stämme aus verschiedenen Wirten und unterschiedlichen Regionen eindeutig zu identifizieren. Auch hier muss man jedoch weiterführende Untersuchungen abwarten.