

Aus dem Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR IDENTIFIZIERUNG POTENTIELL HUMANINFEKTIÖSER
***TRYPANOSOMA (TRYPANOZOOON) BRUCEI* - ISOLATE AUS SÜD-OST UGANDA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sophie von Dobschütz
Tierärztin aus Düsseldorf

Berlin 2002
Journal-Nr.: 2577

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Mehlitz

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Tag der Promotion: 19.04.2002

Meinen Eltern

A	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
B	LITERATURÜBERSICHT	4
B.1	Die Schlafkrankheit	4
B.1.1	Bedeutung und Verbreitung	4
B.1.1.1	Bedeutung und Verbreitung der Schlafkrankheit gestern und heute	4
B.1.1.2	Die Schlafkrankheit in Uganda	6
B.1.2	Ätiologie	7
B.1.2.1	Ätiologie der Rhodesiense Schlafkrankheit	7
B.1.2.2	Ätiologie der Gambiense Schlafkrankheit	8
B.1.3	Epidemiologie und Tierreservoir	8
B.1.3.1	Epidemiologie der Rhodesiense Schlafkrankheit	8
B.1.3.2	Epidemiologie der Gambiense Schlafkrankheit	10
B.1.4	Kontrolle und Bekämpfung	11
B.1.4.1	Überwachung der Bevölkerung	11
B.1.4.2	Chemotherapie und -prophylaxe	12
B.1.4.3	Vektorenbekämpfung	14
B.2	Der Erreger: <i>Trypanosoma brucei</i>	15
B.2.1	Klassifizierung	15
B.2.2	Entwicklungszyklus	17
B.2.3	Biologische Merkmale	18
B.2.3.1	Genetische Rekombination	18
B.2.3.2	Antigenetische Variation	19
B.2.3.3	Humanserumresistenz	20
B.2.4	Organisation des Genoms	23
B.2.4.1	Der Zellkern	23
B.2.4.1.1	Die großen Chromosomen	25
B.2.4.1.2	Die Intermediär-Chromosomen	26
B.2.4.1.3	Die Mini-Chromosomen	26
B.2.4.2	Der Kinetoplast	27
B.2.4.2.1	Maxizirkel	27
B.2.4.2.2	Minizirkel	27
B.2.5	Charakterisierung von <i>Trypanosoma brucei</i> mittels biologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden	28
B.2.5.1	Biologische Charakterisierungsmethoden	28
B.2.5.1.1	Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT) <i>in vivo</i>	28
B.2.5.1.2	Der Humanserum-Resistenztest (HSRT) <i>in vitro</i>	29
B.2.5.2	Biochemische Charakterisierungsmethoden	30
B.2.5.2.1	Die Isoenzymelektrophorese	30
B.2.5.3	Molekularbiologische Charakterisierungsmethoden	31
B.2.5.3.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
B.2.5.3.2	Die Restriktionsenzym-Analyse (RFLP)	32
B.2.5.3.3	Zufällig amplifizierte polymorphe DNA (RAPD)	33
B.2.5.3.4	Die DNA-Proben-Hybridisierung	33

B.2.5.3.5	Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	34
B.2.6	Analyse der Verwandtschaftsgrade	38
B.2.6.1	Die Cluster-Analyse	38
B.2.6.1.1	Distanzen und Ähnlichkeiten	39
B.2.6.1.2	Die UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)	40
B.2.6.1.3	Das Dendrogramm	41
C	MATERIAL UND METHODEN	42
C.1	Untersuchungsmaterial	42
C.1.1	Untersuchungsgebiet	42
C.1.2	Herkunft der Feldisolate	44
C.1.3	Herkunft der Referenzstämme und -klone	47
C.2	<i>In vivo</i> -Kultivierung von Trypanosomen	51
C.2.1	Versuchstiere	51
C.2.2	Parasitologische Untersuchungsmethoden	52
C.2.2.1	Hämatokrit-Zentrifugations-Technik (HCT)	52
C.2.2.2	Nativpräparat	52
C.2.3	Trypanosomen-Vermehrung, -Anreicherung und –Isolierung	53
C.2.3.1	Tierpassagen	53
C.2.3.1.1	Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)	53
C.2.3.2	Isolierung der Trypanosomen aus Mäuseblut	54
C.2.3.3	Stabilatherstellung	55
C.3	<i>In vitro</i> -Kultivierung von Trypanosomen	55
C.3.1	<i>In vitro</i> -Kultivierung von Blutstromformen	55
C.3.1.1	Auftauen und Anzuchten der MEF-Zellen	55
C.3.1.2	Erhaltung der Zellkultur	56
C.3.1.2.1	Trypsinierung der MEF-Zellen	56
C.3.1.3	Herstellung eines Fibroblastenstabilates	57
C.3.1.4	Einsäen der Trypanosomen auf den Zellrasen	57
C.3.1.5	Erhaltung und Wachstum der Trypanosomenkultur	57
C.3.1.6	Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)	58
C.3.2	<i>In vitro</i> -Kultivierung von prozyklischen Formen	59
C.3.2.1	Umwandlung von Blutstromformen in Prozyklische	60
C.3.2.2	Erhaltung und Wachstum der prozyklischen Trypanosomenkultur	61
C.4	Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	62
C.4.1	Vorbereitung und Durchführung der PFGE	62
C.4.1.1	Herstellung der Agarose-Blöcke	62
C.4.1.1.1	Vorbereitung der Blutstromformen	62
C.4.1.1.2	Vorbereitung der prozyklischen Trypanosomen	63
C.4.1.1.3	Gießen der Agarose-Blöcke	64
C.4.1.1.4	Freilegen der Trypanosomen-DNA durch Lysieren der Zellmembranen und -proteine	65

C.4.1.2	Vorbereitung des Gels	66
C.4.1.2.1	Gießen des Gels	66
C.4.1.2.2	Beladen des Gels	67
C.4.1.3	Vorbereiten der Elektrophoresekammer	67
C.4.1.3.1	Füllen der Kammer mit Laufpuffer	67
C.4.1.3.2	Beladen der Kammer mit dem Gel	68
C.4.1.4	Anfang und Ende der Elektrophorese	68
C.4.1.4.1	Parameterlisten zum Auftrennen der verschiedenen Chromosomengrößen	68
C.4.1.4.2	Verwendete Marker zum Größenvergleich der Banden	71
C.4.2	Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse	73
C.4.2.1	Darstellung des Gels	73
C.4.2.1.1	Färben des Gels	73
C.4.2.1.2	Fotografieren des Gels	73
C.4.2.2	Auswertung der Banden	74
C.4.2.2.1	Importieren des Bildes und Optimierung seines Kontrastes	74
C.4.2.2.2	Definition der Spuren und Erstellen der Densitogramme	74
C.4.2.2.3	Definition der Marker, Gelentzerrung und Berechnung der Banden	74
C.4.2.2.4	Berechnung der Banden-Mittelwerte	75
C.4.2.2.5	Vergleich der verschiedenen Bandenmuster	75
C.4.2.3	Die Cluster-Analyse	76
C.4.2.3.1	Der binäre Ähnlichkeitskoeffizient nach JACCARD (1908)	76
C.4.2.3.2	Die UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)	77
C.4.2.3.3	Das Dendrogramm	78
C.5	Lösungen, Puffer, Medien, Seren, Chemikalien, DNA-Marker und Verbrauchsmaterialien	79
C.5.1	Lösungen und Puffer	79
C.5.2	Medien und Seren	82
C.5.3	Chemikalien	85
C.5.4	DNA-Marker	86
C.5.5	Verbrauchsmaterialien	87
C.6	Geräte	87
C.7	Software	88
C.8	Verzeichnis der Abkürzungen	89

D	ERGEBNISSE	93
D.1	Die Humanserumresistenz	93
D.1.1	Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)	93
D.1.1.1	Verhalten der Referenzstämme und -klone im HSRT	93
D.1.1.2	Verhalten der Feldisolate im HSRT	95
D.1.2	Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)	96
D.1.2.1	Verhalten ausgesuchter Feldisolate im BIIT	96
D.2	Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	99
D.2.1	Untersuchungen zur Methoden-Optimierung und zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	99
D.2.1.1	Untersuchungen zur Optimierung der Herstellung von PFGE-Blöcken und Laufgel	99
D.2.1.1.1	Untersuchung verschiedener Puffer zum Einbetten der Trypanosomen in die low melting point (LMP)-Agarose	99
D.2.1.1.2	Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration pro PFGE-Block	100
D.2.1.1.3	Auswirkung der Proteinase K-Menge und der Länge des Verdau auf die Qualität der PFGE-Blöcke	100
D.2.1.1.4	PFGE-Testläufe mit unterschiedlichen Laufgel-Höhen	101
D.2.1.2	Ermittlung von Parameterlisten zur optimalen Darstellung von Mini-intermediären und großen Chromosomen	101
D.2.1.2.1	Auftrennung der Chromosomen von 95 bis 450kbp (Mini- und Intermediär-Chromosomen)	103
D.2.1.2.2	Auftrennung der Chromosomen von 300 bis 840kbp (Intermediäre Chromosomen)	103
D.2.1.2.3	Auftrennung der Chromosomen von 450kbp bis 1,6Mbp (Intermediäre und große Chromosomen)	103
D.2.1.2.4	Auftrennung der Chromosomen von 1 bis 3Mbp (große Chromosomen)	104
D.2.1.3	Untersuchungen zur Stabilität des Karyotypes	109
D.2.1.3.1	Vergleich des Karyotypes von Blutstrom- und prozyklischen Formen	109
D.2.1.3.2	Stabilität des Karyotypes eines Klones im Verlaufe einer chronischen Infektion in Mäusen (frühe und späte Antigenvarianten)	109
D.2.1.3.3	Vergleich des Karyotypes zweier Feldisolate und aus diesen gewonnener Klone	111
D.2.2	Untersuchung der Referenzstämme und -klone mit der PFGE	114
D.2.2.1	Darstellung von <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	117
D.2.2.2	Darstellung von <i>T. b. rhodesiense</i>	118
D.2.2.3	Darstellung von <i>T. b. gambiense</i>	119
D.2.2.4	Vergleich von humanserumresistenten und -sensiblen Referenzen	120
D.2.3	Untersuchung der Feldisolate mit der PFGE	122
D.2.3.1	Aus Tieren isolierte Stämme	127
D.2.3.2	Aus Menschen isolierte Stämme	131
D.2.3.3	Vergleich von humanserumresistenten und -sensiblen Feldisolaten	132
D.2.4	Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse	134
D.2.4.1	Berechnung und Vergleich der Banden nach ihrer Auswertung mit dem	

	<i>ScanPack 3.0</i> [®] -Programm	134
D.2.4.2	Cluster-Analyse und Berechnung der Verwandtschaftsgrade	135
D.2.4.2.1	Dendrogramm der Referenzstämme	136
D.2.4.2.2	Dendrogramm der Feldstämme bzw. -klone	138
D.2.4.2.3	Dendrogramm von Referenz- und Feldstämmen	141
E	DISKUSSION	144
E.1	Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)	145
E.1.1	Diskussion der HSRT-Ergebnisse	146
E.1.1.1	Referenzstämme und -klone	146
E.1.1.2	Aus Tieren isolierte Feldstämme	147
E.1.1.3	Aus Menschen isolierte Feldstämme	149
E.2	Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)	149
E.2.1	Diskussion der BIIT-Ergebnisse	149
E.2.1.1	Aus Tieren isolierte Feldstämme	149
E.2.1.2	Aus Menschen isolierte Feldstämme	150
E.3	Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	150
E.3.1	Durchführung der PFGE	151
E.3.1.1	Test verschiedener Puffer zur Herstellung der PFGE-Blöcke	151
E.3.1.2	Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration pro PFGE-Block	151
E.3.1.3	Test unterschiedlicher Proteinase K-Mengen bzw. Längen des Verdau	152
E.3.1.4	Einfluss der Laufgel-Höhe auf das PFGE-Ergebnis	152
E.3.1.5	Ermittlung der Parameterlisten	153
E.3.2	Stabilität des Karyotypes von Trypanosomen	155
E.3.2.1	Karyotyp von Blutstrom- und prozyklischen Formen	155
E.3.2.2	Karyotyp von frühen und späten Antigen-Varianten	155
E.3.2.3	Karyotyp zweier Feldisolate und aus diesen gewonnener Klone	155
E.3.3	Diskussion der PFGE-Ergebnisse	156
E.3.3.1	Referenzstämme und -klone	157
E.3.3.2	Feldisolate	159
E.3.4	Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse	160
E.3.5	Die Cluster-Analyse	162
E.3.5.1	Der Jaccard-Koeffizient	162
E.3.5.2	Die UPGMA	162
E.3.5.3	Das Dendrogramm	163
E.3.5.3.1	Diskussion des Dendrogrammes von Referenz- und Feldstämmen	163
E.4	Beurteilung der PFGE bezüglich ihrer Anwendung zur Identifizierung humaninfektiöser Trypanosomen	164
E.5	Ausblick	165

F	ZUSAMMENFASSUNG	167
G	SUMMARY	170
H	LITERATURVERZEICHNIS	173
I	ANHANG	197

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und nur die erwähnten Hilfsmittel benutzt wurden.

Sophie von Dobschütz

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Mehlitz für die Überlassung des interessanten Themas und die kritische Durchsicht der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P.-H. Clausen für seine prompte und intensive Unterstützung bei der Ausführung des praktischen Teils sowie bei der Abfassung der Arbeit.

Bei Herrn U. Tietjen möchte ich mich sehr für die Einarbeitung in die Trypanosomen-Diagnostik und *in vitro*-Kultivierung bedanken. Mit seinen innovativen Ideen hat er mir durch einige Schwierigkeiten geholfen. Unsere Diskussionen haben zudem einen wertvollen Beitrag bei der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit geleistet.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Greiner, der mir einen Einblick in die wundersame Welt der Statistik gewährte und mir bei der Auswertung und Darstellung der PFGE-Ergebnisse zur Seite stand.

Ich danke Frau A. Wiemann für die Einarbeitung in einige Labortätigkeiten und ganz besonders für ihren unermüdlichen Zuspruch sowie ihre guten Ideen in allen schwierigen Situationen.

Herrn Dr. E. Schwartz danke ich für seine Hilfestellung bei den Problemen, die anfänglich bei der Durchführung der PFGE auftraten.

Frau E. Hellemann und Frau B. Kortenkamp möchte ich für die Blutabnahmen zur Herstellung des Humanserums danken.

Außerdem danke ich den Kollegen/Innen, MTA's und TierpflegerInnen des Institutes für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, Georg, Felicitas und allen Freunden für ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Aufmunterungsarbeit bedanken.

LEBENS LAUF

Name: Sophie von Dobschütz

Geburtsdatum: 23.02.1973

Geburtsort: Düsseldorf

Eltern: Renate von Dobschütz M.A., geb. von Moltke
Prof. Dr. Leonhard von Dobschütz

Grundschulen: 1979-1981, Grundschule Essen-Kettwig
1981-1983, Grundschule Metzkausen

weiterführende Schulen: 1983-1990, Friedrich-List-Gymnasium (Reutlingen)
1990-1992, Isolde-Kurz-Gymnasium (Reutlingen)

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife (19.05.1992)

Studium: Veterinärmedizin, 01.10.1992-24.03.1998,
Freie Universität Berlin

Studienabschluss: Staatsexamen (24.03.1998)

Erteilung der Approbation
als Tierärztin: 10.06.1998, Berlin

Arbeit an der Dissertation: seit August 1998 (Institut für Parasitologie und internationale
Tiergesundheit, Freie Universität Berlin;
Doktorvater: Prof. Dr. D. Mehlitz)

Tätigkeiten als
tierärztliche Vertretung: November 1998 bis Mai 2001: Kleintierpraxis D. Lehmann, Berlin;
21.10. – 27.10.2001: Kleintierpraxis Dr. U.-J. Pospieszny, Wildau;
26.11. – 30.11.2001: Sanders Veterinary Surgery, Gwent, UK

Tätigkeiten als Wissen-
schaftliche Mitarbeiterin: 01.11 1999 - 14.02.2000, 01.04.2000 – 14.05.2000 und 03.07.2000
– 02.01.2001: Institut für Parasitologie und internationale
Tiergesundheit, Freie Universität Berlin

Tätigkeit als
Tierärztin: 05.02. - 07.03.2001: Kleintierpraxis Dres. W. vom Hove &
S. Heinemann, Berlin;
Ab 04.02.2002: Petcare Animal Clinic, London, UK