

B LITERATURÜBERSICHT

B.1 Die Schlafkrankheit

B.1.1 Bedeutung und Verbreitung

B.1.1.1 Bedeutung und Verbreitung der Schlafkrankheit gestern und heute

Vom Auftreten der Afrikanischen Schlafkrankheit, bzw. deren klinischer Symptome, wurde bereits 1803 berichtet, wobei die Krankheit wahrscheinlich schon länger existiert. Ihre Erreger jedoch, die in Blut und Gewebe parasitierenden, einzelligen Trypanosomen, konnten erst Anfang des letzten Jahrhunderts von Dutton und Castellani identifiziert werden. Kurz darauf zeigte Bruce, dass sie durch den Stich der Tsetse-Fliege (Diptera, Genus Glossina) übertragen werden (KUZOE, 1991).

Tsetse-Fliegen bewohnen in Afrika ein ca. 10 Mio. km² großes Gebiet, den sogenannten "Tsetse-Gürtel". Dieser erstreckt sich zwischen 14° nördlicher und 29° südlicher Breite, er beginnt also unmittelbar unterhalb des Sahel im Norden Afrikas und reicht bis über den Sambesi im Süden (KUZOE, 1993). Über 60 Mio. Menschen in 36 afrikanischen Ländern sind so ständig dem Risiko einer Erkrankung durch Trypanosomen ausgesetzt, jedoch stehen derzeit nur 3 bis 4 Millionen unter ärztlicher Überwachung (WHO, 2000; CATTAND et al., 2001).

Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts war die Schlafkrankheit auf bestimmte Regionen begrenzt. Als dann jedoch im Zuge der Kolonialisierung Schifffahrt, Eisenbahn und schließlich Fahrzeuge in Afrika Einzug fanden, entstanden reger Handel und Bevölkerungsbewegungen über weite Gebiete. So wurde der Erreger an Orte verschleppt, an denen die Bewohner bis zu diesem Zeitpunkt keinen Kontakt mit der Krankheit hatten. Die Schlafkrankheit breitete sich epidemisch aus und forderte Anfang des letzten Jahrhunderts hohe Verluste (KUZOE, 1991 und 1993).

In den folgenden Jahrzehnten setzte eine intensive Bekämpfung der Krankheit ein und ihre Inzidenz ging stark zurück. In den 50er Jahren hatte man die Situation durch systematische Überwachung der Bevölkerung in Risikogebieten und Vektorenbekämpfung zumindest teilweise unter Kontrolle gebracht (KUZOE, 1993). Einige endemische Schlafkrankheitsherde

blieben jedoch bestehen. Sie bergen weiterhin die Gefahr epidemischer Ausbrüche, welche als Begleiterscheinung von politischen Unruhen, Kriegen und Völkerwanderungen immer wieder auftreten, da diese Zustände das Gesundheitssystem des Landes und damit die medizinische Überwachung der Krankheit zusammenbrechen lassen (PAQUET et al., 1995).

Epidemien sind mit hohen Verlusten verbunden. Die Zahl der Infizierten steigt sprunghaft an, und die Krankheit endet ohne rechtzeitige Behandlung nach quälenden zentralnervösen Symptomen mit dem Tod. Die Bevölkerung leidet noch lange an den sozialen und ökonomischen Folgen, die hauptsächlich auf eine Dezimierung der Arbeitskräfte und eine damit einhergehende Unterbrechung der landwirtschaftlichen Aktivitäten zurückzuführen sind (CATTAND et al., 2001). Bis zur vollständigen Kontrolle einer Epidemie ist außerdem mit enormen Kosten zu rechnen. Betroffen sind jedoch Länder, die aufgrund ihres niedrigen Etats ohne finanzielle Hilfe von außen kaum Reaktionsspielraum haben. Diese Tatsachen machen die Schlafkrankheit zu einem auch heute noch schwerwiegenden Gesundheitsproblem in Afrika. Sie gilt als eine der Hauptursachen für die Entvölkerung großer Gebiete, und die Angst der Einwohner vor einer Infektion führt zusätzlich dazu, dass potentiell fruchtbares Land gemieden wird. Die Folge ist eine Hemmung der landwirtschaftlichen Entwicklung und Produktion in diesen Gebieten (KUZOE, 1991 und 1993).

Nach WHO-Schätzungen sind in den humiden und subhumiden Regionen Afrikas südlich der Sahara heute 300.000 bis 500.000 Menschen mit dem Erreger der Schlafkrankheit infiziert. Pro Jahr werden über 40.000 Neuerkrankungen gemeldet (CATTAND und JANNIN, 1998; CATTAND et al., 2001). Die Vereinten Nationen (2000) schätzen jedoch sogar 300.000 jährliche Neuerkrankungen, aber nur 10 bis 15% davon werden überhaupt diagnostiziert und behandelt. Der Schlafkrankheit werden pro Jahr 100.000 Todesfälle zugeschrieben (CATTAND et al., 2001). Trotzdem wird dieser Krankheit in der letzten Zeit international nur wenig Beachtung geschenkt, und die ländlichen und dadurch armen Gegenden, in denen endemische Foci auftreten, sind oft sogar lokal-politisch von geringem Interesse (SMITH et al., 1998). In den letzten Jahren mit wenig bzw. gar keiner Überwachung ist die Schlafkrankheit deswegen zu alarmierenden Zahlen zurückgekehrt (CATTAND et al., 2001).

B.1.1.2 Die Schlafkrankheit in Uganda

Das erste epidemische Auftreten der Schlafkrankheit in Uganda wurde von 1900 bis 1910 am Viktoriasee berichtet (ORMEROD, 1961). Man glaubte zunächst, es handle sich um die chronische Schlafkrankheitsform, da diese bis 1968 endemisch an den Uferregionen nachgewiesen werden konnte (WATSON, 1972). Aufgrund neuerer, sehr detaillierter Untersuchungen zur Geschichte und Epidemiologie der Schlafkrankheit in Uganda wurde jedoch die Theorie entwickelt, dass auch diese Epidemie auf *T. b. rhodesiense* zurückzuführen ist (KOERNER et al., 1995).

Zusätzlich litt Uganda seit Beginn des letzten Jahrhunderts unter drei weiteren großen *T. b. rhodesiense*-Epidemien (1939-1945, 1960-1971 und 1976-1989; MBULAMBERI, 1990), immer zurückzuführen auf einen durch Kriege und Völkerwanderungen verursachten Zusammenbruch des Gesundheitssystems. Die letzte Epidemie begann 1976 und gipfelte 1980 in 8.465 Fällen (MBULAMBERI, 1989). Ursachen waren der Zusammenbruch der Tsetse-Fliegen-Kontrollmaßnahmen um 1972 und die Ausdehnung des Habitats der Fliege durch zunehmendes Busch-Wachstum, zurückzuführen auf Veränderungen der landwirtschaftlichen Praktiken als Folge der herrschenden politischen Unruhen (ENYARU et al., 1993b). Dann übernahm das Deutsche Rote Kreuz die medizinische Überwachung, 1985 abgelöst vom Department for International Development of the U.K.. Auf dem Land wurden Gesundheitszentren erbaut, sowie Überwachungssysteme zur Vektorkontrolle und Training für Angestellte des Gesundheitsdienstes in Diagnose und Management eingeführt. Man bekam die Krankheit langsam unter Kontrolle. Dennoch wurde 1987 von allein 1.000 Neuerkrankungen berichtet (SMITH et al., 1998). Erst die Verknüpfung von Schlafkrankheits-Überwachung mit Behandlung des Tierreservoirs und Bekämpfung der Tsetse-Fliegen-Population brachte einen durchschlagenden Erfolg (MBULAMBERI, 1998). Nach einer vermehrten Einwanderung von Menschen aus dem politisch instabilen Sudan wurde 1983-1990 jedoch von einem erneuten Ausbruch der Schlafkrankheit im Nord-Westen Ugandas berichtet, diesmal handelte es sich um eine *T. b. gambiense*-Epidemie als Folge der Rückkehr von Flüchtlingen, die sich im Süd-Sudan während eines Ausbruchs dieser Schlafkrankheitsform aufgehalten hatten (MBULAMBERI, 1989 und 1990; KUZOE, 1991 und 1993).

Heute kommt die Schlafkrankheit endemisch in zwei Gebieten Ugandas vor: im Südosten des Landes als akute, durch *T. b. rhodesiense* hervorgerufene Form, im Norden und Nord-Westen

als chronische, durch *T. b. gambiense* hervorgerufene Form (ENYARU et al., 1993a). Von den 19 Mio. Einwohnern Ugandas sind 3,6 Mio. dem Risiko einer Trypanosomeninfektion ausgesetzt.

Im Rahmen des staatlich unterstützten „National Sleeping Sickness Control Programme“ wurden zwischen 1995 und 1997 im Südosten 535 und im Norden und Nordwesten 1948 Schlafkrankheitsfälle diagnostiziert und behandelt. Das bedeutete einen Rückgang der Erkrankungen um 27,8% seit 1993 (Uganda Country Report, 1997).

B.1.2 Ätiologie

Man unterscheidet je nach Erreger-Unterart (Subspezies) verschiedene Formen von Trypanosomen beim Menschen: die durch *T. b. rhodesiense* hervorgerufene akute Schlafkrankheit und die durch *T. b. gambiense* hervorgerufene chronische Schlafkrankheit.

B.1.2.1 Ätiologie der Rhodesiense Schlafkrankheit

Die Rhodesiense Schlafkrankheit tritt vornehmlich im savannenreichen östlichen und südlichen Afrika auf und wird hervorgerufen durch die Unterart *Trypanosoma brucei rhodesiense*, welche hauptsächlich durch Glossinen der *Morsitans*-Gruppe übertragen wird (WILLET, 1965; HONORE und PEPIN, 2001). In Ostafrika fungiert allerdings auch die an Flussläufen beheimatete Glossinen-Spezies *G. fuscipes* als Überträger (SMITH et al., 1998).

Nach kurzer Inkubationszeit (2-3 Tage) entwickelt sich ein stark ausgebildeter Schanker an der Einstichstelle in der Haut, eine schmerzhaft entzündete Hautentzündung mit Rötung und Schwellung (siehe B.2.2). Hohe Parasitämien entstehen, die hohes Fieber und bisweilen sogar Schüttelfrost zur Folge haben (haematolymphatisches Stadium = Frühstadium) (WHO, 1998).

Die Parasiten wandern in die Gewebe ein und verursachen starke Kopf-, Gelenk- und Muskelschmerzen. Außerdem bilden sich Ödeme im Gesicht (v.a. Lider) und Ergüsse in den Herzbeutel und in die Leibeshöhlen. Bereits nach weniger als 4 Monaten dringt der Erreger in das Rückenmark ein und bahnt sich seinen Weg zum Gehirn (meningoenzephalitisches Stadium = Spätstadium). Bevor sich jedoch zentralnervöse Störungen entwickeln, stirbt der Patient meistens schon an der Organbesiedelung durch die Trypanosomen, (ANDERSON, 1987; SMITH et al., 1998; WHO 1998).

B.1.2.2 Ätiologie der Gambiense Schlafkrankheit

Sie wird hervorgerufen durch die Unterart *Trypanosoma brucei gambiense*, welche hauptsächlich durch Glossinen der *Palpalis*-Gruppe übertragen wird, die ihr Biotop an bewaldeten Flußläufen der nördlichen Guinea-Savanne und in den Regenwald-Gebieten West- und Zentralafrikas haben (WILLET, 1965; HONORE und PEPIN, 2001).

Die Inkubationszeit ist unterschiedlich lang, meist ohne die Ausbildung eines Schankers, und im Anschluss kommt es zu schwachen, intermittierend verlaufenden Fieberschüben.

Die Parasiten wandern in die Lymphknoten des Körpers ein, welche als Reaktion darauf anschwellen. Dies ist vor allem am Hals des Patienten sichtbar, wo sich seitlich die Halslymphknoten als sogenannte "Winterbottom'sche Zeichen" hervorheben (WHO, 1998). Während dieses Stadiums der Krankheit, das mehrere Jahre andauern kann, zeigen sich Ödeme im Gesicht, Entzündungen der peripheren Nerven mit Ausfallerscheinungen, Herzmuskel- und Hautentzündungen, Schwäche, sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Diese Symptome können gänzlich, teilweise oder überhaupt nicht auftreten.

Das Endstadium der Krankheit beginnt mit dem Einwandern der Parasiten in das Zentralnervensystem (meningoenzephalitisches Stadium), was eine fortschreitende Gehirnhautentzündung zur Folge hat, die ohne Behandlung tödlich endet. Es zeigen sich Persönlichkeitsveränderungen, psychische Störungen, Reizbarkeit, Schlafstörungen oder Umkehrung des Schlafrhythmus, Zittern, Krämpfe, Gleichgewichtsstörungen, Lähmungen, Anaemie, Abmagerung und kardiovaskuläre Störungen. Eine fortschreitende Pericarditis kann zum Tod durch Herzversagen führen. Das Schlafbedürfnis nimmt zu und führt zum Koma, welches dann mit dem Tode endet (ANDERSON, 1987; SMITH et al., 1998; WHO, 1998).

B.1.3 Epidemiologie und Tierreservoir

B.1.3.1 Epidemiologie der Rhodesiense Schlafkrankheit

Die Rhodesiense Schlafkrankheit ist beschränkt auf sog. Foci, wobei unklar ist, warum diese an bestimmten Stellen lokalisiert und stabil sind, während sich die Tier-Trypanosomen über den gesamten afrikanischen Tsetse-Fliegen-Gürtel verteilen (HIDE et al., 1998; WHO, 1998). Sie ist charakterisiert durch kurze Epidemien, zwischen denen lange Perioden niedriger, oft nicht erkennbarer Endemien liegen. Über die Ursachen für das Aufflammen einer Epidemie

gibt es verschiedene Theorien. Eine Hypothese ist das plötzliche Auftreten neuer Stämme (GIBSON und GASHUMBA, 1983) bzw. größere Änderungen in der genetischen Komposition der *T. brucei*-Populationen (CIBULSKIS, 1992). Eine andere Hypothese ist, dass jeder Schlafkrankheits-Focus sozusagen seinen eigenen humaninfektiösen Stamm hat, der in Tier-Fliegen-Zyklen erhalten wird und erst dann eine Epidemie verursacht, wenn der Mensch in diesen Zyklus eindringt (HIDE et al., 1994, 1998 und 2000).

Die akute Schlafkrankheitsform wurde schon 1955 von JACKSON als Zoonose erkannt, konnte jedoch erst 1958 eindeutig von HEISCH et al. als solche identifiziert werden. Sie führten Selbstversuche mit aus Buschböcken (*Tragephalus scriptus*) isolierten Trypanosomen durch, welche sich als humaninfektiös herausstellten. *T. b. rhodesiense* besitzt die Fähigkeit, sich im peripheren Blut von Säugetieren stark zu vermehren und wird deshalb von der Tsetse-Fliege häufig aufgenommen. Unterstützend kommt hinzu, dass sich die hauptsächlich als Überträger fungierende *Morsitans*-Gruppe (siehe B.1.2.1) vorzugsweise von Tierblut ernährt (MEHLITZ, 1985; HIDE et al., 1996; WHO, 1998; HONORE und PEPIN, 2001). Als Reservoirtiere konnten nicht nur zahlreiche Wiederkäuer und Schweinearten, sondern auch Fleischfresser identifiziert werden, wobei der Parasit bei letzteren wahrscheinlich eher beim Verzehr infizierter Tiere durch kleine Verletzungen der Maulschleimhaut aufgenommen wird (ONYANGO et al., 1966; GEIGY et al., 1971; ROBSON et al., 1972; GEIGY et al., 1973; HIDE et al., 1994 und 1998). Die Haustiere nehmen durch ihre Nähe zum Menschen eine besonders wichtige Rolle ein.

Der Wildtier-Fliege-Mensch-Zyklus (v.a. betroffen sind Jäger, Wildhüter, Fischer, Holzsammler, Honigsucher und Touristen, die in das Habitat der Fliege eindringen) ist charakteristisch für das endemische Auftreten der Rhodesiense-Schlafkrankheit (WHO, 1998; HONORE und PEPIN, 2001). Durch Behandlung oder Tod des Erkrankten, der sich dann sowieso - für die Fliege unerreichbar - in seiner Hütte aufhält, steht der Parasit innerhalb des Dorfes nur begrenzt zur Aufnahme und Verbreitung zur Verfügung. So fällt dem Menschen als Erregerreservoir relativ wenig Bedeutung zu (WILLET, 1965). Zum epidemischen Auftreten der Krankheit kommt es deswegen erst, wenn sich ein sog. peridomestischer Zyklus ausbildet (Mensch-Fliege-Mensch oder Haustier-Fliege-Mensch), an dem auch die normalerweise wenig exponierten Frauen und Kinder beteiligt sind (WHO, 1998). Als Überträger fungieren dann hauptsächlich peridomestisch auftretende *Glossina fuscipes*-Populationen (HONORE und PEPIN, 2001).

B.1.3.2 Epidemiologie der Gambiense Schlafkrankheit

Bei der Gambiense Schlafkrankheit wurde die Beteiligung von Tieren am epidemiologischen Geschehen noch lange Zeit bezweifelt, da *T. b. gambiense*-Stämme sehr viel weniger infektiös für Tiere sind (WILLET, 1965; BRUN und JENNI, 1983; GODFREY et al., 1987). Des weiteren saugen die Haupt-Überträger, Glossinen der Palpalis-Gruppe, vorwiegend auf in ihr Biotop eindringenden Menschen, die zum Baden oder Wasserholen kommen (SMITH et al., 1998; HONORE und PEPIN, 2001). Als weitere Überträger fungieren *Glossina fuscipes fuscipes* und *Glossina tachnoides* (WHO, 1998). Man ging zunächst davon aus, dass durch den chronischen Verlauf der Krankheit der Mensch selbst das Erregerreservoir bildet. Der Erreger befindet sich über solch einen langen Zeitraum in seinem Wirt, bevor überhaupt Krankheitssymptome auftreten, dass Infizierte ihren normalen Aktivitäten nachgehen können und die Tsetse-Fliege oft genug Gelegenheit hat, Trypanosomen aufzunehmen und zu übertragen (WILLET, 1965; WHO, 1998). Männer, Frauen und Kinder sind bei dieser Form der Schlafkrankheit gleichermaßen betroffen, so dass generell ein peridomestischer Mensch-Fliege-Mensch-Zyklus vorliegt. In Frage gestellt wurde diese Auffassung jedoch, als man trotz intensiver Massenbehandlung der Bevölkerung die Krankheit nie vollständig ausrotten konnte (MOLYNEUX, 1980). MEHLITZ isolierte den Erreger dann 1982 erfolgreich aus Tieren, schloss 1985 weitere Untersuchungen an und zeigte so, dass ein potentielles Tierreservoir für *T. b. gambiense* existiert. Untersuchungen von GIBSON et al. (1978), SCOTT et al. (1983), TAIT et al. (1984) und PAINDAVOINE et al. (1986) konnten diese Tatsache bestätigen. Die Bedeutung des Tierreservoirs bei der Epidemiologie der Gambiense Schlafkrankheit ist jedoch immer noch ungeklärt und bedarf weiterer Forschung (WHO, 1998).

B.1.4 Kontrolle und Bekämpfung

Durch die Fähigkeit der Trypanosomen, ihre Oberflächenantigene zu verändern, konnte bisher kein wirksamer Impfstoff entwickelt werden (CROSS, 1975). Deswegen muss man sich bei der Kontrolle und Bekämpfung der Schlafkrankheit auf drei grundsätzliche Methoden beschränken:

- Überwachung der Bevölkerung
- Chemotherapie und –prophylaxe der Bevölkerung und des Tierreservoirs mit Trypanoziden
- Tsetse-Fliegen-Kontrolle bzw. –Ausrottung (Vektorenbekämpfung)

Diese Kontrollmechanismen können einzeln oder in Kombination angewandt werden.

B.1.4.1 Überwachung der Bevölkerung

Es gibt vier Modelle einer epidemiologischen Überwachung der Schlafkrankheit, welche in Kombination am wirksamsten sind (CATTAND et al, 2001):

Bei der sogenannten „passiven Überwachung“ werden Patienten, die von sich aus medizinische Hilfe bei Gesundheits-Zentren suchen, auf bestimmte Symptome und Zeichen der Schlafkrankheit hin untersucht. Bei einem Schlafkrankheits-Verdacht wird der Patient in ein auf Diagnose und Behandlung spezialisiertes Zentrum überwiesen. Diese Art der Überwachung allein ist nicht ausreichend, da man die Gambiense Schlafkrankheit im frühen, symptomlosen Stadium nur sehr schwer diagnostizieren kann.

Die „halb-aktive Überwachung“ folgt dem gleichen Muster wie die passive, jedoch werden sensitivere Labortests zum Nachweis des Erregers angewendet. Positive Fälle werden sofort in ein auf Schlafkrankheits-Behandlung spezialisiertes Zentrum überwiesen. Auch diese Art der Überwachung allein ist unzureichend.

Die „wachsamer Überwachung“ ist ausgesuchten Gesundheitszentren oder Krankenhäusern vorbehalten, was sie in der geographischen Abdeckung von Gebieten einschränkt und Wissenslücken über die Verbreitung der Krankheit zur Folge hat. Die technischen Methoden können jedoch sehr modern sein, da Fachkräfte und Geldmittel an einem Ort konzentriert sind. Diese Art der Überwachung eignet sich besonders gut bei bestimmten Anlässen, wie zum Beispiel dem plötzlichen Auftreten einer Medikamentenresistenz.

Die „aktive Überwachung“ besteht aus mobilen Teams, welche in der Bevölkerung aktiv nach der Krankheit suchen. Dies ist die einzig in Frage kommende Art der Überwachung bei einer Krankheit mit zunächst symptomlosem Verlauf, wie zum Beispiel der Gambiense Schlafkrankheit.

B.1.4.2 Chemotherapie und –prophylaxe

Die Chemotherapie und –prophylaxe ist die älteste und am häufigsten angewandte Methode zur Bekämpfung der afrikanischen Trypanosomen. Für die Chemotherapie der Schlafkrankheit beim Menschen werden möglichst andere Präparate eingesetzt als für die Chemotherapie und –prophylaxe der Nagana beim Tier, da Trypanosomen immer häufiger Resistenzen und Kreuzresistenzen ausbilden. Ein Grund für diese Tatsache ist die unsachgemäße Handhabung der Medikamente von Farmern in Gebieten mit hohem Infektionsdruck und dementsprechend hohem Medikamentenverbrauch. Da die Medikamente nicht nur durch Tierärzte abgegeben werden, sondern auch frei auf dem Markt erhältlich sind, mangelt es an Strategie und Kontrolle ihres Einsatzes (MCDERMOTT und COLEMAN, 2001).

Diejenigen Präparate, welche zur Behandlung des Frühstadiums der Schlafkrankheit eingesetzt werden, sind im Spätstadium wirkungslos, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Die Medikamente zur Behandlung des Spätstadiums haben dagegen starke Nebenwirkungen. Deswegen hängt die Behandlungsstrategie in erster Linie vom Krankheitsstadium ab. Heute sind fünf verschiedene Trypanozide auf dem Markt, die zur Chemotherapie der Schlafkrankheit eingesetzt werden (PEPIN und MILORD, 1994; WHO, 1998; SCHOFIELD und MAUDLIN, 2001):

Pentamidin (Pentamidine[®], Lomidine[®]), ein wasserlösliches aromatisches Diamidin, wird seit nunmehr 60 Jahren zur Behandlung des Frühstadiums der *T. b. gambiense*-Schlafkrankheit eingesetzt. Es hat auch prophylaktische Eigenschaften.

Suramin (Germanin[®]), ein wasserlösliches sulfoniertes Naphtylamin, verwendet man seit nahezu 80 Jahren zur Behandlung des Frühstadiums von *T. b. rhodesiense*-Schlafkrankheit. Es hat ebenfalls prophylaktische Eigenschaften.

Bei der Behandlung des Spätstadiums von *T. b. rhodesiense*- und *T. b. gambiense*-Infektionen hat man zur Zeit drei Mittel zur Auswahl: **Eflornithin** (Ornidyl[®]), ein Difluoromethylornithin (DFMO), **Nifurtimox** (Lampit[®]), ein 5-Nitrofurantoin, und **Melarsoprol** (Arsobal[®], Mel B[®]), ein

trivalentes Arsenpräparat aus der Gruppe der Melaminophenylarsen-Verbindungen, welches aufgrund seiner Lipidlöslichkeit ZNS-gängig ist (ZWEYGARTH und RÖTTCHER, 1987).

Die Haus- und Nutztiere, als Erreger-Reservoir für *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*, werden mit den Salzen folgender Verbindungen behandelt (PEREGRINE, 1994):

Diminazenazeturat (Berenil[®], Veriben[®]), ein aromatisches Diamidin, wirkt außer bei *T. congolense*- und *T. vivax*- auch bei *T. b. brucei*-Infektionen von Rindern, Schafen, Ziegen und Schweinen und ist das zur Zeit in Afrika am häufigsten eingesetzte Medikament zur Behandlung der Trypanosomosen von Haus- und Nutztieren.

Isometamidiumchlorid (Samorin[®], Trypamidium[®]) ist ein Hybridmolekül, welches Teile von Diminazen (s.o.) und von Homidium, einem Phenanthridin, beinhaltet (KINABO, 1993). Es wird zur Prophylaxe und Therapie von *T. brucei*-, *T. congolense*-, *T. vivax*-, *T. evansi*- und *T. simiae*-Infektionen der Rinder, Schafe, Ziegen, Esel, Pferde, Kamele und Schweine benutzt.

Suramin (Naganol[®]) gilt als Mittel der Wahl bei *T. evansi*-Infektionen der Kamele und Pferde, ist jedoch generell bei Infektionen mit Trypanosomen des Subgenus *Trypanozoon* wirksam. Die Produktion dieses Mittels wurde allerdings eingestellt.

Quinapyramin (Antrycide[®], Trypacide[®]) ist eine Verbindung aus der 4-Aminochinolingruppe. Als Sulfatsalz (Trypacide sulphate[®]) wird es bei der Therapie, als Kombination von Sulfat- und Chloridsalzen (Trypacide pro-salt[®]) bei der Prophylaxe aller Arten von Trypanosomosen eingesetzt. Seit 1984 ist es jedoch aufgrund von Toxizität und Resistenzentwicklung nur noch zur Behandlung von Kamelen und Pferden zugelassen.

Melarsomin (Mel Cy[®], Cymelarsan[®]), eine Melaminyl-Thioarsenverbindung aus der Gruppe der Melaminophenylarsen-Präparate, wirkt gegen alle Trypanosomen des Subgenus *Trypanozoon*, ist aber nur für die Behandlung von Kamelen zugelassen.

B.1.4.3 Vektorenbekämpfung

In den letzten 20 Jahren gab es eine rasante Entwicklung von Strategien zur Kontrolle der Tsetse-Fliegen-Population, hauptsächlich basierend auf dem Einsatz von Insektiziden.

Der großflächige Sprüheinsatz von Organochlorverbindungen wurde aus ökologischen Gründen zunehmend durch stationäre, mit Geruch anlockende Fallen, insektizidimprägnierte Tücher und auf Rinder applizierte Pyrethroide ersetzt. Diese sind zwar sehr arbeitsintensiv und erfordern Management, jedoch benötigt man weitaus geringere Mengen an Insektiziden und vermindert unerwünschte Nebenwirkungen auf die Umwelt (SCHOFIELD und MAUDLIN, 2001). Mit diesen Methoden konnte die Fliegenpopulation in manchen Gebieten auf einen tolerierbaren Grad reduziert werden (KÜPPER, 1988; WILLEMSE, 1991; LANCIEN, 1991; ROWLANDS et al., 1996).

Die ehemals propagierte Rodung des natürlichen Lebensraumes der Tsetse-Fliege (FORD et al., 1970) wird heute nicht mehr durchgeführt, da die dabei entstehenden ökologischen Schäden und die Rohstoffvergeudung nicht tragbar sind. Ebenso verzichtet man auf das Erschießen des Wildtierbestandes zur Ausrottung der natürlichen Wirte der Fliege. Diese Methode erwies sich nicht nur in Hinblick auf den Artenschutz als unmöglich, sondern führte auch dazu, dass die Tsetse-Fliegen in Ermangelung ihrer ursprünglichen Wirte vermehrt auf domestizierten Tieren und Menschen zu saugen begannen.

Einen großen Erfolg brachte die sogenannte Sterile-Insekten-Technik. Dabei werden männliche Tsetse-Fliegen durch γ -Bestrahlung sterilisiert und ausgesetzt. Da sich die Weibchen im Laufe ihres Lebens nur ein einziges Mal befruchten lassen, pflanzen sie sich folglich nicht fort, wenn diese „Befruchtung“ von einem sterilen Männchen durchgeführt wurde. Diese Methode ist zwar sehr umweltfreundlich, aber zunächst teuer. Ist sie allerdings erfolgreich, werden die Folgekosten drastisch vermindert (SCHOFIELD und MAUDLIN, 2001).

B.2 Der Erreger: *Trypanosoma brucei*

B.2.1 Klassifizierung

Trypanosomen sind Protozoen vom Stamm der *Sacromastigophora*. Je nach Übertragungsart werden sie in Stercoraria (mit dem Kot übertragen) und Salivaria (mit dem Speichel übertragen) unterteilt. Die humanpathogenen Trypanosomen in Afrika gehören den Salivaria an, da sie mit dem Speichel der Tsetse-Fliege übertragen werden.

Nach HOARE (1972) werden die Trypanosomen der Sektion Salivaria in vier morphologisch unterschiedliche Subgenera unterteilt:

1. *Duttonella*
2. *Nannomonas*
3. *Trypanozoon*
4. *Pycnomonas*

Die Erreger der Schlafkrankheit gehören dabei allein dem Subgenus *Trypanozoon* an, dessen 5 Subspezies seiner einzigen Spezies (*Trypanosoma brucei* PLIMMER und BRADFORD, 1899) morphologisch wiederum nicht unterscheidbar sind (HOARE, 1972; WHO, 1978 und 1998):

- | | |
|------------------------------------|----------------------------|
| 3/1. <i>T. (T.) b. brucei</i> | PLIMMER und BRADFORD, 1899 |
| 3/2. <i>T. (T.) b. rhodesiense</i> | STEPHENS und FANTHAM, 1910 |
| 3/3. <i>T. (T.) b. gambiense</i> | DUTTON, 1902 |
| 3/4. <i>T. (T.) b. evansi</i> | STEEL, 1855 |
| 3/5. <i>T. (T.) b. equiperdum</i> | DOFLEIN, 1901 |

T. b. brucei ist einer der Erreger der Nagana-Viehseuche bei Rindern (zusammen mit *T. congolense* und *T. vivax*) und für den Menschen nicht infektiös, während *T. b. rhodesiense* die akute und *T. b. gambiense* die chronische Schlafkrankheitsform des Menschen hervorrufen. Alle drei Subspezies werden durch Tsetse-Fliegen übertragen.

T. b. evansi wird durch Stechfliegen bei Equiden, Kamelen und Wiederkäuern übertragen und ruft bei diesen die Surra hervor. *T. b. equiperdum* wird durch den Deckakt bei Equiden übertragen und führt zur Beschälseuche.

Die Klassifizierung erfolgte aufgrund epidemiologischer Kriterien wie Wirtsspektrum, Virulenz, Krankheitsverlauf, Vektorenart und geographische Verbreitung (WHO 1978 und 1986).

Bei der Unterscheidung von *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* müssen jedoch vielfältigere Kriterien herangezogen werden, da diese drei Subspezies epidemiologisch nicht zufriedenstellend voneinander unterschieden werden können (GIBSON, 2001). Man kann zwar *T. b. brucei* durch seine Unfähigkeit, Menschen zu infizieren, und seine fehlende Resistenz gegenüber Humanserum teilweise abgrenzen (VAN MEIRVENNE et al., 1976), so wie sich *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* durch ihren unterschiedlichen Krankheitsverlauf (HOARE, 1972), verschiedene Antigene (LE RAY et al., 1971), Isoenzymmuster (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) sowie DNA-Muster (GIBSON et al., 1985a; PAINDAVOINE et al., 1986; HIDE et al., 1991 und 1994; MELMS, 1996) einigermaßen voneinander unterscheiden lassen. All diese Methoden produzieren jedoch immer wieder uneinheitliche Ergebnisse, was eine vollkommen eindeutige Zuordnung letztendlich doch nicht möglich macht (GIBSON, 2001). So bilden allein *T. b. gambiense* eine recht einheitliche Gruppe, wie man mit Hilfe von biochemischen und molekularbiologischen Methoden herausfand. Von *T. b. rhodesiense* oder *T. b. brucei* lassen sich nur regionale Gruppen unterscheiden (*zambezi*: semi-akute Schlafkrankheitsform (südlich), bzw. *busoga*: akute Schlafkrankheitsform (nördlich) in Ostafrika; *bouaflé*: normalerweise Tiertrypanosomen in West- und Zentralafrika, aber auch humaninfektiös in Uganda; *kiboko*: Tiertrypanosomen in Kenia bzw. Ostafrika) (ENYARU et al., 1993b).

Dieser Tatsache verdanken wir eine bis heute andauernde Diskussion über die genaue Klassifizierung. BORST et al. (1981) bezeichnen *T. b. rhodesiense* und *T. b. brucei* z.B. als Varianten einer einzigen Subspezies mit unterschiedlichen Wirts-Präferenzen, so wie auch PAINDAVOINE et al. (1986) und andere Autoren eine Unterteilung in *gambiense*- und nicht-

gambiense-Stämme vorschlagen. TAIT et al. (1984) verstehen dagegen alle drei *T. brucei*-Subspezies als drei Genvarianten einer einzigen Spezies oder Subspezies.

B.2.2 Entwicklungszyklus

Trypanosoma brucei sind 15-35µm große, in Blut und Gewebe von Wirbeltieren parasitierende Protozoen. Sie vermehren sich primär durch Zweiteilung, zusätzlich konnte jedoch eine geschlechtliche Vermehrung nachgewiesen werden (B.2.3.1). In Afrika werden sie zyklisch von Tsetse-Fliegen, bzw. azyklisch von Stechfliegen (*Tabanidae*) übertragen.

Trypanosomen durchlaufen einen Lebenszyklus, während dessen sie verschiedene Formen ausbilden. Im Endwirt (Mensch oder Tier) entwickeln sich die Blutstromformen. Diese werden von der Tsetse-Fliege während des Saugaktes aufgenommen, gelangen über den Kropf in den Mitteldarm der Fliege und wandeln sich dort innerhalb von 48-72h in prozyklische trypomastigote Formen um. Bei der Umwandlung in Prozyklische verlieren die Trypanosomen ihren Oberflächenmantel, welcher die variablen Antigene beinhaltet, und sind damit nicht mehr infektiös für Wirbeltiere (HONORE und PEPIN, 2001). Die prozyklischen Trypanosomen vermehren sich zunächst, und wandern 12-20 Tage nach der infektiösen Blutmahlzeit in den Proventrikulus der Fliege ein. Von dort aus gelangen sie entweder über Ösophagus und Hypopharynx oder direkt durch die Darmwand und das Hämocöl in die Speicheldrüsen und wandeln sich anfangs in weiterhin vermehrungsfähige epimastigote, später dann (15-35 Tage nach der Infektion) in teilungsunfähige metazyklische Trypanosomen um (EVANS und ELLIS, 1983; BRUN und JENNI, 1985). Letztere sind wieder wirbeltierinfektiös und gelangen beim nächsten Stich mit dem Speichel der Fliege in die Haut des Endwirtes. An der Stichstelle findet als erstes eine Umwandlung der Trypanosomen in trypomastigote Blutstromformen und ihre örtliche Vermehrung statt, wodurch eine schmerzhaft Hautentzündung mit Rötung und Schwellung, der sogenannte "Schanker" entsteht (HONORE und PEPIN, 2001). Von dort aus wandern die Erreger in die Lymphbahnen und durch den *Ductus thoracicus* in die Blutgefäße, worüber sie sich im ganzen Körper ausbreiten (haematolymphatisches Stadium) (ANDERSON, 1987). Der Kampf des Immunsystems des Wirtes mit den sich immer wieder ändernden Oberflächenantigenen des Parasiten beginnt. Jede Antigenvariante kann sich zunächst ungestört vermehren und verursacht eine Parasitämie, bis sie vom Immunsystem erkannt, bekämpft und schließlich eliminiert wird. Inzwischen hat sich jedoch schon wieder eine neue Antigenvariante

ausgebildet usw. (CROSS, 1975). Während der ansteigenden Phase einer Parasitämiewelle herrschen die langen und schlanken trypomastigoten Formen vor, die sich durch Zweiteilung vermehren. Sie verwandeln sich über trypomastigote intermediäre nach dem Parasitämie-Gipfel in trypomastigote gedrungene Formen („stumpy forms“) um, welche teilungsunfähig sind und Tsetse-Fliegen infizieren können (TURNER, 1990; HONORE und PEPIN, 2001).

Im Endstadium der Schlafkrankheit durchdringen die Trypanosomen den *Plexus chorioidei* des Menschen und besiedeln schließlich sein Zentralnervensystem (meningoenzephalitisches Stadium) (BRUN und JENNI, 1987).

B.2.3 Biologische Merkmale

B.2.3.1 Genetische Rekombination

Entgegen der früheren Meinung, dass Einzeller ihr Genpotential allein durch Mutationen auffrischen, weiß man inzwischen, dass Trypanosomen auch sexuell aktiv sind und dabei ihr Genmaterial rekombinieren können (TAIT et al., 1992).

So können z.B. die Isoenzymmuster von Trypanosomen aus der Gegend des Viktoriasees, welche eine Kombination von Mustern ost- und westafrikanischer Trypanosomen darstellen, als heterozygote Enzyme und damit als Folge einer genetischen Rekombination erklärt werden (GIBSON et al., 1980; TAIT, 1980). Eindeutig bewiesen wurde eine sexuelle Aktivität jedoch erst 1986 von JENNI et al., denen es gelang, Trypanosomen-Stämme im Labor miteinander zu kreuzen.

Unter natürlichen Bedingungen paaren sich Trypanosomen während ihrer zyklischen Entwicklung in der Tsetse-Fliege, wo eine große Vielfalt von Zymodemen (GODFREY, 1979) zur Verfügung steht (GIBSON und WELLDE, 1985; JENNI et al., 1986; STEVENS et al., 1994; MAC LEOD et al., 1999). Aber auch ein hoher Prozentsatz der Säugetier-Wirte muss mit mehr als einem Genotyp von Trypanosomen infiziert sein, was Untersuchungen der Erst-Blutmahlzeit von Tsetse-Fliegen ergeben haben (MAUDLIN, 1991). Die Rekombination folgt den Mendelschen Regeln, d.h. während der Meiose werden die haploiden homologen Chromosomen der Eltern kombiniert. Ist die Meiose unvollständig und das homologe Chromosomenpaar eines Elternteiles trennt sich nicht auf, entsteht Triploidie und der DNA-Gehalt eines Trypanosomen steigt an (HOPE et al., 1999). Ein genetischer Austausch kann

zwischen *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*, zwischen Stämmen aus Ost- und West-Afrika und zwischen rein West-afrikanischen Stämmen stattfinden (TAIT et al., 1992).

Bei der Entstehung von Epidemien scheint eine sexuelle Rekombination der Parasiten jedoch keine Rolle zu spielen, vielmehr stellen sich die während einer Epidemie isolierten *T. brucei*-Populationen genetisch sehr einheitlich dar (STEVENS und WELBURN, 1993; HIDE et al., 1994).

B.2.3.2 Antigenetische Variation

Da Trypanosomen sich im Blutstrom des Wirtes in ständigem Kontakt mit dessen Immunsystem befinden, haben sie einen komplizierten Mechanismus entwickelt, um der Immunantwort zu entkommen: die antigenetische Variation. In der metazyklischen und Blutstrom-Form exprimieren die Trypanosomen ungefähr 10^7 Kopien des gleichen, ca. 50kd großen Oberflächenantigens (variable surface glycoprotein, VSG), auf welche das Immunsystem des Wirtsorganismus antwortet (CROSS, 1975; EL-SAYED, et al.; 2000). Da Blutstromformen ihre VSGs jedoch periodisch, unabhängig von der Immunantwort, ändern können (TURNER und BARRY, 1989; DAVIES et al., 1997), kommt die Reaktion des Immunsystems immer zu spät.

Insgesamt beinhaltet das Genom ungefähr 1.000 verschiedene VSG-Gene, die ca. 5% des Genoms ausmachen und sich auf fast allen Chromosomen befinden (VAN DER PLOEG et al., 1982). Ihr größter Anteil liegt jedoch auf den Mini-Chromosomen, die als VSG-Genpool fungieren (VAN DER PLOEG et al., 1984b). Alle VSGs haben eine ähnliche Grundstruktur, jedoch unterschiedliche Epitope, die aus dieser Grundstruktur herausragen (BLUM et al., 1993). Die Gene der nicht exprimierten VSGs sind auf verschiedene Abschnitte der Chromosomen verteilt, während die zur Zeit exprimierten sich immer telomer-nah befinden (VAN DER PLOEG et al., 1984b; BORST et al., 1998; CROSS et al., 1998; PAYS und NOLAN, 1998). Der häufigste Mechanismus der VSG-Änderung ist das sogenannte Gen-Switching: das VSG-Gen einer aktiven Expressions-Stelle wird durch eine doppelte Kopie eines zur Zeit nicht exprimierten VSG-Gens ersetzt. Eine andere Methode ist die Übertragung eines kompletten Telomers und seines VSG-Gens auf ein anderes Chromosomenende, oder der reziproke Austausch zweier Telomere mit ihren assoziierten VSG-Genen. Des weiteren kann auch ohne DNA-Rearrangements die Transkription einer Expressions-Stelle gestoppt und dafür eine andere aktiviert werden. Andererseits haben DNA-Rearrangements nicht

unbedingt eine Aktivierung oder Expression zur Folge (VAN DER PLOEG et al., 1984b und 1989; EL-SAYED, et al.; 2000).

Für *T. b. gambiense* wurde nur ein limitiertes Repertoire an VSG-Genen herausgefunden (GRAY, 1972).

B.2.3.3 Humanserumresistenz

Laut Klassifizierung (siehe B.2.1) wird die ausschließlich tierpathogene Subspezies *T. b. brucei* von den humanpathogenen *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* durch ihr sensitives Verhalten gegenüber Humanserum abgegrenzt. Seit 1902 weiß man von der trypanoziden Wirkung des Humanserums, als LAVERAN mit *T. b. brucei* infizierte Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Humanserum erfolgreich heilen konnte. Diese Eigenschaft des Humanserums wiesen YORKE et al. 1930 auch *in vitro* nach.

Versuche zur Identifizierung des trypanolytischen Faktors (TLF), welcher in Vollblut, Serum oder Plasma jedes Menschen von Geburt an enthalten ist, schlossen sich an (YAMAGUCHI, 1960; AARONOVITCH und TERRY, 1972; HAWKING et al., 1973). Die trypanolytische Serum-Aktivität ist unabhängig von Ernährung, Gesundheitszustand oder Lebensgewohnheiten eines Menschen, sie variiert jedoch von Individuum zu Individuum (SEED et al., 1993). Neuere Untersuchungen belegen, dass TLF als sogenanntes „high density“ Lipoprotein (TLF-1) und als instabiler hochmolekularer Proteinkomplex (TLF-2) vorliegt (RIFKIN, 1978; BARTH, 1989; GILLETT und OWEN, 1991; TOMLINSON et al., 1995; RAPER et al., 1996). Sowohl an TLF-1 als auch an TLF-2 binden zwei Apolipoproteine, die beide für die Trypanolyse notwendig sind (HAJDUK et al., 1992). Das eine ist ein Haptoglobin-verwandtes Protein (Hpr), das andere ein Apolipoprotein AI (apoAI), wobei Hpr das eigentliche trypanolytische Element darstellt (SMITH et al., 1995; TOMLINSON et al., 1997; TOMLINSON und RAPER, 1998). Wahrscheinlich kann nur TLF-2 seine Aktivität voll entfalten, da TLF-1 durch ebenfalls im Serum vorkommendes Haptoglobin inhibiert wird. Seren von Patienten mit intravaskulärer Hämolyse, bei denen das Haptoglobin durch seine Bindung an freies Hämoglobin bereits verbraucht ist, weisen eine sehr viel höhere trypanolytische Aktivität auf (SMITH et al., 1995; RAPER et al., 1996).

TLF bindet an Rezeptoren der Plasmamembran des Parasiten, wird zur Flagellartasche transportiert, dort durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und an Lysosomen weitergegeben (HAJDUK et al., 1992; HAGER et al., 1994; ORTIZ-ORDONEZ et al., 1994;

ORTIZ-ORDONEZ und SEED, 1995). Der niedrige lysosomale pH aktiviert die Peroxidase von Hpr, was eine Zerstörung der Lysosomen-Membranen durch Fett-Peroxidation und die anschließende Selbstverdauung der Trypanosomen durch Freisetzung lysosomaler Enzyme zur Folge hat (HAGER et al., 1994; SMITH et al., 1995).

Um Menschen infizieren zu können, müssen *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* gegenüber diesem zytotoxischen Mechanismus resistent sein. Während *T. b. gambiense*-Isolate eine relativ stabile Humanserumresistenz auszubilden scheinen (PAINDAVOINE et al., 1986; BRUN und JENNI, 1987), ist dies für Trypanosomen der Subspezies *T. b. rhodesiense* keine feste Eigenschaft. So beschreiben mehrere Autoren (YORKE et al., 1930; FAIRBAIRN, 1933; MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973; RICHNER und JENNI, 1986; BRUN und JENNI, 1987) das Verschwinden bzw. variable Auftreten der Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* nach Tier-Passagen.

Im Rahmen des sogenannten „Tinde-Experiments“ (durchgeführt im Tinde-Labor, Tanganyika) wurde ein definierter *T. b. rhodesiense*-Stamm 23 Jahre lang (ab 1934) zyklisch über Tsetse-Fliegen (*Glossina morsitans*) durch Schafe passagiert und seine Humanserumresistenz immer wieder getestet. Einige Infektionsversuche freiwilliger Testpersonen blieben erfolglos, wobei der Stamm seine Infektiosität für den Menschen trotzdem über all die Jahre beibehielt (FAIRBAIRN und BURTT, 1946; WILLET und FAIRBAIRN, 1955; ASHCROFT, 1959).

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 Injizieren ausschließlich sensibler Individuen eines Stammes, der eigentlich eine Mischung aus sensiblen und resistenten Individuen ist. Es ist deswegen sinnvoll eine differenziertere Unterteilung in voll sensitive, subresistente, resistente und hochresistente Stämme vorzunehmen. Bei einem voll sensitiven Stamm kann kein Individuum im Humanserum überleben, bei einem subresistenten Stamm widerstehen ihm wenige, bei einem resistenten die meisten und bei einem hochresistenten fast alle Individuen (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).

Um die Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* zu erhalten empfiehlt es sich daher, Passagen nur zusammen mit Humanserum durchzuführen (HAWKING, 1976a), oder Feldisolate direkt *in vitro* in Gegenwart von Humanserum zu kultivieren (BRUN und JENNI, 1983).

Untersuchungen von VAN MEIRVENNE et al. (1976), die resistente und sensible Antigen-Typen des selben *T. b. rhodesiense*-Klones (ETat 1) unterscheiden können, führten dann allerdings zu der Theorie, dass die Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* mit der Änderung der Oberflächenantigene gekoppelt sei. DE GREEF et al. (1989 und 1992), RIFKIN et al. (1994) und später auch HAGER und HAJDUK (1997) gelingt es jedoch sowohl resistente als auch sensible Linien aus ein und demselben Antigen-Typ zu gewinnen und ein Serumresistenz-assoziiertes Gen (SRA) zu identifizieren, welches nur bei humanserumresistenten Formen transkribiert wird. XONG et al. (1998) isolieren das SRA-Gen aus der humanserumresistenten Form des Etat 1-Klones (VSG-Variante ETat 1.10; VAN MEIRVENNE et al., 1976), welches sie in einen definierten *T. b. brucei*-Stamm transferieren und diesen dadurch resistent machen. Das SRA-Gen ist allerdings nicht abhängig von der VSG-Variante, sondern nur, genau so wie das VSG-Gen, auf einer telomerischen Expressions-Stelle der Chromosomen gelegen. Von diesen gibt es mehrere und die antigenetische Varianz entsteht durch abwechselndes Abrufen immer anderer Expressions-Stellen (siehe auch B.2.3.2). Ist das SRA-Gen nun nicht auf jeder Expressions-Stelle gelegen, so wird die Humanserumresistenz eben nicht bei jedem VSG-Typ exprimiert. Bei Konfrontation mit Humanserum wird das Gen aktiviert, während unter Abwesenheit von Humanserum ein spontaner Umschlag der Trypanosomen in humanserumsensible Formen erfolgt. Das 1,5kb große SRA-Gen kodiert ein ungewöhnlich kurzes, VSG-ähnliches Protein (DE GREEF et al., 1989; DE GREEF und HAMERS, 1994; MILNER und HAJDUK, 1999). MILNER und HAJDUK (1999) können das SRA-Protein durch Immunfluoreszenz auf der gesamten Oberfläche, Flagellum und Flagellartasche mit eingeschlossen, von resistenten Trypanosomen lokalisieren. Dort unterbindet es möglicherweise die Aufnahme von TLF in die Zelle. Im Gegensatz dazu weisen LORENZ et al. (1995) jedoch nach, dass *T. b. rhodesiense*-Stämmen vergleichbare Mengen von TLF intrazellulär anreichern. Bis heute ist der genaue Resistenz-Mechanismus nicht bekannt.

Bei *T. b. gambiense*-Stämmen kann ein SRA-Gen nicht nachgewiesen werden (DE GREEF et al., 1989). Möglicherweise fehlen hier Rezeptoren auf der Plasmamembran und eine Bindung, bzw. Aufnahme von TLF kann überhaupt nicht oder nur begrenzt stattfinden (HAGER und HAJDUK, 1997; ORTIZ-ORDONEZ und SEED, 1995). Einen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Stufen von Humanserumresistenz, die sie nach mehreren Mauspassagen ohne Humanserum erreichten, und verschiedenen Antigentypen eines *T. b. gambiense*-Klons wiesen ORTIZ et al. 1994 nach.

Auch vom umgekehrten Fall, nämlich der Resistenzausbildung definierter, wiederholt humanserumsensitiver *T. b. brucei*-Stämme wurde berichtet (BÜNGENER, 1980; JENNINGS und URQUHART, 1985; ABEBE et al., 1988), zum Teil verbunden mit einer Änderung des Oberflächenantigen-Typen (RICKMANN und KOLALA, 1979). Weiterhin infizierten RICKMANN et al. (1984) Fliegen (*Glossina morsitans morsitans*) mit Blutstromformen eines beständig humanserumsensiblen *T. b. brucei*-Stammes und ernährten sie mit Humanserum. Die metazyklischen Trypanosomen aus diesen Fliegen erwiesen sich als wiederholt resistent im *in vitro* Humanserum-Resistenztest (siehe B.2.5.1.2).

B.2.4 Organisation des Genoms

Trypanosomen sind diploide Organismen (TAIT, 1980; TAIT et al., 1984; GIBSON et al., 1985b; EL-SAYED et al., 2000). Ihre DNA ist in mehreren linearen Chromosomen und einigen Zirkeln organisiert.

B.2.4.1 Der Zellkern

Da die Chromosomen der Trypanosomen während der Mitose nicht kondensieren, kann man ihre Größe und Anzahl nicht mit Hilfe der konventionellen Licht-Mikroskopie bestimmen (MYLER, 1993; EL-SAYED et al., 2000). Bisher bediente man sich quantitativer DNA-Messungen (BORST et al., 1982) und genetischer Analysen (TAIT, 1980; GIBSON et al., 1985b). Erst jedoch die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE; B.2.5.3.5) nach SCHWARTZ und CANTOR (1984) ermöglichte eine detaillierte Untersuchung des Karyotyps von Trypanosomen.

Der nukleare DNA-Gehalt von *T. brucei* beträgt ca. 35Mb (haploid), mit bis zu 25% Unterschied zwischen verschiedenen Isolaten (BORST et al., 1980 und 1982; VAN DER PLOEG et al., 1989; TAIT et al., 1992; MYLER, 1993; MELVILLE, 1997; HOPE et al., 1999; MELVILLE et al., 2000; EL-SAYED et al., 2000). *T. b. gambiense*-Stämme weisen einen durchschnittlich geringeren DNA-Gehalt auf (KANMOGNE et al., 1997).

Eine Ursache für diese Größen-Unterschiede liegt in der sexuellen Rekombination der Parasiten (B.2.3.1), die eine Triploidie zur Folge haben kann (HOPE et al., 1999). Zuweilen enthalten Hybrid-Formen anfangs sogar die vollständigen Sets von Intermediär- und Mini-Chromosomen beider Elternteile, welche in ihrer Anzahl erst allmählich mit dem Populations-Wachstum abnehmen (STERNBERG et al., 1988; MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998). Generell bleibt Diploidität jedoch nach der sexuellen Rekombination erhalten (HOPE et al., 1999). Zusätzlich wachsen die Chromosomen der Trypanosomen bei jeder Teilung um 6 bis 10bp (VAN DER PLOEG et al., 1984a). Diese geringgradigen Größen-Veränderungen des Genoms können auf das unvollständige Crossing Over von Tandem-ähnlich angeordneten Sequenzen, sowie Crossing Over zwischen ungleich großen Homologen während der Mitose zurückgeführt werden (MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998; ERSFELD et al., 1999). Ein Ausgleich der Veränderungen erfolgt durch das immer wieder vorkommende Löschen großer telomerisch gelegener Segmente (VAN DER PLOEG et al., 1984a; ALSFORD et al., 2001).

Das Genom beinhaltet wahrscheinlich um die 12 000 Gene (EL-SAYED und DONELSON, 1997). Man vermutet, dass diese zu ungefähr 68% aus Codierungs-Sequenzen bestehen, die in jeweils nur einer Kopie vorliegen. Den Rest machen hoch-repetitive (12%) und mittel-repetitive (20%) Sequenzen aus (MYLER, 1993).

Die DNA des Zellkerns lässt sich mit Hilfe der PFGE in 3 Größenklassen von Chromosomen unterteilen (MELVILLE et al., 1998; ERSFELD et al., 1999):

1. mindestens 11 Paare großer (Mega-Basenpaar-) Chromosomen (MBC) von 1Mb bis über 6Mb
2. verschiedene Intermediär-Chromosomen (IC) von 200-900kb
3. bis zu 200 lineare Mini-Chromosomen (MC) von 30-150kb

Der Karyotyp von *Trypanosoma brucei* bleibt dabei in allen Stadien des Lebenszyklus gleich (WELLS et al., 1987; VAN DER PLOEG et al., 1984b, 1989, 1992; ESHITA et al., 1999).

T. b. gambiense haben durchschnittlich weniger Mini- und Intermediär-Chromosomen und ein beständigeres, spezifisches DNA-Muster, während *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* höchst unterschiedliche Bandenmuster aufweisen (PAINDAVOINE et al., 1986; MELVILLE, 1997). Ein Großteil dieser Unterschiede kann durch unterschiedliche Expression oder Verlust der telomerisch liegenden VSG-Gene bzw. Verlust von nicht-Codierungs-Sequenzen und repetitiven Genen erklärt werden (VAN DER PLOEG et al., 1992; KANMOGNE et al., 1997).

B.2.4.1.1 Die großen Chromosomen

Die großen Chromosomen von 1Mb bis über 6Mb sind diploid und es existieren mindestens 11 Paare (GIBSON et al., 1985b; TAIT et al., 1989; GOTTESDIENER et al., 1990). Sie enthalten ca. 420 Haushalts-Gene, die z.B. metabolische Enzyme kodieren, jedoch auch VSG-Gen-Kopien und -Expressions-Stellen (MYLER, 1993; MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998 und 2000). Expressions-Stellen für VSG-codierende Gene liegen telomerisch, während Haushalts-Gene und nicht exprimierte VSG-Gene als Tandem angeordnet nah beieinander in der Chromosomen-Mitte vorliegen (EL-SAYED und DONELSON, 1997; EL-SAYED et al., 2000).

Größenunterschiede von bis zu 400% können sowohl zwischen den zwei Homologen eines Chromosomenpaares als auch zwischen vergleichbaren Chromosomenpaaren verschiedener Trypanosomen-Isolate auftreten (MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998 und 2000). Sie haben ihre Ursache in 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. Damit ist es unmöglich, ein Isolat-übergreifendes Nomenklatur-System zu entwickeln (MELVILLE et al., 1998).

Trotz dieser enormen Größen-Unterschiede zwischen den homologen Chromosomen ist deren Organisation und Gen-Gehalt über lange Strecken, selbst bei verschiedenen Isolaten, identisch (MELVILLE; 1997; MELVILLE et al., 1998). Nur die Regionen, welche mit antigenetischer Variation gekoppelt sind, erscheinen sehr vielgestaltig und sind die Hauptursache für die Größenunterschiede der Homologen (MELVILLE et al., 2000).

B.2.4.1.2 Die Intermediär-Chromosomen

Die Intermediär-Chromosomen von 200kb bis 900kb variieren in ihrer Anzahl von einem Trypanosomen-Stamm zum anderen. Sie können wenige Haushalts-Gene enthalten, weisen aber hauptsächlich telomerisch gelegene VSG-Sequenzen auf und dienen deswegen wahrscheinlich, so wie die Minichromosomen, als Repertoire für VSG-Gene oder deren Expressions-Stellen (VAN DER PLOEG et al., 1984b; LIPS et al., 1993; RUDENKO et al., 1998; ERSFELD et al., 1999). Die Ploidität der Intermediär-Chromosomen ist noch ungewiss, wobei allerdings angenommen wird, dass diese Chromosomen haploid sind, sich also nicht nach Mendelschen Regeln vererben (MELVILLE et al., 1998).

B.2.4.1.3 Die Mini-Chromosomen

Von den linearen Mini-Chromosomen zwischen 30kb und 150kb besitzen *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* ca. 100-200 Stück, während *T. b. gambiense* durchschnittlich nur etwa 10 aufweisen. Ihre genaue Anzahl variiert jedoch nicht nur innerhalb der Subspezies, sondern von Isolat zu Isolat (GIBSON und BORST, 1986; VAN DER PLOEG et al., 1984a; ALSFORD et al., 2001).

Die wahrscheinlich haploiden Mini-Chromosomen (WELLS et al., 1987) bestehen aus einfachen Wiederholungssequenzen und dienen als Repertoire für VSG-Gene, da einige ihrer telomerischen Wiederholungssequenzen mit unexprimierten VSG-Genen gekoppelt sind (WILLIAMS et al., 1982; SLOOF et al., 1983; WEIDEN et al., 1991). Um exprimiert werden zu können, müssen diese VSG-Gene entweder interchromosomal verdoppelt werden oder an einem Austausch von Telomeren teilnehmen (VAN DER PLOEG et al., 1984b und 1992; EL-SAYED et al., 2000).

Minichromosomen scheinen während der Mitose keinen genetischen Veränderungen zu unterliegen, d.h. sie sind mitotisch stabil (VAN DER PLOEG et al., 1992; ALSFORD et al., 2001).

B.2.4.2 Der Kinetoplast

Bereits 1924 entdeckten BRESSLAU und SCREMIN, dass der Kinetoplast von *T. brucei* große Mengen DNA enthält (sog. kDNA). Sein Netzwerk von Maxi- und Minizirkeln macht rund 20% der Gesamt-DNA aus (EL-SAYED et al., 2000).

B.2.4.2.1 Maxizirkel

Die ca. 20kb großen Maxizirkel des Kinetoplasten sind mit mitochondrialer DNA anderer Eukaryoten vergleichbar (STUART et al., 1997). Sie stehen im Zusammenhang mit der Fähigkeit von *Trypanosoma brucei*, sich zyklisch in der Tsetse-Fliege zu entwickeln (ESHITA et al., 1999).

B.2.4.2.2 Minizirkel

Die Minizirkel sind 1kb groß. Sie werden in RNAs transkribiert, die beim sogenannten RNA-Editieren als Schablonen zum Einfügen und Entfernen von Uridin-Säuren in die Maxizirkel-Transkripte dienen (STUART et al., 1997).

B.2.5 Charakterisierung von *Trypanosoma brucei* mittels biologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden

Die Identifizierung humaninfektöser Trypanosomen in Reservoirwirten ist für die erfolgreiche Bekämpfung der Schlafkrankheit besonders wichtig. Zu diesem Zweck wurden einige Charakterisierungsmethoden entwickelt, welche auf unterschiedlichen Grundlagen beruhen.

B.2.5.1 Biologische Charakterisierungsmethoden

Basierend auf der lytischen Wirkung von Humanserum auf einige Trypanosomen der Gattung *Trypanosoma (T.) brucei* wurde zunächst der Blut-Inkubations-Infektiositätstest (RICKMAN und ROBSON, 1970a/b) als Tierversuch und später der Humanserum-Resistenztest (JENNI und BRUN, 1982) als *in vitro*-Versuch entwickelt. Die ehemals durchgeführten Tests in Form von Infektion freiwilliger Testpersonen sind heute aus ethischen Gründen nicht mehr vertretbar.

B.2.5.1.1 Der Blut-Inkubations-Infektiositätstest (BIIT) *in vivo*

Beim Blut-Inkubations-Infektiositätstest (BIIT) (RICKMANN und ROBSON, 1970a/b; modifiziert von HAWKING, 1976b, und MEHLITZ, 1978) wird die zu untersuchende Trypanosomen-Population zunächst für 5h bei 37°C mit Humanserum inkubiert, dann intraperitoneal in Labornager injiziert und beobachtet, ob eine Infektion angeht. Ist diese Population weiterhin infektiös für Labornager, so handelt es sich um humanserumresistente Trypanosomen.

Der Test ist ebenso gültig, wenn die Trypanosomen ohne Inkubation direkt mit Humanserum in Labornager injiziert werden. Da Untersuchungen belegen, dass der Hauptteil der trypanoziden Wirkung des Humanserums sich erst in der Maus entfaltet, ist diese Methode eventuell sogar vorzuziehen (RICKMAN und ROBSON, 1972; HAWKING, 1973). Bei einigen zusammen mit Humanserum injizierten *T. b. rhodesiense*-Stämmen werden dabei im Vergleich zu Labornager-Infektionen mit *T. b. brucei* und *T. b. gambiense* um ca. 10 Tage verlängerte Präpatenzzeiten beobachtet (RICKMAN und ROBSON, 1972; HAWKING, 1973; TARGETT und WILSON, 1973). Solche Stämme werden als „subresistent“ eingestuft (GIBSON et al., 1978).

B.2.5.1.2 Der Humanserum-Resistenztest (HSRT) *in vitro*

Der Humanserum-Resistenztest (HSRT) wurde von JENNI und BRUN (1982) entwickelt, um den Verbrauch an Versuchstieren zu verringern. Es ist ein *in vitro*-Test, bei welchem die zu untersuchende Trypanosomen-Population auf einem Nähr-Zellrasen angezüchtet, Humanserum ausgesetzt und ihr weiteres Wachstum dann mindestens 10 Tage lang beurteilt wird. Grundlage ist ein *in vitro*-Kultursystem, welches das kontinuierliche Wachstum von Blutstromformen des Subgenus *Trypanosoma brucei* ermöglicht (BRUN et al. 1981). Im Vergleich zum BIIT kann man mit dieser Methode die Reaktion der Trypanosomen auf Humanserum direkt und kontinuierlich beobachten.

Mit diesem Test ist es sogar möglich, Minderheiten von humanserumresistenten Trypanosomen in einer Mischpopulation festzustellen. So gelang es JENNI und BRUN (1982) einen einzigen humanserumresistenten Trypanosom aus einer künstlichen Mischpopulation mit 10^5 humanserumsensiblen Trypanosomen nachzuweisen.

Schwierig wird die Interpretation sowohl des BIIT als auch des HSRT allerdings bei gelegentlich auftretenden positiven und negativen Ergebnissen der Untersuchung des selben Trypanosomen-Isolates (MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973, MOLOO und KUTUZA, 1974), welches sich in diesem Fall als Mischpopulation sensitiver und resistenter Trypanosomen in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen erklären lässt (RICKMANN und ROBSON, 1974; GEIGY et al., 1975; HAWKING, 1976a/b). Geklonte Trypanosomen der Subspezies *T. b. brucei* und *T. b. gambiense* liefern konstante BIIT- und HSRT-Ergebnisse (GEIGY et al., 1975; MEHLITZ, 1985; PAINDAVOINE et al., 1986; BRUN und JENNI, 1987), für geklonte *T. b. rhodesiense*-Stämme gilt dies dagegen nicht (MWAMBU und MAYENDE, 1971; TARGETT und WILSON, 1973; VAN MEIRVENNE et al., 1976; RICKMANN, 1977; RICHNER und JENNI, 1986; BRUN und JENNI, 1987).

Dennoch kann man in beiden Tests resistente Populationen als "fast sicher infektiös", subresistente Populationen als "potentiell infektiös" und sensible Populationen als "wahrscheinlich nicht infektiös" für den Menschen beurteilen (HAWKING, 1976a).

B.2.5.2 Biochemische Charakterisierungsmethoden

B.2.5.2.1 Die Isoenzymelektrophorese

Unter Isoenzymen versteht man multiple, trennbare Formen von Enzymen, die im gleichen Organismus vorkommen und die gleiche katalytische Aktivität haben (SHAW, 1969).

Da Enzyme ein DNA-Produkt sind und durch genetische Mutation nur stufenweise verändert werden, ist es möglich den Verwandtschaftsgrad von Organismen durch einen Strukturrenvergleich ihrer homologen Enzyme zu beurteilen. Enzyme können einerseits durch ihre unterschiedlichen elektrischen Ladungen und Molekülgrößen in der Gelelektrophorese (siehe dazu auch B.2.5.3) aufgetrennt und andererseits durch ihre Substratspezifität sehr einfach identifiziert werden.

Da viele Enzyme polymorph sind, ist es sinnvoll nicht nur ein Enzym, sondern mehrere als Charakterisierungsparameter heranzuziehen. Diese Enzymprofile von Organismen werden miteinander verglichen, wobei identische Enzymprofile ein sogenanntes „Zymodem“ bilden (GODFREY, 1979).

Mit Hilfe der Isoenzym-Elektrophorese können *T. b. gambiense*-Isolate von *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* unterschieden werden. Wichtige Enzyme hierfür sind die L-Aspartat 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (ASAT) und die L-Alanin 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (ALAT). Zur Charakterisierung werden weiterhin die Peptidase C, die Isozitat-Dehydrogenase (ICD), die Phosphoglucomutase (PGM), das „Malat-Enzym“ (ME), die Superoxid-Dismutase (SOD) und eine Nukleosid-Hydrolase (NHD) hinzugezogen (BAGSTER und PARR, 1973; GODFREY und KILGOUR, 1976; GIBSON et al., 1978 und 1980; MEHLITZ et al. 1982; GODFREY et al., 1987 und 1990; STEVENS et al., 1992).

Innerhalb eines Schlafkrankheitsgebietes findet man nur geringe, zwischen verschiedenen Gebieten jedoch große Unterschiede der Isoenzymmuster von Trypanosomen-Isolaten. (HIDE et al., 1994). Nur *T. b. gambiense*-Stämme stellen sich als ein Repertoire eng verwandter Zymodeme dar und grenzen sich damit eindeutig von den untereinander sehr unterschiedlichen „nicht-gambiense“-Stämmen, *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*, ab (TAIT et al., 1984; MIHOK et al., 1990). Die relative Homogenität von *T. b. gambiense*-Populationen wurde durch kDNA-Analyse (GIBSON et al., 1985a), Antigen-Genproben

(PANDAVOINE et al., 1986) und repetitive DNA-Proben (HIDE et al., 1991) bestätigt (siehe auch B.2.5.2 und B.2.5.3).

B.2.5.3 Molekularbiologische Charakterisierungsmethoden

Bei allen molekularbiologischen Charakterisierungsmethoden werden DNA-Stücke nach Größe und Ladung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Grundlage ist die Eigenschaft von Nukleinsäure-Molekülen in einem elektrischen Feld auf die Kathode zuzuwandern, da sie bei einem neutralen pH polyanionisch sind, d.h. sie tragen an ihren Phosphatgruppen viele negative Ladungen. Das Elektrophorese-Gel übt dabei durch seine Poren zusätzlich einen Siebeffekt auf die Moleküle aus (NICHOLL, 1994). Die DNA-Banden können nach der Auftrennung mit Ethidiumbromid angefärbt werden, so dass man Bandengrößen im Vergleich mit Markerbanden bestimmen, bzw. Bandenmuster miteinander vergleichen kann.

Mit konventioneller Gelelektrophorese, wie sie z.B. bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Restriktionsenzymanalyse (RFLP) und der zufällig amplifizierten polymorphen DNA (RAPD) durchgeführt wird (s.u.), können DNA-Stücke jedoch nur bis zu einer Größe von ca. 20kb aufgetrennt werden. Moleküle, welche größer sind als die durchschnittliche Porengröße des Agarosegels, wandern eng zusammen durch das Gel und lassen sich nicht voneinander trennen (NOOLANDI und TURMEL, 1992a). Zur Auftrennung intakter Chromosomen wurde deswegen 1984 von SCHWARTZ und CANTOR die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) entwickelt, bei welcher das elektrische Feld während des Laufes periodisch seine Orientierung ändert.

Da verschiedene molekularbiologische Methoden Isolate nicht unbedingt gleich gruppieren, lassen sich ihre Ergebnisse jedoch kaum miteinander vergleichen. So machen z.B. RAPD-PCR und PFGE-Analyse eine sehr viel feinere Unterscheidung möglich (HIDE et al., 1994; GIBSON, 2001). Die relative Homogenität von *T. b. gambiense*-Populationen wurde durch kDNA-Analyse (GIBSON et al., 1985a), Antigen-Genproben (PANDAVOINE et al., 1986) und repetitive DNA-Proben (HIDE et al., 1991) bestätigt. ENYARU et al. (1993a) identifizieren allerdings eine Mikro-Heterogenität von *T. b. gambiense*, da 6 ihrer 8 aus Menschen isolierten Stämme das zuvor als *gambiense*-spezifisch angesehene AnTat 11.17-Gen nicht besaßen.

B.2.5.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden bestimmte DNA-Segmente des Genoms millionenfach vervielfältigt und im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Zunächst wird die DNA des Genoms durch Hitze denaturiert, d.h. ihre Doppelstränge voneinander getrennt. Dann binden zwei spezifische Oligonukleotid-Primer (kurze, einsträngige DNA-Moleküle) an bestimmte, komplementäre Stellen der DNA-Einzelstränge und markieren so DNA-Segmente (sogenannte Ziel-DNA) für das Enzym Polymerase. Die Polymerase beginnt an einem der Primer und synthetisiert Base für Base den komplementären Teil des Stranges, bis sie mit dem anderen Primer endet. Durch wiederholte Zyklen von Hitze-Denaturierung der DNA, Anheften der Primer und Synthese des DNA-Segments erhält man Millionen von Kopien dieses einen DNA-Stückes (= spezifisches Produkt). Da die neu-synthetisierten Sequenzen die Primer ebenfalls binden können und dann auch als Matrize dienen, verdoppelt jeder Zyklus die Anzahl der bereits vorhandenen DNA-Stücke. So können selbst kleine Spuren von Ziel-DNA in einer Probe festgestellt werden, was die PCR jedoch im Gegenzug sehr anfällig für Kontaminationen macht (NEWTON und GRAHAM, 1994).

Nach der Gelelektrophorese kann das spezifische Produkt mit Ethidiumbromid angefärbt und als Bande von bestimmter Größe dargestellt werden.

Die PCR ermöglicht bisher nur eine Identifizierung des Subgenus *Trypanozoon* (GIBSON et al., 1988; MOSER et al., 1989; MASIGA et al., 1992), die drei Subspezies *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* und *T. b. gambiense* können durch sie nicht unterschieden werden. Man benutzt sie vor allem zur epidemiologischen Untersuchung von Trypanosomen in Tsetse-Fliegen und Tieren, wenn es gilt *T. congolense*, *T. vivax* und *T. brucei* voneinander zu unterscheiden.

B.2.5.3.2 Die Restriktionsenzym-Analyse (RFLP)

Bei der Restriktionsenzym-Analyse (RFLP) wird das Genom an definierten Schnittstellen durch Restriktionsenzyme in kleinere DNA-Stücke geschnitten. Man unterscheidet 3 Typen von Restriktionsenzymen, wobei heute hauptsächlich Typ-II-Enzyme eingesetzt werden, die zu den Endonucleasen gehören (NICHOLL, 1994). Sie werden aus Bakterien gewonnen und schneiden den DNA-Strang sehr spezifisch. Die DNA-Stücke werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Diese vielen

unterschiedlich großen DNA-Sequenzen ergeben bestimmte Bandenmuster für jeden Trypanosomenstamm, welche miteinander verglichen werden können.

Die RFLP kann teilweise zur Identifizierung der Subspezies von *T. brucei* herangezogen werden. HIDE et al. (1994) gelingt es z.B. humaninfektiöse (*T. b. rhodesiense*) und nicht-humaninfektiöse Stämme eines bestimmten Gebietes durch RFLP-Analyse voneinander zu unterscheiden. PAINDAVOINE et al. (1989) können *T. b. gambiense* von nicht-gambiense Stämmen in Ost-Afrika durch RFLP-Analyse unterscheiden. Solche Ergebnisse gelten allerdings nur für ein Schlafkrankheitsgebiet, während es zwischen verschiedenen Gebieten große Unterschiede der RFLP-Bandenmuster gibt, die eine Subspezies-Differenzierung unmöglich machen.

B.2.5.3.3 Zufällig amplifizierte polymorphe DNA (RAPD)

Mit Hilfe der zufällig amplifizierten polymorphen DNA (RAPD)-PCR, die auch als willkürlich gestartete (arbitrarily primed; AP-) PCR bezeichnet wird, kann man zufällig ausgesuchte Spaltstücke des Genoms durch die PCR (B.2.5.3.1) vervielfältigen und im Anschluss gelelektrophoretisch auftrennen. Hier werden besonders kurzkettige Oligonukleotid-Primer eingesetzt, die sich unspezifisch an mehrere komplementäre Regionen der DNA binden können. Mit Hilfe der Polymerase entstehen dann viele unterschiedlich große DNA-Stücke, welche nach der Gelelektrophorese bestimmte Bandenmuster für jeden Trypanosomenstamm ergeben, sog. genetische Fingerabdrücke (NEWTON und GRAHAM, 1994).

Mit dieser Technik ist es möglich, *T. b. gambiense* von *T. b. rhodesiense* und *T. b. brucei* durch eine bei *T. b. gambiense* zusätzlich auftretende Bande zu unterscheiden (WAITUMBI und MURPHY, 1993; KANMOGNE et al., 1996; MELMS, 1996).

B.2.5.3.4 Die DNA-Proben-Hybridisierung

Mit Hilfe einer DNA-Proben-Hybridisierung lassen sich bestimmte DNA-Sequenzen im Genom identifizieren.

Die zu untersuchende DNA wird denaturiert und auf einer Nitrocellulose- oder Nylonmembran fixiert. Die DNA-Sequenz, welche als Sonde fungieren soll, wird gereinigt, ebenfalls denaturiert und radioaktiv markiert. Sonde und Membran werden zusammen in

einen Plastikbeutel gegeben, dieser geschlossen und die Hybridisierung mehrere Stunden lang bei 65-68°C durchgeführt. Dabei lagert sich die Sonde wiederum an komplementäre DNA-Sequenzen an. Überschüssiges Sondenmaterial wird anschließend ausgewaschen und der Grad der Hybridisierung durch Autoradiographie bestimmt (NICHOLL, 1994).

Durch DNA-Sondenhybridisierung kann *T. b. gambiense* durch ein spezifisches, einheitliches Bandenmuster von den sehr viel unterschiedlicheren *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* abgegrenzt werden (PAINDAVOINE et al., 1986; HIDE et al., 1991; SCHARES und MEHLITZ, 1996).

B.2.5.3.5 Die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) nach SCHWARTZ und CANTOR (1984) und VAN DER PLOEG et al. (1984b) ermöglicht es, statt einzelner Spaltstücke des Genoms die unbeschädigten Chromosomen im Agarosegel aufzutrennen.

Während der PFGE ändert das elektrische Feld periodisch seine Orientierung und wird pulsartig an- und abgestellt. Das bewirkt eine Streckung und permanente Neuorientierung der Chromosomen im Gel entlang des Gradienten und macht die Auftrennung dieser besonders großen Moleküle überhaupt erst möglich (CARLE et al., 1986). Die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA hängt dabei sowohl von der Molekülgröße als auch von der Pulszeit, also der Einwirkungsdauer des elektrischen Feldes ab. Um eine Bewegung des Moleküls im Gel zu erreichen, muss die Pulszeit länger sein als das Molekül an Zeit benötigt, um sich im Gel neu zu orientieren und zu strecken. Diese benötigte Zeit hängt wiederum von der Molekülgröße ab, d.h. große Moleküle brauchen länger. Daraus folgend hat jede Molekülgröße ihre charakteristische Beweglichkeit im Gel (SCHWARTZ und CANTOR, 1984; CARLE et al., 1986; VIOVY und DEFONTAINES, 1992). Ca. 60% der Trypanosomen-DNA bleibt jedoch in der Geltasche stecken (VAN DER PLOEG et al., 1984b). Diese besteht vorwiegend aus den Kinetoplast-Zirkeln, welche sich aufgrund ihrer Form nicht im Gel fortbewegen können (VAN DER PLOEG et al., 1989; MELVILLE et al., 1998).

Um in der PFGE untersucht werden zu können, müssen $2 - 4 \times 10^9$ Trypanosomen pro ml in Gelblöcke eingebettet werden. Anschließend wird die DNA durch Proteinase K-Verdau freigesetzt, d.h. Zellwände, Membranen, RNA und Proteine werden zu kleinen Teilen

verdaut, welche aus den Agaroseblöcken herausdiffundieren. Die großen, intakten DNA-Stücke bleiben in den Blöcken zurück (NOOLANDI und TURMEL, 1992a). 1/8 dieser Blöcke (d.h. ca. 10µg totale DNA) wird in je eine Tasche des Elektrophorese-Gels verbracht und der Elektrophoreselauf durchgeführt.

Die DNA-Banden können nach dem Färben des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und die für jeden Trypanosomen-Stamm charakteristischen Bandenmuster miteinander verglichen werden. Änderungen in der Genomstruktur auf Chromosomen-Ebene wirken sich direkt auf das Bandenmuster aus (SCHWARTZ und CANTOR, 1984).

Mit Hilfe der PFGE können ARBEIT et al. (1990) *Escherichia coli*-Isolate voneinander unterscheiden, die zuvor phenotypisch und mit den konventionellen molekularbiologischen Methoden nicht voneinander getrennt werden konnten, indem sie enzymverdaute Chromosomen-Riesenbruchstücke auftrennen. 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.

Im Hinblick auf die Anwendung der PFGE bei *Trypanosoma spp.* zeigen MAJIWA et al. (1985) z.B., dass *T. (Nannomonas) congolense* in zwei unterschiedliche Karyotyp-Gruppen eingeteilt werden können, welche morphologisch identisch sind, jedoch nicht mit gegenseitiger DNA kreuz-hybridisieren. WAITUMBI und YOUNG (1994) identifizieren mit Hilfe der PFGE Medikamenten-resistente *Trypanosoma evansi*-Stämme, die bei der kDNA-Analyse keine Unterschiede zeigten. Damit stellt die PFGE eine wichtige Methode zur Aufdeckung sogar erst kürzlich aufgetretener evolutionärer Unterschiede dar (ARBEIT et al., 1990).

Die Karyotypen verschiedener *T. brucei*-Isolate stellen sich höchst unterschiedlich dar (MELVILLE, 1997; ERSFELD et al., 1999), während die Bandenmuster von Blutstromformen und Prozyklischen, sowie verschiedener Antigenvarianten oder Klone desselben Trypanosomenstammes identisch sind (VAN DER PLOEG et al., 1984b und 1989). Untersuchungen belegen außerdem, dass in einem Gebiet zirkulierende Karyotypen über mehrere Jahre stabil bleiben (WAITUMBI und YOUNG, 1994).

Mit Hilfe der PFGE können Trypanosomenstämme anhand ihres Chromosomen-Bauplans verglichen (MELVILLE, 1997; MELVILLE et al., 1998 und 2000) und z.B. die Lage der Muster für die Vielfalt der Oberflächenantigene herausgefunden werden (VAN DER PLOEG et al., 1984b).

Bis jetzt konnten vier Mechanismen der Gel-elektrophoretischen Wanderung von Makromolekülen identifiziert werden: der Siebeffekt durch die Gel-Porengröße, die „reptation“-Bewegung, die Ausbildung von Schleifen im DNA-Strang und das „trapping“, das kurzzeitige Festhalten der DNA an einer Stelle des Gels. Dabei spielt der Siebeffekt bei Molekülen, deren Durchmesser sehr viel größer ist als die Porengröße des Gels, eine untergeordnete Rolle (VIOVY und DEFONTAINES, 1992).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden zwei verschiedene Elektrophorese-Modelle entwickelt, wobei man durch fluoreszierende Video-Mikroskopie herausfand, dass mit ansteigender Feldstärke, bzw. abnehmender Gelkonzentration die Ausbildung von Schleifen im DNA-Strang gefördert wird. Deswegen gilt für niedrige Feldstärken (1-3V/cm) eher das *Tube-Reptation*-Modell, für höhere Feldstärken dagegen das Computer-Simulations-Modell (VIVOY und DEFONTAINES, 1992).

Beim *Tube-Reptation*-Modell wird davon ausgegangen, dass DNA-Stränge sich nur um die eigene Achse drehen können und sich sozusagen in einer Röhre oder einem „primitiven Pfad“ linear durch die Poren des Gels fortbewegen (DE GENNES, 1971). Diese nahezu Größen-unabhängige, wurm- oder reptilartige Beweglichkeit („reptation“) setzt voraus, dass die Bewegung der DNA in die entgegengesetzte Richtung genauso schnell ist wie diejenige nach vorne (LALANDE et al., 1987). Interaktionen von DNA und Gel werden in diesem Modell allerdings nicht berücksichtigt, genauso wenig wie die räumliche Struktur der DNA. Dass diese physikalischen Interaktionen jedoch Moleküle größer als 300kbp beeinflussen, wiesen LALANDE et al. 1987 nach, indem sie zeigten, dass solche DNA-Moleküle für längere Zeit eine Beweglichkeit von 0 aufweisen können („trapping“) und so lange im Gel festgehalten werden, bis Erwärmung ihre Struktur verändert.

Um die räumliche Struktur der DNA und ihre Interaktionen mit dem Gel einzubeziehen, wurden verschiedene Computer-Simulations-Modelle entwickelt. Neben der elektrostatischen

Anziehungskraft und der Brown'schen Molekularbewegung werden auch Kräfte zwischen DNA-Strang und Gel-Partikeln berücksichtigt. In diesen Modellen wechselt der DNA-Strang von einer vollkommen gestreckten zu einer kompakten, aufgefalteten Form, da der Anfang des Stranges ständig mit Partikeln im Gel konfrontiert wird. Damit bewegt sich die DNA nicht linear, sondern eher Zickzack-artig im Gel vorwärts. Bleibt der Anfang des Stranges im Gel stecken („trapping“), so überholt ihn irgendwann das Ende, welches dann die Führung übernimmt, usw.. Dabei bilden sich U-förmige Schleifen oder sogar Knoten im DNA-Strang aus (DEUTSCH, 1992; VIOVY und DEFONTAINES, 1992).

Ausgehend vom ursprünglichen Aufbau nach SCHWARTZ und CANTOR (1984), die zwei quadratisch angeordnete Elektrodenpaare benutzen, zwischen denen die Spannung periodisch hin- und herwechselt und sich damit die Feldrichtung ständig ändert, wurden verschiedene Techniken entwickelt. Die Ergebnisse sind jedoch vergleichbar gut, da für eine Auftrennung von großen Molekülen nicht die Anordnung der Elektroden von Bedeutung ist, sondern eine der Anordnung zugrunde gelegte physikalische Symmetrie (CARLE et al., 1986; BIRREN et al., 1989). Man teilt die gängigen PFGE-Methoden anhand der Geometrie ihres elektrischen Feldes in zwei Klassen ein (NOOLANDI und TURMEL, 1992b). Bei der einen werden zwei transversale elektrische Felder erzeugt und diese abwechselnd angestellt, so dass die Molekül-Wanderung vom Winkel zwischen diesen beiden Feldern abhängt (Contour-clamped homogenes elektrisches Feld = CHEF; Programmierbare, mit autonom kontrollierten Elektroden versehene Gel-Elektrophorese = PACE; Orthogonale Feld-Änderungs-Gelelektrophorese = OFAGE; Rotierendes Feld während der Elektrophorese = ROFE; Transversale Feld-Änderungs-Elektrophorese = TAFE). Bei der anderen wird das unidirektionale elektrische Feld zeitweise umgekehrt (Feld-Inversions-Gelelektrophorese = FIGE; Unidirektionale Pulsfeld-Gelelektrophorese = ODPFGE; Null-integrierte Feld-Elektrophorese = ZIFE).

Bei der sog. zweidimensionalen PFGE wird nach dem ersten Lauf eine Bande aus dem Gel herausgeschnitten, in ein neues Gel transferiert und ein zweiter, eventuell anders ausgerichteter Lauf durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ROFE durchgeführt und im Folgenden als „PFGE“ bezeichnet. Dabei 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).

B.2.6 Analyse der Verwandtschaftsgrade

B.2.6.1 Die Cluster-Analyse

Um die evolutionäre Verwandtschaft von Organismen zu rekonstruieren wurden verschiedene Methoden entwickelt, denen jeweils unterschiedliche Berechnungsverfahren zugrunde liegen und die z.B. Merkmalskombinationen unterschiedlich gewichten. Man unterscheidet Suchmethoden, welche das optimale Vergleichs-Kriterium selbst bestimmen, von konstruktiven Methoden, welche bei der Berechnung einem zuvor definierten Algorithmus folgen (MORRISON, 1996). Einige Methoden bearbeiten die Daten-Matrix direkt, während man für andere Methoden die Beziehungen zwischen Objekt-Paaren (die sog. Distanzen oder Ähnlichkeiten; s. B.2.6.1.1) vorher berechnen muss. Am Ende jeder Berechnungs-Methode steht ein Diagramm in Form eines Stammbaumes, das Dendrogramm (s. B.2.6.1.3).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte „unweighted pair-group method using arithmetic averages“ (UPGMA; SNEATH und SOKAL, 1973) ist eine hierarchische Methode zur Analyse von Ähnlichkeitsdaten und Erstellung eines Baumdiagrammes (Dendrogrammes). Als Berechnungsgrundlage wurde der binäre Ähnlichkeitskoeffizient nach JACCARD (1908) benutzt.

B.2.6.1.1 Distanzen und Ähnlichkeiten

Die Distanz bezeichnet die Beziehung innerhalb eines Objekt-Paares. Haben Objekte den identischen Status für alle ihre Variablen, so ist ihre Distanz „0“, haben sie jedoch bei keiner der Variablen einen gleichen Status, so ist ihre Distanz unendlich groß (MORRISON, 1996).

Werden für die Analyse Enzyme oder Chromosomen als Variablen zugrundegelegt, so spricht man von genetischer Distanz. Sie spiegelt die Vielfalt in der genetischen Zusammensetzung von Organismengruppen auf derselben oder auf unterschiedlichen Organisationsstufen wieder. Als Ergebnis der Evolution resultiert sie aus Mutationen, Selektionen, Zufallsdrift und Migration (LANGSDORF, 1999). Die Daten aus Enzymelektrophoresen wurden schon bei vielen Organismen zur Bestimmung der genetischen Identität bzw. der genetischen Distanz benutzt. Diese statistische Auswertung ermöglicht eine ungefähre Schätzung, wie gleich oder unterschiedlich zwei Gruppen von Organismen sind, und bezieht den Grad der Verschiedenheit mit ein.

Das Gegenteil der Distanz ist die Ähnlichkeit, welche ebenfalls als Grundlage zur Berechnung der Beziehung eines Objekte-Paares benutzt werden kann. Haben Objekte den identischen Status für alle ihre Variablen, so ist ihre Ähnlichkeit „1“, haben sie jedoch bei keiner der Variablen einen gleichen Status, so ist ihre Ähnlichkeit „0“. Der Ähnlichkeits-Koeffizient nach JACCARD (1908) vergleicht 2 von insgesamt n Objekten anhand einer Anzahl von binären Variablen, wobei „0,0“-Variablen, die bei keinem der beiden Objekte vorkommen, nicht ins Gewicht fallen. Das heißt, dass für jedes Objekte-Paar nur die bei diesen Objekten tatsächlich vorhandenen Variablen verglichen werden.

Für jedes Probenpaar wird der JACCARD-Koeffizient berechnet: $J_{ij} = a/(a+b+c)$

Es ergeben sich also folgende Möglichkeiten:

	j = 1	j = 0
i = 1	a	b
i = 0	c	d

wobei i = Objekt i; i = 1, ..., n; j = Objekt j; j = 1, ..., n; i ≠ j

a = Anzahl der Banden, die bei beiden Stämmen vorkommen ("i = 1, j = 1")

b = Anzahl der Banden, die nur in Stamm i vorkommen ("i = 1, j = 0")

c = Anzahl der Banden, die nur in Stamm j vorkommen ("i = 0, j = 1")

n = Anzahl der untersuchten Objekte

PAINDAVOINE et al. (1986) wenden diesen Quotienten zur Erstellung eines Baumdiagrammes aus DNA-Hybridisierungs-Daten von *Trypanosoma brucei*-Stämmen an, genauso wie STEVENS et al. (1992 und 1994) zur Diagrammerstellung aus Isoenzym-Analyse-Daten von *T. brucei*-Stämmen, HIDE et al. (2000) aus RFLP-Daten von *Trypanosoma brucei*-Isolaten aus Tsetse-Fliegen und TOALDO et al. (2001) aus PFGE-Karyotypisierungs-Daten verschiedener *T. rangeli*-Stämme.

B.2.6.1.2 Die UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)

Die „unweighted pair-group method using arithmetic averages“ (UPGMA; SNEATH und SOKAL, 1973) ist eine hierarchische Methode zur Analyse von Ähnlichkeits-Daten und Erstellung eines Baumdiagrammes (Dendrogrammes). Die Objekte werden auf der Basis der abnehmenden Ähnlichkeiten zwischen den Objekt-Paaren (Clustern) gruppiert, beginnend mit dem Paar welches die größte Ähnlichkeit hat. Nach und nach werden dann weniger ähnliche Objekte bzw. Cluster hinzugefügt oder neue Gruppen gebildet. Das Baumdiagramm wird so konstruiert, dass die Ähnlichkeit zwischen zwei Objekten gleich der Astlänge der Objekte, bzw. die Ähnlichkeit zwischen zwei Gruppen die Summe der Astlängen der einbezogenen Objekte ist (MORRISON, 1996). Somit kann die Ähnlichkeit an der x-Achse abgelesen werden.

Die UPGMA nimmt an, dass genetische Veränderungen in einheitlichen Abständen auftreten, was den natürlichen Bedingungen zwar nicht genau entspricht, ihnen jedoch relativ nahe kommt (MORRISON, 1996). Vor allem wenn die Anzahl der Merkmale der zu untersuchenden Objekte groß ist, kann diese Methode das korrekte Baumdiagramm erstellen, wie SOURDIS und KRIMBAS (1987) durch Untersuchungen mit DNA-Sequenz-Daten herausgefunden haben. Im Vergleich mit anderen Methoden ermittelt UPGMA die zu erwartenden Astlängen des Baumdiagrammes am genauesten (NEI et al., 1983).

ENYARU et al. (1993b) und STEVENS et al. (1992 und 1994) wenden die UPGMA z.B. beim Vergleich von Trypanosomenstämmen anhand ihrer Isoenzym-Profile zur Erstellung eines Baumdiagrammes an, genauso wie TOALDO et al. (2001) zur Diagrammerstellung aus PFGE-Karyotypisierungs-Daten verschiedener *T. rangeli*-Stämme, oder LANGSDORF (1999) zur Analyse der genetischen Diversität von RAPD-Daten wildwachsender Futterpflanzen aus der Sahelzone.

B.2.6.1.3 Das Dendrogramm

Evolution kann als Baumdiagramm dargestellt werden. Dabei werden gleiche Eigenschaften verschiedener Organismen auf gemeinsame Vorfahren zurückgeführt. Individuen dieser Vorfahren machten während der Evolution Veränderungen ihrer Merkmale durch und bildeten eine neue Linie, die sich von der alten in einigen Merkmalen unterscheidet. Die Äste des Baumdiagramms repräsentieren die Organismen, ihre Verzweigungen die verwandtschaftlichen Beziehungen der Organismen untereinander.

Das Baumdiagramm, welches bei einer Cluster-Analyse entsteht, wird Dendrogramm genannt. Die zusammenlaufenden Äste verbinden darin hypothetisch verwandte Organismen zu Clustern. Auf der x-Achse wird der Ähnlichkeitskoeffizient aufgetragen und kann für jeden Cluster an der Höhe seiner Wurzel, dem Knotenpunkt der zusammenlaufenden Äste, abgelesen werden. Außerdem kann an der Verzweigungshäufigkeit der Äste die Anzahl der evolutionären Sprünge abgelesen werden (MORRISON, 1996).