

C MATERIAL UND METHODEN

C.1 Untersuchungsmaterial

C.1.1 Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet Mukono-County (Mukono-Distrikt) liegt im Süd-Osten Ugandas, wo sowohl die Nagana als auch die Rhodesiense-Schlafkrankheit endemisch sind (MBULAMBERI, 1998). Die letzte *Rhodesiense*-Epidemie herrschte dort von 1981 bis 1987 und es wurden insgesamt 493 Fälle im Mukono-Distrikt registriert (MBULAMBERI, 1989).

Der zwischen 0°05' bis 0°30' östlicher Länge und 32°39' bis 32°51' nördlicher Breite gelegene Mukono-County grenzt im Süden an den Viktoriasee. Westlich liegen der Mipigi-Distrikt, nördlich der Luwero-Distrikt und östlich die Counties Nakifuma und Buikwe des Mukono-Distriktes. Er umfasst eine Fläche von 1.600km² und unterteilt sich in 6 Sub-Counties und 35 Parishes (Gemeinden). Der Mukono-County liegt zwischen 1.168 und 1.219m über dem Meeresspiegel und zeichnet sich durch ein gemäßigtes Klima aus, ohne ausgeprägte Regen- und Trockenzeiten. Die jährliche Niederschlagsmenge betrug nach Angaben der Wetterstation der Sugar Corporation of Uganda Ltd. im Durchschnitt der Jahre 1986-1995 1.506mm (PÖTZSCH, 1999), wobei der Hauptregen vor allem in den Monaten März bis Mai und September bis November fällt.

Der Mukono-County gehört zu den weiten Kulturlandschaften im Süden und Westen Ugandas. Durch seine Fruchtbarkeit ist das Gebiet relativ dicht besiedelt und ermöglicht eine intensive Landwirtschaft, die den größten Anteil der wirtschaftlichen Aktivitäten ausmacht. Von besonderer Bedeutung ist die Milchviehhaltung, die ungefähr 1/3 der ugandischen Milchproduktion abdeckt und für über ¾ der Farmen die wichtigste Einkommensquelle darstellt. Je nach Größe der Farm werden ein bis zwei, manchmal jedoch sogar über 100 Milchrinder gehalten (PÖTZSCH, 1999). Daneben werden Nahrungspflanzen (Bananen, Kassava, Süßkartoffeln, Bohnen, Mais, Yams, Hirse, Soja, Sesam), Gemüse und Obst (Tomaten, Zwiebeln, Kohl, Ananas, Vanille, Passionsfrüchte, Mangos), sowie Kaffee, Zuckerrohr und Tee angebaut. Die Nahrungsgrundlage der Einwohner ist der Kochbananenbrei (*Matooke*).

In Bulutwe, einem am Viktoriasee gelegenen Dorf im Ngogwe Sub-County, Mukono County wurde im November 1990 eine epidemiologische Langzeit-Studie zur Übertragung von Schlafkrankheit und Nagana durchgeführt. Um Strategien zur Kontrolle der Schlafkrankheit entwickeln zu können, wurden zunächst Informationen über die saisonale Dichte und Wirts-Präferenz des dort vorkommenden Vektors *Glossina fuscipes fuscipes* gesammelt. Die Fliegendichte (*apparent density*, AD) variierte zwischen 4,4 Fliegen/Tag/Falle nach der Trockenzeit und 13,8 Fliegen/Tag/Falle nach der Regenzeit. Die Infektionsrate von Fliegen mit *Trypanozoon*, *Nannomonas* und *Duttonella* war 4,6%, wovon 0,2% als reife *Trypanozoon*-Infektionen identifiziert wurden (NOWAK et al., 1992). Von 165 Blutmahlzeiten waren 46,7% von Hausschweinen, 20% von Reptilien, 10,9% von Menschen, 8,5% von Boviden und 13,5% von anderen Tieren. Die mit Hilfe der mAECT (mini Anion exchange Centrifugation Technique) durchgeführten Untersuchungen von Menschen und Tieren auf Parasitämien ergaben, dass 52,8% der Hausschweine (160/303), 33,5% der Rinder (123/367), 9,5% der Hunde (4/42), 1% der Ziegen (1/105) und 0,7% der Menschen (3/413) *Trypanozoon*-Infektionen aufwiesen (NOWAK et al., 1992). 7,2% der Trypanosomen-Isolate von Rindern und 8,8% derjenigen von Schweinen erwiesen sich bei insgesamt 176 im Blut-Inkubations-Infektiositätstest (BIIT, siehe B.2.5.1.1) untersuchten Isolaten als Humanserum-resistent und damit potentiell infektiös für den Menschen (LAQUA et al., 1992). Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wurde geschlossen, dass das Infektionsrisiko der Menschen mit von Haustieren übertragenen Trypanosomen zum Zeitpunkt der Untersuchungen bedenklich hoch war (MEHLITZ, 1992).

Im April 1992 wurde Bulutwe in das National Sleeping Sickness Control Programme (NSSCP) integriert. Dieses Programm wurde von der Regierung Ugandas in Zusammenarbeit mit der Europäischen Union (EU) und der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) initiiert. Das NSSCP verfolgte sowohl die Vektor-Kontrolle, als auch die Überwachung von Bevölkerung und Tierreservoir. Insektizid-imprägnierte Fliegenfallen wurden im und um das Dorf installiert und parasitologisch positive Tiere mit Trypanoziden behandelt (Kakaire et al., 1993).

Ein Jahr nach Beginn oben genannter Kontrollmaßnahmen wurden zur Untersuchung ihrer Effektivität die Trypanosomen-Prävalenzen in Menschen und in Tieren mit den drei Subgenera *Trypanozoon*, *Nannomonas* und *Duttonella*, sowie die Infektionsraten des Vektors (*Glossina fuscipes fuscipes*) bestimmt. Die *apparent density* (AD) der Tsetse-Fliegen-Population sank im Bekämpfungsgebiet auf 0,16 Fliegen/Falle/Tag, was verglichen mit

Untersuchungen zu Beginn der Maßnahmen einen Rückgang um 97,9% bedeutete (KAKAIRE et al., 1993). Die Prävalenz von Trypanozoon-Infektionen in Rindern sank von 34,9% auf 9,1%, diejenige in Schweinen sank von 47,8% auf 8,2% (KAKAIRE et al., 1993).

Neue Schlafkrankheits-Fälle wurden in Bulutwe nach Einsatz der Kontrollmaßnahmen nicht gemeldet. Zusätzlich wurde die Prävalenz humaninfektöser Trypanosomen in Schweinen und Rindern seit Beginn der Kontrollmaßnahmen ermittelt. Von den 18 parasitologisch positiven Schweinen war nur ein Stamm im BIIT humanserumresistent. Die *Trypanozoon*-Stämme der 9 parasitologisch positiven Rinder und des positiven Hundes verhielten sich im BIIT sensitiv gegenüber Humanserum (LAQUA et al., 1992).

In jeder dieser Untersuchungsphasen wurden Trypanosomenstabilate aus Menschen und Haustieren gewonnen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stabilate aus Schlafkrankheitspatienten wurden im Zeitraum Februar 1990 bis April 1991 gesammelt, die Tierstabilate stammen aus dem Zeitraum März 1991 bis Juli 1992.

C.1.2 Herkunft der Feldisolate

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tierisolate (Tabelle C.1) stammen aus dem Dorf Bulutwe (Mukono-Distrikt), Süd-Ost-Uganda. Sie können aufgrund ihrer Morphologie und ihres Verhaltens in Labormäusen der Spezies *Trypanosoma brucei* zugeordnet werden.

Der Schweine- und Rinder-Bestand des Dorfes wurde von März 1991 bis April 1993 in vierteljährlichem Abstand parasitologisch auf Trypanosomen untersucht (LAQUA et al., 1992). Von Tieren, die bei mehr als einem Untersuchungstermin (trotz Behandlung mit 7,0mg/kg KGW Diminazenazeturat i.m. nach jeder Untersuchung mit positivem Befund) Trypanosomen-Infektionen aufwiesen, wurden Blutstabilate hergestellt. Einige konnten in Berlin in *Mastomys coucha* angezüchtet und weitere Stabilate aus hoch parasitärem Mäuseblut hergestellt werden. Die Isolate Nr. 83/9 und 319/7 wurden zusätzlich mehrmals geklont, das heißt ein einziger Trypanosom isoliert und in einer Maus angezüchtet. Aus der sich entwickelnden Parasitämie wurden ebenfalls Stabilate hergestellt (PELLMANN, 1999). 18 der Mäuseblut-Stabilate und 7 dieser Klone wurden in der vorliegenden Untersuchung verwendet.

Im Feld wurden bereits 20 der Stabilate (13 Isolate + 7 Klone) mittels BIIT auf ihre Humanserumresistenz untersucht, wobei sich 5 davon sensitiv, 9 subresistent und 6 resistent verhielten (MANGENI, 1994; TIETJEN, persönliche Auskunft).

Zu diesen 18 Tierisolaten wurden außerdem vier aus Rhodesiense-Schlafkrankheitspatienten isolierte Trypanosomenstämme zur Untersuchung hinzugezogen. Drei davon (H1, H2 und H5) stammen ebenfalls aus Bulutwe und wurden im Zeitraum von 1990 bis 1991 isoliert. Sie wurden als Menschenblut-Stabilate eingefroren und erst im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen in Labormäusen angezüchtet. Der vierte Stamm (2602 „Babalande“) wurde 1990 in Kapyanga (Bukoli County) isoliert, welches im östlich an den Mukono-Distrikt angrenzenden Iganga-Distrikt Ugandas liegt. Er wurde 1992 in Labormäusen angezüchtet und als Mäuseblut-Stabilat eingefroren. Im BIIT verhielt er sich resistent (TIETJEN, persönliche Auskunft).

Tabelle C.1

Herkunft der Feldstabilate und BIIT-Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen

Stamm	Herkunft	Isolierung	Isoliert aus	BIIT
SUS/BU 83/6	Bulutwe, Mukono	Mär. 1992	Schwein 83	sensitiv [°]
SUS/BU 83/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Schwein 83	sensitiv [°]
SUS/BU 83/9	Bulutwe, Mukono	Jul. 1992	Schwein 83	n.d.
SUS/BU 83/9 Cl.1	Klon von BU 83/9	s.o.	s.o.	subresistent*
SUS/BU 83/9 Cl.2	Klon von BU 83/9	s.o.	s.o.	sensitiv*
SUS/BU 83/9 Cl.4	Klon von BU 83/9	s.o.	s.o.	subresistent*
SUS/BU 83/9 Cl.5	Klon von BU 83/9	s.o.	s.o.	subresistent*
SUS/BU 132/2	Bulutwe, Mukono	Mär. 1991	Schwein 132	n.d.
SUS/BU 132/4	Bulutwe, Mukono	Aug. 1991	Schwein 132	n.d.
SUS/BU 139/2	Bulutwe, Mukono	Mär. 1991	Schwein 139	resistent*
SUS/BU 169/4	Bulutwe, Mukono	Aug. 1991	Schwein 169	sensitiv [°]
SUS/BU 319/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Schwein 319	subres.* /sens. [°]
SUS/BU 319/7 Cl.1	Klon von BU 319/7	s.o.	s.o.	sensitiv*
SUS/BU 319/7 Cl.2	Klon von BU 319/7	s.o.	s.o.	subresistent*
SUS/BU 319/7 Cl.3	Klon von BU 319/7	s.o.	s.o.	subresistent*
SUS/BU 319/9	Bulutwe, Mukono	Jul. 1992	Schwein 319	sensitiv [°]
SUS/BU 347/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Schwein 347	resistent [°]
SUS/BU 373/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Schwein 373	resistent [°]
SUS/BU 561/3	Bulutwe, Mukono	Jun. 1991	Schwein 561	subres.* /sens. [°]
SUS/BU 932/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Schwein 932	subresistent*
BOT/BU 483/2	Bulutwe, Mukono	Mär. 1991	Rind 483	subresistent*
BOT/BU 492/2	Bulutwe, Mukono	Mär. 1991	Rind 492	n.d.
BOT/BU 602/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Rind 602	subres.* /res. [°]
BOT/BU 623/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Rind 623	resistent [°]
BOT/BU 1845/7	Bulutwe, Mukono	Apr. 1992	Rind 1845	resistent [°]
HOM/BU H1	Bulutwe, Mukono	Nov. 1990	Mensch	n.d.
HOM/BU H2	Bulutwe, Mukono	Nov. 1990	Mensch	n.d.
HOM/BU H5	Bulutwe, Mukono	Apr. 1991	Mensch	n.d.
HOM/IG 2602	Kapyanga, Iganga	Feb. 1990	Mensch	resistent [°]

BIIT: Blutinkubations-Infektiositätstest (modifiziert nach HAWKING, 1973)

SUS: Sus (Hausschwein); BOT: Bos taurus (Rind); HOM: Homo sapiens (Mensch) (WHO, 1986)

s.o.: siehe oben; n.d.: nicht durchgeführt

sens.: sensitiv; res.: resistent; subres.: subresistent

* MANGENI, 1994 ° TIETJEN, persönliche Auskunft

C.1.3 Herkunft der Referenzstämme und –klone

Als Referenzen wurden fünf Stämme der Subspezies *Trypanosoma brucei brucei*, neun Stämme der Subspezies *T. b. gambiense* und zwei Stämme der Subspezies *T. b. rhodesiense* zur Untersuchung hinzugezogen (Tabelle C.2).

T. b. brucei:

Cl. 8/18 ist ein Klon von TREU 1397, welcher 1962 aus einem natürlich infizierten Schwein in Nsukka, Nigeria isoliert wurde (KILLICK-KENDRICK und GODFREY, 1963). Wiederholt auf sein Verhalten gegenüber Humanserum getestet, erwies er sich im Freiwilligenversuch als nicht infektiös (GODFREY und KILLICK-KENDRICK, 1967), bzw. im Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT, siehe B.2.5.1.1) und Humanserum-Resistenztest (HSRT, siehe B.2.5.1.2) als sensitiv (HAWKING, 1976b; GIBSON et al., 1978; TAIT et al., 1984; FEDDERSEN, 1988). Isoenzymelektrophoretisch (siehe B.2.5.2.1) (BAGSTER und PARR, 1973; GODFREY und KILGOUR, 1976; GIBSON et al., 1980; KITTLAUSZ, 1982; TAIT et al., 1984; FEDDERSEN, 1988; GODFREY et al., 1990; STEVENS et al., 1992; MELMS, 1996) und mittels zufällig amplifizierter polymorpher DNA (RAPD-PCR, siehe B.2.5.3.5) bzw. DNA-Proben-Hybridisierung (siehe B.2.5.3.4) (MELMS, 1996) wurde der Klon als „nicht-gambiense“ eingestuft.

CP 2469 wurde 1985 aus einer Kuh in Hakaka, Soakow-Distrikt, Somalia isoliert (KAMINSKY et al., 1993).

Der pleomorphe Stamm **CP 547** wurde 1985 aus einer natürlich infizierten Kuh in Jilib, Somalia, isoliert (KAMINSKY und ZWEYGARTH, 1989).

Klon **ILTat 1.4** ist eine Antigenvariante eines monomorphen Klons von EATRO 795. Dieser Stamm wurde 1964 aus einem Stier in Uhembo, Kenia isoliert (MILLER und TURNER, 1981). Er verhielt sich im BIIT und HSRT wiederholt sensitiv (RICKMANN und ROBSON, 1970b; HAWKING 1976a/b) und wurde mittels der Restriktions-Enzym-Analyse (RFLP, siehe B.2.5.3.2) und DNA-Proben-Hybridisierung als „nicht-gambiense“ eingestuft (PAINDAVOINE et al.; 1986).

STIB 345 RA wurde 1969 in Kiboko, Kenia aus einer Tsetse-Fliege isoliert. Der Stamm wurde zunächst als EATRO 1529 bei der East African Trypanosomiasis Research Organisation registriert, später dann im Schweizerischen Tropeninstitut Basel umbenannt in

STIB 345 (KAMINSKY, persönliche Auskunft). In Kiboko und in einem Umkreis von 200km sind noch nie Fälle von Schlafkrankheit aufgetreten (GIBSON et al., 1980; HIDE et al., 2000; OLOO, persönliche Auskunft).

T. b. gambiense:

DAL 69 wurde 1978 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Koetinga, Elfenbeinküste isoliert (STEVENS et al., 1992). Er verhielt sich im BIIT und im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels RFLP, RAPD-PCR und DNA-Proben-Hybridisierung als „*gambiense*“ eingestuft (MEHLITZ et al., 1982; MEHLITZ, 1985; PAINDAVOINE et al., 1986 und 1989; RICHNER-JAISLI, 1987; GODFREY et al., 1990; STEVENS et al., 1992; ENYARU et al., 1993a; MELMS, 1996).

DAL 72 Cl. A ist ein Klon von DAL 72, welcher 1978 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Vavoua, Elfenbeinküste isoliert wurde (STEVENS et al., 1992). Er verhielt sich im BIIT und im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch als „*gambiense*“ eingestuft (MEHLITZ et al., 1982; MEHLITZ, 1985; GODFREY et al., 1990; STEVENS et al., 1992).

TH 152 wurde 1978 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Carrefour, Elfenbeinküste isoliert (RICHNER-JAISLI, 1987). Er verhielt sich im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels RAPD-PCR und DNA-Proben-Hybridisierung als „*gambiense*“ eingestuft (RICHNER-JAISLI, 1987; MELMS, 1996).

H1 CI wurde 1978 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Koudougou, Elfenbeinküste isoliert (RICHNER-JAISLI, 1987). Er verhielt sich im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels DNA-Proben-Hybridisierung als „*gambiense*“ eingestuft (RICHNER-JAISLI, 1987).

G. DOLO wurde 1980 aus einem Schlafkrankheitspatienten namens Gamey Dolo in Gbao, Liberia isoliert (RICHNER-JAISLI, 1987). Er verhielt sich im BIIT und im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels RFLP, RAPD-PCR und DNA-Proben-Hybridisierung als „*gambiense*“ eingestuft (MEHLITZ, 1985; PAINDAVOINE et al., 1986 und 1989; RICHNER-JAISLI, 1987; FEDDERSEN, 1988; MELMS, 1996).

DAL 487 Cl. A ist ein Klon von DAL 487, welcher 1982 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Bieguhé, Elfenbeinküste isoliert wurde (PAINDAVOINE et al.,

1986). Er verhielt sich im BIIT und im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels RFLP bzw. DNA-Proben-Hybridisierung als „gambiense“ eingestuft (PAINDAVOINE et al., 1986; GODFREY et al., 1987 und 1990; FEDDERSEN, 1988).

A0 83 wurde 1982 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Kouassi-Perita, Elfenbeinküste isoliert (PAINDAVOINE et al., 1986). Er verhielt sich im HSRT wiederholt resistent und wurde isoenzymelektrophoretisch und mittels RFLP bzw. DNA-Proben-Hybridisierung als „gambiense“ eingestuft (PAINDAVOINE et al., 1986 und 1989; GODFREY et al., 1987 und 1990; STEVENS et al., 1992).

H1 ZR wurde 1989 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Leimba, Zaire isoliert (TIETJEN, persönliche Auskunft).

H2 ZR wurde ebenfalls 1989 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Leimba, Zaire isoliert (TIETJEN, persönliche Auskunft).

T. b. rhodesiense:

EATRO 174 wurde 1959 aus einem Schlafkrankheitspatienten in Busoga, Uganda isoliert (STEVENS et al., 1992) und auch als LUMP 1196 registriert (GIBSON et al., 1980). Er wurde isoenzymelektrophoretisch als „nicht-gambiense“ eingestuft (GIBSON et al., 1980; GODFREY et al., 1990; STEVENS et al., 1992).

STIB 704 wurde 1982 am St. Francis Hospital in Ifakara, Tansania aus einem Schlafkrankheitspatienten isoliert (PAINDAVOINE et al., 1986; MELMS, 1996). Er verhielt sich im HSRT resistent und wurde mittels Isoenzym-Elektrophorese, RFLP, RAPD-PCR und DNA-Proben-Hybridisierung als „nicht-gambiense“ eingestuft (PAINDAVOINE et al., 1986 und 1989; RICHNER-JAISLI, 1987; MELMS, 1996).

Tabelle C.2

Herkunft der Referenzstämme und –klone und Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen

Referenz-Stamm bzw. -Klon	Mutter-Stamm	Herkunft	Jahr	Isoliert aus	BIIT	HSRT	Isoenzym-Muster	RFLP* / RAPD-PCR [^] / Hybr. ^o
<i>T. b. brucei:</i> Cl. 8/18 CP 2469 CP 547 ILTat 1.4 Cl. STIB 345 RA	TREU 1397 EATRO 795 EATRO 1529	Nigeria Somalia Somalia Kenia Kenia	1962 1985 1985 1964 1969	Schwein Rind Rind Rind Tsetse-Fliege	sens. ^{6,8,15} sens. ¹	sens. ^{5,10,15,20} sens. ^{4,5}	nicht-gamb. ^{2,3,7,8,10,15,17,19}	nicht-gamb. ^{^/o20} nicht-gamb. ^{*/o12}
<i>T. b. gambiense:</i> DAL 69 DAL 72 Cl. A TH 152 H1 Cl G. DOLO DAL 487 Cl. A A0 83 H1 ZR H2 ZR	DAL 72 DAL 487	Elfenbeinküste Elfenbeinküste Elfenbeinküste Elfenbeinküste Liberia Elfenbeinküste Elfenbeinküste Zaire* Zaire*	1978 1978 1978 1978 1980 1982 1982 1989 1989	Mensch Mensch Mensch Mensch Mensch Mensch Mensch Mensch Mensch	res. ¹¹ res. ¹¹ res. ^{11,15} res. ¹⁵	res. ^{9,12,14,20} res. ⁹ res. ^{14,20} res. ¹⁴ res. ^{12,14,15,20} res. ^{12,15} res. ¹²	<i>gamb.</i> ^{9,11,14,17,19,21} <i>gamb.</i> ^{9,11,17,19} <i>gamb.</i> ¹⁴ <i>gamb.</i> ¹⁴ <i>gamb.</i> ^{11,14,15} <i>gamb.</i> ^{13,15,17} <i>gamb.</i> ^{13,17,19}	<i>gamb.</i> ^{*/^/o12,14,16,20} <i>gamb.</i> ^{^/o14,20} <i>gamb.</i> ^{o14} <i>gamb.</i> ^{*/^/o12,14,16,20} <i>gamb.</i> ^{*/o12} <i>gamb.</i> ^{*/o12,16}
<i>T. b. rhodesiense:</i> EATRO 174 STIB 704	LUMP 1196	Uganda Tansania	1959 1982	Mensch Mensch		res. ^{14,20}	nicht-gamb. ^{7,17,19} nicht-gamb. ¹⁴	nicht-gamb. ^{*/^/o12,14,16,20}

BIIT: Blutinkubations-Infektiositätstest

HSRT: Humanserum-Resistenztest

RFLP: Restriktionsenzym-Analyse

RAPD-PCR: zufällig amplifizierte polymorphe DNA

Hybr.: DNA-Proben-Hybridisierung

sens.: sensitiv

res.: resistent

gamb.: *gambiense*

*Zaire: heute Demokratische Republik Kongo

Referenzen der Tabelle C.2:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1 RICKMANN & ROBSON (1970b) | 2 BAGSTER & PARR (1973) |
| 3 GODFREY & KILGOUR (1976) | 4 HAWKING (1976a) |
| 5 HAWKING (1976b) | 6 GIBSON et al. (1978) |
| 7 GIBSON et al. (1980) | 8 KITTLAUSZ (1982) |
| 9 MEHLITZ et al.(1982) | 10 TAIT et al. (1984) |
| 11 MEHLITZ (1985) | 12 PAINDAVOINE et al. (1986) |
| 13 GODFREY et al. (1987) | 14 RICHNER-JAISLI (1987) |
| 15 FEDDERSEN (1988) | 16 PAINDAVOINE et al. (1989) |
| 17 GODFREY et al. (1990) | 18 HIDE et al. (1991) |
| 19 STEVENS et al. (1992) | 20 MELMS (1996) |
| 21 ENYARU et al. (1993a) | |

C.2 *In vivo*-Kultivierung von Trypanosomen

C.2.1 Versuchstiere

Zur Vermehrung und Anreicherung der Trypanosomen wurden 6-11 Wochen alte *Mastomys coucha* (Afrikanische Vielzitzenmaus, rotäugige Variante) beiderlei Geschlechts aus der institutseigenen Zucht eingesetzt (MEHLITZ, 1978; BRUN und JENNI, 1983; KRUPPA et al., 1990). Diese geht auf eine Zuchtlinie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg zurück.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von durchschnittlich 60% in Makrolonkäfigen mit Einstreu für Labornager gehalten. Sie erhielten pelletiertes Standardfutter und Wasser ad libitum.

Infiziert wurden sie durch intraperitoneale Injektion von Trypanosomen.

(Versuchstiergenehmigung: Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, Reg 0001/99; Genehmigung vom 02.03.1999).

C.2.2 Parasitologische Untersuchungsmethoden

Mit Trypanosomen infizierte Mäuse wurden täglich auf die Höhe ihrer Parasitämie untersucht. Dies geschah sowohl mittels der Hämatokrit-Zentrifugations-Technik als auch durch Anfertigung eines Nativpräparates. Für die Untersuchung entnahm man der Maus Schwanzblut, welches nach Abschneiden der äußersten Schwanzspitze gewonnen wurde.

C.2.2.1 Hämatokrit-Zentrifugations-Technik (HCT)

Die Hämatokrit-Zentrifugations-Technik nach WOO (1970), modifiziert nach WALKER (1972) und Mehlitz (1978), ermöglicht die Feststellung bereits schwacher Parasitämien ab 5×10^2 Trypanosomen pro ml Blut (WHO, 1986). Damit ist sie sehr viel sensitiver als das Nativpräparat (s.u.).

Eine heparinisierte Hämatokritkapillare (60µl Volumen) wurde zu 1/3 mit Walker-Lösung gefüllt. Dort hinein gab man 4-5 Tropfen Schwanzblut, verschloß die Kapillare einseitig mit Versiegelungskitt und zentrifugierte sie anschließend für mindestens 8min bei 10.000g in einer Hämatokrit-Zentrifuge. Danach wurde die Kapillare in eine Vertiefung einer Neubauer-Zählkammer gelegt, mit Immersionsöl bedeckt und unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Spitzobjektiv 40/0,85 Öl) die Grenze zwischen rotem Blutzellsediment und Plasmasäule untersucht. Bei der HCT reichern sich die Trypanosomen in diesem Gebiet an.

Um möglichst alle Trypanosomen zu erfassen, wurde die Kapillare nach dem ersten Durchmustern um ca. 180° rotiert und dann noch ein zweites Mal durchgemustert. Die Höhe der Parasitämie wurde in Anzahl der Trypanosomen pro Kapillare angegeben.

C.2.2.2 Nativpräparat

Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Schwanzblut verbracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter dem Mikroskop musterte man bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10x, Objektiv F 40/0,65) maximal 20 Gesichtsfelder durch und gab die Höhe der Parasitämie in Trypanosomen pro Gesichtsfeld (Tryp/F) an, wobei 1Tryp/F ca. $1,5 \times 10^6$ Trypanosomen pro ml Blut entspricht (KITTLAUSZ, 1982).

C.2.3 Trypanosomen-Vermehrung, -Anreicherung und -Isolierung

C.2.3.1 Tierpassagen

Ein Stabilat wurde zügig im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und langsam, tropfenweise, mit ca. 1ml Medium verdünnt. Diese Lösung wurde in eine Spritze aufgenommen und 4 Mäuse mit jeweils höchstens 0,3ml der Suspension intraperitoneal injiziert.

Die Mäuse wurden täglich ab dem dritten Tag *post infectionem* (*p.i.*) mit der HCT (C.2.2.1) und im Nativpräparat (C.2.2.2) parasitologisch untersucht. In der ansteigenden Phase der ersten Parasitämiewelle wurden wenige Tropfen Schwanz- oder Herzblut in eine mit 1ml Medium gefüllte Spritze aufgenommen, gut vermischt und damit weitere Mäuse infiziert.

Durch schnell aufeinander folgende wiederholte Passagen kann die Virulenz der Trypanosomen und damit auch die Höhe der ersten Parasitämiewelle in der Maus gesteigert werden.

Die Anzahl der durchgeführten Passagen war damit abhängig von der Höhe der erreichten Parasitämien. Um eine *in vitro*-Trypanosomen-Kultur erfolgreich initiieren zu können, benötigte man eine Dichte von mindestens 10^6 Trypanosomen pro ml Mäuseblut.

C.2.3.1.1 Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)

Da *T. b. rhodesiense* nach mehreren Passagen durch Labortiere ihre Humanserumresistenz verlieren können (siehe B.2.3.3), wurden bei einigen ausgewählten Stämmen Mauspassagen zusammen mit Humanserum (HS) durchgeführt (HAWKING, 1976a/b). Nach RICKMAN und ROBSON (1972) und HAWKING (1973) ist diese Vorgehensweise als Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT) interpretierbar.

Das Infektionsmaterial wurde auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilt und dem verdünnenden Medium einmal 20% Humanserum und einmal 20% Pferdeserum (PS) zugesetzt. Beide Röhrchen wurden 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 Mäuse mit der gleichen Menge (0,3ml) an Trypanosomensuspension mit HS infiziert (= Testgruppe), während weitere 4 Mäuse mit der identischen Menge an Trypanosomensuspension mit PS infiziert wurden (= Kontrollgruppe). Test- und Kontrollgruppe wurden in getrennten Käfigen gehalten und 14 Tage lang täglich mittels HCT und Nativpräparat auf die Höhe ihrer

Parasitämie untersucht. Für die Auswertung wurden Kontroll- und Testgruppe miteinander verglichen und nach HAWKING (1976a) interpretiert.

Als humanserumresistent wurden solche Stämme bezeichnet, die sowohl bei den Mäusen der Test- als auch der Kontrollgruppe nach annähernd identischer Präpatenzzeit eine Parasitämie hervorriefen. Humanserumsensible Stämme erzeugten bei der Testgruppe keine Parasitämie, während subresistente Stämme bei der Testgruppe erst nach verlängerter Präpatenzzeit (ca. 10 Tage) eine Parasitämie hervorriefen.

C.2.3.2 Isolierung der Trypanosomen aus Mäuseblut

In der ansteigenden Phase der ersten Parasitämiewelle einer infizierten Maus wurde ihr Schwanz desinfiziert, die äußerste Spitze abgeschnitten, mit einer sterilen Pipette wenige Tropfen Schwanzblut vorsichtig aufgenommen und in ein mit ca. 4ml Medium gefülltes Zentrifugenröhrchen gegeben.

Wollte man Blutstromformen kultivieren, so wählte man als Medium zur Isolierung Iscove's Medium modifiziert nach Baltz (IMB) bzw. Minimum Essential Medium (MEM), jeweils mit einem 20-30%igen Serumanteil. Wollte man dagegen die isolierten Trypanosomen in prozyklische Formen umwandeln, so wählte man Culture Medium for Procyclics (CMP) als Medium.

Bei einer geringen Dichte der Trypanosomen im Schwanzblut ($<10^6$ Trypanosomen/ml) gewann man Blut durch sterile Herzpunktion unter Zugabe von 0,1ml Antikoagulans (ca. 2IU Heparin), da sich während der ansteigenden Phase der Parasitämiewelle Trypanosomen der Subspezies *T. brucei* vor allem im zentralen Blut anreichern. Das Herzblut wurde ebenfalls tropfenweise in ein Medium enthaltendes Zentrifugenröhrchen überführt (s.o.).

Zur Isolierung der Trypanosomen wurde eine sogenannte 150g-Isolierung durchgeführt, d.h. die Suspension wurde zunächst 20min bei 150g (900U/min) zentrifugiert. Dadurch setzten sich die schwereren zellulären Blutbestandteile am Boden des Röhrchens ab und das überstehende trypanosomenhaltige Medium konnte mittels einer Spritze vorsichtig aufgenommen werden. Diese Suspension wurde dann in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals, allerdings 10min bei 250g (1.200U/min), zentrifugiert. Nun reicherten sich die Parasiten am Boden an und das überstehende Medium wurde bis auf 1ml mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Trypanosomen mit der

Spritze aufgemischt, aufgenommen und auf einen vorbereiteten Zellrasen (siehe C.3.1.4 bzw. C.3.2.1) aufgegeben.

C.2.3.3 Stabilatherstellung

Stabilate konnten entweder aus trypanosomenhaltigem Blut oder Kulturformen enthaltendem Medium hergestellt werden. Dieses Blut bzw. Medium wurde 1:1 mit Einfrierlösung gemischt, welcher zuvor 1/3 Foetales Bovines Serum (FBS) zugegeben worden war (dies erhöht die Überlebensfähigkeit der Trypanosomen). Die Mischung wurde in 1ml-Kryoröhrchen (Nalgene[®]) gegeben und mit Hilfe einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox (Nalgene[®]) über Nacht in einer Tiefkühltruhe (-80°C) tiefgefroren. Am nächsten Tag wurden die Stabilate in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert.

C.3 In vitro-Kultivierung von Trypanosomen

C.3.1 In vitro-Kultivierung von Blutstromformen

Voraussetzung für die Durchführung des Humanserum-Resistenztests (HSRT) war die Kultivierung der Blutstromform-Trypanosomen *in vitro*.

Als Zellrasen diente eine Primärzelllinie von *Microtus* Embryofibroblasten-ähnlichen Zellen (MEF-Zellen), welche von 15 Tage alten *Microtus montanus*-Embryonen isoliert wurden.

Diese sogenannten Nährzellen unterstützen das Wachstum von *T. brucei*-Blutstromformen in Kultur und erhalten ihre Infektiösität für Versuchstiere über längere Zeiträume.

C.3.1.1 Auftauen und Anzuchten der MEF-Zellen

Die in Flüssigstickstoff aufbewahrten MEF-Zellstabilate (Volumen ca. 1ml) wurden zügig im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und mit Hilfe einer Spritze in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Darauf wurde tropfenweise langsam 4ml MEM mit 10% FBS gegeben und die Zellsuspension anschließend 10min bei 200g (1.100U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe bis auf 1ml entfernt und die Zellen in 2ml frischem Medium resuspendiert. In einer T-25 Zellkulturflasche wurde 1ml MEM mit 10% FBS vorgelegt und dann die Zellsuspension dazugegeben. Optimal war eine Einsaat von ca. 1×10^6 Zellen. Die Zellkulturflaschen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer

Luftfeuchtigkeit inkubiert und zur Belüftung der Schraubverschluß der Flaschen um $\frac{1}{4}$ Drehung geöffnet. Nach ca. 36h hatte sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet.

C.3.1.2 Erhaltung der Zellkultur

Zur Erhaltung der Zellkultur mußte alle 3-4 Tage das Medium ausgetauscht werden. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt und durch 3-4ml frisches MEM mit 10% FBS ersetzt.

Da MEF-Zellen während einer Passage einem Alterungsprozeß unterliegen, mußten die Fibroblasten-Zellkulturen spätestens nach 7 Tagen passiert, d.h. enzymatisch abgelöst und wieder neu ausgesät werden. Die Passage wurde mit Trypsin durchgeführt.

C.3.1.2.1 Trypsinierung der MEF-Zellen

Vor der Trypsinierung wurde das Medium vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 4ml Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) mit 25mM HEPES ersetzt, um die Zellen von Serumresten frei zu waschen, welche sich hemmend auf Trypsin auswirken. Nach 2min wurde die EBSS-Lösung wieder vollständig abgesaugt, durch 0,5ml einer 0,25%igen Trypsinlösung ersetzt und bei 37°C für 5-10min inkubiert. Begannen die Zellen sich abzurunden, wurde die Trypsinlösung bis auf einen geringen Rest abgesaugt. Die Zellen wurden durch einen leichten Schlag von der Kulturfläche gelöst und MEM mit 10% FBS zugegeben. Dabei diente der Serumanteil als Inhibitor des Trypsins.

Die Zellsuspension wurde mit einer Spritze auf neue Kulturgefäße verteilt, bzw. ein Stabilat daraus hergestellt.

Insgesamt sind nur ca. 15 Passagen möglich, da die Zellen trotz des Trypsinierens zu altern beginnen. Auch verringert sich die Regenerationszeit älterer Zellen, so dass sie sich zunehmend schlechter trypsinieren lassen.

C.3.1.3 Herstellung eines Fibroblastenstabilates

Im Anschluß an das Trypsinieren wurden die MEF-Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 200g sedimentiert. Das überstehende Medium wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Zellpellet in 1ml Einfriermedium für Fibroblasten resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nalgene[®]) abgefüllt.

In einer Isopropanol-gefüllten Einfrierbox (Nalgene[®]) wurden die Stabilate über Nacht in einer Tiefkühltruhe (-80°C) heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert.

C.3.1.4 Einsäen der Trypanosomen auf den Zellrasen

Vor der Einsaat von Trypanosomen auf den 1-3 Tage alten konfluenten MEF-Zellrasen einer 24-Loch Multischale wurde das Medium komplett abgesaugt und später durch trypanosomenhaltiges MEM bzw. IMB mit 20-30%igem Serumanteil ersetzt.

Die Trypanosomen wurden, wie unter C.2.3.2 beschrieben, aus Mäuseblut isoliert und mit einer Spritze auf den MEF-Zellrasen verbracht. Dabei strebte man eine Einsaatdichte von ca. 10^6 Trypanosomen pro ml Medium an.

Bei besonders hohen Parasitämien im Wirtstier konnte anstatt der aufwendigen Isolierung nach C.2.3.2 auch einfach ein Tropfen Schwanzblut steril in Kultur gebracht werden (ZWEYGARTH et al., 1989). Dazu wurde der Mäuseschwanz ausreichend mit Alkohol desinfiziert, die äußerste Schwanzspitze abgeschnitten und mit einer Pipette ein Tropfen Schwanzblut aufgenommen. Dieser Tropfen wurde vorsichtig auf den Boden der Vertiefung einer Multischale verbracht, bei welcher zuvor das MEF-Zellkulturmedium durch 1ml MEM bzw. IMB mit 20-30%igem Serumanteil ersetzt wurde.

Die beimpften Platten wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luft inkubiert.

C.3.1.5 Erhaltung und Wachstum der Trypanosomenkultur

Zur Erhaltung der Trypanosomenkultur wurden 50 bis 100% des Mediums je nach Parasitendichte im Abstand von 1-3 Tagen durch frisches ersetzt. Bei geringem Wachstum der Trypanosomen gab man nur frisches Medium zu.

Das Wachstum der Trypanosomen wurde täglich über 14 Tage unter dem Umkehrmikroskop (Okular 10x, Objektiv 20x bzw. 32x) betrachtet, die Trypanosomendichte ausgezählt und in Anlehnung an FEDDERSEN (1988) bewertet:

+++++	gutes, gleichmäßiges Wachstum (>20 T/GF)
++++	gutes, aber nicht gleichmäßiges Wachstum
+++	gutes, gleichmäßiges Wachstum nach verzögertem Einsetzen der Vermehrung
++	gutes anfängliches Wachstum, dann keine erkennbare Vermehrung oder Sterben der Trypanosomen
+	ungleichmäßiges, geringes Wachstum
+/0	geringes anfängliches Wachstum, dann keine Vermehrung oder Sterben der Trypanosomen
0	kein Wachstum, Absterben der Trypanosomen

Die Adaptationsphase an den Zellrasen und die Kulturbedingungen war unterschiedlich lang. Bei einer adaptierten Kultur vermehrten sich die Trypanosomen auch noch nach 3 Tagen in Kultur und die Parasitendichte betrug bis zu +++++ (>50T/GF).

C.3.1.6 Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)

Die Untersuchung der Trypanosomen-Isolate erfolgte *in vitro* im Humanserum-Resistenztest (HSRT) nach JENNI und BRUN (1982) und modifiziert nach BRUN und JENNI (1983).

Die Trypanosomen wurden, wie bei C.2.3.2 beschrieben, aus Mäuseblut isoliert. Die Isolierung wurde in der ansteigenden Phase der ersten Parasitämiewelle einer infizierten Maus durchgeführt und zwar im doppelten Ansatz, wobei MEM bzw. IMB einmal mit 20% Pferdeserum (PS) und einmal mit 20% Humanserum (HS) als Medium verwendet wurde. Die mit Pferdeserum isolierten Trypanosomen wurden auf zwei Vertiefungen einer 1-24h zuvor mit MEF-Zellen bepflanzten 24-Loch Multischale verteilt und dienten als Kontrollgruppe. Die mit Humanserum isolierten Trypanosomen wurden auf 2 weitere Vertiefungen der

gleichen Platte verteilt und dienten als Testgruppe. Die Kulturplatte wurde im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nun wurde die Vermehrung der Trypanosomen über 14 Tage täglich wie bei C.3.1.5 beschrieben beobachtet und bewertet. Für die Auswertung wurden Kontroll- und Testgruppe miteinander verglichen.

Um die Ergebnisse zu festigen, wurden pro Trypanosomen-Isolat mindestens zwei Testreihen mit frisch isolierten Trypanosomen durchgeführt.

Als humanserumresistent wurden Populationen bezeichnet, die mindestens 10 Tage lang in der Kultur überlebten und sich vermehrten (Wachstum +++ bis +++++), als humanserumsensibel solche, die 3 Tage nach Humanserum-Kontakt abgestorben waren (Wachstum 0). Trypanosomen-Populationen, welche zwar länger als 3 aber weniger als 10 Tage überlebten wurden nach HAWKING (1976b) als subresistent bezeichnet (Wachstum + bis ++).

Zusätzlich wurden auch die Kontrollen der Testreihen nach Ablauf der Beobachtungszeit mit Humanserum behandelt. Dazu wurde das Medium einer mit Pferdeserum adaptierten Trypanosomen-Kultur teilweise entfernt und zunächst durch wenige Tropfen MEM bzw. IMB und 20% HS ersetzt. Bei dem je nach Wachstum der Kultur vorgenommenen Mediumwechsel wurde täglich der Anteil des Humanserum enthaltenden Mediums erhöht und die Kultur so langsam auf Humanserum umgestellt. Als Kontrolle diente die weiterhin mit Pferdeserum behandelte Nachbar-Vertiefung mit Trypanosomen der gleichen Isolierung.

C.3.2 *In vitro*-Kultivierung von prozyklischen Formen

Um eine ausreichende Anzahl von Trypanosomen ($2-4 \times 10^9$) für die Pulsfeld-Gelelektrophorese zu erhalten, mussten die Blutstromformen in prozyklische Formen umgewandelt werden. Letztere vermehren sich, zu einem logarithmischen Wachstum angeregt, in kurzer Zeit sehr schnell.

Das Genom von Blutstromformen und Prozyklischen des identischen Trypanosomenstammes stellt sich in der PFGE genau gleich dar (VAN DER PLOEG et al., 1984b).

C.3.2.1 Umwandlung von Blutstromformen in Prozyklische

Prozyklische Kulturen wurden entweder mit Blutstromformen aus infiziertem Mäuseblut initiiert oder es konnten bereits *in vitro* kultivierte Blutstromformen in prozyklische Formen umgewandelt werden.

Blutstromformen wurden, wie bei C.2.3.2 beschrieben, aus frischem oder tiefgefrorenem Mäuseblut isoliert und CMP mit ca. 10^5 Trypanosomen pro Vertiefung in eine 96-Loch Mikrotestplatte verbracht.

Für die Untersuchung der Stabilität des Karyotypes eines Klones im Verlauf einer chronischen Infektion in Mäusen (frühe und späte Antigenvarianten; siehe D.2.1.3.2) (VAN DER PLOEG et al., 1984b und 1989), wurde bei einer mit dem Klon 3 des Feldstammes SUS/BU 319/7 infizierten Maus täglich über 42 Tage mittels Nativpräparat (C.2.2.2) die Höhe ihrer Parasitämie festgestellt. Aus jeder Parasitämie-Spitze wurden Trypanosomen isoliert und in Prozyklische umgewandelt. So konnten am Ende 5 verschiedene VATs mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (C.4) untersucht werden, wobei Trypanosomen des VAT1 an Tag 0, des VAT2 an Tag 11, des VAT3 an Tag 20, des VAT4 an Tag 27 und des VAT5 an Tag 33 isoliert wurden (siehe Tab. D.4 in Kapitel D.2.1.3.2).

Bei besonders hohen Parasitämien im Wirtstier konnte anstatt der aufwendigen Isolierung nach C.2.3.2 auch einfach ein Tropfen Schwanzblut steril in Kultur gebracht werden (ZWEYGARTH et al., 1989). Dazu wurde der Mäuseschwanz ausreichend mit Alkohol desinfiziert, die äußerste Schwanzspitze abgeschnitten und mit einer Pipette ein Tropfen Schwanzblut aufgenommen. Dieser Tropfen wurde vorsichtig auf den Boden einer zuvor mit CMP gefüllten Vertiefung der Mikrotestplatte verbracht.

Vor der Trypanosomen-Einsaat wurden, um die Umwandlung von Blutstromformen in prozyklische Formen zu unterstützen, in einige Vertiefungen Nährzellen der Mücken-Gattung *Anopheles gambiae* eingesät.

Die Anopheles-Zellen wurden in T-25 Kulturflaschen mit CMP bei 28°C ohne CO₂ kultiviert. Durch Abspritzen des Flaschenbodens mit CMP aus einer 2ml-Spritze wurden die Zellen abgelöst

und konnten in die Spritze aufgenommen werden. Jeweils ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer Mikrottestplatte gegeben.

3mM Aconit- und 3mM Zitronensäure, welche die Umwandlung in prozyklische Formen verbessert (BRUN and SCHÖNENBERGER, 1981; BRUN and JENNI, 1983), konnte bei Bedarf einer Kultur zugegeben werden.

Innerhalb von 24 bis 48 Stunden wandelten sich die Trypanosomen in Prozyklische um, was an einer Form- und Bewegungsänderung erkennbar wurde.

Die beimpften Platten wurden im Brutschrank bei 28°C (ohne CO₂) inkubiert.

Auch bereits an *in vitro*-Kulturbedingungen adaptierte Blutstromformen konnten in Prozyklische umgewandelt werden (KAMINSKY et al., 1988), indem das ursprüngliche Kulturmedium schrittweise durch CMP ersetzt und die Platte bei 28°C ohne CO₂ inkubiert wurde. Im Überstand befindliche umgewandelte prozyklische Trypanosomen konnten im Anschluß ohne Nährzellrasen weiter kultiviert werden.

C.3.2.2 Erhaltung und Wachstum der prozyklischen Trypanosomen-Kultur

Um die prozyklischen Trypanosomen zu einem massiven Wachstum anzuregen, wurde je nach Parasitendichte ein Teil des Überstandes der Kultur mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in eine freie Nachbarvertiefung der 96-Loch Mikrottestplatte überführt. Die Ursprungskultur wurde dann wieder mit frischem CMP gefüllt, wobei man darauf achten musste, die Trypanosomensuspension nicht zu sehr zu verdünnen. Durch Mediumauffrischung werden die Trypanosomen zu schnelleren Teilungen animiert, eine zu hohe Verdünnung führt jedoch zum Gegenteil und damit zu ihrem Absterben.

Nahm die Trypanosomendichte in der Kultur sehr schnell zu, wurde der Überstand von 2 bis 4 Vertiefungen aufgenommen, in einer Vertiefung einer 24-Loch Multischale vereinigt und mit ca. 2ml CMP aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde dieser Überstand auf 2 bis 3 Nachbarvertiefungen verteilt und alle mit Medium aufgefüllt. Am Tag darauf hatte man genügend prozyklische Trypanosomen, um sie in eine T-25 Kulturflasche zu überführen und gab darauf ca. 20ml CMP. Das Volumen wurde so lange jeden Tag verdoppelt oder verdreifacht, bis genügend Trypanosomen (mindestens 5×10^8 ; siehe Tab. C.3 in Kapitel C.4.1.1.2) für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zur Verfügung standen.

C.4 Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

C.4.1 Vorbereitung und Durchführung der PFGE

C.4.1.1 Herstellung der Agarose-Blöcke

Um ihr Genom später mit Hilfe der PFGE auftrennen zu können, mussten die Trypanosomen zunächst in Agarose-Blöcke eingebettet und dadurch fixiert werden. Bei der Herstellung der Agarose-Blöcke war unbedingt darauf zu achten, dass die Trypanosomen lebend mit der Agarose-Lösung vermischt wurden und erst durch das Erkalten der Blöcke abstarben. Beim Zelltod freiwerdende, zelleigene Enzyme können das Genom in Fragmente spalten, was falsche Ergebnisse der PFGE zur Folge hat. Sterben die Trypanosomen jedoch erst durch das Erkalten der Agarose-Blöcke, so werden die Zellenzyme sofort durch die niedrige Temperatur inhibiert.

C.4.1.1.1 Vorbereitung der Blutstromformen

Um zu zeigen, dass Blutstromformen dasselbe Bandenmuster hervorbringen wie Prozyklische des identischen Stammes (VAN DER PLOEG et al., 1984b und 1989; ESHITA et al., 1999; ALSFORD et al., 2001), wurden aus Blutstromformen des Klonen 3 des Feldstammes SUS/BU 319/7, der in Mäusen hohe Parasitämien entwickelte, PFGE-Blöcke hergestellt:

5 Mäuse wurden zeitgleich infiziert, so dass sie am selben Tag auf der Höhe ihrer ersten Parasitämiewelle per Herzpunktion entblutet werden konnten (siehe C.2.3.2). Da die Blutzellen die PFGE beeinträchtigen, mussten die Trypanosomen daraus isoliert werden. Dies geschah mit Hilfe der Anionen-Austauschsäule (DEAE-Zellulose) nach LANHAM (1968) und LANHAM und GODFREY (1970). Durch Unterschiede der Oberflächenladungen von Blutzellen und Trypanosomen werden die stärker negativ geladenen Blutzellen an die Zellulose gebunden, während die Trypanosomen nicht binden und so herausgewaschen werden können.

Die Säule wurde vorbereitet, indem zunächst der Stopfen einer 10ml-Einmalspritze entfernt und in ihren Körper ein passend ausgeschnittenes Filterpapier und darauf eine Pur-Zellin-Zellstofflage gelegt wurde. PSG-Zellulose-Suspension wurde bis zur 10ml-Marke eingefüllt und die Säule mit PSG äquilibriert. 1ml trypanosomenhaltiges Mäuseblut wurde nun

tropfenweise auf die Säule aufgebracht und mit PSG langsam durch die Säule gespült. Die Trypanosomen reichern sich in einem unter die Spritze gestellten Auffanggefäß an.

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Trypanosomendichte im PSG-Puffer bestimmt, die Suspension 10 min bei 1.500g (3.000U/min) zentrifugiert und auf $2-4 \times 10^9$ Trypanosomen pro ml PSG-Puffer eingestellt.

Zur Herstellung eines PFGE-Blockes benötigte man $72,5 \mu\text{l}$ Trypanosomensuspension, d.h. $1,5-2,9 \times 10^8$ Trypanosomen in $72,5 \mu\text{l}$ PSG-Puffer (Tab. C.3 in Kapitel C.4.1.1.2).

C.4.1.1.2 Vorbereitung der prozyklischen Trypanosomen

Die prozyklischen Trypanosomen wurden mit einer 20ml-Spritze aus den T-25 Kulturflaschen entnommen und in 50ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde zunächst die Trypanosomendichte im Medium bestimmt, dann wurden die Röhrchen für 20min bei 1.500g (3.000U/min) zentrifugiert.

Der Überstand wurde bis auf das Trypanosomen-Pellet abgesaugt, dieses in 10ml PSG resuspendiert, die Suspension in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt und erneut, diesmal nur für 10 min, bei 1.500g (3.000U/min) zentrifugiert. Für die Untersuchung der verschiedenen Puffer zum Waschen und Einbetten der Trypanosomen (siehe D.2.1.1.1) wurde anstatt des PSG-Puffers PS- bzw. 1xTBE-Puffer (letzterer sowohl mit als auch ohne Magnesiumchlorid) verwendet.

Dieser Waschvorgang wurde nochmals wiederholt und nach dem Zentrifugieren die Trypanosomendichte auf $2-4 \times 10^9$ Trypanosomen pro ml PSG- (bzw. PS- oder TBE-Puffer) eingestellt.

Zur Herstellung eines PFGE-Blockes benötigte man $72,5 \mu\text{l}$ Trypanosomensuspension, d.h. $1,5-2,9 \times 10^8$ Trypanosomen in $72,5 \mu\text{l}$ Puffer (Tab. C.3).

Ziel des Waschens ist es, Medium- und Serumreste zu entfernen, die später die Ergebnisse der PFGE verfälschen können. Dabei eignet sich der PSG-Puffer besonders gut, da seine Ionenkonzentration ein optimales Milieu für die Trypanosomen schafft, und diese zusätzlich durch den Anteil an Glukose über längere Zeit ernährt und somit am Leben hält (siehe auch D.2.1.1.1).

Tab. C.3:

Benötigte Trypanosomenmenge (in PSG) für die Herstellung der PFGE-Blöcke (Verhältnis Trypanosomensuspension zu Agaroselösung 1 : 1)

Anzahl der Blöcke	Volumen gesamt*	Anzahl Tryps/Vol. PSG	Vol. Agaroselösung
1	145µl	$1,5-2,9 \times 10^8 / 72,5\mu\text{l}$	72,5µl
3	435µl	$5 \times 10^8 - 1 \times 10^9 / 250\mu\text{l}$	250µl
6	870µl	$1-2 \times 10^9 / 500\mu\text{l}$	500µl
13	1,885ml	$2-4 \times 10^9 / 1\text{ml}$	1ml

*zum Gießen eines Blockes benötigt man 145µl

Tryps: Trypanosomen

Vol.: Volumen

C.4.1.1.3 Gießen der Agarose-Blöcke

Als Agarose wurde sogenannte „low melting point“ (LMP) InCert®-Agarose (FMC BioProducts, Rockland, USA) verwendet. Sie zeichnet sich durch einen besonders niedrigen Schmelzpunkt aus und ermöglicht dadurch das Einbetten thermolabiler Elemente, wie z.B. lebender Zellen. 10mg dieser Agarose wurden in 1ml PSG-Puffer gelöst (= 1%) und in einem 90°C-warmen Wasserbad bis zum Aufklaren erhitzt. Für die Untersuchung der verschiedenen Puffer zum Waschen und Einbetten der Trypanosomen (siehe D.2.1.1) wurde anstatt des PSG-Puffers PS- bzw. 1xTBE-Puffer (letzterer sowohl mit als auch ohne Magnesiumchlorid) zum Lösen der LMP-Agarose verwendet. Anschließend wurde die Agarose-Lösung in einem zweiten Wasserbad auf 37°C abgekühlt und auf dieser Temperatur gehalten.

Die nach C.4.1.1.1 bzw. C.4.1.1.2 fertiggestellte Trypanosomen-Suspension wurde ebenfalls in dem 37°C-warmen Wasserbad angewärmt, um so die Temperatur an die Agarose-Lösung anzugleichen.

In der Zwischenzeit wurde die Blöckchen-Gießform mit H₂O_{dest} benetzt, die Unterseite abgetrocknet und mit Tesafilm zugeklebt. Für das schnellere Aushärten der Agarose-Blöcke wurde die Gießform (mit der zugeklebten Seite nach unten) zur Durchkühlung auf Eis gestellt.

Nun wurden Trypanosomen-Suspension und InCert-Agarose vorsichtig mit Hilfe einer Pipette 1:1 miteinander vermischt und unverzüglich 145µl der Mischung unter Vermeidung von

Blasen in je ein Loch der Gießform pipettiert. Die obere Seite der Gießform wurde mit Haushaltsfolie abgedeckt und die Form zum Aushärten der Agarose-Blöcke für 15min bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die Haushaltsfolie und der Tesafilm von der Blöckchenform entfernt, die Blöcke mit Hilfe eines Schiebers aus der Form gedrückt und als nächster Schritt die Trypanosomen-DNA durch Proteinase K-Verdau freigelegt.

C.4.1.1.4 Freilegen der Trypanosomen-DNA durch Lysieren der Zellmembranen und -Proteine

Um die reine Trypanosomen-DNA zu erhalten, mussten zunächst die Zellmembranen und -Proteine lysiert werden. Dies geschah durch Proteinase K-Verdau.

Zuerst wurde der Lysis-Mix hergestellt, bestehend aus NDS-Puffer und Proteinase K. Dazu wurden genau soviel ml NDS-Puffer in ein 10ml-Röhrchen gefüllt, dass 2ml Puffer pro Agaroseblock vorhanden waren. Dort hinein gab man 1mg Proteinase K pro ml NDS-Puffer und löste diese durch Schwenken des Röhrchens. Für die Untersuchung der Auswirkung der Proteinase K-Menge auf die Qualität der PFGE-Blöcke (siehe D.2.1.1.3) wurden einige Blöcke in NDS-Puffer mit nur 100µg/ml Proteinase K verdaut.

Die ausgehärteten Agarose-Blöcke wurden direkt aus der Gießform in das Röhrchen mit dem Lysis-Mix überführt und zunächst 30min lang bei Raumtemperatur belassen (die Blöcke sollten in dieser Zeit aufklaren). Anschließend wurde das Röhrchen für 48h in ein 50°C-warmes Wasserbad verbracht. Diese Temperatur gewährleistet neben einer optimalen Proteinase K-Aktivität auch die Agarose-Stabilität. Die Agarose-Blöcke würden bei ca. 65°C schmelzen, die Proteinase K entfaltet ihr Aktivitätsmaximum bei 37-56°C (SAMBROOK et al., 1989).

Für die Untersuchung der Auswirkung der Proteinase K-Menge auf die Qualität der PFGE-Blöcke (siehe D.2.1.1.3) wurden einige Blöcke 78h lang verdaut, bzw. bei einigen Blöcken der Lysis-Mix nach 48h erneuert und sie anschließend ein zweites Mal für 48h inkubiert.

Nach dem Inkubieren wurde das Röhrchen aus dem Wasserbad genommen, 30min bei Raumtemperatur abgekühlt und damit die Proteinase K inaktiviert. Anschließend wurde der Lysis-Mix vorsichtig mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch die entsprechende Menge TE-Puffer ersetzt, um so die Proteinase K zu entfernen. Dieser Puffer wurde am nächsten Tag durch halbes Volumen an frischem TE-Puffer ersetzt und das

Röhrchen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Blöcke können so über Jahre gelagert werden (siehe auch VAN DER PLOEG et al., 1992).

C.4.1.2 Vorbereitung des Gels

C.4.1.2.1 Gießen des Gels

Das Geltaflet wurde aus der Elektrophoresekammer genommen, auf eine ebene Fläche gelegt, die Eckisolatoren entfernt und der Gießrahmen befestigt.

Für alle drei Läufe (siehe C.4.1.4.1) benötigte man ein 4 bis 5mm hohes Gel (200ml entsprechen einer Höhe von ca. 4,5mm). Zu seiner Herstellung wurden bei der Auftrennung der kleinen (Lauf 0) bzw. der intermediären Chromosomen (Lauf I und II) 2g PFGE-taugliche Agarose (Agarose III, Biometra, Göttingen, D) in 200 ml 0,25 x TBE-Puffer (=1%) gelöst. Bei Lauf III mussten jedoch zur optimalen Auftrennung der großen Chromosomen die Pufferkonzentration verdoppelt und die Agarosekonzentration erniedrigt werden, d.h. 1,4g PFGE-taugliche Agarose wurden in 200 ml 0,5 x TBE-Puffer (=0,7%) gelöst. Für die PFGE-Testläufe mit unterschiedlichen Laufgel-Höhen (siehe D.2.1.1.4) wurde ein 7mm hohes Gel hergestellt, wobei 3g PFGE-taugliche Agarose in 300ml TBE-Puffer (=1%) gelöst wurden.

Die Agarose-Lösung wurde in der Mikrowelle in mehreren Etappen so lange erhitzt, bis sie flüssig, klar und blasenfrei war. Die Ecken des Gießrahmens mussten sofort mit ein wenig heißer Agarose-Lösung abgedichtet werden, der Rest der Lösung wurde jedoch vor dem Gießen für 10-15min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Die etwas abgekühlte Agarose-Lösung wurde langsam aber zügig, unter Vermeidung von Blasen in die Gelkammer gegossen. Eventuell doch vorhandene Blasen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze an den Rand und aus der Laufrichtung gezogen. Nun wurde der Kamm zum Aussparen der Taschen eingesetzt und man ließ das Gel ca. 45min erstarren. War das Gel milchig und fest, wurde der Kamm vorsichtig und gerade nach oben aus den Taschen gezogen, mit einer Skalpellklinge das Gel vom Gießrahmen geschnitten und dieser entfernt. Dabei war darauf zu achten, dass das Gel seine Haftung an den Taflettboden beibehält. Die 4 Löcher, durch welche der Gießrahmen auf dem Geltaflet befestigt worden war, wurden von unten mit wasserdichtem Klebeband verschlossen, um die Pufferzirkulation während des Elektrophoreselaufes nicht zu beeinträchtigen.

C.4.1.2.2 Beladen des Gels

Zunächst wurden die Agarose-Blöcke mit einer Skalpellklinge auf die richtige Größe geschnitten (ca. 1×10^7 bis 1×10^8 Trypanosomen pro eingesetzten PFGE-Block) und dann für ca. 30min in Laufpuffer äquilibriert. Dazu füllte man jeweils 0,5ml zuvor sterilisierten Laufpuffer in Reagenzgefäße und legte je einen PFGE-Block mit Hilfe eines Spatels hinein. Nach 30min wurden die Blöcke dann in die Taschen des Gels überführt und mit dem Spatel an die in Laufrichtung vorne liegende Wand gedrückt. Der Rest der Tasche wurde mit warmer 1%iger Agaroselösung unter Vermeidung von Blasen verschlossen. In die beiden äußersten Taschen wurden Marker gegeben (siehe C.4.1.4.2), um die Größe der entstehenden Banden später genau einordnen zu können. Eventuell vorhandene Unebenheiten auf der Oberfläche des Gels wurden mit einer Skalpellklinge vorsichtig abgeschnitten und lose Agarose-Stücke entfernt. Die Eckisolatoren wurden über die Abstandhalter geschoben und nach unten gedrückt, bis sie auf dem Geltablett aufsaßen.

C.4.1.3 Vorbereiten der Elektrophoresekammer

C.4.1.3.1 Füllen der Kammer mit Laufpuffer

Die Elektrophoresekammer wurde exakt waagrecht (mit Hilfe einer Laborwasserwaage) aufgestellt und mit 2,4l des 0,25 x TBE-Puffers (bei Lauf 0, I und II) bzw. 0.5 x TBE-Puffers (bei Lauf III) gefüllt. Der Thermostat der Kühlvorrichtung wurde so eingestellt, dass eine Puffer-Temperatur zwischen 10°C und 15°C in der Kammer während des gesamten Elektrophoreselaufes gewährleistet werden konnte. Vor Beginn der Elektrophorese wurde der Puffer auf die gewünschte Temperatur vorgekühlt. Zur Beschleunigung wurde die Pumpe an der Steuereinheit eingeschaltet, um den Puffer in Bewegung zu halten und immer wieder an den Kühlschlangen vorbeizuführen.

C.4.1.3.2 Beladen der Kammer mit dem Gel

Hatte der Puffer die gewünschte Temperatur erreicht, wurde das Geltablett langsam in die Kammer gesenkt, die Seite mit den Taschen nach hinten und zuerst. Diese Vorgehensweise ermöglicht das Entweichen der Luft unter dem Geltablett. Mit Schließen des Deckels wurde der elektrische Kontakt hergestellt, der Lauf jedoch erst 5-10min später gestartet, um das Gel zunächst im Laufpuffer zu äquilibrieren.

C.4.1.4 Anfang und Ende der Elektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde im Rotaphor[®] Typ V (Vers. 5.1) von Biometra durchgeführt. Das Netzteil wurde eingeschaltet, die gewünschten Parameter eingegeben (siehe C.4.1.4.1) und die Elektrophorese gestartet.

War der Lauf nach 24 bis 120h beendet, wurden der Kammer-Deckel abgenommen, die Eckisolatoren entfernt und das Geltablett an den Abstandhaltern vorsichtig, leicht schräg herausgehoben, so dass der Puffer über eine Ecke abtropfen konnte. Das Gel wurde zum Transport in das Färbebad auf eine Glas- oder Plastikplatte gelegt.

C.4.1.4.1 Parameterlisten zum Auftrennen der verschiedenen Chromosomengrößen

In Abhängigkeit von der Chromosomengröße, welche man darstellen wollte, mussten verschiedene Parameter am Netzteil des PFGE-Gerätes eingestellt werden.

Tab. C.4

Parameter und deren Einfluss auf die Auftrennung

Parameter	Auswirkung
Agarose-Konzentration	Je konzentrierter die Agarose, desto langsamer laufen die Chromosomen und desto schwerer können große Moleküle aufgetrennt werden
Ionenstärke des Laufpuffers	Je stärker der Laufpuffer, desto besser können große Moleküle aufgetrennt werden (Cave: Feldstärke erhöht sich!)
Temperatur	Je höher die Feldstärke, desto niedriger muss die Kühltemperatur gewählt werden um die anfallende Wärme abzuführen. Große DNA-Moleküle lassen sich besser bei höheren Temperaturen auftrennen.
Spannung	Je höher die Spannung, desto schneller laufen die Moleküle (Cave: Feldstärke erhöht sich!)
Feldstärke	Je größer die aufzutrennenden Moleküle, desto niedriger muss die Feldstärke sein (regelbar über Ionenstärke und Spannung)
Spannungsunterbrechung während der Rotorbewegung	Bei sehr kurzen Intervallzeiten und Trennungen von Molekülen über 150kb führt eine Spannungsunterbrechung während der Rotorbewegung zu einer besseren Auftrennung
Zeitintervall zwischen den Rotorbewegungen	Je kürzer das Zeitintervall zwischen den Rotorbewegungen (Pulszeit), desto besser werden kleine, schnelle Moleküle aufgetrennt (und umgekehrt). Bei ihrer Verlängerung erreicht man eine bessere Auftrennung zweier nah beieinander liegenden Banden (LALANDE et al., 1987).
Inverses Intervall	= Inversion der Feldrichtung in Bezug auf die Laufrichtung. Verbessert bei großen Molekülen deren Ausrichtung während der Änderung des elektrischen Feldes (wurde hier nicht verwendet)
Rotorwinkel	Je kürzer die Elektrophoresedauer, desto spitzer sollte der Winkel gewählt werden
Rotor-Geschwindigkeit	Je konzentrierter die Agarose, desto höher sollte die Rotorgeschwindigkeit gewählt werden
Dauer der Elektrophorese	Je größer die aufzutrennenden Moleküle, desto länger muss die Elektrophorese laufen

Zusätzlich hat man die Möglichkeit, die Größen für Spannung, Intervall und Winkel während des Elektrophoreselaufes zu verändern. Gibt man einen Anfangs- und einen davon unterschiedlichen Endwert ein, so wird zwischen den beiden Werten eine wahlweise lineare oder logarithmische Rampe über die gesamte Dauer der Elektrophorese aufgebaut. Damit ermöglicht man z.B. während des selben Laufes zunächst eine gute Auftrennung der kleinen Chromosomen und später dann der größeren (CARLE et al., 1986; LALANDE et al., 1987).

Die in Tabelle C.5 aufgeführten Parameterlisten wurden empirisch aufgrund von Testläufen, basierend auf der Gebrauchsanweisung für den Rotaphor[®] Typ V (BIOMETRA, 1992) und verschiedenen Veröffentlichungen (VAN DER PLOEG et al., 1989 und 1992; ZIEGLER und VOLZ, 1992) ermittelt. Da identische Proben in zwei verschiedenen PFGE-Geltaschen, vor allem in innen oder außen liegenden, aufgrund des elektrischen Feldes leicht unterschiedliche Bandenmuster ergeben können (VAN DER PLOEG et al., 1984; CHU et al., 1986), wurden mehrere Läufe mit unterschiedlicher Positionierung der Proben durchgeführt.

Tab. C.5

Verwendete Parameterlisten zur Pulsfeld-gelelektrophoretischen Auftrennung des *Trypanosoma brucei*-Genoms

Chromosomengröße ⇒	Mini- und intermediär	Intermediär	Intermediär und groß	Groß
Parameter ↓	(Lauf 0)	(Lauf I)	(Lauf II)	(Lauf III)
Agarose-Konzentration	1%	1%	1%	0,7%
Ionenstärke des Puffers	0,25 x TBE	0,25 x TBE	0,25 x TBE	0,5 x TBE
Temperatur	10°C	13°C	13°C	11°C
Spannung	10V/cm konst.	10V/cm konst.	10→9V/cm lin.	6→2,5V/cm lin.
Spannungsunterbrechung	ja	ja	ja	ja
Intervall	15s konst.	50s konst.	100→10s log.	350→50s log.
Inverses Intervall	0	0	0	0
Rotorwinkel	110° konst.	120° konst.	100→125° log.	110→100° log.
Rotor-Geschwindigkeit	5	5	6	5
Elektrophoresedauer	24h	24h	36h	84h

konst.: konstant

lin.: linear

log.: logarithmisch

C.4.1.4.2 Verwendete Marker zum Größenvergleich der Banden

Um die Größe der entstehenden Banden später bestimmen zu können, wurden in die äußeren Geltaschen ein bzw. zwei Marker mit bereits definierten Banden gegeben, welche die Industrie als PFGE-Blöcke liefert. Die Wahl der Marker richtete sich nach den zu erwartenden Chromosomengrößen. Jeder Marker wurde doppelt eingefüllt, je ein Block links und rechts außen. Bei der späteren Auswertung des Gels konnten dann sogenannte Referenzlinien (siehe C.4.2.2.3) durch die sich entsprechenden Banden gezogen und damit das Gel „entzerrt“ werden.

Lambda phage *cl857S7* ladder ist ein künstlich aus DNA-Oligomeren hergestellter Marker, dessen kleinste Bande 48,5kb beträgt. Jede Bande unterscheidet sich um 48,5kb von der vorherigen und der Marker reicht bis ca. 1Mb. Er wird in 2x5x10mm großen InCert[®]-Agarose-Gelblöcken geliefert (FMC BioProducts, Rockland, USA). Bei der PFGE wurde pro Geltasche $\frac{1}{4}$ des Blockes eingesetzt.

Der Hefenstamm *Saccharomyces cerevisiae* YPH 149 hat 16 Banden mit definierten Größen. Sie reichen von 95kb bis 2,4Mb und haben unterschiedliche Abstände (siehe Tab. C.6). Der Marker wird in 1x7x10mm großen LMP-Agaroseblöcken geliefert (Biometra, Göttingen, D). Bei der PFGE wurde pro Geltasche $\frac{1}{4}$ des Blockes eingesetzt.

Der Hefenstamm *Schizosaccharomyces pombe* CBS 1058 hat 3 definierte Banden, die eine Größe von 3Mb, 4,6Mb und 5,7Mb haben. Der Marker wird in 1x7x10mm großen LMP-Agaroseblöcken geliefert (Biometra, Göttingen, D). Bei der PFGE wurde pro Geltasche $\frac{1}{4}$ des Blockes eingesetzt.

Tab. C.6

Verwendete Marker und deren Banden-Größen

Name:	Lambda phage cI857S7 ladder	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH 149	<i>Schizosaccharomyces pombé</i> CBS 1058
Banden (kbp):	776	2400	5700
	727,5	1600	4600
	679	1050	3000
	630,5	1010	
	582	950	
	533,5	840	
	485	810	
	436,5	780	
	388	710	
	339,5	620	
	291	570	
	242,5	480	
	194	450	
	145,5	300	
	97	235	
	48,5	95	
PFGE-Lauf:	Lauf 0 und I	Lauf 0, I, II und III	Lauf III

C.4.2 Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse

C.4.2.1 Darstellung des Gels

C.4.2.1.1 Färben des Gels

Zum Färben wurde das Gel in 500ml Ethidiumbromid-Färbelösung gelegt (1µg Ethidiumbromid pro ml H₂O_{dest}) und bei Raumtemperatur für 30min vorsichtig auf einem Schwenktisch hin- und herbewegt. Dann wurde die Färbelösung abgegossen und durch 500ml H₂O_{dest} ersetzt. Nach wiederum 30min wurde das H₂O_{dest} verworfen und durch frisches ersetzt, in welchem das Gel über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch entfärbt wurde. Sämtliches mit Ethidiumbromid kontaminiertes H₂O_{dest} wurde als Sondermüll in einer Tonne gesammelt und über die Firma KEG, Sonderabfall-Entsorgungsgesellschaft mbH, Berlin entsorgt.

Am nächsten Tag wurde das Gel aus dem Wasserbad genommen, auf einer Glas- oder Plastikplatte transportiert, über ultraviolettes Licht gelegt und fotografiert.

C.4.2.1.2 Fotografieren des Gels

Das Gel wurde auf den Transilluminator (TI 2[®], Biometra) gelegt, der Schutzdeckel darüber geklappt und das ultraviolette Licht angestellt. Das Dunkel-Kabinett wurde geschlossen und die im Abstand von 65cm montierte CCD-Kamera (Sperrfilter, Empfindlichkeit >10E-6lux, Auflösung 596 x 795 Pixel, Kameraobjektiv mit f=15mm, Lichtstärke 1:1,2) übertrug das Bild in ein Dokumentationsprogramm (*BioDoc[®] II / NT*, Biometra, Göttingen, D). Damit konnten Belichtungszeit, Kontrast und Helligkeit des Bildes beliebig eingestellt werden, wobei die durchschnittliche Belichtungszeit 6,4s betrug. Das optimale Bild wurde gespeichert und nachträglich entstört, indem man hell erscheinende Staubpartikel durch das Programm entfernen ließ. Anschließend wurde das Bild in das *ScanPack 3.0[®]*-Programm überführt und die Banden ausgewertet.

C.4.2.2 Auswertung der Banden

Die Auswertung der Banden geschah mit Hilfe des *ScanPack 3.0*[®]-Programmes (vers. 4.45) von Biometra, Göttingen, D.

C.4.2.2.1 Importieren des Bildes und Optimierung seines Kontrastes

Das Bild wurde aus dem *BioDoc*[®]-Programm in das *ScanPack 3.0*[®]-Programm importiert und als *ScanPack*-Datei gespeichert.

Mit der sogenannten „*Gel Gamma Correction*“ wurde der Kontrast zwischen Banden und Hintergrund optimiert. Anschließend wurde das Bild als Negativ gespeichert, da das Programm dunkle Flächen als Banden und helle als Hintergrund erkennt.

C.4.2.2.2 Definition der Spuren und Erstellen der Densitogramme

Jeder auswertbare Trypanosomen-Stamm oder Marker wurde als Spur auf dem Gel definiert. Anschließend ließ man das Programm für jede Spur ein Densitogramm erstellen, d.h. das Hell- (Hintergrund) Dunkel- (Banden) Muster wurde in Kurvenform umgesetzt. Nun musste man auf dem Densitogramm die sogenannte Basislinie manuell direkt auf der Hintergrundlinie definieren, um eine optimale Hintergrunds-Reduktion zu erhalten. Dadurch wurden die Banden besser vom Hintergrund abgesetzt. Anfang und Ende jeder Bande wurden manuell definiert und anhand des Densitogrammes kontrolliert. Das Programm setzt dann den dunkelsten Wert zwischen Anfang und Ende der Bande als zu berechnenden Bandenwert fest.

C.4.2.2.3 Definition der Marker, Gelentzerrung und Berechnung der Banden

Jede einzelne Marker-Spur wurde definiert und die Größe der Banden kalibriert. Damit gab man dem Programm die bei der Berechnung zu verwendende Kalibrierungs-Funktion vor.

Da Unterschiede der Laufgeschwindigkeiten von Spuren auf verschiedenen Positionen des Gels auftreten können, musste es entzerrt werden. Dafür war wichtig, dass jeder Marker doppelt im Gel aufgetragen wurde, rechts und links in die außen liegenden Geltaschen. Nun konnte man durch die sich entsprechenden Banden beider Marker-Spuren über das gesamte Gel sogenannte Referenzlinien ziehen, deren Größe nochmals festlegen und eventuelle Laufunterschiede damit ausgleichen, bzw. die Bandenberechnung optimieren.

Mit der Option „*Rf-Value Corrections*“ wurden alle Banden berechnet und ihre Rf-Werte (Referenzwert = Mobilität im Gel) in der Gel-Information des Programms abgespeichert. Zur Auswertung gelangten jedoch nur die innerhalb der mit Referenzlinien begrenzten Bereiche liegenden Banden, da außerhalb liegende vom Programm nicht zuverlässig berechnet werden konnten.

C.4.2.2.4 Berechnung der Banden-Mittelwerte

Da für die Betrachtung des gesamten Trypanosomen-Genomes insgesamt 4 verschiedene PFGE-Läufe durchgeführt wurden, deren auswertbare Bereiche sich z.T. überlappten (s. Abb. C.1), wurden für die meisten Banden mehrere, voneinander mehr oder weniger stark abweichende Werte ermittelt. Um so viele Informationen wie möglich für jede Bande in die Auswertung mit einzubeziehen, wurden die Banden-Mittelwerte per Hand berechnet.

Die vom Computer errechneten Rf-Bandenwerte (siehe C.4.2.2.3) jeweils eines Stammes wurden Lauf für Lauf aus der Gelinformation des *ScanPack 3.0*[®]-Programmes in die Spalten einer Excel[®]-Tabelle (Microsoft) übertragen, die Ergebnisse eines Laufes in je eine Spalte. Aus verschiedenen Läufen stammende Werte sich entsprechender Banden, die zum Teil von Lauf zu Lauf höchst unterschiedlich ausfielen, wurden durch den Vergleich der Photographien der einzelnen Läufe identifiziert und nebeneinander in die gleiche Zeile eingetragen. Nachdem man so alle Informationen für einen Stamm tabellarisch erfasst hatte, wurde für jede Bande, bzw. jede Zeile das arithmetische Mittel berechnet und in die letzte Spalte eingetragen. Im Nachfolgenden wurden nur noch diese Mittelwerte für die Auswertung benutzt.

C.4.2.2.5 Vergleich der verschiedenen Bandenmuster

Die Spalten mit den Banden-Mittelwerten (siehe C.4.2.2.4) aller Stämme (n = 47) wurden in eine weitere Excel[®]-Tabelle (Microsoft) übertragen und nebeneinander aufgeführt. Anhand der Photographien der einzelnen Läufe wurden die Bandenmuster der Stämme miteinander verglichen und die Werte auf gleicher Höhe liegender Banden in die gleiche Zeile eingetragen. Zeigte ein Stamm eine bestimmte Bande nicht, so wurde für diese der Wert "0" in die entsprechende Zeile eingetragen. Die Banden-Mittelwerte dienten hierbei zur Orientierung und Kontrolle. So entstand eine numerische Matrix mit einer Spalte für jedes Objekt (Trypanosomen-Stamm) und einer Zeile für jede Variable (Bande). Insgesamt wurden

k = 72 verschieden große Banden (Chromosomen) ermittelt: 17 im Mini- und 38 im Intermediär-Chromosomen-Bereich, 17 im Bereich der großen Chromosomen.

C.4.2.3 Die Cluster-Analyse

Für die Cluster-Analyse wurde das Computerprogramm *Stata Statistical Software (Release 7.0, StataCorp. 2001)* benutzt, welches die Verwandtschaftsgrade auf der Basis des binären Ähnlichkeitskoeffizienten nach JACCARD (1908, siehe C.4.2.3.1) berechnet. Zu diesem Zweck wurden die Daten in die binäre Form gebracht, also anstatt der jeweiligen Banden-Mittelwerte der Wert "1" in die Felder der Tabelle aus C.4.2.2.5 eingegeben. So entstand eine numerische Matrix mit der Information für jede Variable (Bande): "vorhanden" ("1") oder "nicht vorhanden" ("0"), mit k = 72 Zeilen (Banden) und n = 47 Spalten (Stämme).

Da *Stata* jedoch eine zeilenweise Anordnung von Elementen zur Clusteranalyse voraussetzt, wurde vor dem Export der Daten eine Matrixtransposition in Excel[®] vorgenommen, so dass die Datenmatrix in *Stata* dann die Dimension n x k hatte.

C.4.2.3.1 Der binäre Ähnlichkeitskoeffizient nach JACCARD (1908)

Für jede mögliche Kombination zweier der insgesamt n=47 Trypanosomen-Stämme aus der Tabelle wurde nun der binäre Ähnlichkeitskoeffizient nach JACCARD (1908) ausgerechnet:

$$J_{ij} = a/(a+b+c)$$

Es ergeben sich also folgende Möglichkeiten:

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

wobei i = Trypanosomen-Stamm i, i = 1, ..., 47

j = Trypanosomen-Stamm j, j = 1, ..., 47; 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 i vorkommen ("i = 0, j = 1")

Der JACCARD-Koeffizient vergleicht 2 Objekte (Stämme) auf alle ihre Variablen (hier: 72 Größen-verschiedene Banden). „0,0“-Banden, die bei keinem der beiden Stämme vorkommen, fallen dabei nicht ins Gewicht, d.h. dass für jedes Objekte-Paar nur die bei diesen Stämmen tatsächlich vorhandenen Banden verglichen werden.

So konnten die $n = 47$ Trypanosomen-Stämme (22 Feldstämme, 6 Klone, 5 VATs und 14 Referenzstämme) anhand von $k = 72$ binären Variablen (Banden) verglichen werden. Der zuvor errechnete Mittelwert jeder Bande (siehe C.4.2.2.4) ist dabei unwichtig, da er zu stark von der aufgetragenen DNA-Menge, den Laufbedingungen und der Bild-Auflösung abhängig und damit nicht repräsentativ ist. Man benötigt ihn nur zur adäquaten Einordnung, bzw. zum Vergleich der Banden (siehe C.4.2.2.5).

C.4.2.3.2 Die UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)

Für die Berechnung der Verwandtschaftsgrade wurde die UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages; SNEATH und SOKAL, 1973) benutzt.

Dasjenige Paar von Trypanosomen-Stämmen, welches den größten Ähnlichkeitskoeffizienten und damit die größte Übereinstimmung hatte, wurde vom Computerprogramm als Cluster zusammengefasst und galt in der nächsten Berechnung als ein einzelnes Objekt, d.h. die beiden vereinten Objekte verloren ihre Individualität. Nun wurden wiederum die Ähnlichkeitskoeffizienten aller möglichen Paare berechnet. Bei fusionierten Objekten wurden hierzu die Mittelwerte aller Paarvergleiche der Einzelobjekte aus dem vorhergehenden Berechnungs-Schritt verwendet. Das nächste Paar mit dem größten Koeffizienten wurde anschließend ebenfalls zu einem Objekt zusammengefasst und die erneute Berechnung aller Koeffizienten durchgeführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Ähnlichkeitskoeffizient für das letzte, am unterschiedlichsten ausgefallene Objekte-Paar berechnet war.

C.4.2.3.3 Das Dendrogramm

Die Ergebnisse wurden als Baumdiagramm, auch Dendrogramm genannt (siehe B.2.6.1.3), dargestellt. Dabei kann der Ähnlichkeits-Koeffizient eines Objekte-Paares an der x-Achse abgelesen werden und zwar auf der Höhe der "Wurzel" eines Clusters (vertikale Verbindung der beiden Objekte). Die Trypanosomen-Stämme der Cluster, deren Wurzel sich am weitesten rechts des Dendrogrammes befindet, haben die größte Ähnlichkeit. Ein Ähnlichkeits-Koeffizient von "1" bedeutet völlige Gleichheit der Objekte (Trypanosomen-Stämme), je mehr er jedoch gegen "0" geht (auf der x-Achse nach links), desto verschiedener sind die Objekte. Ein Koeffizient von "0" bedeutet schließlich völlige Verschiedenheit.

C.5 Lösungen, Puffer, Medien, Seren, Chemikalien, DNA-Marker und Verbrauchsmaterialien

C.5.1 Lösungen und Puffer

Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (1x) mit 25mM Hepes

Stammlösung EBSS (10x), Ca⁺⁺ - und Mg⁺⁺ - frei, ohne NaHCO₃:100ml

HEPES (25mM) 6g

Aqua_{dest} 900ml

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 5M NaOH-Lösung auf 7,5-7,9 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Einfrierlösung für Trypanosomen

EBSS (1x) mit 25mM HEPES 70ml

99%iges Glycerol 30ml

Das Medium wurde sterilfiltriert, portioniert und bei 4°C gelagert.

Heparinlösung

Heparin-Natrium 2.000IU

EBSS (1x) mit 25mM HEPES 100ml

Der pH wurde auf 8 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert, portioniert und bei 4°C gelagert.

NDS-Puffer

EDTA Na₂ 93,05g

Sarkosyl (N-Lauroyl-Sarcosine) 1% 5g

Aqua_{dest} ad 500ml

Zunächst wurde das EDTA Na₂ in 450ml H₂O_{dest} gegeben und der pH mit NaOH-Pellets auf 8 eingestellt. Hatte es sich vollständig gelöst, wurde mit H₂O_{dest} auf 500ml aufgefüllt und 1% Sarkosyl zugegeben (1g in 100ml).

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Lysis-Mix

Kurz vor Gebrauch wurde dem NDS-Puffer 1mg/ml Proteinase K zugegeben.

PS-Puffer (Phosphate-buffered Saline)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16,9g
NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O	0,78g
NaCl	4,25g
Aqua _{dest}	ad 1l

Die Substanzen wurden nacheinander zunächst in 900ml H₂O_{dest} gelöst und dann der pH auf 7,4 eingestellt. Zum Schluß wurde mit H₂O_{dest} auf 1l aufgefüllt.

Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

PSG-Puffer (Phosphate-buffered Saline Glucose) 4:6

PS-Puffer	400ml
25%ige Glukoselösung	100ml
Aqua _{dest}	ad 1l

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

PSG-Zellulose-Suspension

30g DE-52-Cellulose Pre-swollen Microgranular wurden in 200ml PS-Puffer 45min lang gequollen. Dann wurde der Überstand abgegossen, das Volumen mit frischem PS-Puffer aufgefüllt und der pH-Wert mit 5%iger H₃PO₄ auf 7,3 eingestellt. Wiederum ließ man die Zellulose quellen und ersetzte den Überstand nochmals durch frischen PS-Puffer.

Die Zellulose-Suspension wurde autoklaviert, nach dem Abkühlen der Überstand unter sterilen Bedingungen abgegossen und das Volumen mit PSG aufgefüllt.

Die Suspension wurde bei 4°C über mehrere Wochen gelagert.

10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

Tris	53,886g
Borsäure	27,514g
EDTA Na ₂	3,722g
Aqua _{dest}	ad 500ml

Als erstes wurde der TRIS-Puffer in 400ml H₂O_{dest} gelöst, dann gab man die Borsäure dazu und stellte den pH mit NaOH auf 8,5 ein. Zum Schluß wurde das EDTA Na₂ hinzugefügt und nach seiner vollständigen Auflösung mit H₂O_{dest} auf 500ml aufgefüllt.

Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Der Elektrophoresepuffer wurde erhalten, indem die Stammlösung für 0,25xTBE-Puffer (0,025M) 1:40 bzw. für 0,5xTBE-Puffer (0,05M) 1:20 mit H₂O_{dest} verdünnt wurde.

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

Tris	0,605g
EDTA Na ₂	0,186g
Aqua _{dest}	ad 500ml

Zunächst wurde der TRIS-Puffer in 400ml H₂O_{dest} aufgelöst und der pH auf 8,0 eingestellt. Dann gab man das EDTA Na₂ dazu. Hatte sich dieses gelöst, wurde mit H₂O_{dest} bis 500ml aufgefüllt.

Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Trypsinlösung (0,25%)

EBSS (1x) mit 25mM Hepes	100ml
Trypsin (1:250, bovine pancreas, 0,38U/mg)	250mg

Der pH wurde mit 1N NaOH-Lösung auf 7,7 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert, portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Walker-Lösung

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,0g
Tris	0,1g
Glycerin	9,0ml
Aqua _{dest}	ad 100ml

Die Substanzen wurden nacheinander in H₂O_{dest} gelöst und anschließend Phenolrot bis zur leichten Rosaverfärbung zugegeben. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

C.5.2 Medien und Seren

Einfriermedium für Fibroblasten

MEM (komplett)	65ml
FBS	25ml
99%iges Glycerin	10ml

Das Medium wurde sterilfiltriert, portioniert und bei 4°C gelagert.

Foetales Bovines Serum (FBS)

Das Serum wurde kommerziell bei der Firma GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D erworben, portioniert und bei -20°C eingefroren.

Vor Gebrauch wurde das Serum über einen Spritzenvorsatzfilter (0,2µm) sterilfiltriert.

Humanserum (HS)

Das Humanserum wurde aus eigenem Serum selbst hergestellt. Dazu wurde mit einer Spritze Blut abgenommen, in 50ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und diese zunächst bei Raumtemperatur für 2h und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4°C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Koagulum mit Hilfe eines Glasstabes vorsichtig vom Rand des Zentrifugenröhrchens gelöst, das Röhrchen wieder verschlossen und für 15min bei 3.000U/min zentrifugiert.

Das überstehende Serum wurde mit einer Spritze abgenommen, über einen Spritzenvorsatzfilter (0,2µm) sterilfiltriert, portioniert und bei -20°C eingefroren.

Iscove`s Medium (IM) mod. nach Baltz (IMB)

IM	500ml
L-Cystein	90,5mg
L-Glutamin	146mg
Na-Pyruvat	55mg
Thymidin	19,5mg
Hypoxanthin	34mg

Das Hypoxanthin wurde vorher in 0,5ml 1N NaOH suspendiert, da es sich nur im basischen Bereich löst.

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Minimum Essential Medium (MEM)

mit Earle`s Salzen, 2,2g/l NaHCO₃, 25mM Hepes, ohne Glutamin

MEM (Eagle) mit 25mM Hepes	500ml
MEM non essential amino acids (100x)	5ml
L-Glutamin	0,146g
Glucose	1,5g

Der pH-Wert wurde mit 4N NaOH-Lösung auf 7,3 eingestellt, das Medium sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Medium für MEF-Zellkulturen

Kurz vor Gebrauch wurde dem IMB bzw. MEM (komplett) 10% FBS zugefügt.

Medium für Trypanosomen-Blutstromform-Kulturen

Kurz vor Gebrauch wurde dem IMB bzw. MEM (komplett) 20% PS bzw. HS und 5% FBS zugefügt.

Medium for Procyclics (MP)

Cunningham- und SDM-79-Medium, 1:1 (MEHLITZ und TIETJEN; 1988)

Das Medium wurde als fertige pulverförmige Mischung von GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D bezogen. 62g Pulver wurden in 1,5l Aqua_{dest} auf einem Magnetheizrührer bei Raumtemperatur aufgelöst. Dazu gab man

BME-Vitamine-Lösung (100x)	2ml
MEM amino acids (50x)	8ml
MEM nonessential amino acids (100x)	10ml

und wartete ab, bis sich alles vollständig gelöst hatte. Dann wurde der pH mit 10N NaOH auf 7,3-7,4 eingestellt und mit Aqua_{dest} auf 2l aufgefüllt.

Das fertige Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Culture Medium for Procyclics (CMP)

Kurz vor Gebrauch wurde dem MP-Medium 20% FBS zugefügt. (MEHLITZ und TIETJEN; 1988)

Pferdeserum (PS)

Das Serum wurde kommerziell bei der Firma GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D erworben und zunächst in einem Wasserbad bei 56°C 1h lang inaktiviert. Anschließend wurde es portioniert und bei -20°C eingefroren.

Vor Gebrauch wurde das Serum über einen Spritzenvorsatzfilter (0,2µm) sterilfiltriert.

C.5.3 Chemikalien

Aconitsäure	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
Agarose III Pulsed-Field Appl.	Amresco [®] , Solon, Ohio, USA
InCert [®] -Agarose	FMC BioProducts, Rockland, USA
BME-Vitamine-Lösung (100x)	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
Borsäure	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
DE-52-Cellulose Microgranular	Whatman, Springfield, UK
Cunningham- und SDM-79-Medium, 1:1	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
L-Cystein	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
EBSS 10x (Ca ⁺⁺ - und Mg ⁺⁺ - frei, ohne NaHCO ₃)	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
EDTA Na ₂	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Fötales Bovines Serum (FBS)	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, D
L-Glutamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Glycerol 99%	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Heparin-Na	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
HEPES	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
Hypoxanthin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Immersionsöl	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Iscoves Medium (IM)	Biochrom KG, Berlin, D
Isopropanol (absol.)	Riedel-deHaen Laborchemikalien GmbH, Seelze, D
MEM (Eagle) mit 25mM Hepes, mit Earle's Salzen, 2,2g/l NaHCO ₃ , 25mM Hepes, ohne Glutamin	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D

MEM amino acids (50x)	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
MEM non essential amino acids (100x)	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pferdeserum (PS)	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein, D
Phenolrot	Merck KGaA, Darmstadt, D
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na-Pyruvat	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
Sarkosyl (N-Lauroyl-Sarcosine)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Thymidin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypsin (1:250, bovine pancreas, 0,38U/mg)	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D
Zitronensäure (DL-Isocitric acid Na ₃ salt)	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D

C.5.4 DNA-Marker

Lambda phage cI857S7 ladder	FMC BioProducts, Rockland, USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH 149	Biometra, Göttingen, D
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBS 1058	Biometra, Göttingen, D

C.5.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser Superior (18x18mm)	Marienfeld, D
Einmalkanülen (20G, 23G)	Braun, Melsungen, D
Einmalkanülen (1,5x1000mm)	TSK-Supra, Geislingen, D
Einmalspritzen (2, 5, 10, 20ml)	Braun, Melsungen, D
Hämatokritkapillaren (75mm/60µl)	Brand, Wertheim, D
Kryoröhrchen (1ml) Nalgene®	Nalge Company, Rochester, USA
Kulturflaschen (50ml) T-25 Falcon®	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
96-Loch Mikrottestplatten	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich, D
24-Loch Multischalen	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich, D
Objektträger Superior (76x26mm)	Marienfeld, D
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Pur-Zellin-Zellstoff	Hartmann AG, Heidenheim, D
Reagiergefäß	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rundfilterpapier	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, D
Spritzenvorsatzfilter	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel, D
Sterilfilter 125ml „Bottle Top“ (0,2µm) Nalgene®	Nalge Company, Rochester, USA
Versiegelungskitt	Hirschmann Laborgeräte
Zentrifugenröhrchen (4, 10, 50ml) Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg, D

C.6 Geräte

Autoklav	Fedegari, Albuzzano, I
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
CCD-Kamera	Biometra, Göttingen, D
Dunkel-Kabinett	Biometra, Göttingen, D
Eismaschine	Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen, D
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch Haushaltsgeräte GmbH, D
Hämatokrit-Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Isopropanol-Einfrierbox Nalgene®	Nalge Company, Rochester, USA
Kühlschrank (4°C)	Bosch Haushaltsgeräte GmbH, D
Kühlvorrichtung (Thermostat 2763)	Eppendorf, Hamburg, D
Kühlzentrifuge Rotanta / R	Hettich GmbH, Tuttlingen, D

Laborwaage	Sartorius GmbH, Göttingen, D
Magnetheizrührer RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Mikroskop Standard 20	Zeiss, Jena, D
Spitzobjektiv Ph 3, 40/0,85 Öl	Zeiss, Jena, D
Objektiv F 40/0,65	Zeiss, Jena, D
Okular 10x	Zeiss, Jena, D
Mikrowelle	Sanyo Electric Co., Ltd., Singapur
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena, D
PFGE-Blöckchengießform	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter Calimatic (761)	Knick, Berlin, D
Pipetten (10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Rotaphor [®] Typ V (Vers. 5.1)	Biometra, Göttingen, D
Schwenktisch (REAX 3)	Heidolph, D
Spannungsgeber Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Stickstoffbehälter	Cryoson Deutschland GmbH, Schöllkrippen, D
Tiefkühltruhe (-80°C)	Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich, D
Transilluminator TI 2 [®]	Biometra, Göttingen, D
Umkehrmikroskop Wilovert [®]	Hund, Wetzlar, D
Objektiv L 20/0,40	Leitz, Wetzlar, D
Objektiv L 32/0,40	Leitz, Wetzlar, D
Okular 10x	Hund, Wetzlar, D
Video-Geldokumentationssystem BioDoc [®]	Biometra, Göttingen, D
Wasserbad	Köttermann GmbH, Hänigsen, D

C.7 Software

<i>BioDoc[®] (II / NT)</i>	Biometra 1998, Göttingen, D
<i>ScanPack 3.0[®] (vers. 4.45)</i>	Biometra 1997, Göttingen, D
<i>Stata Statistical Software (Release 7.0)</i>	StataCorp. 2001; College Station; TX: Stata Corporation

C.8 Verzeichnis der Abkürzungen

BIIT	Blut-Inkubations-Infektiositätstest
bp	Basenpaare
BSF	Blutstromform
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cl.	Klon
cm	Zentimeter
CMP	Culture Medium for Procyclics
d	Tag
D	Deutschland
DEAE	Diethylaminoethyl
dest	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EATRO	East African Trypanosomiasis Research Organisation
EBSS	Earle`s Balanced Salt Solution
et al.	und andere
F	Gesichtsfeld
FBS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde
HCT	Hämatokrit-Zentrifugations-Technik
HS	Humanserum
HSRT	Humanserum-Resistenztest
I	Italien
i.m.	intramuskulär
IMB	Iscoe`s Medium mod. nach Baltz
i.p.	intraperitoneal
IU	Internationale Einheit
kbp	kilo-Basenpaare

kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
km	Kilometer
konst.	konstant
l	Liter
lin.	linear
LMP	Low Melting Point
log.	logarithmisch
LUMP	London School of Hygiene and Tropical Medicine
m	Meter
M	Mol
mA	Milli-Ampere
Mbp	Mega-Basenpaare
MEF	<i>Microtus montanus</i> -Embryofibroblasten
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mod.	modifiziert
MP	Medium for Procyclics
N	normal
N	Norwegen
n.d.	nicht durchgeführt
Nr.	Nummer
P	Prozyklische
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
p.i.	post infectionem
PS	Pferdeserum
PS (-Puffer)	Phosphate-buffered Saline
PSG	Phosphate-buffered Saline Glucose
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonuklein-Säure
s	Sekunde
s.	siehe
SDM	Semi-defined Medium
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte/s/r
SRA	Serum-assoziiertes Antigen
STIB	Schweizerisches Tropeninstitut Basel
s.u.	siehe unten
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
<i>T. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. b. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>T. b. g.</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. b. rh.</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
TE	Tris-EDTA
TLF	trypanolytischer Faktor
Tryp	Trypanosom
TREU	Trypanosome Research Edinburgh University
UK	United Kingdom
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
usw.	und so weiter
V	Volt

VSG	Variant Surface Glycoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
x	mal
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
®	eingetragenes Markenzeichen