

## D ERGEBNISSE

### D.1 Die Humanserum-Resistenz

#### D.1.1 Der Humanserum-Resistenztest (HSRT)

Der HSRT wurde durchgeführt wie bei C.3.1.6 beschrieben und das Wachstum der Trypanosomen wie bei C.3.1.5 bewertet. Zunächst wurden die Referenzstämme und -klone getestet, um die Sensitivität und Stabilität des Testsystems zu überprüfen.

##### D.1.1.1 Verhalten der Referenzstämme und –klone im HSRT

Alle 5 im HSRT getesteten *T. b. brucei*-Referenzen verhielten sich sensitiv (Tab. D.1). 24 Stunden nach Zugabe des Humanserums waren bereits sämtliche Trypanosomen in den Testvertiefungen abgestorben (Wachstum 0), während diejenigen in den Kontrollvertiefungen mit Pferdeserum gut und gleichmäßig weiterwuchsen (Wachstum +++++).

Die 3 im HSRT getesteten *T. b. gambiense*-Referenzen DAL 72 Cl. A, DAL 487 Cl. A und A0 83 verhielten sich ausgeprägt resistent (Tab. D.1). Das Wachstum der Trypanosomen in den Vertiefungen mit Humanserum war genauso gut und gleichmäßig (Wachstum +++++) wie in den Kontrollvertiefungen mit Pferdeserum. 6 *T. b. gambiense*-Referenzen wurden nicht im HSRT getestet, da sie erst nach Abschluss der Testreihen in die Untersuchung mit aufgenommen worden waren. Sie wurden als Ersatz von DAL 487 Cl. A und A0 83 für die PFGE benötigt, welche nicht in Prozyklische transferiert werden konnten.

Von den 2 im HSRT getesteten *T. b. rhodesiense*-Referenzen verhielt sich STIB 704 ausgeprägt resistent (Wachstum +++++ sowohl in den Test- als auch in den Kontrollvertiefungen; Tab. D.1), dagegen reagierte EATRO 174 sensitiv auf Humanserum (Tab. D.1). Bereits 24 Stunden nach Zugabe des Humanserums waren alle Trypanosomen in den Testvertiefungen abgestorben (Wachstum 0), während diejenigen in den Kontrollvertiefungen gut, jedoch nicht gleichmäßig weiterwuchsen (Wachstum ++++).

Tab. D.1

Verhalten der Referenzstämme und -klone im Humanserumresistenztest (HSRT)

Trypanosomen- Stamm	Wachstum mit		Interpretation	Anzahl der Testreihen
	HS	/ PS		
<i>T. b. brucei:</i>				
Cl. 8/18	0	+++++	sensitiv	2
CP 2469	0	+++++	sensitiv	3
CP 547	0	+++++	sensitiv	2
ILTat 1.4 Cl.	0	+++++	sensitiv	2
STIB 345 RA	0	+++++	sensitiv	4
<i>T. b. gambiense:</i>				
DAL 69	n.d.	n.d.		0
DAL 72 Cl. A	+++++	+++++	resistent	4
TH 152	n.d.	n.d.		0
H1 CI	n.d.	n.d.		0
G. DOLO	n.d.	n.d.		0
DAL 487 Cl. A	+++++	+++++	resistent	2
A0 83	+++++	+++++	resistent	2
H1 ZR	n.d.	n.d.		0
H2 ZR	n.d.	n.d.		0
<i>T. b. rhodesiense:</i>				
EATRO 174	0	++++	sensitiv	2
STIB 704	+++++	+++++	resistent	2

HS: Humanserum  
 PS: Pferdeserum  
 Wachstum (siehe C.6.2)

0: kein Wachstum; Absterben der Trypanosomen  
 ++++: gutes, aber nicht gleichmäßiges Wachstum  
 +++++: gutes, gleichmäßiges Wachstum

n.d.: nicht durchgeführt

### **D.1.1.2 Verhalten der Feldisolate im HSRT**

Von den 18 aus Tieren isolierten Stämmen verhielten sich 3 resistent, 6 subresistent und 9 sensitiv gegenüber Humanserum. Die 7 Klone verhielten sich ebenfalls sensitiv, genau wie ihre Mutterstämme (Tab. D.2).

Die im HSRT resistenten Tierisolate BOT/BU 602/7 (Rind), SUS/BU 347/7 (Schwein) und SUS/BU 373/7 (Schwein) zeigten in den Testvertiefungen zwar nur geringes, ungleichmäßiges Wachstum (+), blieben jedoch bis zum 10. Tag am Leben. In den Kontrollvertiefungen mit Pferdeserum wuchsen sie gut und gleichmäßig (Wachstum +++++).

Die im HSRT subresistenten Tierisolate blieben in den Testvertiefungen nur bis zum 4., 5. bzw. 6. Tag nach Zugabe von Humanserum am Leben (bis dahin Wachstum +, dann Wachstum 0), d.h. länger als die sensiblen Stämme, jedoch nicht so lange wie die resistenten. In den Kontrollvertiefungen mit Pferdeserum wuchsen sie gut und gleichmäßig (Wachstum +++++). Zu den aus Schweinen isolierten subresistenten Stämmen gehören SUS/BU 132/4, SUS/BU 139/2, SUS/BU 169/4 und SUS/BU 932/7, aus Rindern isoliert wurden BOT/BU 623/7 und BOT/BU 1845/7.

Alle restlichen Tierisolate und die 7 Klone verhielten sich sensitiv im HSRT, d.h. sie starben in den Testvertiefungen 24-76h nach Zugabe von Humanserum ab. In den Kontrollvertiefungen mit Pferdeserum wuchsen sie dagegen gut und gleichmäßig (Wachstum +++++).

Die 4 aus Schlafkrankheitspatienten isolierten Stämme verhielten sich alle im HSRT resistent (Tab. D.2). HOM/BU H1 und HOM/BU H2 zeigten sogar in den Testvertiefungen ein besseres Wachstum (+++++) als in den Kontrollvertiefungen (++++). HOM/BU H5 wuchs sowohl in den Test- als auch in den Kontrollvertiefungen gut und gleichmäßig (+++++), während HOM/IG 2602 in den Testvertiefungen nur ungleichmäßiges, geringes Wachstum (+) bis zum 10. Tag zeigte, in den Kontrollvertiefungen jedoch gut und gleichmäßig weiterwuchs (+++++).

Die im HSRT resistenten und subresistenten Feldisolate und ihre Überlebensdauer im Humanserum sind in Tab. D.3 gesondert zusammengefasst.

## **D.1.2 Der Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT)**

Da der BIIT nicht Bestandteil der eigentlichen Untersuchungen war, wurde er nur bei 8 Feldisolaten durchgeführt (Tab. D.2). Ziel war es außerdem, die Humanserumresistenz der Stämme nach Maus-Passagen durch gleichzeitige Injektion von Humanserum zu erhalten (siehe auch B.2.3.3 und B.2.5.1.1).

Der BIIT wurde durchgeführt wie bei C.2.3.1.1 beschrieben.

### **D.1.2.1 Verhalten ausgesuchter Feldisolate im BIIT**

Ausgewählt wurden 5 aus Tieren isolierte Feldstämme, welche direkt nach der Isolierung bereits im BIIT getestet (MANGENI, 1994; TIETJEN, persönliche Auskunft) und als resistent oder subresistent eingestuft worden waren, sowie 3 aus Menschen isolierte Feldstämme.

Von den aus Tieren isolierten Stämmen verhielten sich SUS/BU 347/7 (Schwein) und BOT/BU 1845/7 (Rind) im BIIT subresistent, d.h. sie wiesen bei Inokulation in Mäuse mit Humanserum eine im Gegensatz zur Inokulation ohne Humanserum um ca. 10 Tage verlängerte Präpatenzzeit auf. Bei SUS/BU 373/7 (Schwein), BOT/BU 602/7 (Rind) und BOT/BU 623/7 (Rind) waren die Präpatenzzeiten mit und ohne Humanserum annähernd identisch, sie verhielten sich im BIIT also resistent (Tab. D.2).

Die aus Schlafkrankheitspatienten isolierten Stämme HOM/BU H1, HOM/BU H2 und HOM/BU H5 verhielten sich im BIIT resistent, d.h. Test- und Kontrollmäuse entwickelten Parasitämien nach annähernd identischen Präpatenzzeiten (Tab. D.2).

Die Informationen für das BIIT-Verhalten der restlichen Stämme, bei welchen dieser Test im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht durchgeführt wurde, konnten durch MANGENI (1994) und TIETJEN (persönliche Auskunft) in Tab. D.2 mit einbezogen werden (siehe auch Tab. C.1).

Tab. D.2

Verhalten der Feldisolate im Humanserumresistenztest (HSRT) und im Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT; soweit durchgeführt)

Trypanosomen-Stamm bzw. -Klon	Passagen	Wachstum im HSRT mit HS / PS		Interpretation	Testreihen (HSRT)	Verhalten im BIIT
SUS/BU 83/6	2	0	+++++	sensitiv	2	sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 83/7	2	0	+++++	sensitiv	2	sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 83/9	2	0	+++++	sensitiv	2	n.d.
SUS/BU 83/9 Cl.1	4	0	+++++	sensitiv	2	subres.*
SUS/BU 83/9 Cl.2	8	0	+++++	sensitiv	2	sensitiv*
SUS/BU 83/9 Cl.4	7; 9	0	+++++	sensitiv	2	subres.*
SUS/BU 83/9 Cl.5	6	0	+++++	sensitiv	2	subres.*
SUS/BU 132/2	2; 3	0	+++++	sensitiv	2	n.d.
SUS/BU 132/4	4; 5	+bis d5	+++++	subres.	2	n.d.
SUS/BU 139/2	2; 3	+bis d5	+++++	subres.	2	resistent*
SUS/BU 169/4	2; 3	+bis d4	+++++	subres.	2	sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 319/7	2	0	+++++	sensitiv	2	subres.*/sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 319/7 Cl.1	6	0	+++++	sensitiv	2	sensitiv*
SUS/BU 319/7 Cl.2	24	0	+++++	sensitiv	2	subresistent*
SUS/BU 319/7 Cl.3	?	0	+++++	sensitiv	2	subresistent*
SUS/BU 319/9	?	0	+++++	sensitiv	2	sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 347/7	4 <sub>HS</sub>	+	+++++	resistent	2	subres./resistent <sup>o</sup>
SUS/BU 373/7	4 <sub>HS</sub>	+	+++++	resistent	2	resistent/resistent <sup>o</sup>
SUS/BU 561/3	6; 7	0	+++++	sensitiv	2	subres.*/sensitiv <sup>o</sup>
SUS/BU 932/7	2	+bis d5	+++++	subres.	2	subres.*
BOT/BU 483/2	2	0	+++++	sensitiv	2	subres.*
BOT/BU 492/2	3	0	+++++	sensitiv	2	n.d.
BOT/BU 602/7	1; 2; 5 <sub>HS</sub>	+	+++++	resistent	7	resistent/subres.*/ resistent <sup>o</sup>
BOT/BU 623/7	6 <sub>HS</sub> ; 8 <sub>HS</sub> ; 9 <sub>HS</sub>	+bis d4	+++++	subres.	3	resistent/resistent <sup>o</sup>
BOT/BU 1845/7	4 <sub>HS</sub>	+bis d6	+++++	subres.	2	subres./resistent <sup>o</sup>
HOM/BU H1	1 <sub>HS</sub>	+++++	++++	resistent	2	resistent

Tab. D.2 (Fortsetzung)

Trypanosomen-Stamm	Passagen	Wachstum HSRT mit HS / PS	im	Inter- pretation	Test- reihen (HSRT)	Verhalten im BIIT
HOM/BU H2	1 <sub>HS</sub>	+++++	++++	resistent	2	resistent
HOM/BU H5	1 <sub>HS</sub>	+++++	+++++	resistent	2	resistent
HOM/IG 2602	?	+	+++++	resistent	2	resistent <sup>o</sup>

SUS: sus (Hausschwein)

BOT: Bos taurus (Rind)

HOM: Homo sapiens (Mensch)

(WHO, 1986)

HS: Humanserum; <sub>HS</sub>: Passage mit Humanserum

PS: Pferdeserum

Wachstum (siehe C.6.2)

0: kein Wachstum; Absterben der Trypanosomen

+: ungleichmäßiges, geringes Wachstum

++++: gutes, aber nicht gleichmäßiges Wachstum

+++++: gutes, gleichmäßiges Wachstum

?: unbekannt

n.d.: nicht durchgeführt

subres.: subresistent

Cl.: Klon

Referenzen für den BIIT:

\*MANGENI, 1994

<sup>o</sup>TIETJEN, persönliche Auskunft

Tab. D.3

Zusammenstellung der im HSRT resistenten und subresistenten Feldisolate und ihr minimales bzw. maximales Überleben im Humanserum

Trypanosomen-Stamm	Grad der Resistenz	Wachstum mit HS in Tagen		Test-reihen
		min.	max.	
HOM/BU H1	resistent	14	14	2
HOM/BU H2	resistent	14	14	2
HOM/BU H5	resistent	14	14	2
HOM/IG 2602	resistent	5	10	2
BOT/BU 602/7	resistent	5	10	7
SUS/BU 347/7	resistent	3	10	2
SUS/BU 373/7	resistent	3	10	2
BOT/BU 1845/7	subresistent	4	6	2
SUS/BU 132/4	subresistent	3	5	2
SUS/BU 139/2	subresistent	3	5	2
SUS/BU 932/7	subresistent	0	5	2
SUS/BU 169/4	subresistent	0	4	2
BOT/BU 623/7	subresistent	0	4	3

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

HS: Humanserum

## **D.2 Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

### **D.2.1 Untersuchungen zur Methoden-Optimierung und zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse**

#### **D.2.1.1 Untersuchungen zur Optimierung der Herstellung von PFGE-Blöcken und Laufgel**

##### **D.2.1.1.1 Untersuchung verschiedener Puffer zum Einbetten der Trypanosomen in die low melting point (LMP)-Agarose**

Zur Durchführung der PFGE-Block-Herstellung lagen verschiedene Protokolle vor, bei denen 3 unterschiedliche Puffer zum Einbetten der Trypanosomen in die LMP-Agarose benutzt wurden: PSG-, PS- und 1xTBE-Puffer (letzterer sowohl mit als auch ohne Magnesium-Chlorid).

Aus dem *T. b. rhodesiense*-Referenzstamm EATRO 174 und den Feldisolaten BOT/BU 483/2 und HOM/IG 2602 wurden deswegen PFGE-Blöcke hergestellt, bei denen die prozyklischen Trypanosomen einmal mit PSG-, einmal mit PS-, einmal mit 1xTBE-Puffer mit MgCl und einmal mit 1xTBE-Puffer ohne MgCl gewaschen (siehe C.4.1.1.2) und in LMP-Agarose (gelöst in dem entsprechenden Puffer) eingebettet wurden (siehe C.4.1.1.3). Bereits nach dem Waschen zeigte sich mikroskopisch (Objektträger mit Deckglas, 400-fache Vergrößerung, Okular 10x, Objektiv F 40/0,65), dass die Trypanosomen nur noch im PSG-Puffer lebten, sowohl im PS- als auch im 1xTBE-Puffer mit oder ohne MgCl waren ihre Zellmembranen zerstört und keine Zellstrukturen mehr erkennbar.

In der PFGE zeigten nur die in PSG- und in PS-Puffer suspendierten Trypanosomen ein deutlich abgesetztes Bandenmuster, wobei die in PS-Puffer suspendierten im Vergleich etwas schwächere Banden erzeugten. Die in 1xTBE-Puffer ohne MgCl suspendierten Trypanosomen stellten sich als sogenannte Schmierspür (*smear*) dar, d.h. das genetische Material verteilte sich gleichmäßig über die ganze Länge der Spur und ließ sich einheitlich mit dem Ethidiumbromid anfärben (keine Abbildung). Die in 1xTBE-Puffer mit MgCl suspendierten Trypanosomen stellten sich als eine breite Bande bei ca. 3Mb und als feiner *smear* über den Rest der Spur verteilt dar.

Nur PSG-Puffer ermöglichte also eine auswertbare Darstellung des Chromosomen-Bandenmusters von Trypanosomen.

#### **D.2.1.1.2 Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration pro PFGE-Block**

Zur Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration der Trypanosomen im Puffer vor der Herstellung der PFGE-Blöcke wurden aus dem *T. b. rhodesiense*-Referenzstamm EATRO 174 mehrere Blöcke mit unterschiedlichen Trypanosomenkonzentrationen hergestellt:  $1,5 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1,5 \times 10^9$  und  $2 \times 10^9$ . Erst bei einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  Trypanosomen pro ml Puffer war überhaupt ein Bandenmuster zu erkennen, dieses jedoch sehr schwach. Für eine optimale Intensität der Banden war eine Trypanosomen-Konzentration von 1,5 bis  $2 \times 10^9$  pro ml Puffer nötig (keine Abbildung).

Für die Herstellung der restlichen PFGE-Blöcke wurden Konzentrationen von 1,3 bis  $2,8 \times 10^9$  Trypanosomen pro ml Puffer verwendet, je nachdem wie viele prozyklische Trypanosomen zur Verfügung standen.

#### **D.2.1.1.3 Auswirkung der Proteinase K-Menge und der Länge des Verdaus auf die Qualität der PFGE-Blöcke**

Um die Auswirkung von Proteinase K-Menge bzw. Länge des Verdaus auf die Qualität der PFGE-Blöcke zu testen (siehe C.4.1.1.4), wurden PFGE-Blöcke des Feldstammes IG 2602 einmal mit  $100 \mu\text{g}$  und einmal mit  $1 \text{mg}$  Proteinase K pro ml NDS-Puffer 48h lang verdaut. Ein Teil der mit  $1 \text{mg}$  Proteinase K pro ml NDS-Puffer verdauten Blöcke wurden anschließend mit frischem Lysis-Mix (ebenfalls  $1 \text{mg/ml}$  Proteinase K) ein zweites Mal 48h lang verdaut.

Des weiteren wurden PFGE-Blöcke des *T. b. rhodesiense*-Referenzstammes STIB 704 mit  $1 \text{mg}$  Proteinase K pro ml NDS-Puffer 78h lang verdaut.

In der PFGE zeigten die mit  $100 \mu\text{g/ml}$  NDS-Puffer verdauten Blöcke nur schwache Banden mit etwas *smear* über die gesamte Spur verteilt. Bei den mit  $1 \text{mg/ml}$  NDS-Puffer verdauten Blöcke zeigten sich im Ergebnis keinerlei Unterschiede, egal ob  $1 \times 48\text{h}$ ,  $2 \times 48\text{h}$  oder  $1 \times 78\text{h}$  lang verdaut. Die Chromosomen konnten gut aufgetrennt werden, die Banden waren scharf und leuchtend und kein *smear* entstand (keine Abbildung).

Um eine gute Auftrennung der Chromosomen zu erreichen, müssen die PFGE-Blöcke also in NDS-Puffer mit mindestens  $1 \text{mg/ml}$  Proteinase K inkubiert werden, wobei  $48\text{h}$  ausreichend sind.

#### **D.2.1.1.4 PFGE-Testläufe mit unterschiedlichen Laufgel-Höhen**

Zur Untersuchung der Auswirkung der Laufgel-Höhe auf das PFGE-Ergebnis wurde das Gel einmal 7mm (300ml) und einmal 4,5mm (=200ml) hoch gegossen (siehe C.4.1.2.1).

Nach der PFGE war bei dem 7mm hohen Gel eine schlechte Auftrennung der Chromosomen und ein hochgradiger Verlust der Bandenschärfe zu sehen, während sich die Chromosomen im 4,5mm hohen Gel sehr gut auftrennten und sich scharf und klar darstellten (keine Abbildung).

#### **D.2.1.2 Ermittlung von Parameterlisten zur optimalen Darstellung von Mini-, intermediären und großen Chromosomen**

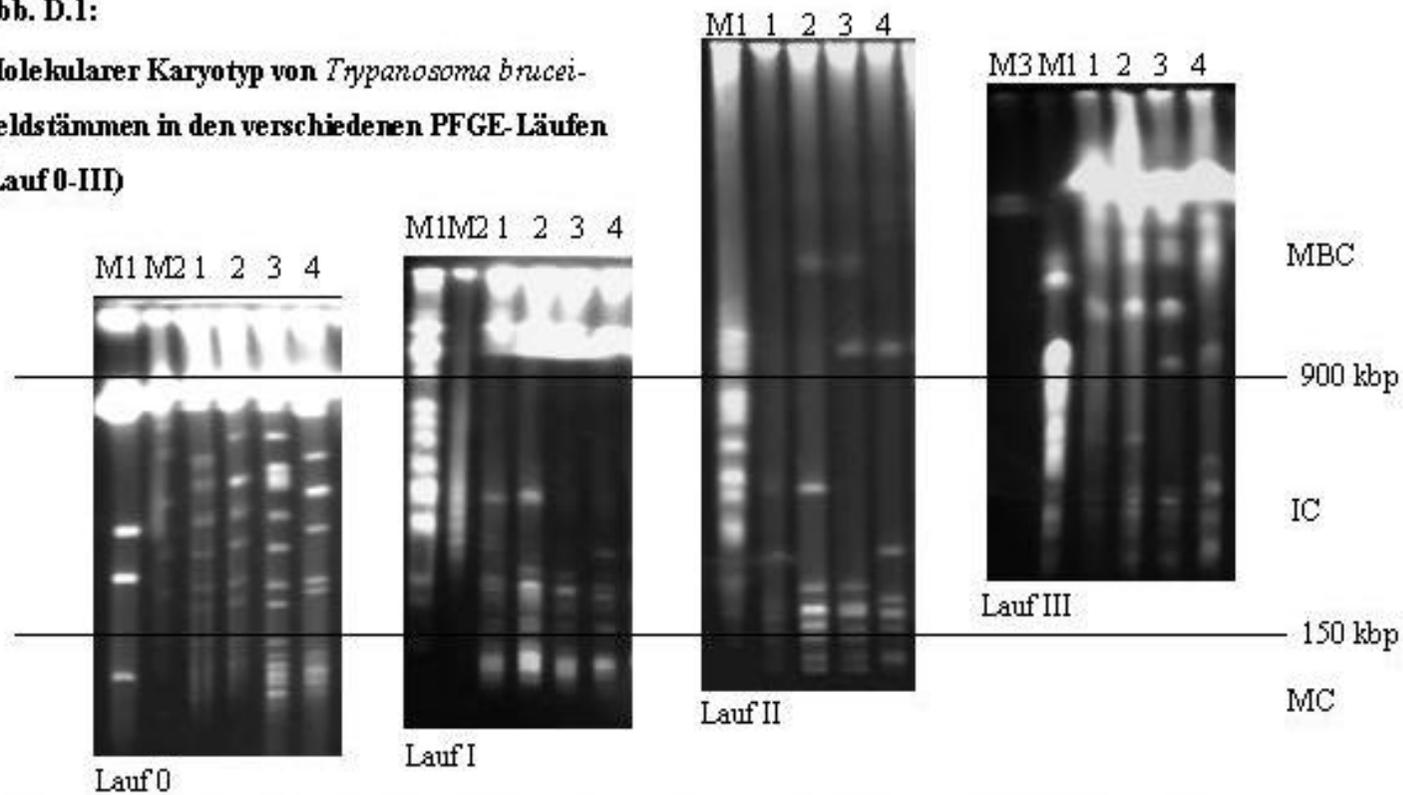
Da die Bandbreite der Chromosomengrößen (30kbp bis 5,7Mbp) keine Darstellung aller Chromosomen durch einen einzigen Lauf ermöglichte, mussten mehrere Läufe gefunden werden. Dies geschah empirisch aufgrund von Testläufen, basierend auf der Gebrauchsanweisung für den Rotaphor<sup>®</sup> Typ V Vers. 5.1 (BIOMETRA, 1992) und verschiedenen Veröffentlichungen (VAN DER PLOEG et al., 1989 und 1992).

Eine übersichtliche Auflistung der Laufkonditionen kann man der Tabelle C.5 (C.4.1.4.1) entnehmen.

Die Gel-Fotographien der Läufe 0 bis III sind in der Abbildung D.1 dargestellt. Zum besseren Vergleich wurden Zonen markiert, wobei „MC“ für die Mini-, „IC“ für die Intermediär- und „MBC“ für die großen Chromosomen stehen.

**Abb. D.1:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-  
Feldstämmen in den verschiedenen PFGE-Läufen  
(Lauf 0-III)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Lambda ladder; M3: Marker *Schizosaccharomyces pombe*

Spur 1: HOM/BU H1; Spur 2: HOM/BU H2; Spur 3: HOM/BU H5; Spur 4: BOT/BU 602/7

MBC: große Chromosomen (>900kbp); IC: Intermediär-Chromosomen (150-900kbp); MC: Mini-Chromosomen (<150kbp)  
kbp: kilo-Basenpaare

#### **D.2.1.2.1 Auftrennung der Chromosomen von 95 bis 450kbp (Mini- und Intermediär-Chromosomen)**

Die Mini- und einen Teil der Intermediär-Chromosomen konnte man in einem 24h-Lauf mit einer Spannung von 10V/cm, einem Intervall von 15s und einem Winkel von 110° auftrennen. Als Laufpuffer wurde 10°C-warmer 0,25xTBE-Puffer verwendet, bei einer Rotorgeschwindigkeit von 5 mit einer Spannungsunterbrechung zwischen den Rotorbewegungen. Die 30-150kbp großen Mini-Chromosomen bewegten sich sehr schnell durch das Gel und ließen sich ab ca. 95kbp gut und eindeutig auftrennen. Unter 95kbp waren die Banden bei den meisten Stämmen jedoch aufgrund ihrer großen Anzahl nur schlecht voneinander zu unterscheiden. Die Intermediär-Chromosomen (ab 200kbp) stellten sich als eindeutige, gut abgesetzte Banden dar (Abb. D.2).

#### **D.2.1.2.2 Auftrennung der Chromosomen von 300 bis 840kbp (Intermediäre Chromosomen)**

Eine optimale Auftrennung nahezu aller Intermediär-Chromosomen erreichte man mit einem 24h-Lauf, einer Spannung von 10V/cm, einem Intervall von 50s und einem Winkel von 120°. Als Laufpuffer wurde 13°C-warmer 0,25xTBE-Puffer verwendet, bei einer Rotorgeschwindigkeit von 5 mit einer Spannungsunterbrechung zwischen den Rotorbewegungen. Die 200-840kbp großen Moleküle bewegten sich im Gel relativ schnell und ließen sich ab ca. 300kbp gut und eindeutig auftrennen. Unter 300kbp konnten die Chromosomenbanden nur schlecht ausgewertet werden, da sie so nahe beieinander lagen, dass sie optisch nicht voneinander zu trennen waren (Abb. D.3).

#### **D.2.1.2.3 Auftrennung der Chromosomen von 450kbp bis 1,6Mbp (intermediäre und große Chromosomen)**

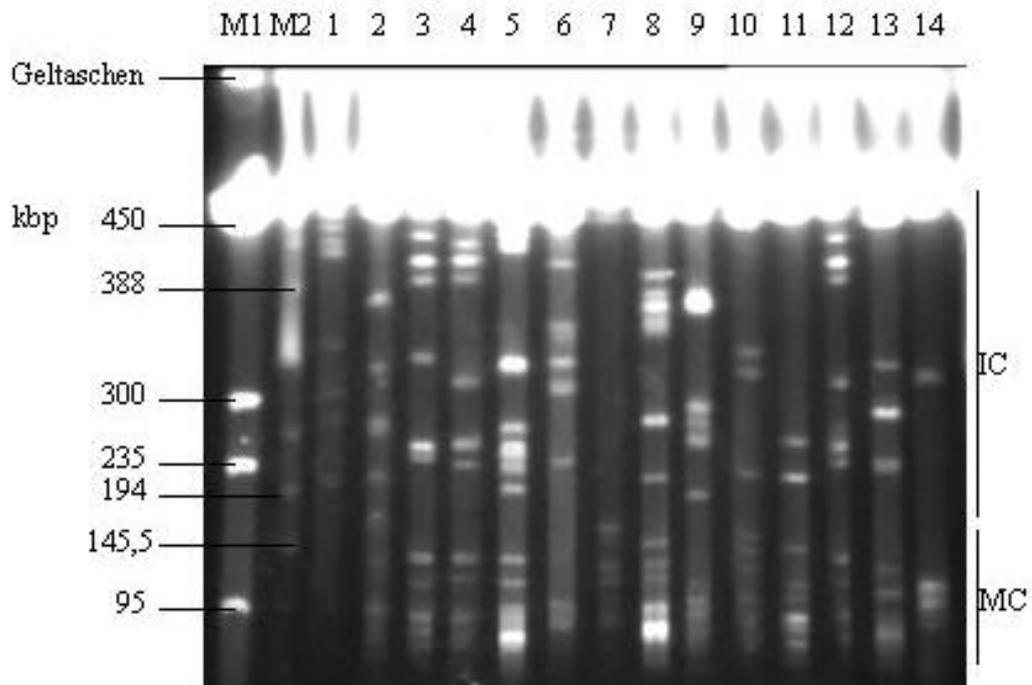
Fast alle intermediären und ein Teil der großen Chromosomen (450kbp bis 1,6Mbp) konnten in einem 36h-Lauf, einer Spannung von 10 bis 9V/cm (linear), einem Intervall von 100 bis 10s (logarithmisch) und einem Winkel von 100 bis 125° (logarithmisch) aufgetrennt werden. Als Laufpuffer wurde 13°C-warmer 0,25xTBE-Puffer verwendet, bei einer Rotorgeschwindigkeit von 5 mit einer Spannungsunterbrechung zwischen den Rotorbewegungen. In diesem Bereich wurden die Chromosomen relativ gut und eindeutig voneinander getrennt (Abb. D.4).

#### **D.2.1.2.4 Auftrennung der Chromosomen von 1 bis 3Mbp (große Chromosomen)**

Die großen Chromosomen von 1 bis 3Mbp wurden in einem 84h-Lauf aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 11°C-warmer 0,5xTBE-Puffer verwendet, bei einer Rotorgeschwindigkeit von 5 mit einer Spannungsunterbrechung zwischen den Rotorbewegungen. Die Auftrennung dieser besonders massigen Moleküle gelang durch eine Spannung von 6 bis 2,5V/cm (linear), einem Intervall von 350 bis 50s (logarithmisch) und einem Winkel von 110 bis 100° (logarithmisch). Die exakte Berechnung dieser Chromosomen erwies sich jedoch als schwierig, da sich die Banden breit und verschwommen darstellten (Abb. D.5).

**Abb. D.2:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feld- und -Referenzstämmen bzw. -klonen im Bereich der Mini- (MC) und Intermediär-(IC)-Chromosomen (PFGE-Lauf 0)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Marker Lambda ladder

Feldstämme: Spur 1: BOT/BU 623/7; Spur 2: HOM/IG 2602; Spur 3: SUS/BU 319/7; Spur 4: SUS/BU 347/7; Spur 5: SUS/BU 132/2; Spur 6: SUS/BU 561/3; Spur 12: SUS/BU 373/7

Referenzstämme: *T. b. gambiense*: Spur 7: DAL 69; Spur 14: G. DOLO

*T. b. rhodesiense*: Spur 8: STIB 704

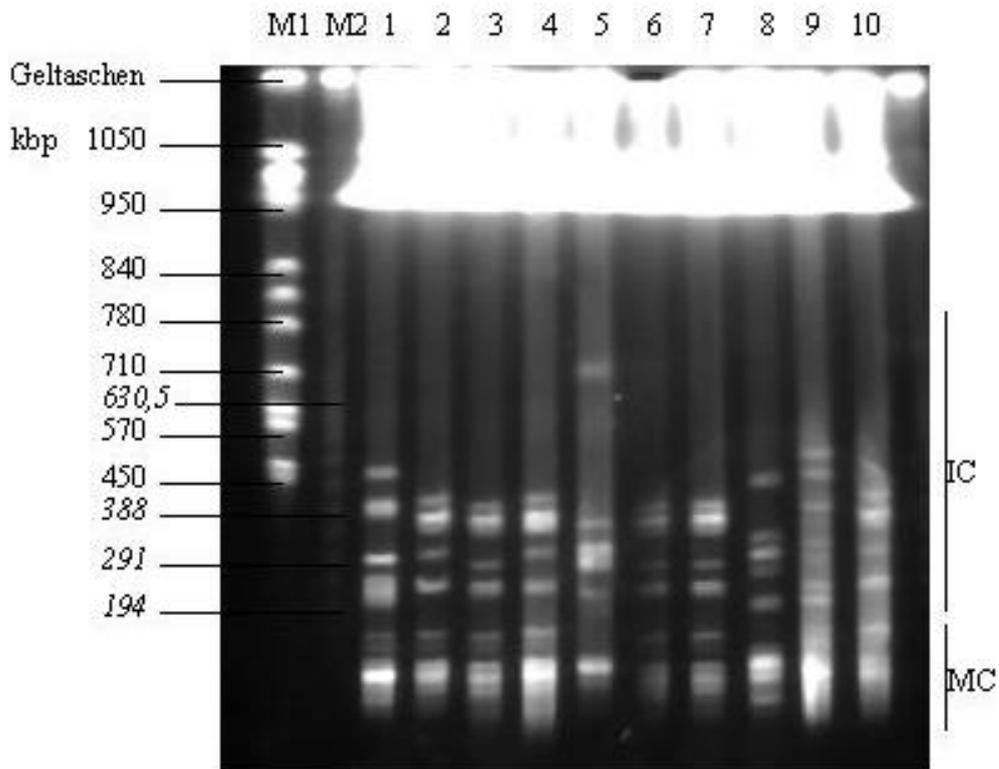
*T. b. brucei*: Spur 9: Cl. 8/18; Spur 10: CP 2469; Spur 11: CP 547; Spur 13: STIB 345

kbp: kilo-Basenpaare

Laufbedingungen: 10 V/cm, 15s-Intervall, 110°, 24h.

**Abb. D.3:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldisolaten im Bereich der Intermediär-Chromosomen (IC) (PFGE-Lauf I)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Marker Lambda ladder

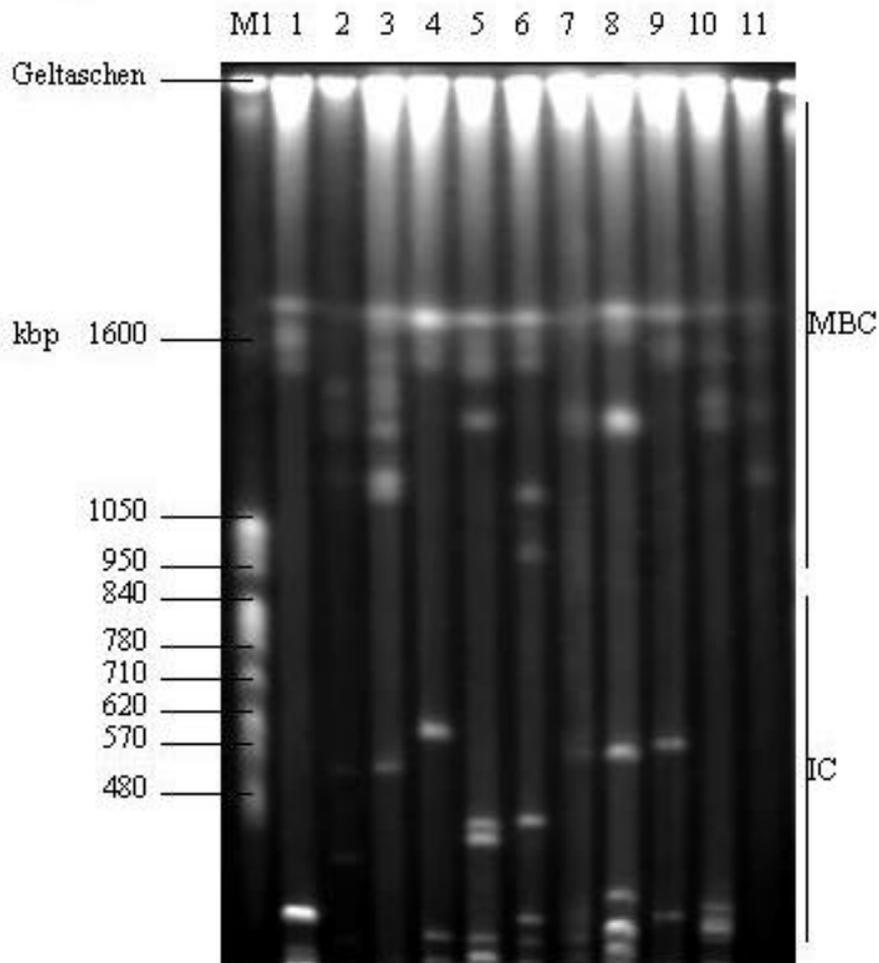
Spur 1: SUS/BU 132/2; Spur 2: SUS/BU 132/4; Spur 3: SUS/BU 139/2; Spur 4: SUS/BU 169/4; Spur 5: SUS/BU 561/3; Spur 6: BOT/BU 483/2; Spur 7: BOT/BU 492/2; Spur 8: BOT/BU 602/7; Spur 9: SUS/BU 83/7; Spur 10: SUS/BU 932/7

kbp: kilo-Basenpaare

Laufbedingungen: 10 V/cm, 50s-Intervall, 120°, 24h.

**Abb. D.4:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Referenzstämmen und aus Menschen isolierten Feldstämmen im Bereich der intermediären (IC) und großen (MBC) Chromosomen (PFGE-Lauf II)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; kbp: kilo-Basenpaare

*T. b. brucei*: Spur 1: Cl. 8/18; Spur 2: CP 2469; Spur 3: CP 547;

Spur 4: ILTat 1.4 Cl.; Spur 5: STIB 345

*T. b. rhodesiense*: Spur 9: EATRO 174; Spur 10: STIB 704

*T. b. gambiense*: Spur 11: DAL 72 Cl. A

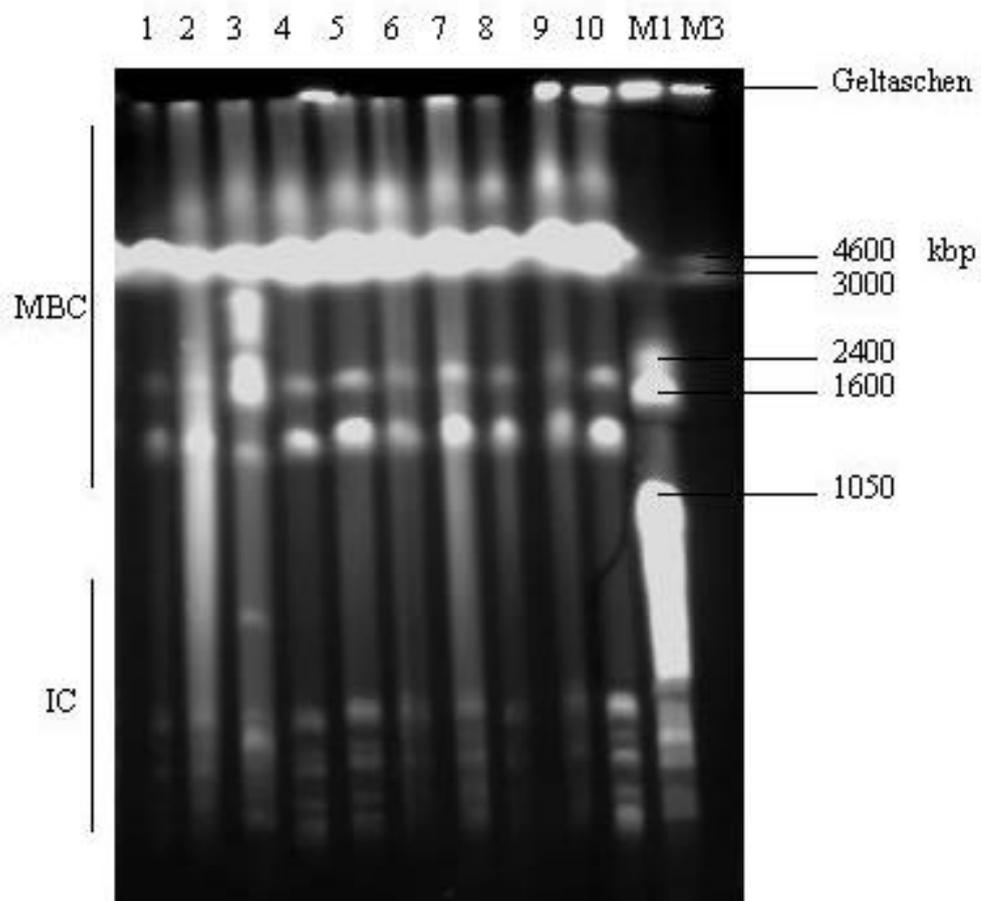
Feldstämme: Spur 6: HOM/IG 2602; Spur 7: HOM/UG H1; Spur 8: HOM/UG H2

Laufbedingungen: 10->9 V/cm (linear), 100->10s-Intervalle (logarithmisch),

100->125° (logarithmisch), 36h.

**Abb. D.5:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldisolaten im Bereich der großen Chromosomen (MBC) (PFGE-Lauf III)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*;

M3: Marker *Schizosaccharomyces pombe*

Spur 1: SUS/BU 319/7; Spur 2: SUS/BU 319/9; Spur 3: SUS/BU 561/3;

Spur 4: SUS/BU 483/2; Spur 5: SUS/BU 492/2; Spur 6: BOT/BU 169/4;

Spur 7: BOT/BU 932/7; Spur 8: BOT/BU 139/2; Spur 9: SUS/BU 132/4;

Spur 10: SUS/BU 1845/7

kbp: kilo-Basenpaare

Laufbedingungen: 6- $\rightarrow$ 2,5 V/cm (linear), 350- $\rightarrow$ 50s-Intervalle

(logarithmisch), 110- $\rightarrow$ 100° (logarithmisch), 84h.

### **D.2.1.3 Untersuchungen zur Stabilität des Karyotypes**

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

#### **D.2.1.3.1 Vergleich des Karyotypes von Blutstrom- und prozyklischen Formen**

Um zu zeigen, dass der Karyotyp von Blutstromformen und Prozyklischen desselben Trypanosomenstammes identisch ist, wurden vom Klon 3 des Feldstammes SUS/BU 319/7 PFGE-Blöcke sowohl aus Blutstrom- als auch aus prozyklischen Formen der gleichen Passage hergestellt (siehe C.4.1.1.1 und C.4.1.1.2).

In allen vier Läufen stellten sich die Chromosomenmuster beider Formen genau gleich dar. Abbildung D.6 zeigt die Mini-, Intermediär- und einen Teil der großen Chromosomen (Lauf 0 und III). Für die Läufe I und II stellten sich identische Verhältnisse dar (keine Abbildung). Daraus kann geschlossen werden, dass Trypanosomen während ihres Wandels von der Blutstromform (im Endwirt Mensch oder Tier) in die prozyklische Form (im Überträger Tsetse-Fliege) keine Änderung ihres Karyotypes erfahren.

#### **D.2.1.3.2 Stabilität des Karyotypes eines Klonen im Verlaufe einer chronischen Infektion in Mäusen (frühe und späte Antigenvarianten)**

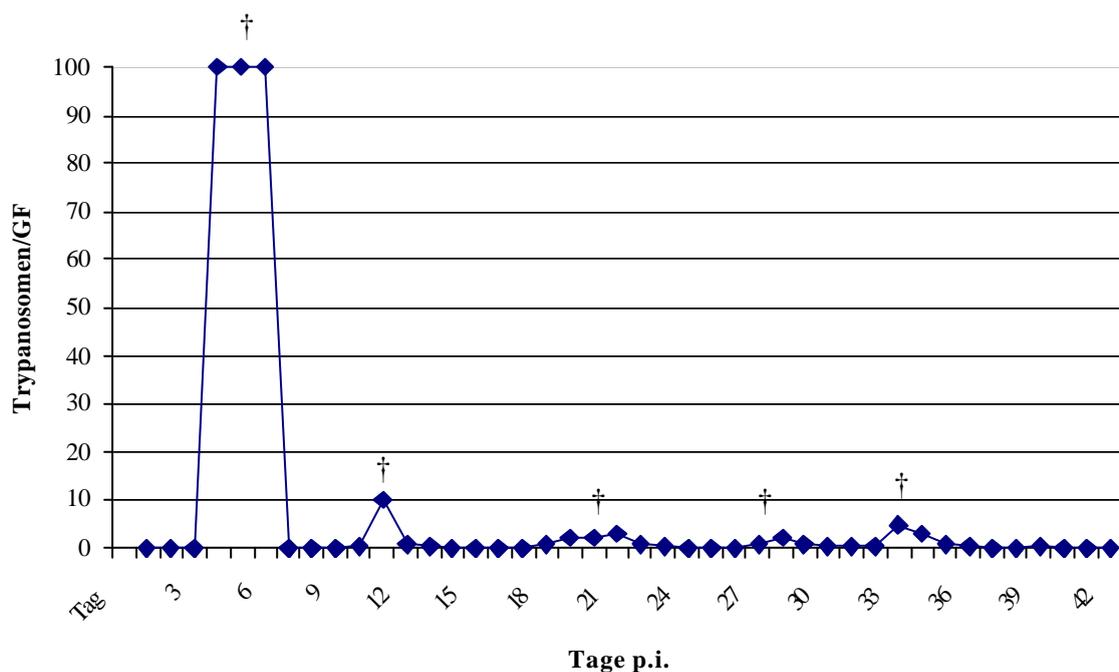
Um im Endwirt überleben zu können, müssen Trypanosomen beständig dessen Immunantwort entgehen. Das erreichen sie durch phasenweise Änderung ihres Oberflächenantigen-Typen (*variant antigen type*, VAT), wodurch auch die verschiedenen Parasitämien im Wirt entstehen (siehe B.2.3.2). Dabei bestimmt immer ein VAT eine Parasitämiewelle. Die Trypanosomen vermehren sich bis zur Parasitämiespitze, werden vom Immunsystem des Wirtes erkannt und langsam eliminiert (Abfall der Parasitämiewelle). Inzwischen beginnen die Parasiten jedoch ihren VAT zu ändern, dieser neue VAT kann sich zunächst ungestört vermehren und bildet die nächste Parasitämiewelle, bis das Immunsystem auch diesen neuen VAT als körperfremd erkannt hat, u.s.w..

Da bei der Änderung des VATs Genverschiebungen auf den Chromosomen stattfinden (siehe B.2.3.2), wäre es denkbar, dass auch der Karyotyp Änderungen der Chromosomengrößen bzw. -verteilung erfährt. Um das zu untersuchen, 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 (C.2.3.2), in Prozyklische umgewandelt (C.3.2.1), vermehrt und PFGE-Blöcke daraus hergestellt (C.4.1.1). Dabei wurde davon ausgegangen, dass jede Parasitämie-Spitze hauptsächlich einen VAT repräsentierte. Die einzelnen Trypanosomen-Populationen wurden aus Zeitgründen nicht serologisch auf ihre Oberflächen-Antigene hin untersucht, jedoch kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass es sich hierbei um verschiedene VATs handelte. Trypanosomen des VAT1 wurden an Tag 5, des VAT2 an Tag 11, des VAT3 an Tag 20, des VAT4 an Tag 27 und des VAT5 an Tag 33 isoliert (Tab. D.4).

Tab. D.4

Parasitämieverlauf in einer mit dem Klon 3 des Trypanosomen-Feldstammes  
SUS/BU 319/7 infizierten Maus



Trypanosomen/GF: Trypanosomen pro Gesichtsfeld im Nativpräparat

† Entnahme von Trypanosomen zur Umwandlung in Prozyklische für die PFGE

In allen vier Läufen stellten sich die Chromosomenmuster der verschiedenen VATs genau gleich dar. In Abbildung D.6 sind Mini-, Intermediär- und große Chromosomen dargestellt (Lauf 0 und III). Identische Verhältnisse stellten sich für die Läufe I und II dar (keine

Abbildung). Daraus kann geschlossen werden, dass der Karyotyp von Trypanosomen auch nach der Änderung ihres Oberflächenantigen-Typs stabil bleibt.

#### **D.2.1.3.3 Vergleich des Karyotypes zweier Feldisolate und aus diesen gewonnener Klone**

Da ein Trypanosomen-Feldisolat als eine Population von Individuen betrachtet werden muss (siehe B.2.3.3), wurden, um die Aussagefähigkeit der Untersuchung von Feldisolaten zu bestätigen, zwei aus Schweinen gewonnene Feldstabilate mehrmals von PELLMANN (1999) geklont. Dabei wurde jeweils genau ein Trypanosom isoliert, eine Maus damit infiziert und die sich daraus entwickelnde Trypanosomenpopulation untersucht.

In allen vier Läufen stellten sich die Chromosomenmuster der Klone 1, 2, 4 und 5 und ihres Ausgangs-Feldisolates SUS/BU 83/9, sowie der Klone 1, 2 und 3 und ihres Ausgangs-Feldisolates SUS/BU 319/7 identisch dar. Abbildung D.7 zeigt die Mini-, Intermediär- und einen Teil der großen Chromosomen dar (Lauf 0 und II). Für die Läufe I und III stellten sich identische Verhältnisse dar (keine Abbildung für Lauf I; die Darstellung von Lauf III kann Abb. D.6 entnommen werden). Daraus kann geschlossen werden, dass die in einem passagierten Feldisolat vereinten Individuen den gleichen Karyotyp haben. Also haben Aussagen, die mit Hilfe der PFGE über ein bereits passagiertes Feldisolat gemacht werden, für jedes der darin enthaltenen Trypanosomen-Individuum Gültigkeit.

**Abb. D.6:**

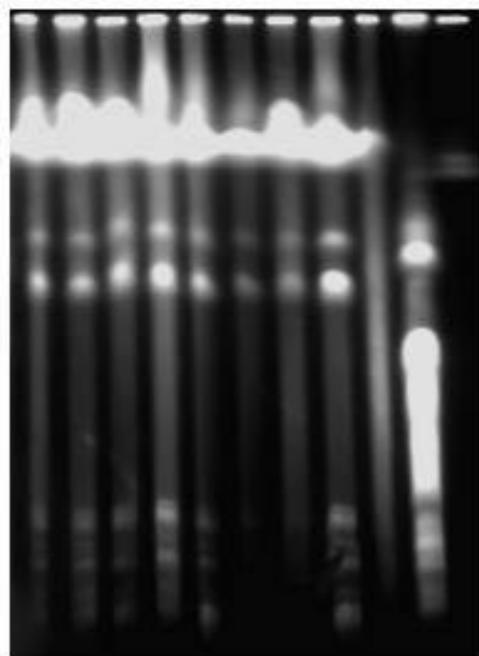
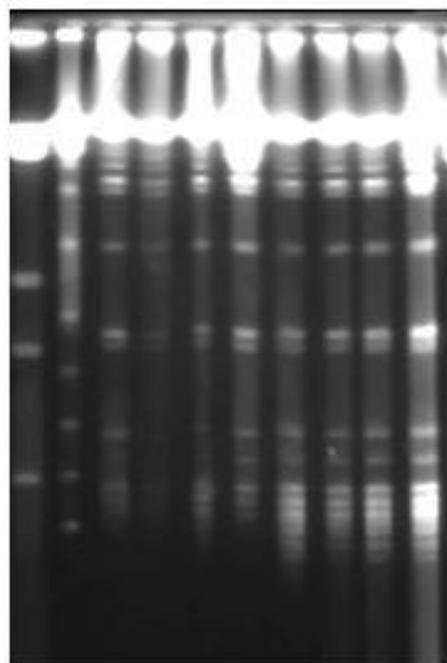
**Vergleich des Karyotypes von Blutstrom- und prozyklischen Formen sowie verschiedener Antigenvarianten**

PFGE-Lauf 0:

PFGE-Lauf III:

M1 M2 1 2 3 4 5 6 7 8

1 2 3 4 5 6 7 8 M1 M3



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*

M2: Marker Lambda ladder

M3: Marker *Schizosaccharomyces pombe*

Spur 1: SUS/BU 319/7

Spur 2: SUS/BU 319/7 C1. 1

Spur 3: SUS/BU 319/7 C1. 3 BSF

Spur 4: SUS/BU 319/7 C1. 3 VAT 1

BSF: Blutstromform

Spur 5: SUS/BU 319/7 C1. 3 VAT 2

Spur 6: SUS/BU 319/7 C1. 3 VAT 3

Spur 7: SUS/BU 319/7 C1. 3 VAT 4

Spur 8: SUS/BU 319/7 C1. 3 VAT 5

VAT: Variant Antigen Type

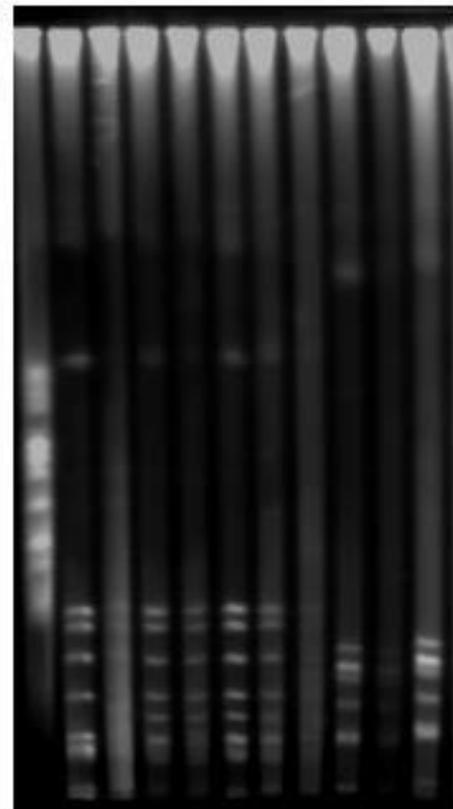
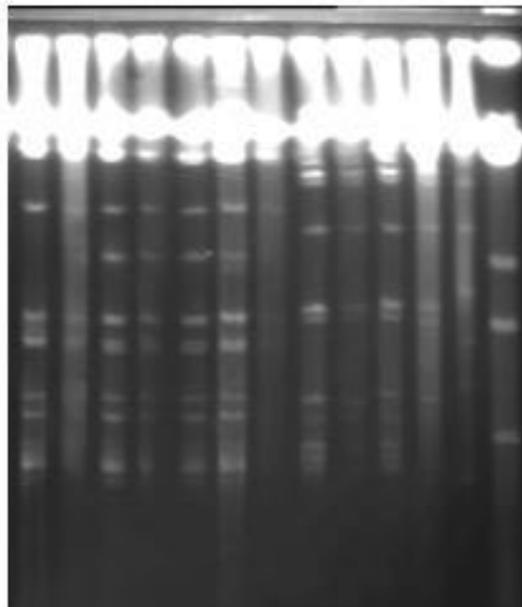
**Abb. D.7:**

**Vergleich des Karyotypes zweier Feldisolate und aus diesen gewonnener Klone**

PFGE-Lauf 0:

PFGE-Lauf II:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M2 M1 M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*

M2: Marker Lambda ladder

Spur 1: SUS/BU 83/6

Spur 2: SUS/BU 83/7

Spur 3: SUS/BU 83/9

Spur 4: SUS/BU 83/9 C1. 1

Spur 5: SUS/BU 83/9 C1. 2

Spur 6: SUS/BU 83/9 C1. 4

Spur 7: SUS/BU 83/9 C1. 5

Spur 8: SUS/BU 319/7

Spur 9: SUS/BU 319/7 C1. 1

Spur 10: SUS/BU 319/7 C1. 3

Spur 11: SUS/BU 319/9

## D.2.2 Untersuchung der Referenzstämme und –klone mit der PFGE

Bei der Darstellung der Referenzstämme und –klone mit der PFGE wurde deutlich, dass nahezu jeder einzelne Trypanosomenstamm oder –klon sein eigenes Chromosomenmuster aufweist, welches dem anderer Stämme höchstens ähnelt.

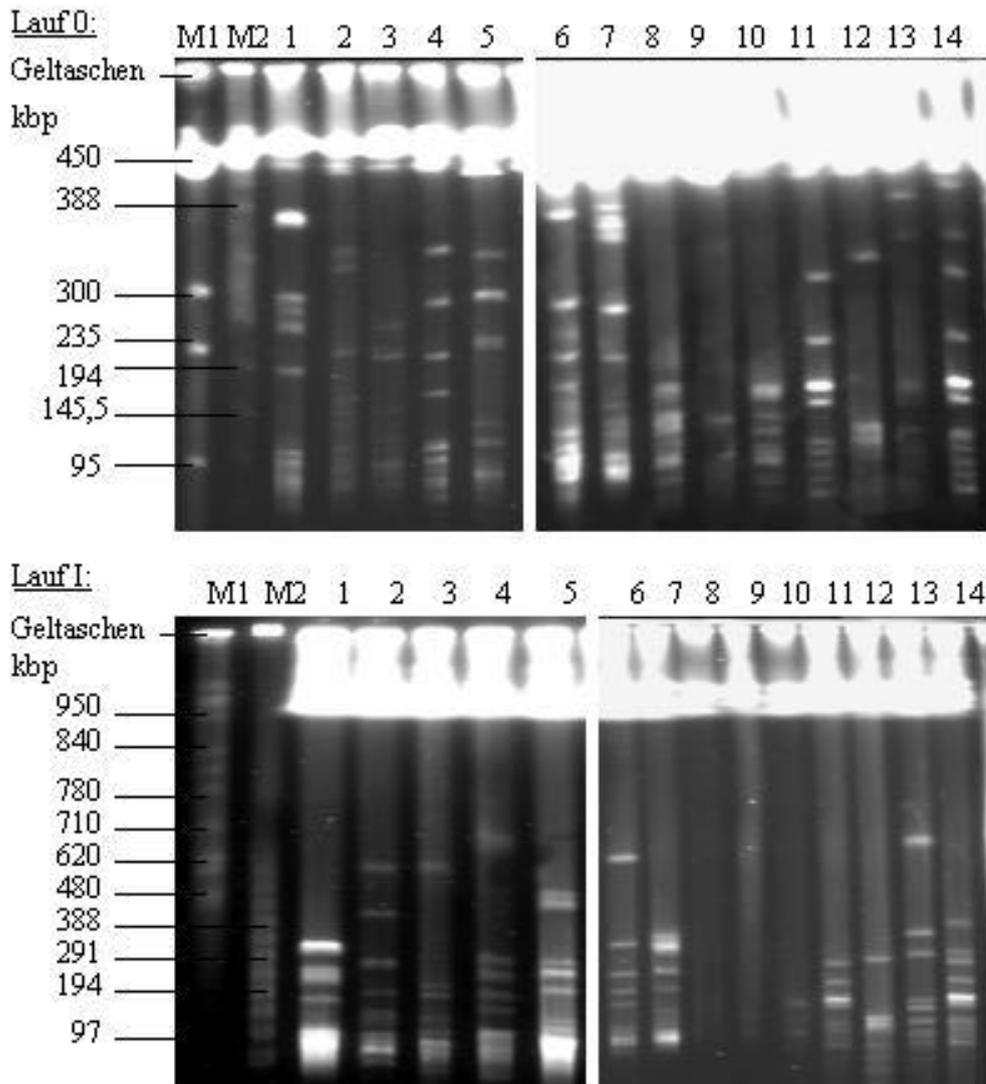
Da identische Proben in zwei verschiedenen PFGE-Geltaschen, vor allem in innen oder außen liegenden, aufgrund des elektrischen Feldes leicht unterschiedliche Bandenmuster ergeben können (VAN DER PLOEG et al., 1984; CHU et al., 1986), wurden mehrere Läufe mit unterschiedlicher Positionierung der Proben durchgeführt.

Die PFGE ermöglichte eine deutliche Auftrennung von Chromosomen-DNA im Bereich zwischen 95kbp und 3000kbp. Alle Stämme besaßen viele, nahe beieinander liegende Mini-Chromosomenbanden (im Folgenden "MC", nach ERSFELD et al., 1999; durchnummeriert mit der kleinsten auswertbaren Bande des Stammes beginnend) im Bereich von 95 bis 194kbp (Abb. D.8) und einige vereinzelt Intermediär-Chromosomenbanden ("IC") zwischen 210 und 670kbp (Abb. D.8 und 9). Große Chromosomenbanden ("MBC" = Mega-Basenpaar-Chromosomen; ERSFELD et al., 1999) zeigten sich im Bereich von 1050 bis 3000kbp, die jedoch aufgrund ihrer Masse nur schlecht ausgewertet werden konnten (Abb. D.9). Aus dem allgemeinen Bild fielen die sieben *T. b. gambiense*-Stämme (DAL 69, DAL 72 Cl. A, TH 152, H1 CI, G. DOLO, H1 ZR und H2 ZR) heraus, die durchschnittlich weniger intermediäre Chromosomenbanden zeigten als die *T. b. brucei*- und *T. b. rhodesiense*-Referenzen (siehe D.2.2.3). Eine herausstechende, weil etwas abseits zwischen 550 und 650kbp liegende Intermediär-Chromosomenbande hatten die *T. b. brucei*-Referenzstämme ILTat 1.4, CP 547 und CP 2469, sowie der *T. b. rhodesiense*-Referenzstamm EATRO 174 und der *T. b. gambiense*-Referenzstamm H1 ZR, nur bei den beiden CP-Stämmen lagen sie jedoch auf identischer Höhe.

Drei Banden fanden sich bei nahezu allen Referenzstämmen:

Bande 2 bei ca. 85kbp, welche nur H1 CI, H1 ZR und H2 ZR fehlte, Bande 64 bei ca. 1600kbp, welche nur CP 2469 und G. Dolo nicht aufwiesen, und Bande 72 bei ca. 2900kbp, welche nur CP 547 und ILTat 1.4 Cl. nicht hatten. Ihre Nummerierung ergibt sich aus der Anzahl der insgesamt dokumentierten Banden und sie sollen im Folgenden als Orientierungsmarken gelten.

**Abb. D.8: Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Referenzstämmen bzw. -klonen im Bereich der Mini- (<150kbp) und Intermediär- (150-700kbp) Chromosomen**



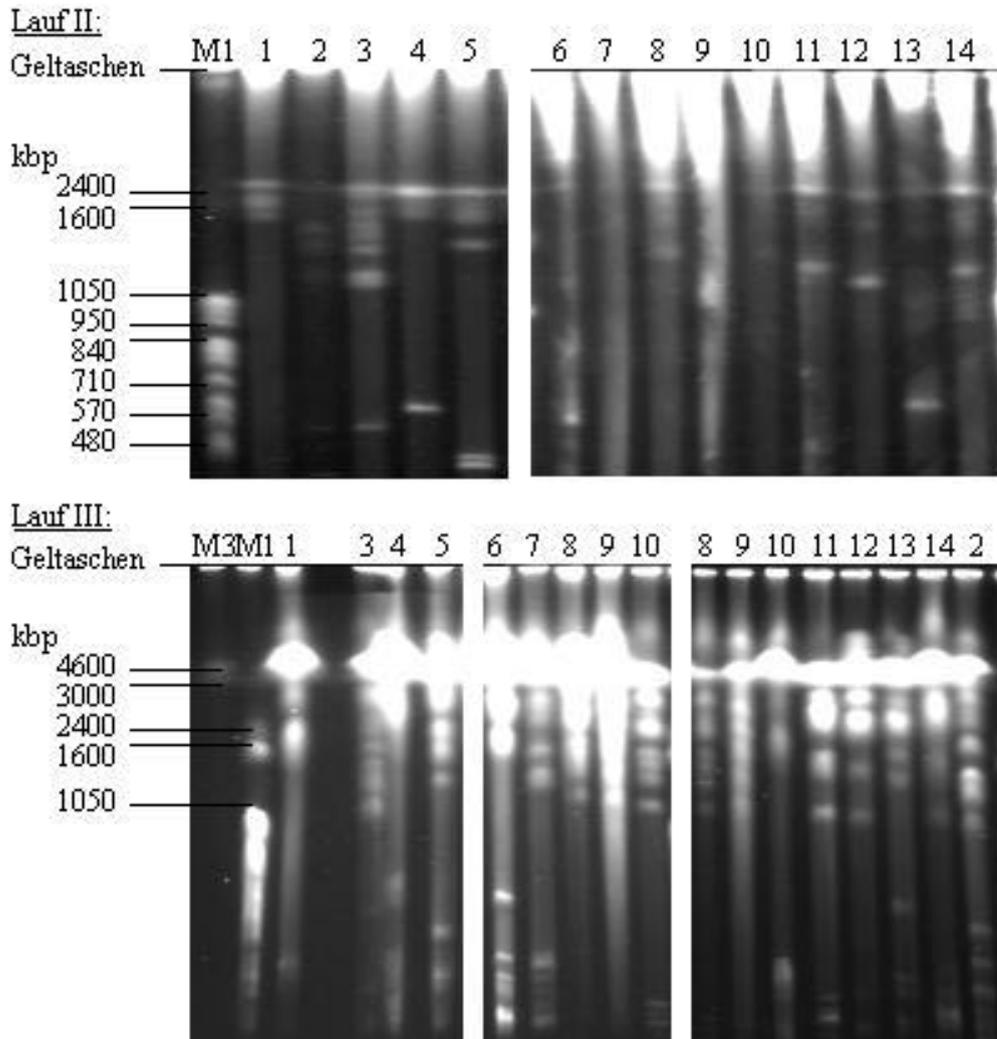
M1: *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Lambda ladder; kbp: kilo-Basenpaare

*T. b. brucei*: Spur 1: Cl. 8/18; Spur 2: CP 2469; Spur 3: CP 547; Spur 4: IITat 1.4 Cl.; Spur 5: STIB 345 RA

*T. b. rhodesiense*: Spur 6: EATRO 174; Spur 7: STIB 704

*T. b. gambiense*: Spur 8: DAL 69; Spur 9: DAL 72 Cl.; Spur 10: TH 152; Spur 11: H1 Cl.; Spur 12: G. DOLO; Spur 13: H1 ZR; Spur 14: H2 ZR

**Abb. D.9: Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Referenzstämmen bzw. -klonen im Bereich der Intermediär- (450-700kbp) und großen (900kbp-3Mbp) Chromosomen**



M1: *Saccharomyces cerevisiae*; M3: *Schizosaccharomyces pombe*;

kbp: kilo-Basenpaare

*T. b. brucei*: Spur 1: Cl. 8/18; Spur 2: CP 2469; Spur 3: CP 547; Spur 4: IITat 1.4 Cl.; Spur 5: STIB 345 RA

*T. b. rhodesiense*: Spur 6: EATRO 174; Spur 7: STIB 704

*T. b. gambiense*: Spur 8: DAL 69; Spur 9: DAL 72 Cl.; Spur 10: TH 152; Spur 11: H1 Cl.; Spur 12: G. DOLO; Spur 13: H1 ZR; Spur 14: H2 ZR

Da es schwierig ist, Objekte miteinander zu vergleichen, die augenscheinlich höchst unterschiedlich sind, beschränkt sich der nun folgende Text auf die kurze Beschreibung der Bandenanzahl der einzelnen Stämme und das Hervorheben besonders auffälliger Gemeinsamkeiten. Details über Bandenschätzwerte, sowie ihre Lage und Verteilung können der Tabelle 1 aus dem Anhang entnommen werden. Eine umfassendere Analyse der Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen befindet sich im Kapitel D.2.4.2.1 im Zusammenhang mit der Cluster-Analyse.

### **D.2.2.1 Darstellung von *Trypanosoma brucei brucei***

Die 5 *T. b. brucei*-Referenzstämme zeigten in allen drei Chromosomen-Größenklassen mehrere Banden, hatten jedoch im Bandenmuster nur wenig Gemeinsamkeiten. Die Schätzgrößen, sowie Lage und Verteilung der Banden können Tabelle 1 aus dem Anhang entnommen werden.

**Cl. 8/18** zeigte insgesamt nur 11 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden, mit seiner MC2 auf Höhe von Bande 2, hatten einen auffällig großen Abstand zwischen MC3 und MC4. Von seinen 4 Intermediär-Chromosomenbanden lagen IC1 bis 3 eigentümlich nah beieinander. Er besaß 3 große Chromosomenbanden, welche in ihrer Lage mit den jeweils 3 letzten Banden von DAL 69 und TH 152 identisch waren. MBC1 lag dabei auf Höhe von Bande 64 und MBC3 auf Höhe von Bande 72.

**CP 2469** hatte insgesamt 19 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 7 Mini-Chromosomenbanden erweckten durch ihre recht regelmäßigen Abstände voneinander einen leiterartigen Eindruck. Seine MC2 lag auf Höhe von Bande 2. Er ähnelte mit seinem Mini-Chromosomenmuster stark STIB 704 (*T. b. rh.*). Von den 5 Intermediär-Chromosomen waren IC1 und IC5 in ihrer Höhe jeweils identisch mit IC1 und IC3 von CP 547. Auch in der Lage und Verteilung seiner 7 großen Chromosomenbanden ähnelte er dem Stamm CP 547, wobei sich seine MBC7 auf der Höhe von Bande 72 befand.

**CP 547** zeigte insgesamt 15 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 6 Mini-Chromosomenbanden waren in ihrer Lage und Verteilung kaum mit denen der anderen *T. b. brucei*-Referenzstämme vergleichbar, nur seine MC2 lag auf Höhe von Bande 2. Er wies 3 Intermediär-Chromosomenbanden auf, von denen IC1 und IC3 auf jeweils gleicher Höhe mit IC1 und IC5 von CP 2469 lagen und seine IC3 damit in großem Abstand von IC2. Seine 6

großen Chromosomenbanden konnten in ihrer Lage und Verteilung mit denen von CP 2469 verglichen werden, wobei seine MBC4 in ihrer Lage mit Bande 64 identisch war.

**ILTat 1.4 Cl.** besaß insgesamt 12 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 5 Mini-Chromosomenbanden ähnelten in ihrer Lage und Verteilung denen von EATRO 174 (*T. b. rh.*). MC1 lag dabei auf Höhe von Bande 2. Die ersten 3 seiner 4 Intermediär-Chromosomenbanden machten zusammen mit MC5 von ihren Abständen her einen sehr regelmäßigen, leiterartigen Eindruck. Nur IC4 lag weiter weg. Das Muster der 3 großen Chromosomenbanden ähnelte dem von EATRO 174, wobei MBC1 auf gleicher Höhe mit Bande 64 lag.

**STIB 345 RA** wies insgesamt 14 auswertbare Chromosomenbanden auf. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden lagen relativ dicht beieinander, mit MC2 auf Höhe von Bande 2 und hatten einen sehr großen Abstand zu den Intermediär-Chromosomen. Von letzteren besaß er 5 Stück, wobei IC4 und IC5 mit einigem Abstand von den restlichen IC als Doppelbande eng zusammen lagen. Die letzten 4 seiner 5 großen Chromosomenbanden lagen auf der Höhe der letzten 4 großen Chromosomen von DAL 72 Cl. A, wobei MBC2 in ihrer Lage identisch mit Bande 64 und MBC4 mit Bande 72 war.

#### **D.2.2.2 Darstellung von *T. b. rhodesiense***

Es wurden nur zwei *T. b. rhodesiense*-Referenzstämme mit der PFGE untersucht. Sie zeigten mit den *T. b. brucei*-Referenzstämmen vergleichbar viele Mini- und Intermediär-, jedoch weniger große Chromosomenbanden. Die Schätzgrößen, sowie Lage und Verteilung der Banden können Tabelle 1 aus dem Anhang entnommen werden.

**EATRO 174** wies insgesamt 14 auswertbare Chromosomenbanden auf. Seine 7 Mini-Chromosomenbanden waren in Lage und Verteilung ILTat 1.4 Cl. (*T. b. b.*) sehr ähnlich, wobei MC2 auf der Höhe von Bande 2 lag. Er wies 4 Intermediär-Chromosomenbanden auf, mit einem großen Abstand zwischen IC3 und IC4, wobei IC1 der IC1 von STIB 704 und IC3 der IC5 von STIB 704 in ihrer Lage entsprachen. Seine 3 großen Chromosomenbanden waren in ihrem Muster identisch mit den jeweils letzten 3 MBC von STIB 704, H1 ZR und H2 ZR (die letzten beiden gehören zu *T. b. g.*), wobei MBC1 auf Höhe von Bande 64 und MBC3 von Bande 72 lagen.

**STIB 704** hatte insgesamt 16 auswertbare Chromosomenbanden: 6 Mini, 6 Intermediär- und 4 große Chromosomenbanden. Sein Bandenmuster war teilweise mit dem von EATRO 174 vergleichbar, jedoch nur einzelne Bandengrößen identisch. Seine MC2 lag auf Höhe von Bande 2. Besonders auffällig waren 4 seiner Intermediär-Chromosomenbanden (IC3 bis 6), die sehr nahe beieinander lagen. Seine 4 großen Chromosomenbanden waren in ihrer Lage identisch mit denen von H1 ZR (*T. b. g.*), wobei MBC2 in ihrer Höhe mit Bande 64 und MBC4 mit Bande 72 identisch waren.

#### **D.2.2.3 Darstellung von *T. b. gambiense***

Zwei *T. b. gambiense*-Referenzen aus der Elfenbeinküste (DAL 487 Cl. A und A0 83) konnten nicht mit der PFGE untersucht werden, da es selbst unter Zugabe von Aconit- und Zitronensäure nicht möglich war, sie in Prozyklische zu transferieren und genügend Trypanosomen zu erhalten. Die sieben in der PFGE untersuchten *T. b. gambiense*-Stämme zeigten durchschnittlich weniger Intermediär-Chromosomen als *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense*. Die Anzahl der Mini- und der großen Chromosomen war jedoch vergleichbar mit den übrigen Referenzen. Die Schätzgrößen, sowie Lage und Verteilung der Chromosomenbanden lassen sich aus Tabelle 1 im Anhang entnehmen.

Am wenigsten auswertbare Banden (insgesamt 8) zeigte **DAL 72 Cl. A**, der nur 2 Mini-Chromosomenbanden, und keine Intermediär-Chromosomen aufwies. Chromosomenbanden auf gleicher Höhe mit seiner MC1 (auf Höhe von Bande 2) und MC2 wiesen auch STIB 704 (*T. b. rh.*), DAL 69 und TH 152 auf. Seine 6 großen Chromosomenbanden ähnelten in ihrer Lage und Verteilung denen von DAL 69, TH 152, H1 CI und H1 ZR, wobei seine MBC3 auf Höhe von Bande 64 und MBC6 von Bande 72 lagen.

**DAL 69** hatte insgesamt 11 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 6 Mini-Chromosomenbanden ähnelten in ihrer Lage und Verteilung denen von TH 152, wobei MC1 auf Höhe von Bande 2 lag. Er besaß genau wie DAL 72 Cl. A keine Intermediär-Chromosomen. Er hatte 5 große Chromosomenbanden, die in ihrer Lage und Verteilung denen von DAL 72 Cl. A, TH 152, H1 CI und H1 ZR ähnelten, wobei MBC3 in ihrer Höhe identisch mit Bande 64 und MBC5 mit Bande 72 waren.

**TH 152** zeigte insgesamt 14 auswertbare Chromosomenbanden. Von seinen 8 Mini-Chromosomenbanden waren 4 in ihrer Lage identisch mit denen von DAL 69, wobei MC1

auf Höhe von Bande 2 lag. Er wies ebenfalls keine Intermediär-, jedoch 6 große Chromosomenbanden auf, die in ihrer Lage und Verteilung denen von DAL 72 Cl. A, DAL 69, H1 CI und H1 ZR ähnelten. Seine MBC4 befand sich auf Höhe von Bande 64 und MBC6 von Bande 72.

**H1 CI** hatte insgesamt 11 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden waren in ihrer Lage mit denen von H1 ZR und H2 ZR identisch. Er zeigte 2 Intermediär-Chromosomenbanden, die in ihrer Lage IC1 und IC2 von H2 ZR entsprachen. Seine 6 große Chromosomenbanden ähnelten in ihrer Lage und Verteilung denen von DAL 72 Cl. A, DAL 69, TH 152 und H2 ZR, wobei MBC3 in ihrer Höhe mit Bande 64 und MBC5 mit Bande 72 identisch waren.

**G. DOLO** besaß insgesamt 9 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden lagen nah beieinander und MC1 auf Höhe von Bande 2. Er zeigte lediglich eine intermediäre Chromosomenbande, welche in ihrer Lage mit der IC2 von CP 2469 (*T. b. b.*) identisch war und großen Abstand zu den MC hatte. Sein Bandenmuster der 4 großen Chromosomen ähnelte dem von H1 CI, wobei MBC4 auf Höhe von Bande 72 lag.

**H1 ZR** zeigte insgesamt ebenfalls 11 auswertbare Chromosomenbanden. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden entsprachen in ihrer Lage denen von H1 CI und H2 ZR. Seine 3 Intermediär-Chromosomenbanden lagen in großem Abstand zu den MC, und nur IC1 zeigte sich in ihrer Lage identisch mit IC3 von H2 ZR. Die 4 großen Chromosomenbanden lagen vergleichbar mit denen von STIB 704 (*T. b. rh.*), wobei sich MBC2 auf Höhe von Bande 64 und MBC4 von Bande 72 befanden.

**H2 ZR** wies insgesamt 12 auswertbare Chromosomenbanden auf. Seine 4 Mini-Chromosomenbanden waren in ihrer Lage mit denen von H1 CI und H1 ZR identisch. Von seinen 4 Intermediär-Chromosomenbanden entsprachen IC1 und IC2 in ihrer Lage denen von H1 CI, und IC3 entsprach IC1 von H1 ZR. Sein Bandenmuster der 4 großen Chromosomen ähnelte dem von H1 CI, wobei MBC1 auf Höhe von Bande 64 und MBC4 von Bande 72 lagen.

#### **D.2.2.4 Vergleich von humanserumresistenten und –sensiblen Referenzen**

Eine Einteilung der Referenzen in humanserumresistent bzw. –sensitiv aufgrund von PFGE-Ergebnissen war nicht möglich. Auch konnten die drei Subspezies *Trypanosoma brucei brucei*, *T. b. gambiense* und *T. b. rhodesiense* nicht eindeutig durch die PFGE differenziert

werden. Auffällig war jedoch ein Hervorstechen der Gambiense-Gruppe, die durchschnittlich weniger Intermediär-Chromosomen als *T. b. brucei* und *T. b. rhodesiense* zeigte. Eine Auflistung der Referenzstämme und -klone unter Angabe ihrer Chromosomen-Anzahl im auswertbaren Bereich (95-3000kbp) kann Tabelle D.5 entnommen werden.

Tab. D.5

Auflistung der Referenzstämme unter Angabe ihrer Chromosomen-Anzahl im Bereich von 95-3000kbp

Subspezies	Name	Mini-Chr.	Intermediär-Chr.	Große Chr.
<i>T. b. brucei</i> :	ILTat 1.4 Cl.	5	4	3
	CP 547	6	3	6
	CP 2469	7	5	7
	Cl. 8/18	4	4	3
	STIB 345 RA	4	5	5
<i>T. b. rhodesiense</i> :	EATRO 174	7	4	3
	STIB 704	6	6	4
<i>T. b. gambiense</i> :	DAL 72 Cl. A	2	0	6
	DAL 69	6	0	5
	TH 152	8	0	6
	G. DOLO	4	1	4
	H1 CI	4	2	6
	H1 ZR	4	3	4
	H2 ZR	4	4	4

Chr.: Chromosomen

*T. b.*: *Trypanosoma brucei*

### **D.2.3 Untersuchung der Feldisolate mit der PFGE**

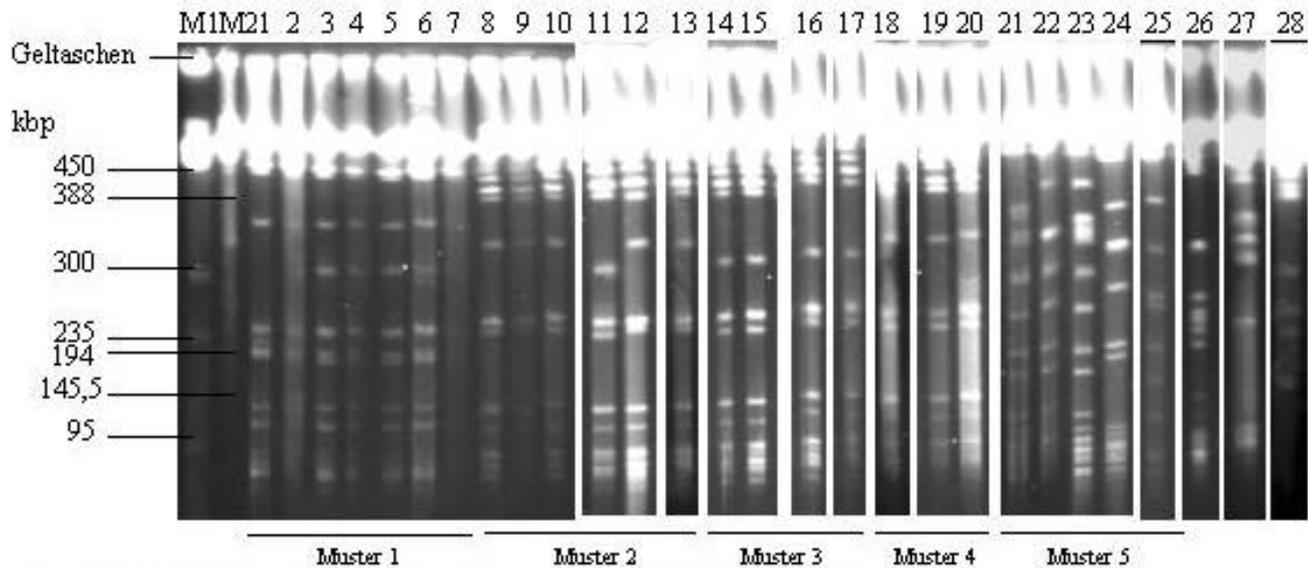
Die Feldisolate aus Bulutwe, Südost-Uganda stellten sich in ihrem Bandenmuster sehr viel homogener dar als die Referenzstämme und konnten deswegen 5 Grundmustern zugeordnet werden (Tab. D.6 und 7). Da identische Proben in zwei verschiedenen PFGE-Geltaschen, vor allem in innen oder außen liegenden, aufgrund 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.

Die PFGE ermöglichte eine deutliche Auftrennung von Chromosomen-DNA im Bereich zwischen 95kbp und 3000kbp. Alle Stämme besaßen ähnlich viele, nahe beieinander liegende Mini-Chromosomenbanden (im Folgenden "MC", nach ERSFELD et al., 1999; durchnummeriert mit der kleinsten auswertbaren Bande des Stammes beginnend) im Bereich von 95 bis 200kbp und einige Intermediär-Chromosomenbanden ("IC") zwischen 210 und 680kbp. Große Chromosomenbanden ("MBC" = Mega-Basenpaar-Chromosomen; ERSFELD et al., 1999) zeigten sie unterschiedlich viele im Bereich von 1010 bis 3000kbp, die jedoch aufgrund ihrer Masse nur schlecht ausgewertet werden konnten. Eine herausstechende, weil etwas abseits zwischen 480 und 680kbp liegende Intermediär-Chromosomenbande hatten die Stämme SUS/BU 561/3, HOM/BU H1 und 2, sowie HOM/IG 2602.

Die Schätzgrößen, sowie Lage und Verteilung der Chromosomenbanden lassen sich aus den Tabellen 2-4 im Anhang entnehmen. Eine umfassendere Analyse der Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen befindet sich im Kapitel D.2.4.2.2 im Zusammenhang mit der Cluster-Analyse.

**Abb. D.10:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldstämmen bzw. -klonen im Bereich der Mini- (<150kbp) und Intermediär- (150-450kbp) Chromosomen (PFGE-Lauf 0)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Marker Lambda ladder; kbp: kilo-Basenpaare

Muster 1: Spur 1: SUS/BU 83/6; Spur 2: SUS/BU 83/7; Spur 3: SUS/BU 83/9; Spur 4: SUS/BU 83/9 Cl. 1; Spur 5: SUS/BU 83/9 Cl. 2; Spur 6: SUS/BU 83/9 Cl.4; Spur 7: SUS/BU 83/9 Cl. 5

Muster 2: Spur 8: SUS/BU 319/7; Spur 9: SUS/BU 319/7 Cl. 1; Spur 10: SUS/BU 319/7 Cl. 3; Spur 11: SUS/BU 373/7; Spur 12: SUS/BU 1845/7; Spur 13: SUS/BU 132/4

Muster 3: Spur 14: BOT/BU 483/2; Spur 15: BOT/BU 492/2; Spur 16: SUS/BU 347/7; Spur 17: SUS/BU 139/2

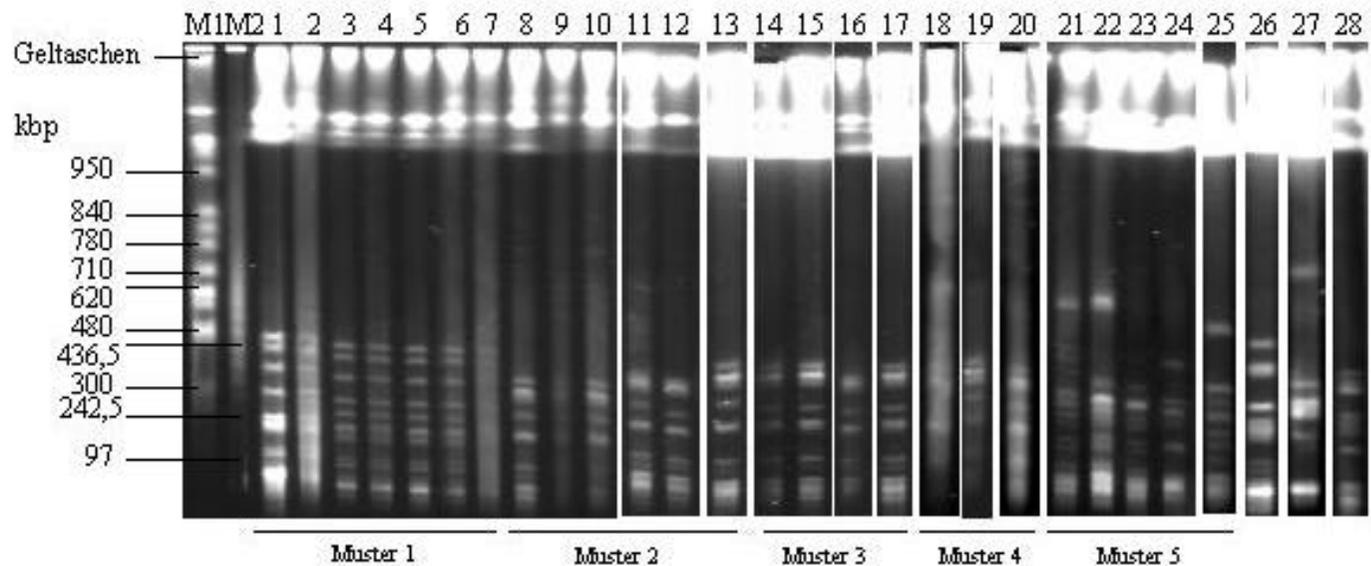
Muster 4: Spur 18: SUS/BU 319/9; Spur 19: SUS/BU 169/4; Spur 20: SUS/BU 932/7

Muster 5: Spur 21: HOM/BU H1; Spur 22: HOM/BU H2; Spur 23: HOM/BU H5; Spur 24: BOT/BU 602/7; Spur 25: HOM/IG 2602

Spur 26: SUS/BU 132/2; Spur 27: SUS/BU 561/3; Spur 28: BOT/BU 623/7

**Abb. D.11:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldstämmen bzw. -klonen im Bereich der Intermediär-Chromosomen (150-840kbp) (PFGE-Lauf D)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; M2: Marker Lambda ladder; kbp: kilo-Basenpaare

Muster 1: Spur 1: SUS/BU 83/6; Spur 2: SUS/BU 83/7; Spur 3: SUS/BU 83/9; Spur 4: SUS/BU 83/9 Cl. 1; Spur 5: SUS/BU 83/9 Cl. 2; Spur 6: SUS/BU 83/9 Cl.4; Spur 7: SUS/BU 83/9 Cl. 5

Muster 2: Spur 8: SUS/BU 319/7; Spur 9: SUS/BU 319/7 Cl. 1; Spur 10: SUS/BU 319/7 Cl. 3; Spur 11: SUS/BU 373/7; Spur 12: SUS/BU 1845/7; Spur 13: SUS/BU 132/4

Muster 3: Spur 14: BOT/BU 483/2; Spur 15: BOT/BU 492/2; Spur 16: SUS/BU 347/7; Spur 17: SUS/BU 139/2

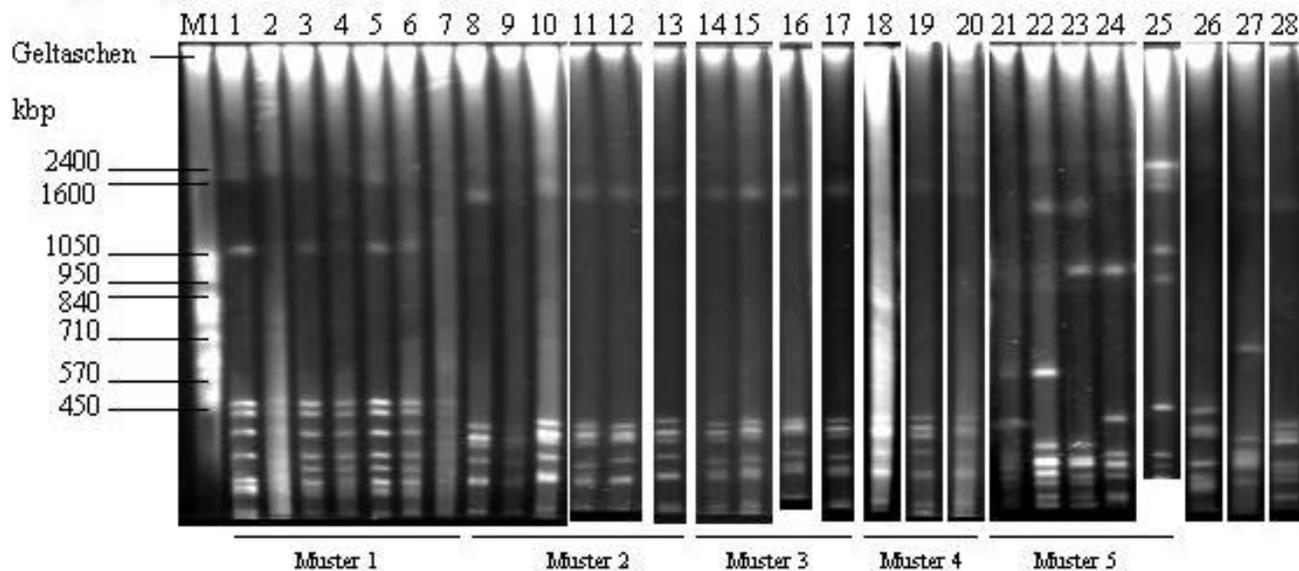
Muster 4: Spur 18: SUS/BU 319/9; Spur 19: SUS/BU 169/4; Spur 20: SUS/BU 932/7

Muster 5: Spur 21: HOM/BU H1; Spur 22: HOM/BU H2; Spur 23: HOM/BU H5; Spur 24: BOT/BU 602/7; Spur 25: HOM/IG 2602

Spur 26: SUS/BU 132/2; Spur 27: SUS/BU 561/3; Spur 28: BOT/BU 623/7

**Abb. D.12:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldstämmen bzw. -klonen im Bereich der Intermediär- (450-700kbp) und großen (900kbp-1,6Mbp) Chromosomen (PFGE-Lauf II)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; kbp: kilo-Basenpaare

Muster 1: Spur 1: SUS/BU 83/6; Spur 2: SUS/BU 83/7; Spur 3: SUS/BU 83/9; Spur 4: SUS/BU 83/9 Cl. 1; Spur 5: SUS/BU 83/9 Cl. 2; Spur 6: SUS/BU 83/9 Cl. 4; Spur 7: SUS/BU 83/9 Cl. 5

Muster 2: Spur 8: SUS/BU 319/7; Spur 9: SUS/BU 319/7 Cl. 1; Spur 10: SUS/BU 319/7 Cl. 3; Spur 11: SUS/BU 373/7; Spur 12: SUS/BU 1845/7; Spur 13: SUS/BU 132/4

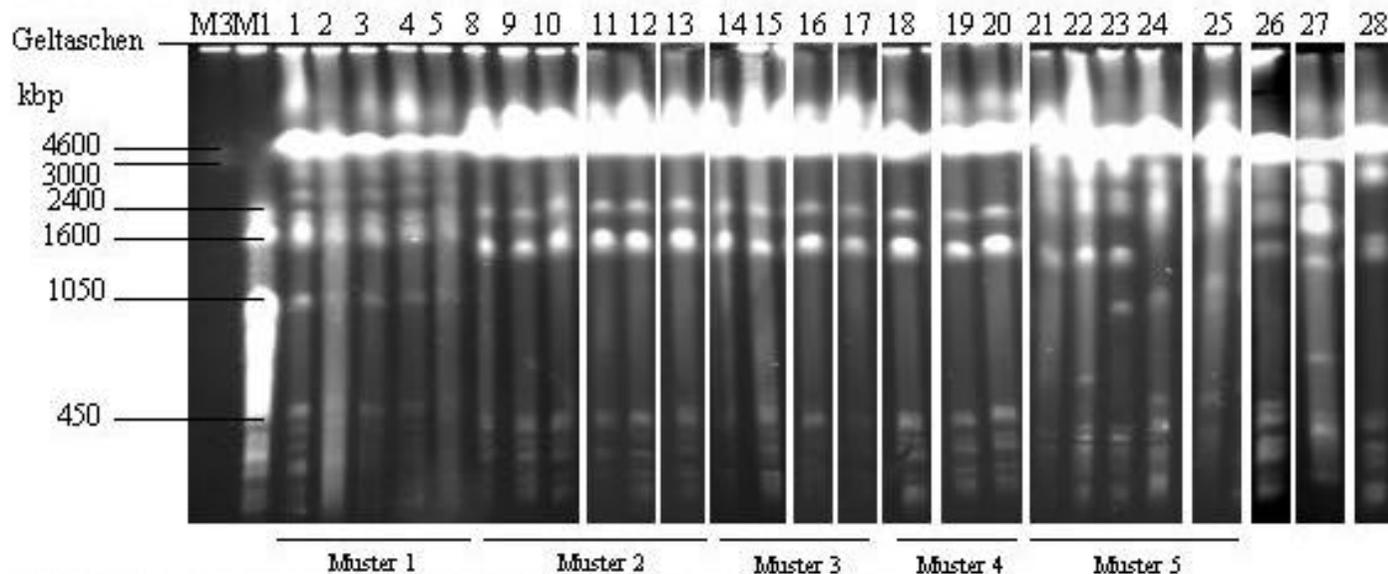
Muster 3: Spur 14: BOT/BU 483/2; Spur 15: BOT/BU 492/2; Spur 16: SUS/BU 347/7; Spur 17: SUS/BU 139/2

Muster 4: Spur 18: SUS/BU 319/9; Spur 19: SUS/BU 169/4; Spur 20: SUS/BU 932/7

Muster 5: Spur 21: HOM/BU H1; Spur 22: HOM/BU H2; Spur 23: HOM/BU H5; Spur 24: BOT/BU 602/7; Spur 25: HOM/IG 2602  
Spur 26: SUS/BU 132/2; Spur 27: SUS/BU 561/3; Spur 28: BOT/BU 623/7

**Abb. D.13:**

**Molekularer Karyotyp von *Trypanosoma brucei*-Feldstämmen bzw. -klonen im Bereich der Intermediär- (450-700kbp) und großen (900kbp-3Mbp) Chromosomen (PFGE-Lauf III)**



M1: Marker *Saccharomyces cerevisiae*; MP: Marker *Schizosaccharomyces pombe*; kbp: kilo-Basenpaare

Muster 1: Spur 1: SUS/BU 83/6; Spur 2: SUS/BU 83/7; Spur 3: SUS/BU 83/9; Spur 4: SUS/BU 83/9 C1 1; Spur 5: SUS/BU 83/9 C1 2

Muster 2: Spur 8: SUS/BU 319/7; Spur 9: SUS/BU 319/7 C1 1; Spur 10: SUS/BU 319/7 C1 3; Spur 11: SUS/BU 373/7; Spur 12: SUS/BU 1845/7; Spur 13: SUS/BU 132/4

Muster 3: Spur 14: BOT/BU 483/2; Spur 15: BOT/BU 492/2; Spur 16: SUS/BU 347/7; Spur 17: SUS/BU 139/2

Muster 4: Spur 18: SUS/BU 319/9; Spur 19: SUS/BU 169/4; Spur 20: SUS/BU 932/7

Muster 5: Spur 21: HOM/BU H1; Spur 22: HOM/BU H2; Spur 23: HOM/BU H5; Spur 24: BOT/BU 602/7; Spur 25: HOM/IG 2602  
Spur 26: SUS/BU 132/2; Spur 27: SUS/BU 561/3; Spur 28: BOT/BU 623/7

### D.2.3.1 Aus Tieren isolierte Stämme

Ein Großteil der aus Rindern und Schweinen isolierten Stämme ließ sich durch Anzahl und Verteilung seiner Chromosomenbanden 4 verschiedenen Grundmustern zuordnen (Tab. D.6). Einige Bandenmuster waren dabei komplett identisch, jedoch kamen auch geringe Abweichungen vor. Diese werden im Text beschrieben.

4 Stämme fielen aus dieser Zuordnung heraus, da sie ein sehr eigentümliches Chromosomen-Bandenmuster aufwiesen: SUS/BU 132/2 (Humanserum-sensitiv), SUS/BU 561/3 (Humanserum-subresistent), BOT/BU 602/7 und BOT/BU 623/7 (beide Humanserum-resistent). BOT/BU 602/7 wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit mit den aus Menschen isolierten Feldstämmen zusammen mit diesen dem Grundmuster 5 (Tab. D.7) zugeordnet.

Alle aus Tieren isolierten Stämme zeigten keine Chromosomenbanden im Bereich von 450 bis 1010kbp, außer SUS/BU 561/3 (Schwein), der eine einzelne Bande bei ca. 700kbp aufwies.

Tab. D.6

Einteilung der aus Tieren isolierten Feldstämmen (Isolierungsdatum in Klammern) aufgrund von Anzahl und Lage ihrer Chromosomenbanden

Muster 1	Muster 2	Muster 3	Muster 4
SUS/BU 83/6 (3/92)	SUS/BU 319/7 (4/92)	BOT/BU 492/2 (3/91)	SUS/BU 319/9 (7/92)
SUS/BU 83/7 (4/92)	SUS/BU 319/7 Cl.1	BOT/BU 483/2 (3/91)	SUS/BU 169/4 (8/91)
SUS/BU 83/9 (7/92)	SUS/BU 319/7 Cl.3	SUS/BU 347/7 (4/92)	SUS/BU 932/7 (4/92)
SUS/BU 83/9 Cl.1	SUS/BU 132/4 (8/91)	SUS/BU 139/2 (3/91)	
SUS/BU 83/9 Cl.2	BOT/BU 1845/7 (4/92)		
SUS/BU 83/9 Cl.4	SUS/BU 373/7 (4/92)		
SUS/BU 83/9 Cl.5			

SUS: sus (Hausschwein); BOT: Bos taurus (Rind)

(WHO, 1986);

Cl.: Klon

Dem Muster 1 konnten 3 Trypanosomen-Stämme, die alle 1992 (März, April, Juli) aus dem Schwein Nr. 83 isoliert wurden, und 4 aus einem dieser Stämme gewonnener Klone zugeordnet werden. Die Stämme und Klone verhielten sich z.T. Humanserum-sensitiv (4) und z.T. -subresistent (3). Dem Muster 2 entsprachen 3 aus verschiedenen Schweinen, jedoch fast

alle im April 1992 isolierte Stämme (bis auf SUS/BU 132/4, welcher im August 1991 isoliert worden war), sowie 2 aus einem dieser Stämme gewonnene Klone, die sich alle bis auf SUS/BU 319/7 Cl. 1 (sensitiv) Humanserum-subresistent verhielten. Zusätzlich wies dieses Muster ein ebenfalls im April 1992 aus einem Rind isolierter Stamm auf, welcher sich resistent zeigte. Dem Muster 3 wurden 2 im März 1991 aus Rindern und 2 im März 1991, bzw. April 1992 aus Schweinen isolierte Stämme zugeordnet, die sich Humanserum-sensitiv (1), -subresistent (2) und -resistent (1) verhielten. Dem Muster 4 entsprachen 3 aus verschiedenen Schweinen im August 1991, April bzw. Juli 1992 isolierte Stämme, die sich Humanserum-sensitiv (1) und -subresistent (2) zeigten (vgl. Tab. D.2).

Grundmuster 2 umfasst also als einzige Gruppe hauptsächlich subresistente Stämme (4) und einen resistenten Stamm. Die einzige Ausnahme bildet ein sensitiver Stamm, der jedoch ein Klon (Cl. 1) des ansonsten subresistenten Feldstammes SUS/BU 319/7 ist.

Die Grundmuster 1, 3 und 4 umfassen dagegen Stämme, die nahezu alle Grade der Humanserum-Resistenz ausbilden. Eine Verbindung der gruppierten Stämme lässt sich eher über ihr Isolierungsdatum herstellen. So entsprechen dem Muster 3 hauptsächlich im März 1991 isolierte Stämme.

Mini-Chromosomen: Die aus Rindern und Schweinen isolierten Stämme zeigten bis auf SUS/BU 561/3 (Schwein), BOT/BU 623/7 (Rind), SUS/BU 373/7 (Schwein) und BOT/BU 602/7 (Rind) ein identisches Bandenmuster von 4 auswertbaren Mini-Chromosomenbanden. Diese lagen auf Höhe der Banden 1, 3, 8 und 10. Die aus dem Schwein 83 isolierten Stämme (SUS/BU 83/6, 83/7 und 83/9 samt seiner Klone 1, 2, 4 und 5) hatten noch eine zusätzliche Mini-Chromosomenbande auf Höhe der Bande 16 und der Stamm SUS/BU 139/2 (Schwein) eine zusätzliche Bande auf Höhe der Bande 2.

Die 4 in ihrem Mini-Chromosomenmuster abweichenden Stämme verhielten sich Humanserum-resistent (BOT/BU 602/7 und 623/7, SUS/BU 373/7) und -subresistent (SUS/BU 561/3) (vgl. Tab. D.2). Die 3 resistenten wiesen viele (5), näher beieinander liegende Mini-Chromosomenbanden auf, der subresistente SUS/BU 561/3 (Schwein) jedoch nur 3 kleine, sehr nahe beieinander liegende, wobei diese in ihrer Lage MC2-4 von BOT/BU 623/7 (Rind) und MC1-3 von BOT/BU 602/7 (Rind) genau entsprachen und sich auf Höhe der Banden 2, 3 und 4 befanden.

Intermediär-Chromosomen: Die Intermediär-Chromosomenbanden-Muster der aus Tieren isolierten Stämme waren nicht so einheitlich wie die der Mini-Chromosomen, weshalb die Stämme nun den 4 Grundmustern (Tab. D.6) zugeteilt wurden. Nahezu alle Stämme wiesen 6 Intermediär-Chromosomenbanden auf, bis auf SUS/BU 83/7 (Schwein) und BOT/BU 602/7 (Rind), welche beide nur 5 Intermediär-Chromosomenbanden besaßen. Die Stämme zeigten keine Chromosomenbanden im Bereich von 450 bis 1010kbp, außer SUS/BU 561/3 (Schwein), der eine Bande bei ca. 700kbp aufwies.

**Muster 1** zeigte 6 Intermediär-Chromosomenbanden auf Höhe von Bande 21, 29, 34, 42, 44 und 48, genau so stellten sich der aus dem Schwein 83 isolierte Stamm SUS/BU 83/9 und seine Klone Cl.1, 2, 4 und 5 dar. SUS/BU 83/6 und 7 unterschieden sich davon durch das Fehlen einer Bande auf Höhe von Bande 29. IC3 von SUS/BU 83/7 lag außerdem ein wenig unterhalb der durchschnittlichen IC4 auf Höhe von Bande 41 (anstatt 42). SUS/BU 83/6 zeigte eine zusätzliche Bande auf Höhe von Bande 19, so dass nur SUS/BU 83/7 insgesamt eine Intermediär-Chromosomenbande weniger (nämlich 5) aufwies.

Die Stämme SUS/BU 132/4 (Schwein), BOT/BU 1845/7 (Rind) und SUS/BU 319/7 (Schwein), seine Klone Cl.1 und 3, sowie dessen verschiedene VATs mit dem **Muster 2** zeigten ihre 6 Intermediär-Chromosomenbanden auf Höhe der Banden 21, 22, 32, 38, 39 und 42. Damit ähnelten sie sehr dem Banden-Muster der Stämme mit den Grundmustern 3 und 4. Nur SUS/BU 373/7 (Schwein) unterschied sich durch eine nach unten verschobene IC3 (von Höhe der Bande 32 auf Bande 30).

**Muster 3** wies 6 Intermediär-Chromosomenbanden auf Höhe von Bande 20, 22, 30, 38, 39 und 41 auf und genau so stellten sich die Stämme BOT/BU 492/2 (Rind), BOT/BU 483/2 (Rind) und SUS/BU 347/7 (Schwein) dar. SUS/BU 139/2 (Schwein) zeigte als einzigen Unterschied eine nach oben verschobene IC6 (von Höhe der Bande 41 auf Bande 42). Mit diesem Muster ähnelten sie sehr den Stämmen aus den Grundmustern 2 und 4.

Die Stämme SUS/BU 319/9 (Schwein) und SUS/BU 169/4 (Schwein) mit dem **Muster 4** zeigten ihre 6 Intermediär-Chromosomenbanden auf Höhe der Banden 20, 22, 32, 38, 39 und 42, ähnelten also sehr den Stämmen mit den Mustern 2 und 3. SUS/BU 932/7 (Schwein) unterschied sich nur durch eine nach oben verschobene IC6 (von Höhe der Bande 42 auf Bande 43).

Die nun folgenden Stämme konnten keinem Muster zugeordnet werden.

SUS/BU 132/2 (Schwein) zeigte 8 Intermediär-Chromosomenbanden, wobei IC2 und 3, sowie IC6 und 7 durch ihre ausgeprägte Nähe zueinander jeweils eine Doppelbande bildeten.

Von den 7 Intermediär-Chromosomenbanden des Stammes SUS/BU 561/3 (Schwein) lagen IC2-5 sehr nahe beieinander, wobei IC4 und 5 sogar eine Doppelbande ausbildeten. Als einziger aus Tieren isolierter Stamm hatte er eine von den übrigen Intermediär-Chromosomen abgesetzte Bande bei ca. 700kbp.

BOT/BU 623/7 (Rind) zeigte ebenfalls 7 Intermediär-Chromosomenbanden, wobei seine letzten 3 sehr nahe beieinander lagen.

Der Stamm BOT/BU 602/7 (Rind) hatte nur 5 Intermediär-Chromosomenbanden, von denen IC2-4 sehr nahe beieinander lagen und IC5 erst in größerem Abstand darauf folgte.

Große Chromosomen: In Anzahl und Lage ihrer auswertbaren großen Chromosomen zeigten sich die aus Rindern und Schweinen isolierten Stämme wieder einheitlicher. Die Stämme mit den Mustern 2, 3 und 4 zeigten alle nur 2 große Chromosomenbanden auf Höhe der Banden 62 und 66. Muster 1 wies dagegen 6 große Chromosomenbanden auf, mit MBC1 bereits bei ca. 1050kbp und damit in einigem Abstand von den restlichen MBC. Ihre MBC2-4 lagen sehr nahe beieinander.

Ebenfalls nur 2 große Chromosomenbanden zeigte der Stamm BOT/BU 623/7 (Rind), jedoch auf Höhe der Banden 61 und 70.

SUS/BU 312/2 (Schwein) hatte 5 große Chromosomenbanden, wobei MBC2 und 3 sowie MBC4 und 5 nahe beieinander lagen.

Auch BOT/BU 602/7 (Rind) zeigte 5 große Chromosomenbanden mit einer MBC1, die sich in einigem Abstand von den restlichen MBC bei ca. 1010kbp befand, und sehr nahe beieinander liegenden MBC3 und 4.

Von den 6 großen Chromosomenbanden des Stammes SUS/BU 561/3 (Schwein) lagen MBC2 und 3 sowie MBC4-6 sehr nahe beieinander.

### D.2.3.2 Aus Menschen isolierte Stämme

Die 4 aus Menschen isolierten Feldstämme hatten sehr ähnliche, jedoch keineswegs identische Chromosomenbanden. Ihre Muster ähnelten demjenigen von BOT/BU 602/7, welcher jedoch aus einem Rind isoliert worden war. Mit ihm zusammen wurden sie als **Muster 5** zusammengefasst (Tab. D.7).

Tab. D.7

Einteilung der aus Menschen isolierten Feldstämme und des aus einem Rind stammenden BOT/BU 602/7 aufgrund von Anzahl und Lage ihrer Chromosomenbanden (**Muster 5**):

BOT/BU 602/7    |    HOM/BU H1    |    HOM/BU H2    |    HOM/BU H5    |    HOM/IG 2602

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

Alle Stämme mit dem Muster 5 waren Humanserum-resistent. Sie wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Februar 1990, November 1990, April 1991, April 1992) isoliert.

Mini-Chromosomen: Die 4 Stämme wiesen 5-6 auswertbare Mini-Chromosomenbanden auf, wobei sie alle Banden auf Höhe von Bande 2 und 8 hatten. Die Banden erweckten durch ihre regelmäßige Anordnung einen leiterartigen Eindruck.

Intermediär-Chromosomen: Von ihren 6-7 Intermediär-Chromosomenbanden waren nur die auf Höhe von Bande 18 in ihrer Lage identisch. Die IC von HOM/IG 2602 waren sehr regelmäßig, leiterartig angeordnet bis auf IC6, welche bei ca. 480kbp etwas abseits lag. Auch HOM/BU H1 und 2 zeigten eine solche abgelegene letzte IC, jedoch höher, bei ca. 600kbp gelegen.

Große Chromosomen: Von ihren 4-6 auswertbaren großen Chromosomenbanden waren die letzten 3 in ihrer Lage identisch und auf Höhe der Banden 66, 67 und 72 gelegen. Die Stämme HOM/BU H1, 2 und 5 hatten zusätzlich dazu eine etwas abseits gelegene Bande bei ca. 1400kbp und H5 noch eine bei ca. 1010kbp. HOM/IG 2602 zeigte 2 solcher abgelegenen Banden bei ca. 1010 und 1100kbp.

### **D.2.3.3 Vergleich humanserumresistenter und -sensibler Stämmen**

Die Einteilung der Feldstämme, welche ja auf der Grundlage ihrer Bandenmuster erstellt wurde (Tabb. D.6 und D.7), zeigte bereits, dass die Grundmuster 1, 3 und 4 Stämme umfassen, die nahezu alle Grade der Humanserum-Resistenz ausbilden. Nur die Muster 2 und 5 vereinigen subresistente bzw. resistente Stämme, mit der Ausnahme vom Klon 1 des Feldstammes SUS/BU 319/7 (Muster 2), der sich im Gegensatz zu seinem Mutterstamm Humanserum-sensitiv verhielt. Die Bandenmuster der hauptsächlich aus Menschen isolierten Stämme mit Muster 5 waren jedoch unterschiedlicher voneinander als die Bandenmuster der Stämme, welche einem der restlichen Grundmuster zugeordnet wurden. Von dem PFGE-Bandenmuster eines Feldstammes konnte also nur bedingt auf seine Humanserum-Resistenz geschlossen werden. Auch konnte keine einzelne Bande identifiziert werden, die sich mit Humanserum-Resistenz oder -Sensitivität eines Feldstammes in Verbindung bringen ließ. Eine Auflistung der Feldstämme und -klone unter Angabe ihrer Chromosomen-Anzahl im auswertbaren Bereich (95-3000kbp) kann Tabelle D.8 entnommen werden.

Tab. D.8

Gruppeneinteilung der Feldstämme anhand ihres Chromosomen-Musters mit Angabe ihrer Chromosomen-Anzahl (Bereich: 95-3000kbp) und ihres Verhaltens gegenüber Humanserum

	Name	Mini-Chr.	Intermediär-Chr.	große Chr.	HS-Resistenz
<b>Muster 1:</b>	SUS/BU 83/6	5	6	6	sens.
	SUS/BU 83/7	5	5	6	sens.
	SUS/BU 83/9	5	6	6	sens.
	SUS/BU 83/9 Cl.1	5	6	6	sens./subr.
	SUS/BU 83/9 Cl.2	5	6	6	sens.
	SUS/BU 83/9 Cl.4	5	6	6	sens./subr.
	SUS/BU 83/9 Cl.5	5	6	6	sens./subr.
<b>Muster 2:</b>	SUS/BU 319/7	4	6	2	sens./subr.
	SUS/BU 319/7 Cl.1	4	6	2	sens.
	SUS/BU 319/7 Cl.3	4	6	2	sens./subr.
	SUS/BU 132/4	4	6	2	subr.
	BOT/BU 1845/7	4	6	2	subr./res.
	SUS/BU 373/7	5	6	2	res.
<b>Muster 3:</b>	BOT/BU 492/2	4	6	2	sens.
	BOT/BU 483/2	4	6	2	sens./subr.
	SUS/BU 347/7	4	6	2	subr./res.
	SUS/BU 139/2	5	6	2	subr./res.
<b>Muster 4:</b>	SUS/BU 319/9	4	6	2	sens.
	SUS/BU 169/4	4	6	2	subr./sens.
	SUS/BU 932/7	4	6	2	subr.
<b>Muster 5:</b>	BOT/BU 602/7	5	5	5	res./subr.
	HOM/BU H1	5	6	4	res.
	HOM/BU H2	6	6	4	res.
	HOM/BU H5	6	7	5	res.
	HOM/IG 2602	5	6	6	res.

Chr.: Chromosomen

HS: Humanserum

Cl.: Klon

sens.: sensitive

subr.: subresistent

res.: resistant

## D.2.4 Dokumentation und Auswertung der PFGE-Ergebnisse

### D.2.4.1 Berechnung und Vergleich der Banden nach ihrer Auswertung mit dem *ScanPack 3.0*<sup>®</sup>-Programm

Die Bandengrößen wurden durch ein Computerprogramm (*ScanPack 3.0*<sup>®</sup> Vers. 4.45, Biometra, Göttingen, D) nach Eingabe der Markergrößen und Referenzlinien errechnet. Da die kleinste Bande des kleinsten auf dem Markt befindlichen Markers (Lambda phage ladder) 48,5bp groß ist und die größte Bande des größten Markers (*Schizosaccharomyces pombe*) 5,7Mb, war man bei der Auswertung auf diesen Bereich beschränkt. Dass in der vorliegenden Arbeit nur Chromosomen im Bereich von 95-3000kbp dargestellt werden konnten, liegt an einer Verdichtung der Banden außerhalb dieses Bereiches. Durch ihre große Anzahl (Mini-Chromosomen) bzw. ihre Molekülgröße (große Chromosomen) konnten sie nicht eindeutig voneinander getrennt, geschweige denn ihre genaue Anzahl bestimmt werden.

Die vom Computer errechneten Werte derselben Bande unterschieden sich von Auswertung zu Auswertung (sogar desselben Gels), deswegen wurden zum besseren Vergleich die Mittelwerte berechnet.

Insgesamt wurden 72 verschieden große Banden (Chromosomen) im Bereich von 95 bis 3000kbp ermittelt: 17 im Mini- und 38 im Intermediär-Chromosomen-Bereich, 17 im Bereich der großen Chromosomen. Die Schätzwerte, sowie Lage und Verteilung der Chromosomenbanden können den Tabellen 1-4 im Anhang entnommen werden.

Die Nummerierung der Banden (Spalte links außen) bezieht sich hierbei auf die Anzahl der insgesamt dokumentierten, sowohl bei Referenz- als auch Feldstämmen gefundenen Banden. Sie soll den Vergleich der Banden erleichtern.

Drei Banden fanden sich bei nahezu allen Referenzstämmen:

Bande 2 bei ca. 85kbp, welche nur H1 CI, H1 ZR und H2 ZR fehlte, Bande 64 bei ca. 1600kbp, welche nur CP 2469 und G. Dolo nicht aufwiesen, und Bande 72 bei ca. 2900kbp, welche nur CP 547 und ILTat 1.4 Cl. nicht hatten. Sie wurden in den Tabellen (Anhang) als Orientierungsmarken hervorgehoben.

Die Angaben über die Chromosomenbanden der Feldstämme wurden auf die Tabellen 2 bis 4 (Anhang) aufgeteilt, diese jedoch zum einfacheren Vergleich identisch aufgebaut. Die Aufteilung der Stämme beruhte auf ihrem Verhalten im Humanserum-Resistenztest (HSRT) und kann aus Tabelle D.2 abgeleitet werden.

In Tabelle 2 (Anhang) sind die im HSRT sensitiven Feldstämme aufgelistet.

Tabelle 3 (Anhang) umfasst die im HSRT subresistenten Feldstämme und auch einige, die sich dort sensitiv verhielten, jedoch von anderen Untersuchern (MANGENI, 1994; TIETJEN, persönliche Auskunft) zuvor als subresistent eingestuft worden waren.

In Tabelle 4 (Anhang) sind die im HSRT resistenten und diejenigen subresistenten Stämme aufgeführt, welche von anderen Untersuchern (MANGENI, 1994; TIETJEN, persönliche Auskunft) zuvor als resistent eingestuft worden waren.

Die beim Vergleich der Bandenmuster der Feldstämme gefundenen 5 Grundmuster (Tabb. D.6 und 7) lassen sich nur bedingt mit dem Grad der Humanserum-Resistenz eines Feldstammes in Verbindung bringen, gehen deswegen aus der Anordnung der Stämme in den Tabellen 1 bis 4 (Anhang) nicht hervor.

#### **D.2.4.2 Cluster-Analyse und Berechnung der Verwandtschaftsgrade**

Basierend auf den Tabellen 1-4 (Anhang) wurde eine binäre Matrix erstellt („1“ = Bande vorhanden; „0“ = Bande nicht vorhanden). Durch das Computerprogramm *Stata Statistical Software* (Release 7.0, StataCorp. 2001) wurde dann für jedes Objekte-Paar der Ähnlichkeitskoeffizient nach JACCARD (1908) berechnet und mit Hilfe der UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages; SNEATH und SOKAL, 1973) anschließend ein Dendrogramm (Abb. D.14 bis 16) erstellt. Anhand dieses Baumdiagrammes konnte man die Ähnlichkeiten bzw. Distanzen der Stämme ablesen, wobei die Trypanosomen-Stämme der Cluster (=Paare), deren Wurzel sich auf der rechten Seite des Dendrogrammes befand, die größte Ähnlichkeit hatten. Ein Ähnlichkeits-Koeffizient von "1" bedeutete völlige Gleichheit der Objekte (Trypanosomen-Stämme), je mehr er jedoch gegen "0" ging (auf der x-Achse nach links), desto verschiedener waren die Objekte. Ein Koeffizient von "0" bedeutete schließlich völlige Verschiedenheit.

#### D.2.4.2.1 Dendrogramm der Referenzstämme

Die augenscheinliche Verschiedenheit der Referenzstämme, die schon in Kapitel D.2.2 beschrieben wurde, spiegelte sich auch in ihrem Dendrogramm (Abb. D.14) wieder. Die Stämme der Gambiense-Gruppe schienen dabei am homogensten, wurden jedoch im Dendrogramm nicht als einheitliche Gruppe herausgestellt.

Die Gruppe der *T. b. brucei*-Referenzstämme wurde vom Computer auseinandergerissen und dazwischen zwei *T. b. gambiense*-Stämme eingestreut. Dabei wurde G. Dolo den *T. b. brucei*-Stämmen CP 2469 und CP 547, und DAL 72 Cl. A den *T. b. brucei*-Stämmen STIB 345 RA und Cl. 8/18 zugeordnet. Der *T. b. brucei*-Stamm STIB 345 RA und der *T. b. gambiense*-Stamm DAL 72 Cl. A bildeten sogar einen Cluster mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,385.

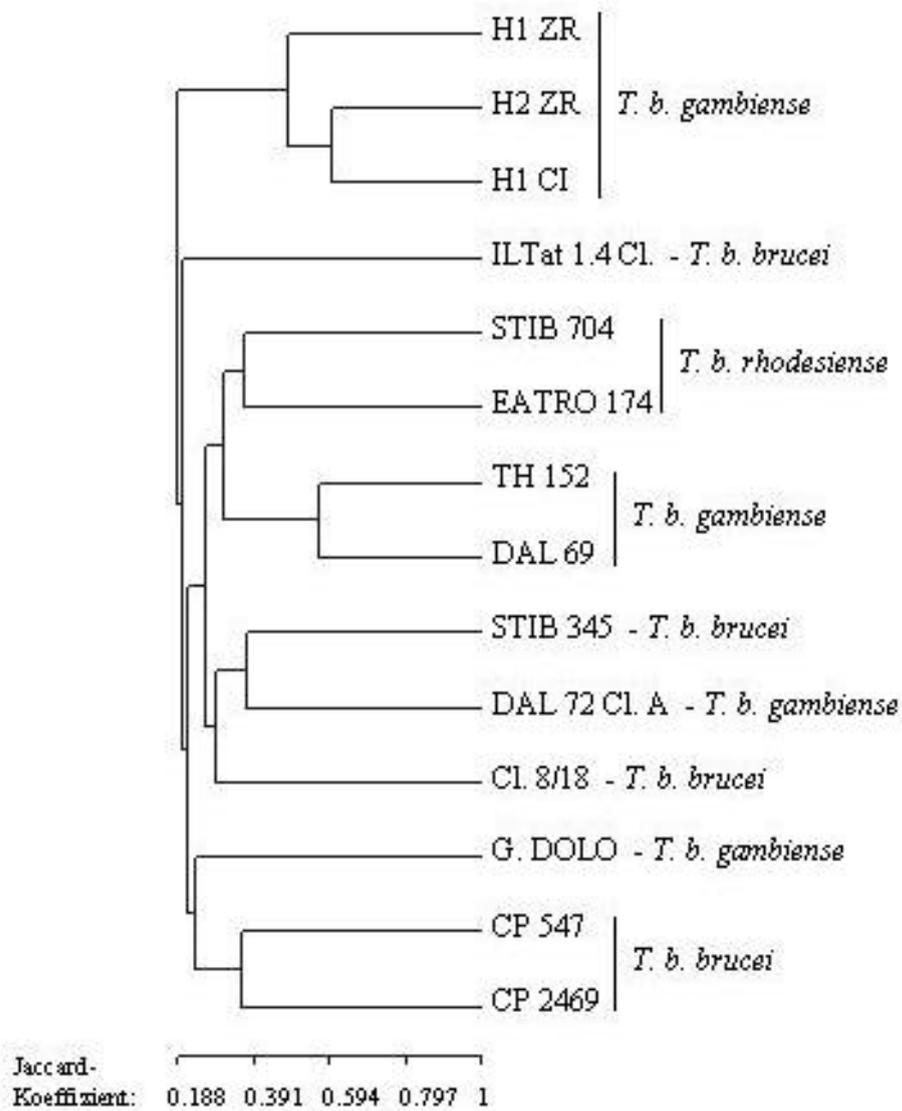
Von allen *T. b. brucei*-Stämmen wurden nur CP 2469 und CP 547 als Cluster zusammengefasst, mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,385.

Auch die beiden *T. b. rhodesiense*-Stämme EATRO 174 und STIB 704 wurden als Cluster zusammengefasst, mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,385. Zusammen mit den *T. b. gambiense*-Stämmen DAL 69 und TH 152 wurden sie zwischen den *T. b. brucei*-Stämmen eingeordnet.

Von den *T. b. gambiense*-Stämmen waren sich H1 CI und H2 ZR mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,595 am ähnlichsten und ihnen wurde mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,500 der Stamm H1 ZR angegliedert. Auffällig war, dass der Stamm G. Dolo ihnen in diesem Dendrogramm nicht zugeordnet wurde, wie dies dem allgemeinen Dendrogramm (Abb. D.16) entnommen werden konnte. Diese 3 Stämme formten eine außenstehende Gruppe, welche sich von den anderen Stämmen am meisten unterschied (Ähnlichkeitskoeffizient: 0,188). Die beiden Stämme DAL 69 und TH 152 wurden in die Nähe der Rhodesiense-Stämme platziert und ähnelten sich mit einem Koeffizienten von ca. 0,590.

**Abb. D.14:**

**Dendrogramm der Referenz-Stämme bzw. -klone**



#### **D.2.4.2.2 Dendrogramm der Feldstämme bzw. -klone**

Im Dendrogramm der Feldstämme und -klone (Abb. D.15) konnte man die Mustereinteilung aus Kapitel D.2.3 wiedererkennen. Nur bei den Mustern 2 und 4 wurde jeweils ein Stamm abgespalten (SUS/BU 373/7 bzw. SUS/BU 932/7), jedoch in deren Nähe platziert. Die Stämme mit den Mustern 2, 3 und 4 lagen außerdem sehr nahe beieinander, da sie sich ja hauptsächlich in der Verteilung ihrer Intermediär-Chromosomen voneinander unterschieden.

Die nicht einem der Muster zuzuordnenden Stämme SUS/BU 132/2 (Schwein), SUS/BU 561/3 (Schwein) und BOT/BU 623/7 (Rind) fielen auch im Dendrogramm durch außenstehende Positionen auf. SUS/BU 132/2 wurde dabei jedoch eher in die Nähe der Stämme mit dem Muster 1 eingeordnet (mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,300), während SUS/BU 561/3 und BOT/BU 623/7 den Stämmen mit Muster 5 nahegestellt wurden. Ersterer mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,350, letzterer von ca. 0,220.

Aufgrund der Anordnung der Feldstämme und -klone im Dendrogramm konnte eine weitere Einteilung vorgenommen werden. Es lassen sich 3 Gruppen (*I-III*) erkennen, die den Hauptästen des Baumdiagrammes entsprechen.

**Gruppe I** enthält resistente (6) und subresistente (1) Feldstämme und beinhaltet alle Stämme mit dem Muster 5. In dieser Gruppe befinden sich Isolate aus Menschen (4), Rindern (2) und Schweinen (1). Die Stämme mit dem Muster 5 wurden zwar oben im Bild nahe beieinander platziert, ihre Ähnlichkeit untereinander war jedoch nicht sehr ausgeprägt. Mit einem Koeffizienten von ca. 0,550 am ähnlichsten waren sich die Stämme HOM/BU H1 und 2, denen mit einem Koeffizienten von ca. 0,450 der Stamm HOM/BU H5 angegliedert wurde. Die beiden Stämme BOT/BU 602/7 und HOM/IG 2602 ähnelten sich mit einem Koeffizienten von ca. 0,390 und wurden als Cluster den anderen 3 Stämmen mit einem Koeffizienten von ca. 0,250 zugeordnet.

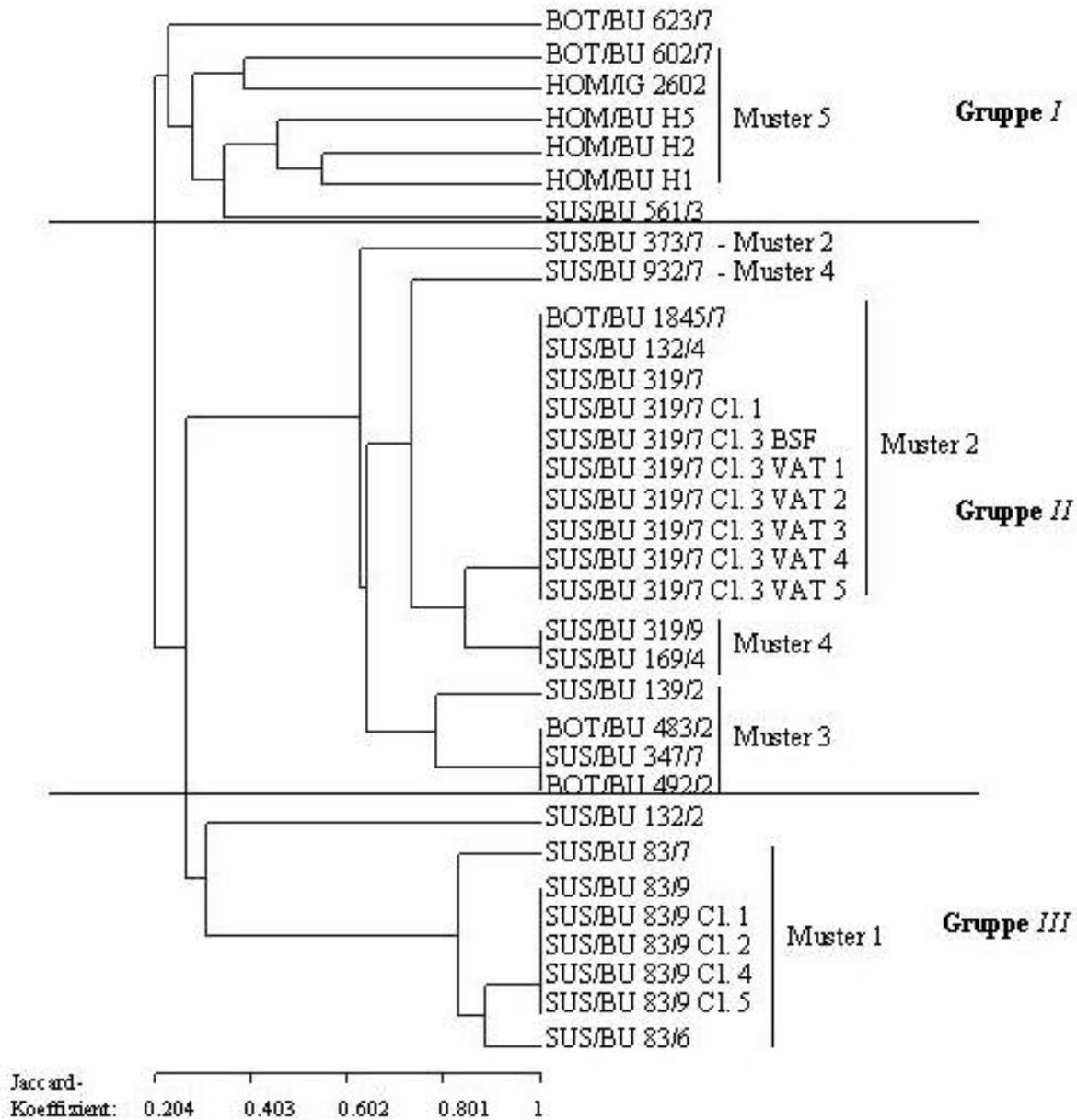
**Gruppe II** umfasst hauptsächlich subresistente (6 + 5 VATs) und resistente (4) Feldstämme und -klone aus Schweinen und Rindern. Die 3 sensitiven Ausnahmen bilden der Klon 1 von SUS/BU 319/7, sowie die Stämme SUS/BU 319/9 und BOT/BU 492/2. Damit beinhaltet Gruppe II alle Stämme mit den Mustern 2, 3 und 4. Die Stämme mit dem Muster 2 wurden nahezu alle, mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von 1, als identisch eingestuft. Nur der Stamm SUS/BU 373/7 lag mit einem Koeffizienten von ca. 0,605 abseits der Gruppe. Die Stämme BOT/BU 492/2, BOT/BU 483/2 und SUS/BU 347/7 mit dem Muster 3 waren mit einem Koeffizienten von 1 auch absolut identisch. SUS/BU 139/2 wurde ihnen mit einem

Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,795 zugeordnet. Die beiden Stämme SUS/BU 319/9 und SUS/BU 169/4 mit dem Muster 4 wiesen ebenfalls einen Koeffizienten von 1 und damit absolute Gleichheit auf. Der Stamm SUS/BU 932/7 wurde mit einem Koeffizienten von ca. 0,750 weiter weg platziert. Näher als dieser schienen die Stämme mit dem Muster 2 denen mit Muster 4 zu stehen, denn sie zeigten zu diesen einen Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,810.

**Gruppe III** enthält hauptsächlich sensitive (4 + 1 Klon), aus Schweinen isolierte Feldstämme und –klone. 3 subresistente Ausnahmen bilden die Klone 1,4 und 5 des Feldstammes SUS/BU 83/9. Alle Stämme mit dem Muster 1 wurden in dieser Gruppe zusammengefasst. Dabei finden sich diejenigen Stämme, welche aus dem Schwein Nr. 83 isoliert wurden, unten im Bild. Der Stamm SUS/BU 83/9 und seine Klone 1, 2, 4 und 5 zeigten einen Ähnlichkeitskoeffizienten von 1, waren also absolut identisch. Ihnen mit einem Koeffizienten von ca. 0,900 am ähnlichsten war der Stamm SUS/BU 83/6, während SUS/BU 83/7 mit einem Koeffizienten von ca. 0,810 etwas weiter weg lag.

Abb. D.15:

Dendrogramm der Feldstämme bzw. -klone aus Bulutwe, Südost-Uganda



D.2.4.2.3 Dendrogramm von Referenz- und Feldstämmen

Zur Übersicht wurde außerdem ein Dendrogramm erstellt, welches alle Referenz- und Feldstämme zusammen darstellt (Abb. D.16). Die Beziehungen der Referenzstämme bzw. Feldstämme und -klone untereinander zeigten sich nahezu identisch mit denen aus den Teil-Dendrogrammen (Abbb. D.14 und D.15) und wurden dort bereits beschrieben (D.2.4.2.1 und D.2.4.2.2).

Interessant war, dass im gemeinsamen Dendrogramm insgesamt 5 Gruppen (I-V) entstanden, die den Hauptästen des Baumdiagrammes entsprechen.

Die **Gruppen II** und **III** waren hierbei jeweils identisch mit den Gruppen *II* und *III* des Teil-Dendrogrammes der Feldstämme und -klone. Gruppe II umfasst also hauptsächlich Humanserum-subresistente (6 + 5 VATs) und -resistente (4) Feldstämme und -klone aus Schweinen und Rindern. Die 3 sensitiven Ausnahmen bilden der Klon 1 von SUS/BU 319/7, sowie die Stämme SUS/BU 319/9 und BOT/BU 492/2. Gruppe III enthält dagegen hauptsächlich Humanserum-sensitive (4 + 1 Klon), aus Schweinen isolierte Feldstämme und -klone. 3 subresistente Ausnahmen bilden die Klone 1,4 und 5 des Feldstammes SUS/BU 83/9.

Die Feldstämme und -klone der Gruppe *I* des Teil-Dendrogrammes wurden auch im gemeinsamen Dendrogramm zusammengestellt und bilden zusammen mit den 2 *T. b. rhodesiense*-Referenzen und den *T. b. gambiense*-Referenzstämmen DAL 69 und TH 152 die **Gruppe I**. Diese enthält damit Humanserum-resistente (6) und -subresistente (1) Feldstämme aus Menschen (4), Rindern (2) und Schweinen (1), die den Referenzstämmen mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von ca. 0,250 nahegestellt wurden. Von diesen waren 3 resistent und 1 sensitiv. Der Humanserum-sensitive EATRO 174 ist jedoch ein *T. b. rhodesiense*-Referenzstamm und damit eigentlich humaninfektiös.

Nur der Feldstamm BOT/BU 623/7 wurde von der Gruppe *I* abgespalten und im gemeinsamen Dendrogramm der **Gruppe V** zugeordnet. Diese Gruppe bilden weiterhin die 5 *T. b. brucei*-Referenzstämme und -klone und der *T. b. gambiense*-Referenzklon DAL 72 Cl. A. Damit enthält Gruppe V einen Humanserum-resistenten Feldstamm (Rind) und einen -resistenten Referenzklon, sowie 5 sensitive Referenzstämme und -klone.

Die **Gruppe IV** bilden allein die *T. b. gambiense*-Referenzstämme G. DOLO, H1 ZR, H2 ZR und H1 Cl, welche alle Humanserum-resistent waren. Sie formten eine oben im Bild stehende

Gruppe, die sich von allen anderen Stämmen mit einem Ähnlichkeitskoeffizienten von nur 0,124 am meisten unterschied.

Auch aus dieser Gruppeneinteilung konnte nur bedingt auf die Humanserum-Resistenz bzw. -Sensitivität eines Stammes oder Klones geschlossen werden. Z.B. beinhaltet Gruppe IV nur resistente *T. b. gambiense*-Referenzen und Gruppe I enthält hauptsächlich resistente und subresistente Stämme und -klone, mit der Ausnahme eines einzigen sensitiven *T. b. rhodesiense*-Stammes.

Die Anzahl der sensitiven, subresistenten und resistenten Stämme und Klone einer Gruppe lassen sich der Tabelle D.9 entnehmen.

Tab. D.9

Auflistung der durch den Computer eingeteilten Gruppen (I-V) mit der Anzahl ihrer Humanserum-sensitiven, -subresistenten bzw. -resistenten Stämme und -klone

<b>Gruppe</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
Humanserum-sensitiv	1	3	5	0	5
Humanserum-subresistent	1	6	3	0	0
Humanserum-resistent	8	4	0	4	2

Abb. D.16:

Dendrogramm aller Referenz- und Feldstämme bzw. -klone

