

## F ZUSAMMENFASSUNG

Für die beiden humaninfektiösen Trypanosomen-Subspezies *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *T. b. gambiense* existiert ein Reservoir von Haus- und Wildtieren. Morphologisch sind sie jedoch nicht von der allein tierinfektiösen Subspezies *T. b. brucei* unterscheidbar. Mit Hilfe von biologischen, biochemischen oder molekularbiologischen Methoden gelingt eine Differenzierung nur teilweise. Daher werden Testsysteme benötigt, die Tiere schnell und zuverlässig als Träger humaninfektiöser Trypanosomen identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Trypanosomen-Referenzstämme und -klone (5 *T. b. brucei*, 9 *T. b. gambiense* und 2 *T. b. rhodesiense*), sowie 18 Feldstämme und 7 -klone aus Tieren und 4 Feldstämme aus Menschen in Bulutwe, einem Schlafkrankheits-Endemiegebiet im Südosten Ugandas, durch die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) charakterisiert. Es sollte untersucht werden, ob anhand der spezifischen Karyotypen Rückschlüsse auf ihre Humanserumresistenz gezogen werden können.

Um ihr Verhalten gegenüber Humanserum zu bestimmen, wurden die Stämme im *in vitro*-Humanserum-Resistenztest (HSRT) und teilweise im Blutinkubations-Infektiositätstest (BIIT) untersucht.

Die Referenzstämme und -klone verhielten sich im HSRT erwartungsgemäß sensitiv (*T. b. brucei*) bzw. resistent (*T. b. gambiense*). Von den 2 *T. b. rhodesiense*-Stämmen verhielt sich der eine, wie zu erwarten, resistent, der andere jedoch sensitiv, was sich durch einen Verlust der Humanserumresistenz von *T. b. rhodesiense* nach Labortierpassagen bzw. Kultivierung ohne Humanserum erklären lässt.

Von den 18 aus Tieren isolierten ugandischen Feldstämme verhielten sich 3 resistent, 6 subresistent und 9 sensitiv im HSRT. Die 7 Klone verhielten sich ebenfalls sensitiv, genau wie ihre Mutterstämme. Diese Ergebnisse waren nur teilweise identisch mit früher gewonnenen BIIT-Ergebnissen, was allerdings die Aussage unterstützt, dass *T. b. rhodesiense* ihre Humanserumresistenz verlieren können (s.o.). So zeigten ohne Humanserum passagierte Stämme bei meinen Untersuchungen z.T. einen geringeren Resistenzgrad als vorher, während 2 von mir zusammen mit Humanserum passagierte Stämme einen höheren Resistenzgrad aufwiesen.

Die 4 aus Menschen isolierten ugandischen Feldstämme verhielten sich im HSRT erwartungsgemäß resistent.

Von den 5 für den BIIT ausgewählten, aus Tieren isolierten Feldstämmen verhielten sich 3 resistent, 2 jedoch subresistent, obwohl sie anhand früherer BIIT-Ergebnisse als resistent eingestuft worden waren. Diese sich nur im Resistenzgrad unterscheidenden Ergebnisse können trotzdem als übereinstimmend gewertet werden.

Die 3 ausgewählten menschlichen Isolate verhielten sich im BIIT erwartungsgemäß resistent.

Für die PFGE-Untersuchungen der Trypanosomen-Karyotypen mussten sowohl die Probenaufbereitung als auch die Laufbedingungen zunächst optimiert werden.

Mit 4 verschiedenen PFGE-Parameterlisten (Lauf 0-III) konnten Chromosomenbanden von 95kbp bis 3Mbp in einem jeweils 4,5cm hohen Agarosegel aufgetrennt werden. Dabei brachte der Einsatz von  $2 \times 10^9$  Trypanosomen pro ml PSG-Puffer zur Herstellung der PFGE-Agaroseblöcke und deren anschließender Verdau mit 1mg Proteinase K pro ml NDS-Puffer für 48h gute Ergebnisse. Die DNA-Banden wurden 30min mit Ethidiumbromid gefärbt und über Nacht entfärbt. Das Gel wurde anschließend über UV-Licht fotografiert, zur Bildoptimierung in das Dokumentationsprogramm *BioDoc*<sup>®</sup> (Biometra, Göttingen) übertragen und schließlich mit Hilfe des *ScanPack 3.0*<sup>®</sup>-Programmes (Biometra, Göttingen) ausgewertet.

Die Untersuchungen zur Stabilität des Karyotypes von Trypanosomen zeigten, dass Blutstrom- und prozyklische Formen, frühe und späte Antigenvarianten oder Feldstämme und aus diesen gewonnene Klone identische Karyotypen besitzen.

Die Karyotypen der Referenzstämme waren sehr unterschiedlich voneinander, und es ließen sich keine Gemeinsamkeiten ausmachen. In den Bereichen der Mini- (MC) und großen (MBC) Chromosomen zeigten alle Referenzen ungefähr vergleichbar viele Chromosomenbanden (durchschnittlich 4-7 MC und 4-6MBC). Nur von den Intermediär-Chromosomen (IC) besaßen die *T. b. gambiense*-Stämme durchschnittlich weniger (0-4 IC) als die nicht-*gambiense*-Stämme (3-6 IC). Eine Einteilung der Referenzen in humanserumresistent bzw. -sensitiv aufgrund von PFGE-Ergebnissen war nicht möglich. Auch konnten die 3 *Trypanosoma brucei*-Subspezies nicht eindeutig durch die PFGE identifiziert werden.

Die aus Rindern und Schweinen in Bulutwe, Südost-Uganda isolierten Feldstämme stellten sich in ihren Karyotypen sehr viel homogener dar als die aus Menschen isolierten. Letztere waren untereinander genauso unterschiedlich wie die Referenzen. Ähnliche oder identische Karyotypen verschiedener Stämme konnten jedoch nur auf einen identischen Isolierungszeitraum bzw. dasselbe Isolierungstier zurückgeführt werden. Die durch das

Dendrogramm entstandene Einteilung der Referenz- und Feldstämme bzw. -klone in 5 Gruppen (I-V) zeigte ebenfalls, dass in nahezu jeder Gruppe sowohl Humanserum-resistente bzw. -subresistente als auch -sensitive Stämme oder Klone enthalten sind. Gruppe IV beinhaltet als einzige nur resistente *T. b. gambiense*-Referenzen. Vom Karyotyp eines Stammes konnte also nicht auf seine Humanserumresistenz geschlossen werden. Auch konnte keine einzelne Bande identifiziert werden, die sich mit der Humanserumresistenz oder -sensitivität eines Stammes oder Klones in Verbindung bringen ließ.

Die PFGE kann als einfach erlern- und durchführbare Methode Trypanosomen-Stämme spezifisch charakterisieren und selbst geringgradige Änderungen ihres Genotyps nachweisen. Trotzdem konnte in der vorliegenden Untersuchung anhand der Karyotypen der Stämme nicht auf ihre Humanserumresistenz oder Subspezies-Zugehörigkeit geschlossen werden. Grund hierfür ist die relativ geringe Sensitivität der PFGE, die auf der Ebene der Größenänderungen von Chromosomen liegt. Diese Größenänderungen entstehen bei Trypanosomen jedoch sehr häufig und zwar aufgrund immer wieder willkürlich auftretender Gen-Rearrangements.

Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, könnte man, anstatt die intakten Chromosomen aufzutrennen, diese zunächst an definierten Schnittstellen durch Restriktionsenzyme in Chromosomen-Bruchstücke schneiden. Noch sensitiver, wenn auch Kontaminationsgefährdeter, wären PCR-Methoden, die eine Identifizierung von humaninfektiösen Trypanosomen-Isolaten erlauben.