

**Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz**

**Kardiomyopathie bei der Chagas-Krankheit:
Experimente zur Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) und NO-Synthasen im
Mausmodell**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Theresa Herterich

aus Hammelburg

Würzburg, März 2018

Referent: Prof. Dr. med. Oliver Ritter
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 2019

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	DIE KRANKHEIT	1
1.2	DER ERREGER	3
1.3	THERAPIE	4
1.4	STICKSTOFFMONOXID	5
1.5	NO-SYNTHESEN	5
1.5.1	INDUZIERBARE NOS	5
1.5.2	KONSTITUTIV EXPRIMIERTE NOS	6
1.6	STICKSTOFFMONOXID IM MYOKARD	7
1.7	STICKSTOFFMONOXID UND <i>T. CRUZI</i>	8
1.8	VORARBEITEN DER ARBEITSGRUPPE	8
1.9	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
<u>2</u>	<u>MATERIAL</u>	<u>11</u>
2.1	GERÄTE	11
2.1.1	S3-LABOR (ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG WÜRZBURG)	11
2.1.2	LABOR ZEMM (ZENTRUM FÜR EXPERIMENTELLE MOLEKULARE MEDIZIN)	11
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN LABOR ZEMM	12
2.2.1	ALLGEMEINES VERBRAUCHSMATERIAL	12
2.2.2	CHEMIKALIEN	12
2.3	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	12
2.3.1	FÄRBE LÖSUNGEN	12
2.3.2	ZELLKULTUR	13
2.3.3	WESTERN BLOT	15
2.3.4	POLYMERASE-KETTENREAKTION	17
2.4	ANTIKÖRPER	17
2.4.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	17
2.4.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	18
2.5	KOMMERZIELLE KITS	18
<u>3</u>	<u>METHODEN</u>	<u>19</u>
3.1	PARASITEN	19
3.1.1	KULTUR	19
3.1.2	INFEKTION VON FIBROBLASTEN	19
3.1.3	GIEMSA-FÄRBUNG	20

3.1.4	VORBEREITUNG DER PARASITEN FÜR DIE INFEKTION	20
3.2	VERSUCHSAUFBAU	21
3.2.1	INFEKTION DER MÄUSE	21
3.2.2	BLUTENTNAHME UND BESTIMMUNG DER PARASITÄMIE	21
3.2.3	DNA-EXTRAKTION AUS MAUSBLUT	21
3.2.4	PCR ZUR BESTIMMUNG DER PARASITÄMIE	22
3.2.5	GELELEKTROPHORESE	22
3.2.6	ORGANENTNAHME	23
3.2.7	NO-MESSUNG IM HERZGEWEBE	23
3.2.8	DNA-/RNA-EXTRAKTION	24
3.2.9	ERMITTLUNG DER PARASITENLAST IM GEWEBE DURCH REAL-TIME PCR	24
3.2.10	GEWEBESCHNITTE	25
3.2.10.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
3.2.10.2	Bestimmung der Kardiomyozytengröße – Cardiomyocyte cross sectional area	26
3.2.11	WESTERN BLOT ANALYSEN	27
3.2.11.1	Proteinextraktion aus Herzgewebe	27
3.2.11.2	Ermittlung der Proteinkonzentration mittels NanoDrop® 2000	27
3.2.11.3	Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot	27
3.3	ZELLKULTUR – NEONATALE RATTENKARDIOMYOZYTEN	28
3.3.1	ERMITTLUNG DER PARASITENZAHL IM ÜBERSTAND	29
3.3.2	ERMITTLUNG DER PARASITENLAST IM KARDIOMYOZYT	29
3.3.3	ERMITTLUNG DER PARASITENLAST MITTELS REAL-TIME PCR	30
3.3.4	WESTERN BLOT ANALYSEN	30
3.3.4.1	Proteinextraktion aus Zellkultur	30
3.3.4.2	Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot	30
3.3.5	NO-MESSUNG	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	TIERVERSUCH	32
4.1.1	NO-MESSUNG	32
4.1.2	PARASITENLAST IM HERZGEWEBE	32
4.1.3	BEURTEILUNG DER HERZEN	33
4.1.3.1	Herzgewicht/Mausgewicht	34
4.1.3.2	Kardiomyozytengröße	34
4.1.4	EXPRESSION DER NO-SYNTHASEN IM HERZGEWEBE	35
4.1.4.1	iNOS-Expression	35
4.1.4.2	nNOS-Expression	35

4.1.4.3	eNOS-Expression	36
4.2	ZELLKULTURVERSUCHE	37
4.2.1	EXPRESSION DER iNOS IN INFIZIERTEN VS. NICHT-INFIZIERTEN KARDIOMYOZYTEN	37
4.2.2	NO-PRODUKTION IN INFIZIERTEN VS. NICHT-INFIZIERTEN KARDIOMYOZYTEN	37
4.2.3	EINFLUSS VON LPS AUF DIE iNOS-EXPRESSION	38
4.2.4	NO-PRODUKTION UNTER BEHANDLUNG MIT LPS	39
4.2.5	EXPRESSION DER iNOS IN MIT LPS BEHANDELTEN, INFIZIERTEN KARDIOMYOZYTEN	40
4.2.6	NO-PRODUKTION IN INFIZIERTEN, MIT LPS BEHANDELTEN KARDIOMYOZYTEN	41
4.2.7	EINFLUSS DER LPS-BEHANDLUNG AUF DAS INFektionsAUSMAß	42
4.2.7.1	Parasiten im Überstand	42
4.2.7.2	Parasiten pro Kardiomyozyt	43
4.2.7.3	Relative Quantifizierung der Parasiten-DNA mittels Real-Time PCR	43
4.2.7.4	ANP Western Blot	44
4.2.8	EINFLUSS DES NO-DONATORS AUF DAS INFektionsAUSMAß	45
4.2.8.1	Parasiten im Überstand	45
4.2.8.2	Relative Quantifizierung der Parasiten-DNA mittels Real-Time PCR	45
4.2.8.3	Expression der iNOS unter Behandlung mit NO-Donator Glyceroltrinitrat	46
4.2.8.4	ANP Western Blot	47
5	DISKUSSION	48
5.1	TIERVERSUCH	48
5.2	ZELLKULTURVERSUCHE	50
5.2.1	DIE iNOS IN INFIZIERTEN VS. NICHT-INFIZIERTEN KARDIOMYOZYTEN	50
5.2.2	EINFLUSS EINER iNOS-ÜBEREXPRESSION AUF DIE INFektion MIT <i>T. CRUZI</i>	50
5.2.3	HEMMUNG DER NO-PRODUKTION DURCH NOS-INHIBITOREN	51
5.2.4	EINFLUSS DES NO-DONATORS GLYCEROLTRINITRAT AUF DIE INFektion MIT <i>T. CRUZI</i>	52
5.2.5	ANP ALS PROGNOSTISCHER MARKER BEI INFektion MIT <i>T. CRUZI</i>	52
5.3	STICKSTOFFMONOXID UND DIE CHAGAS-KRANKHEIT	52
6	ZUSAMMENFASSUNG	54
7	ANHANG	55
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	55
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
7.3	TABELLENVERZEICHNIS	59
7.4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60

DANKSAGUNG

1 Einleitung

1.1 Die Krankheit

Die Chagas-Krankheit wird von der WHO zu den 17 „Neglected tropical diseases“ gezählt. Diese, zu denen auch die durch *T. brucei* verursachte Schlafkrankheit gehört, zeichnen sich dadurch aus, dass sie von Politik und Wissenschaft vernachlässigt wurden, da vor allem die ärmsten Menschen der Welt von ihnen betroffen sind [24]. Die Chagas-Krankheit ist in Südamerika endemisch. Durch Bevölkerungsbewegungen gewinnt die Erkrankung aber auch in anderen Teilen der Welt – vor allem in Europa und Nordamerika – an Bedeutung [18]. Weltweit sind laut WHO etwa 6–7 Millionen Menschen mit dem Erreger infiziert [61].

Erreger der Chagas-Krankheit ist der protozoische Parasit *Trypanosoma cruzi*. Dieser wird in der Regel über den Kot von Raubwanzen der Familie Triatominae (Abb. 1) übertragen. Zudem sind aber auch andere Übertragungswege möglich wie zum Beispiel über Bluttransfusionen, Organspende, diaplazentar in der Schwangerschaft oder selten durch orale Aufnahme des Erregers [50].



Abbildung 1: Raubwanze, aus [50]

Die akute Infektion mit *T. cruzi* verläuft häufig asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen wie zum Beispiel Fieber [38]. Erfolgt die Infektion über Raubwanzen, kann sich an der Eintrittsstelle des Erregers eine entzündliche Läsion bilden – das Chagom. Ist das Augenlid betroffen heißt diese auch Romaña-Zeichen (Abb. 2). Unbehandelt geht die Erkrankung nach der akuten Phase in die indeterminate Phase über. Nur durch eine spezifische antiparasitäre Therapie kann eine Ausheilung erzielt werden.



Abbildung 2: Romaña-Zeichen, übernommen aus [50]

In der indeterminanten Phase sind Parasiten zwar nachweisbar, die Patienten zeigen jedoch keine Krankheitssymptome. Nur etwa 20–30 % entwickeln im Verlauf eine chronische Chagas-Krankheit, die sich sowohl kardial als auch gastrointestinal

manifestieren kann (s. Abb. 3). Die chronische Chagas-Kardiomyopathie ist die häufigste chronische Manifestation der Chagas-Krankheit. Sie tritt bei etwa einem Drittel der chronisch Infizierten auf und äußert sich vor allem in Form von Herzinsuffizienz, Arrhythmien, thrombembolischen Ereignissen und plötzlichem Herztod [40].



Abbildung 3: Verschiedene Ausprägungen der Chagas-Krankheit: Megacolon, Kardiomegalie, Aneurysma der Herzspitze, aus [50]

Der Mechanismus, durch den es letztendlich zu einer chronischen Herzerkrankung kommt, ist noch nicht vollständig geklärt und schematisch in Abbildung 4 zusammengefasst. Man vermutet, dass eine Kombination aus Persistenz des Parasiten im Gewebe, Endzündungsreaktion und autoimmunem Geschehen ursächlich ist [6].

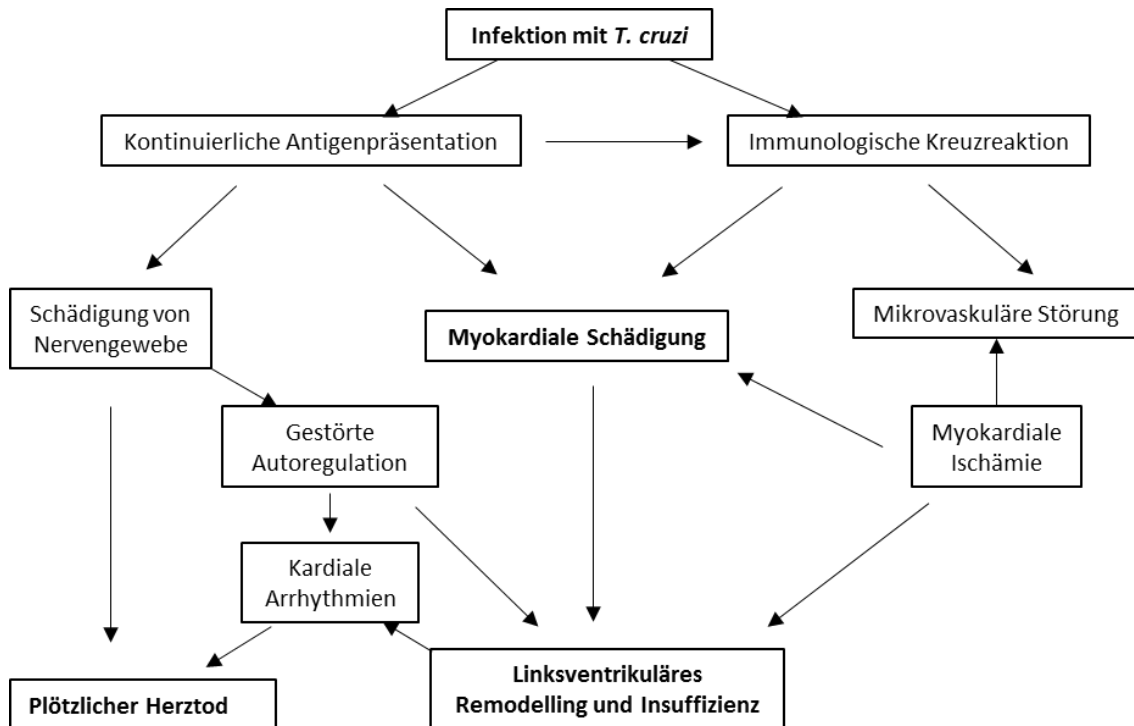


Abbildung 4: Die Pathogenese der chronischen Chagas-Kardiomyopathie, adaptiert aus [3]

Die Persistenz von *T. cruzi* nach der Infektion im Gewebe löst eine kontinuierliche Entzündungsreaktion aus, die sowohl myokardiales als auch neuronales Gewebe schädigt [3]. Zudem kommt es im Rahmen einer molekularen Mimikry zwischen Parasiten- und Wirtsantigenen zur Produktion von Autoantikörpern, die zur weiteren Gewebsschädigung beitragen. Diese Mechanismen resultieren letztlich in kardialen Funktionsverlust und können zu Herzinsuffizienz und sogar zum plötzlichen Herztod führen.

1.2 Der Erreger

Trypanosoma cruzi gehört zu einer Gruppe einzelliger, geißeltragender Parasiten – den Kinetoplastida. Diese zeichnen sich durch den Kinetoplasten aus – ein Mitochondrium, das die Basis der Flagelle bildet. Weitere wichtige Vertreter dieser Gruppe sind *Trypanosoma brucei*, der Erreger der Schlafkrankheit, und die Gruppe der Leishmanien, die die Leishmaniose verursachen.

Wie viele andere Parasiten durchläuft *T. cruzi* einen komplexen Lebenszyklus (s. Abb. 5) [14]. Dabei nimmt der Parasit im Verlauf verschiedene Formen an. Man unterscheidet eine epimastigote, eine trypomastigote und eine amastigote

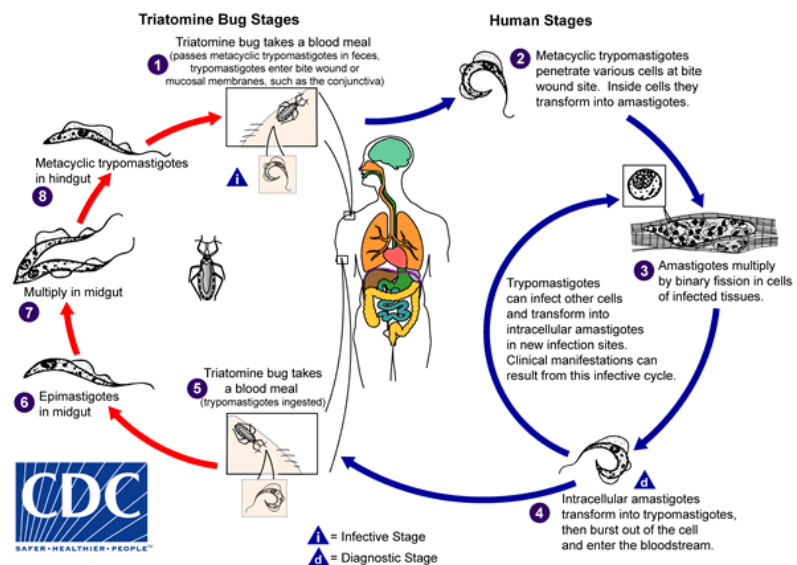


Abbildung 5: Lebenszyklus von *T. cruzi* übernommen aus [14]

Form. Raubwanzen, welche als Vektor dienen, nehmen durch das Saugen von Blut eines infizierten Wirtes (z. B. eines Menschen) trypomastigote Formen auf. Im Darm der Raubwanze entsteht daraus die epimastigote Form, welche sich dort zunächst durch Teilung vermehrt. Im Anschluss erfolgt die Weiterentwicklung zur infektiösen trypomastigoten Form, welche mit dem Kot ausgeschieden wird, den die Raubwanze typischerweise während einer Blutmahlzeit absetzt. Durch den Stich beim Blutsaugen

entsteht eine juckende Hautläsion, in die der Wirt den infektiösen Kot hineinreibt. Nach Aufnahme in eine Wirtszelle entwickelt sich aus der trypomastigoten Form die amastigote. Die amastigote Form vermehrt sich wiederum durch Zweiteilung. Nach mehreren Teilungen transformiert diese in eine trypomastigote Form, die schließlich aus der Zelle freigesetzt wird und entweder andere Zellen infiziert oder in den Blutstrom gelangt.

1.3 Therapie

Die Therapie der Chagas-Krankheit ist derzeit auf zwei Medikamente begrenzt – Nifurtimox und Benznidazol. Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) ist ein Nitrofuranderivat, das zu einem Stickstoffanionen-Radikal reduziert wird [22],[59]. Dieses wiederum reagiert in Anwesenheit von Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoffmetaboliten, die den Parasiten durch oxidativen Stress schädigen. Benznidazol (Rochagan[®], Roche), ein Nitroimidazol, ist durch die Bindung an Makromoleküle wie z. B. die DNA der Trypanosomen antiparasitär wirksam. Diese beiden Medikamente wurden vor mehr als 40 Jahren für die Behandlung der Infektion mit *T. cruzi* zugelassen.

In der akuten Phase der Chagas-Krankheit ist ihre Wirksamkeit relativ hoch [2]. In 60–85 % der Patienten können nach Behandlung keine Trypanosomen mehr nachgewiesen werden. Auch bei kongenitalen Infektionen und nach Reaktivierung der Erkrankung bei Immunsuppression zeigt die Behandlung mit Nifurtimox oder Benznidazol gute Ergebnisse. In diesen Fällen besteht deshalb eine klare Indikation zur antiparasitären Behandlung. Kinder sollen unabhängig vom Krankheitsstadium antiparasitär behandelt werden.

Um den Nutzen der medikamentösen Behandlung der chronischen Chagas-Krankheit zu evaluieren, wurde in der internationalen BENEFIT-Studie die Therapie mit Benznidazol in einem doppelblinden Versuchsaufbau der Placebo-Behandlung gegenübergestellt [43]. Dabei stellte sich heraus, dass Benznidazol bei Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie ein Voranschreiten der Erkrankung nicht aufhalten kann [46]. Zudem führen Benznidazol und auch Nifurtimox zu teilweise sehr starken Nebenwirkungen. Benznidazol, das als besser verträglich gilt, führt bei etwa 30–50 % der Behandelten zu Hautveränderungen wie Dermatitis und Photosensibilisierung [1],[13]. Eine weitere

häufige Nebenwirkung ist eine Neuropathie, die ebenfalls bei 30 % der Patienten auftritt. Nifurtimox verursacht in 50–75 % der Fälle gastrointestinale Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen mit Gewichtsverlust bis hin zur Anorexie. Auch psychische und neurologische Veränderungen werden in circa 50 % der Patienten beobachtet.

1.4 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Radikal mit einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom. Abbildung 6 zeigt die Strukturformel. Das Radikal weist eine für Radikale bemerkenswert lange Halbwertszeit von 5 Sekunden auf und ist daher in zahlreiche physiologische Vorgänge involviert.

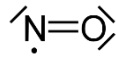


Abbildung 6: Strukturformel
Stickstoffmonoxid

Im Jahr 1992 wurde es aufgrund der Vielfalt seiner Funktionen zum Molekül des Jahres ernannt [19]. Abhängig von der Konzentration hat Stickstoffmonoxid unterschiedliche Wirkungen.

Liegt es in hohen Konzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$) vor, reagiert NO mit Sauerstoff oder Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und bildet reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen wie beispielsweise Peroxynitrit (ONOO^{\cdot}) [52].

Diese wiederum können kovalent an Makromoleküle wie DNA, Lipide oder Proteine binden und somit in zelluläre Prozesse pathogener Organismen eingreifen und diesen schaden. Dadurch ist NO ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität.

In niedrigen, picomolaren Konzentrationen agiert NO als „second messenger“ und ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. NO wird intrazellulär durch NO-Synthasen gebildet.

1.5 NO-Synthasen

1.5.1 Induzierbare NOS

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS2) findet sich in vielen Immunzellen wie dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, Mastzellen oder Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten, Mikroglia, Neutrophilen, Eosinophilen und Kupfferzellen. Aber auch viele andere nicht primär als Immunzellen bezeichnete Zellen wie unter

anderem Epithelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten können iNOS exprimieren [4]. Im Rahmen einer Infektion wird die iNOS durch Interferon gamma (Inf- γ) alleine oder in Kombination mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und zahlreichen weiteren Chemokinen und Zytokinen induziert [42]. Um sich selbst vor der schädlichen Wirkung des Stickstoffmonoxids zu schützen, kann der Wirtsorganismus die Funktion der iNOS jedoch auch hemmen. Dabei spielen unter anderem die Signalmoleküle Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor beta (TGF- β) eine entscheidende Rolle [48].

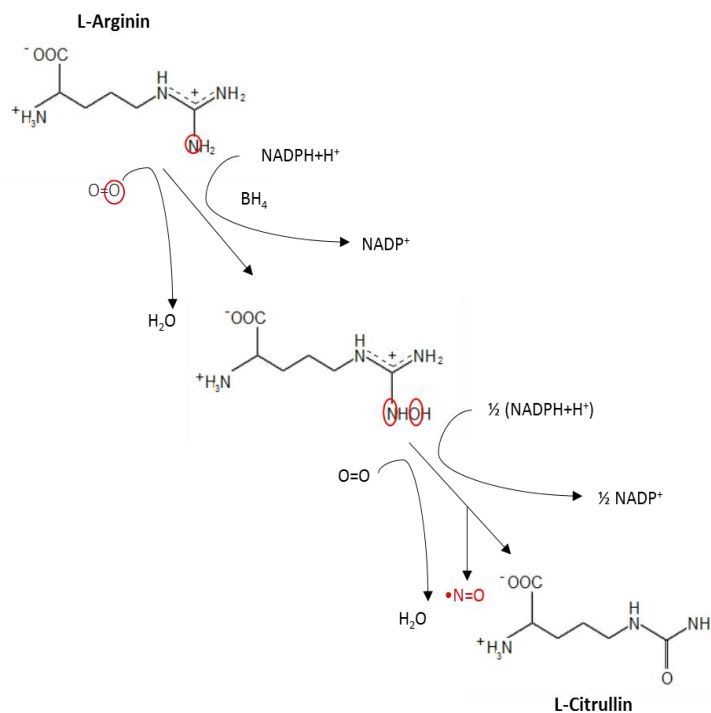


Abbildung 7: NOS-Reaktion, adaptiert aus [35]

Unter Umwandlung des Substrats L-Arginin mit den Kosubstraten Sauerstoff und NADPH bildet die iNOS schließlich Stickstoffmonoxid und L-Citrullin (Abb. 7) [5]. Dieser Prozess erfolgt unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration, benötigt aber zahlreiche andere Kofaktoren (FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin).

1.5.2 Konstitutiv exprimierte NOS

Neben der induzierbaren gibt es noch zwei weitere konstitutiv exprimierte NO-Synthasen, die neuronale und die endotheliale NO-Synthase. Diese bilden auf ähnliche Weise wie die iNOS, aber abhängig von Ca^{2+} und Calmodulin, geringere Konzentrationen an Stickstoffmonoxid ($< 1 \mu M$) [52]. In geringen Konzentrationen fungiert NO cGMP-

abhängig oder -unabhängig als Signalmolekül. Bei der cGMP-abhängigen Signaltransduktion aktiviert NO die zytosolische Guanylatcyclase (sGC), die GTP in cyclisches GMP umwandelt. Dieses aktiviert wiederum die Proteinkinase G (PKG). Die cGMP-unabhängigen Effekte von NO werden durch Proteinmodifikation mittels S-Nitrosylierung bewirkt [58].

Im zentralen und peripheren Nervensystem lokalisiert beeinflusst die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS1) unter anderem die neuronale Plastizität, die Regulation der Durchblutung, die Übertragung von Schmerzsignalen und die Freisetzung von Neurotransmittern [44]. Anders als ihr Name suggeriert hat die nNOS aber auch in Kardiomyozyten, im Skelettmuskel, in der glatten Muskulatur der Gefäßwand, in Epithelzellen der Lunge, des Uterus und des Gastrointestinaltrakts, in den Inselzellen des Pankreas und in der Macula densa der Niere Funktionen inne [25],[26].

Die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3) ist vor allem in Endothelzellen, aber auch in Kardiomyozyten, Thrombozyten, Neuronen, in der Plazenta und in Zellen der Nierentubuli lokalisiert. Endothelial gebildetes NO diffundiert durch die Zellmembran glatter Muskelzellen und führt dort cGMP-abhängig zur Relaxation glatter Muskelzellen der Gefäßwand und damit zur Dilatation von Blutgefäßen [9]. Ebenfalls über die Bildung von cGMP kann NO außerdem die Thrombozytenaggregation hemmen.

1.6 Stickstoffmonoxid im Myokard

Alle drei NOS-Isoformen kommen auch im Herzen vor. Die neuronale und die endotheliale NO-Synthase sind in den Kardiomyozyten konstitutiv exprimiert. Während sich die nNOS im sarkoplasmatischen Retikulum, in der Plasmamembran und in den Mitochondrien der Herzmuskelzellen befindet, ist die eNOS assoziiert mit Caveolin-3 im Bereich der Caveolae lokalisiert. In den Kardiomyozyten gebildetes NO moduliert die elektromechanische Kopplung und wirkt auf das Myokard negativ inotrop. Das von der nNOS gebildete NO greift zudem in die mitochondriale Atmungskette ein und beeinflusst die Aktivität der kardialen Xanthinoxidoreduktase (XOR) und damit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Myokard [62]. Während nNOS und eNOS physiologischerweise in gesunden Herzen exprimiert werden, wird iNOS im Rahmen von Entzündungsreaktionen induziert. In diesem Fall entstehen hohe Konzentrationen an

NO und Peroxynitrit, welche durch Oxidation zelluläre Schäden verursachen können [63].

1.7 Stickstoffmonoxid und *T. cruzi*

Stickstoffmonoxid dient der Abwehr von Infektionserregern, darunter Viren, Pilze, Bakterien und Protozoen [54]. Bei einer Infektion mit *T. cruzi* spielt NO eine zentrale Rolle. Makrophagen sind in der Lage, getriggert zum Beispiel durch INF- γ oder TNF- α , Stickstoffmonoxid zu bilden, wodurch die Proliferation von *T. cruzi* gehemmt wird [28]. Aber nicht nur in Makrophagen, sondern auch in infizierten Kardiomyozyten wird iNOS-abhängig trypanozides NO produziert [39]. Dementsprechend zeigen Mäuse, die aufgrund eines defizienten IFN- γ -Rezeptors oder wegen eines iNOS-Knockouts unfähig sind NO zu bilden, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *T. cruzi* [32]. Stickstoffmonoxid ist dabei durch verschiedene Mechanismen zytotoxisch wirksam. Zum einen greift es direkt in den Stoffwechsel des Parasiten ein, indem es Cruzipain, eine für den Parasiten lebenswichtige Proteinase, inaktiviert. Zum anderen wirkt es über die Bildung von Peroxynitrit dosisabhängig trypanozid [54]. Jedoch ist die Rolle von NO und den verschiedenen NO-Synthasen in der Chagas-Kardiomyopathie noch nicht abschließend geklärt. In der Literatur findet man daher diesbezüglich auch widersprüchliche Aussagen. *Chandrasekar et al.* analysierten die Regulierung der NO-Synthasen im Rattenmyokard nach Infektion mit *T. cruzi*. Zu Beginn zeigten sich eNOS und iNOS, später nur noch iNOS hochreguliert. nNOS konnte hingegen nicht gefunden werden [15]. Im Gegensatz dazu schreiben *Cummings et al.* der iNOS keine Bedeutung für die Kontrolle der *T. cruzi*-Infektion zu [20]. Diese Erkenntnisse stützen sie auf die Untersuchung von infizierten Mäusen mit iNOS-Knockout. *Durand et al.* beschäftigten sich zudem mit nNOS- und eNOS-KO-Mäusen. Dort war die Mortalität in der Gruppe der infizierten nNOS-KO-Mäuse am höchsten, was wiederum die Bedeutung der nNOS propagiert [23].

1.8 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Um die Bedeutung der neuronalen NOS im Myokard weiter zu erforschen, wurde in der Arbeitsgruppe ein Mausmodell mit myokardialer nNOS-Überexpression etabliert. Mit

Hilfe dieses Mausmodells konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der nNOS zu einer verminderten myokardialen Kontraktilität führt [10]. In weiteren Untersuchungen wurde die Expression der nNOS in Mitochondrien und ihr Einfluss auf die Atmungskette und den damit assoziierten myokardialen Sauerstoffverbrauch bestätigt. Zudem konnte der nNOS eine protektive Wirkung bei kardialen Ischämieschäden zugeschrieben werden [11].

Insbesondere interessierte auch die Rolle der nNOS in der Chagas-Kardiomyopathie. Daher wurde ein Teil der nNOS-Überexpressionsmäuse mit *T. cruzi* infiziert. Im Anschluss wurde die Herzinsuffizienz mittels MRT evaluiert. In der nNOS-Überexpressions-Gruppe konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant bessere Ejektionsfraktion nach Infektion gemessen werden. Zudem fiel die Parasitämie in dieser Gruppe signifikant geringer aus. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich eine ebenfalls signifikant verminderte Zahl an Trypanosomen/Zelle im Myokard in der nNOS-Überexpressionsgruppe. Diese Ergebnisse suggerieren einen positiven Effekt der nNOS auf die Chagas-Kardiomyopathie.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Stickstoffmonoxid, das während einer Infektion mit *T. cruzi* vom Wirt endogen produziert wird, scheint den Verlauf der Chagas-Krankheit, insbesondere der Chagas-Kardiomyopathie, günstig zu beeinflussen.

Schon vor 20 Jahren wurde eine schädliche Wirkung von exogen zugeführtem NO auf Trypanosomen belegt. *In vitro* ist der NO-Donator S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) in der Lage das Wachstum von *T. cruzi* zu hemmen [7],[60]. Diese Erkenntnisse und der Bedarf an neuen Medikamenten gegen die Chagas-Krankheit treiben die Forschung an NO-freisetzenden Substanzen voran [53]. Eine brasilianische Arbeitsgruppe entwickelte einen NO-Donator, der sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell vielversprechende Ergebnisse zeigte [29]. Bevor diese neuen Präparate als Medikamente zugelassen werden können, sind noch viele Untersuchungen und Studien notwendig [41].

In anderen Bereichen finden NO-Donatoren jedoch schon lange Zeit therapeutische Anwendung. Pentaerythrityltetranitrat (PETN) wurde bereits im Jahr 1959 für die Behandlung der Koronaren Herzerkrankung zugelassen [34]. Dementsprechend konnten bereits langjährige Erfahrungen mit diesem Medikament gesammelt werden. Zudem ist das Nebenwirkungsprofil günstig. Als häufigste Nebenwirkung sind Kopfschmerzen beschrieben, gelegentlich kann es zu orthostatischer Hypotension, Reflextachykardie oder Flush kommen, nur selten zeigen sich allergische Hautreaktionen oder gastrointestinale Beschwerden [27].

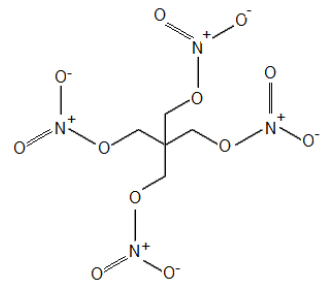


Abbildung 8: Strukturformel Pentaerythrityltetranitrat

Ziel meiner Arbeit ist es, die Wirkung von PETN im Rahmen der Chagas-Krankheit anhand von mit *T. cruzi* infizierten Mäusen zu untersuchen. Zudem sollen Kardiomyozyten mit *T. cruzi* infiziert werden. Anhand der Zellkulturversuche soll die Wirkung des iNOS-Induktors LPS und der NOS-Inhibitoren L-NAME und SMLT untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 S3-Labor (Zentrum für Infektionsforschung Würzburg)

Tabelle 1: Geräteliste S3-Labor

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
Inverses Mikroskop	Labovert	Leitz
Lichtmikroskop	Lux 3	Leitz
Inkubator	Heraeus BB 6220	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Labor ZEMM (Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin)

Tabelle 2: Geräteliste Labor ZEMM

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
ELISA-Reader	Tecan Spectra	Tecan
ELISA-Reader	Dynex MRX tc	Dynex
Entwicklermaschine	Ecomax	Protec medical systems
Fluoreszenzmikroskop	Biozera BZ-8000K	Keyence
Heizblock	ThermoStat plus	Eppendorf
Inkubator	Function line	Heraeus
Inkubator	Steri-Cult 200	Forma Scientific
Lichtmikroskop	Labovert	Leitz
	Axioskop 2 plus	Zeiss
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Power Supply	P25, PP4000	Biometra
Real-Time PCR System	iCycler iQ	BioRad
Scanner	Expression 1600	Epson
Thermocycler	TPersonal Thermal Cycler	Biometra
Vakuumpumpe	LAB Laboport	KNF
Zentrifuge	2K15, Sigma 2-15	Sigma
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge	GPKR Centrifuge	Beckman

2.2 Verbrauchsmaterialien Labor ZEMM

2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wie z. B. Plastikröhrchen oder Pipettenspitzen wurden über die Universitätsklinik Würzburg (Medizinische Fakultät, Zentrallager), die Firma A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) oder die Firma Weckert Labor-, Röntgen- und Medizintechnik (Kitzingen, Deutschland) bezogen.

2.2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg oder über die Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (München, Deutschland) und A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) bezogen.

2.3 Puffer, Lösungen und Medien

2.3.1 Färbelösungen

Tabelle 3: Giemsa

Produkt	Verdünnung
Giemsa-Stammlösung (Roth)	1:20

Tabelle 4: Hämatoxylin

Inhaltsstoffe	Menge in g
Hämatoxylin (Roth)	3,0
Natriumiodat	0,5
Aluminiumkaliumsulfat	125
Chloralhydrat	125
Zitronensäure	2,5

Alle Komponenten in 2500 ml destilliertem Wasser lösen.

Tabelle 5: Eosin

Inhaltsstoff	Menge in g
Eosin (Merck)	1

In 100 ml destilliertem Wasser lösen.

Cardiomyocyte cross sectional area

Tabelle 6: 4 % PFA (Paraformaldehyd)

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge in g
PFA [30,03]	4,0
PBS	Ad 100 ml

Tabelle 7: Permeabilisierungslösung Nonidet 2 %

Inhaltsstoffe	Volumen in ml
Nonidet p40	1,0
PBS	Ad 50 ml

Tabelle 8: DAPI

Inhaltsstoffe	Volumen in ml
DAPI (Roth) (10 mg/ml)	0,1 ml
PBS	Ad 50 ml

- Red Alexa Fluor 594 conjugate Wheat Agglutinin 1 µg/µl (Invitrogen™)

2.3.2 Zellkultur

Tabelle 9: Mattei-Medium für *T. cruzi*

Inhaltsstoffe	Masse in g
NaCl	4,0
KCl	0,4
Na ₂ HPO ₄	8,0
Glucose	2,0
Tryptose	10,0
Liver infusion broth (Difco)	2,0

Gemäß eines Protokolls des Schweizerischen Tropen- und Public Health-Instituts in Basel wurden für die Herstellung des Mediums alle Komponenten in 1 l Wasser gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf pH = 7,2 wurde die Lösung mit einem 0,2 µm Bottle Top Filter steril filtriert. Das noch inkomplette Medium wurde in 50 ml Tubes zu Aliquots von 45 ml portioniert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Fertigstellung wurde das Medium kurz vor Gebrauch aufgetaut und mit 5 ml inaktiviertem Fetalen Kälberserum (inaktiviert für 30 Minuten im Wasserbad bei 60 °C) und 50 µl Hämin-Stocklösung versetzt.

Tabelle 10: Medium für Fibroblastenkultur

Inhaltsstoffe	Volumen in ml
Medium-199 (Gibco)	500
FCS (Invitrogen)	50,0
Penicillin + Streptomycin (10000 U/ml + 250 mg/ml)	5,0
Fungizone (250 µg/ml)	5,0

Tabelle 11: Medium für neonatale Rattenkardiomyozyten

Inhaltsstoffe	Menge/Volumen
MEM HBS with NEAA (Amimed)	12,5 g
L-Glutamin	292 mg
Na-Bicarbonat	350 mg
Streptomycin (50 mg/ml)	1 ml
Penicillin G (50000 U/ml)	1 ml
Vitamin B12 (2 mg/ml)	1 ml
Bromdesoxyuridin (6,14 mg/ml)	5 ml
FCS (Invitrogen)	50 ml
dH ₂ O	Ad 1 l

Tabelle 12: PBS für Zellkultur

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge in g
NaCl [58,44]	40,0
KCl [74,56]	1,0
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O [177,99]	7,2
KH ₂ PO ₄ [136,09]	1,02

Zutaten in 5 Liter destilliertem Wasser auflösen und auf pH = 7,4 einstellen.

Tabelle 13: SMLT-Stammlösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
SMLT [265,33]	10 mg
dH ₂ O	Ad 1 ml

Tabelle 14: L-NAME-Stammlösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
L-NAME [269,69]	1 mg
dH ₂ O	Ad 1 ml

Tabelle 15: LPS-Stammlösung

Inhaltsstoffe	Menge
LPS	1 mg
dH ₂ O	Ad 1 ml

2.3.3 Western Blot

Tabelle 16: MHC-Puffer

Inhaltsstoffe	Menge in g
NaCl	3,5
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	2,76
Na ₂ HPO ₄	1,42
MgCl*6H ₂ O	0,04
Na ₄ P ₂ O ₇	0,54
EDTA	0,74
NaF	0,168
Natriumorthovanadat	0,037

In 200 ml destilliertem Wasser auflösen

Tabelle 17: 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
Tris [121,14]	18,17 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

Tabelle 18: 1,0 M Tris-Puffer pH 6,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
Tris [121,14]	12,1 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

Tabelle 19: 10 % SDS pH 8,0

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
SDS [288,38]	10,0 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

Tabelle 20: Trenngel

Inhaltsstoffe	10 %	15 %
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml
Acrylamid/Bis (30 % Stock)	6,67 ml	10 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml
dH ₂ O	8,02 ml	4,69 ml

Tabelle 21: Sammelgel

Inhaltsstoffe	Menge in ml
1,0 M Tris pH 6,8	2,5
10 % SDS	0,1
Acrylamid/Bis (30 % Stock)	1,7 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml
dH ₂ O	5,64 ml

Tabelle 22: 5 x PBS

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
NaCl [58,44]	20,0 g
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O [137,99]	11,73 g
Na ₂ HPO ₄ [141,96]	41,17 g
dH ₂ O	Ad 5,0 l

Tabelle 23: 5 x Elektrophorese-Puffer pH 8,3

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
Tris [121,14]	75,0 g
Glycin [75,07]	360,0 g
SDS	25,0 g
dH ₂ O	Ad 5,0 l

Tabelle 24: Transfer-Puffer pH 8,3

Inhaltsstoffe	Menge
5 x Elektrophorese-Puffer pH 8,3	200 ml
Methanol 100%ig	200 ml
dH ₂ O	Ad 1,0 l

Tabelle 25: Waschlösung

Inhaltsstoffe	Menge
5 x PBS pH 7,4	200,0 ml
Tween20 100%ig	0,5 ml
dH ₂ O	Ad 1,0 l

Tabelle 26: Blocklösung

Inhaltsstoffe	Menge
5 x PBS pH 7,4	20 ml
Magermilchpulver	5 g
dH ₂ O	Ad 100 ml

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 27: 50 x TAE-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Menge
Tris [121,14]	42 g
CH ₃ COOH [60,05]	55,1 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	100 ml
dH ₂ O	Ad 1 l

2.4 Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Tabelle 28: Primärantikörper

Primärantikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
NOS2 Antibody (M-19), rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-650	1:250
Purified Mouse Anti-nNOS	BD Transduction Laboratories™	610309	1:1000
Purified Mouse Anti-eNOS	BD Transduction Laboratories™	610297	1:250
Anti-Atrial Natriuretic Peptide Antibody	Merck Millipore	AB5490	1:250
alpha 1 cardiac muscle Actin, purified mouse antibody	Acris Antibodies GmbH	BM5079	1:3000

2.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 29: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep)	GE Healthcare Life Sciences	NA931V	1:2000
ECL Rabbit IgG, HRP-linked F(ab') ₂ fragment (from donkey)	GE Healthcare Life Sciences	NA9340V	1:2000

2.5 Kommerzielle Kits

Tabelle 30: Kommerzielle Kits

Produkt	Firma	Katalog Nr.
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen	69504
All Prep DNA/RNA Mini Kit	Quiagen	80204
Nitric Oxide Assay Kit	QuantiChrom	D2NO-100

3 Methoden

3.1 Parasiten

Für alle Versuche wurde *Trypanosoma cruzi* vom Stamm Y genutzt. Die Parasiten wurden uns von dem Schweizerischen Tropen- und Public Health-Institut in Basel überlassen. Für die Arbeit mit dem humanpathogenen Parasiten, der eine erhöhte Schutzstufe erfordert, wurde das S3-Labor des Zentrums für Infektionsforschung Würzburg zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Kultur

T. cruzi Y wurde in 25 mm² Zellkulturflaschen mit luftdurchlässigem Schraubverschluss in einem Inkubator mit 5 % CO₂-Gehalt bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Regelmäßig wurden die Kulturen mit Hilfe eines inversen Mikroskops bezüglich der Parasitendichte beurteilt. Sobald die Dichte der Parasiten so hoch war, dass in allen Mikroskopierebenen Parasiten zu sehen waren, wurden diese zumeist im Verhältnis 1:7 in frisches Medium überführt.

Des Weiteren wurden, um die Kultur zu erneuern, von Zeit zu Zeit neue Stabilate, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, aufgetaut. Dafür wurde in Zellkulturflaschen Medium, versetzt mit Penicillin G und Streptomycin, vorgelegt und die bei 37 °C im Wasserbad aufgetauten Stabilate hinzugefügt. Um die Konzentration an toxischem DMSO (Dimethylsulfoxid) zu reduzieren, wurde die neu aufgetaute Kultur am darauffolgenden Tag im Verhältnis 1:7 in frisches Medium überführt.

3.1.2 Infektion von Fibroblasten

In Kulturmedium wächst *T. cruzi* in der epimastigoten Form. Um aus der epimastigoten Form die für Säugetiere infektiöse, trypomastigote Form zu erhalten, wurden Fibroblasten infiziert. Die Fibroblasten wurden als Nebenprodukt bei der Isolation von Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten gewonnen. Sie wurden in Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Kurz vor Infektion wurden die Fibroblasten trypsinisiert und gezählt. In jede 25 mm² Zellkulturflasche wurden $2,2 \times 10^5$ Fibroblasten ausgesät. Die Infektion erfolgte durch Zugabe der zehnfachen Anzahl an epimastigoten Trypanosomen. In den Fibroblasten wandeln sich die Trypanosomen in ihre amastigoten Formen um und

vermehren sich durch Zellteilung. Die amastigoten Formen transformieren schließlich zu den trypomastigoten Parasiten, die durch Lyse des Fibroblasten freigesetzt werden.

3.1.3 Giemsa-Färbung

Um die trypomastigote Form von der epimastigoten unterscheiden zu können, wurden die Trypanosomen mit Giemsa-Lösung gefärbt. Dafür wurden 10 µl Überstand von den infizierten Fibroblasten abgenommen, auf einen Objektträger pipettiert und luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate 10 Minuten in Methanol fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit der

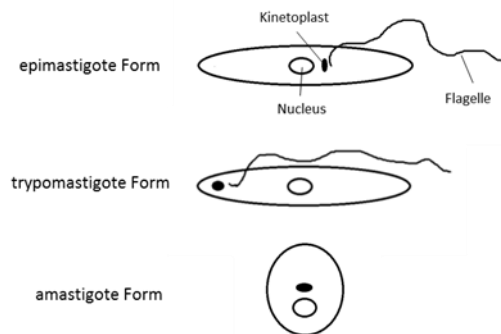


Abbildung 9: Schematische Darstellung der morphologischen Stadien von *T. cruzi*

Präparateseite nach unten in die Giemsa-Färbelösung getaucht. Nach 30 Minuten wurden die Objektträger mit Wasser abgespült und luftgetrocknet.

Das Präparat wurde im Lichtmikroskop betrachtet. Die Giemsa-Lösung färbt vor allem den Zellkern und den Kinetoplasten der Parasiten an. Anhand der Lokalisation des Kinetoplasten, an dem die Geißel inseriert, können trypomastigote und epimastigote Form unterschieden werden (s. Abb. 9).

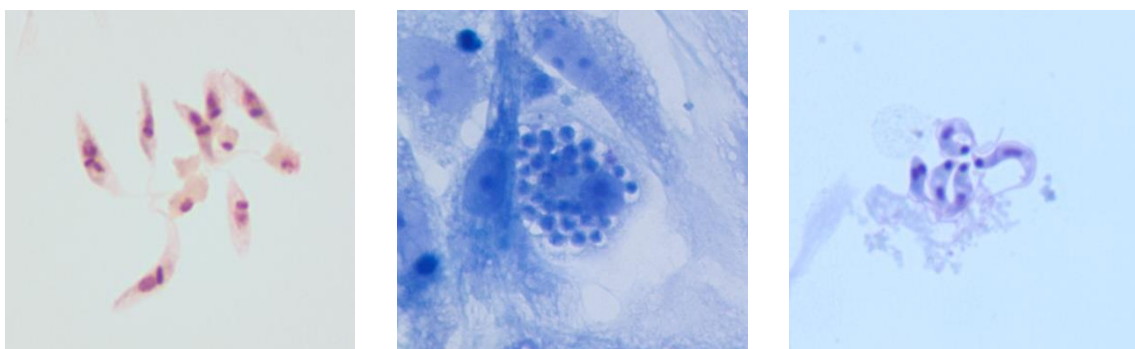


Abbildung 10: links – epimastigote *T. cruzi*, mittig: amastigote *T. cruzi*, rechts: trypomastigote *T. cruzi*

3.1.4 Vorbereitung der Parasiten für die Infektion

Sobald im mit Giemsa gefärbten Präparat trypomastigote Parasiten detektiert worden waren, wurde die Infektion der Mäuse vorbereitet. Hierfür wurden zunächst die Überstände der infizierten Fibroblastenkultur bei 1000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Die

Parasiten wurden mit Hilfe einer Neubauerkammer am Lichtmikroskop gezählt. Anhand der ermittelten Parasitenkonzentration wurde das zu injizierende Volumen berechnet.

3.2 Versuchsaufbau

Als Versuchstiere dienten Mäuse der Linie Balb/c, welche von Janvier Labs bezogen wurden. Diese wurden im Tierstall des Rudolf-Virchow-Zentrums in licht- und klimakontrollierter Umgebung gehalten.

Um die Wirkung von exogen zugeführtem Stickstoffmonoxid auf die Infektion mit *T. cruzi* zu beurteilen, wurden die Mäuse mit dem NO-Donator PETN behandelt. Diese schon lange bekannte Substanz, die zur Behandlung der Koronaren Herzerkrankung eingesetzt wird, wurde den Mäusen mit dem Futter verabreicht. Die tägliche Dosis von 300 mg/kg Körpergewicht verursacht bei Mäusen keine relevanten Nebenwirkungen [47]. Für den Versuch wurden 6 mit PETN behandelte und 6 unbehandelte Kontrollmäuse infiziert.

3.2.1 Infektion der Mäuse

Unmittelbar vor der Infektion wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert. Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 1×10^5 trypomastigoten Parasiten des Stammes Y (s. [3.1.4](#)).

3.2.2 Blutentnahme und Bestimmung der Parasitämie

10, 20 und 35 Tage nach Infektion wurde den Mäusen Blut abgenommen, um die Parasitämie zu beurteilen. Am Tag 85 nach Infektion erfolgte die Organentnahme. Den Mäusen wurde unter Isoflurannarkose ein kleines Stückchen der Schwanzspitze abgeknipst. Die aus dem Schwanz gewonnenen Blutstropfen wurden mit einer Kapillare aufgesaugt und schließlich in ein mit EDTA beschichtetes Eppendorfröhrchen überführt. Mit dieser Methode konnten etwa 50 µl Blut pro Maus gewonnen werden.

3.2.3 DNA-Extraktion aus Mausblut

Das gewonnene Blut wurde mit PBS zu einem Volumen von 200 µl aufgefüllt. Aus den Proben wurde anschließend die DNA mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit nach Protokoll des Herstellers extrahiert.

Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop® 2000 bestimmt.

3.2.4 PCR zur Bestimmung der Parasitämie

Um mögliche Unterschiede bezüglich der Parasitämie zwischen den mit PETN behandelten und den unbehandelten Mäusen zu detektieren, wurde eine PCR durchgeführt. Die Primersequenzen für die Amplifikation der *T. cruzi*-DNA waren 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3' und 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3'. Als Positivkontrolle diente aus *T. cruzi*-Lysat gewonnene DNA.

Die DNA-Proben wurden hierfür durch Verdünnung mit Wasser auf die gleiche DNA-Konzentration von 5 ng/μl normalisiert. Des Weiteren wurde ein Mastermix hergestellt (s. Tabelle 31).

Tabelle 31: Reaktionsmix PCR *T. cruzi*

Inhaltsstoffe	Volumen in μl
5' Primer	5
3' Primer	5
dNTP	5
TaqPolymerase (Genaxxon, 250 U/μl)	0,5
10 x PCR Buffer E (Genaxxon)	5
H ₂ O	27,5

Pro Probe wurden 48 μl Mastermix in PCR-Tubes vorgelegt. Dann wurden 2 μl DNA hinzugefügt, um schließlich ein Volumen von 50 μl zu erhalten. 30 Zyklen (96 °C für 30 Sek., 60 °C für 30 Sek. und 72 °C für 45 Sek.) wurden für die DNA-Amplifikation verwendet.

3.2.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht. Nach Zugabe von 7,5 μl Ethidiumbromid (2 mg/ml) wurde das Gel in eine Form mit Taschenformer gegossen. Sobald dieses fest geworden war, konnten die mit 6 x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzten Proben in die Taschen des Gels pipettiert werden. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 10 Volt/cm. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

3.2.6 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 2,2,2-Tribromoethanol (Handelsname Avertin®) betäubt. Die betäubte Maus wurde auf einer Feinwaage gewogen. Im Anschluss wurde der Thorax eröffnet und das Herz entfernt. Dieses wurde kurz in Natriumchlorid-Lösung gespült und gewogen. Mit einer Spritze wurde sämtliches Blut aus dem Thoraxraum aufgesaugt und in ein mit EDTA beschichtetes Eppendorfröhrchen überführt. Des Weiteren wurden Lunge, Milz, Nieren, Skelettmuskel (M. gastrocnemius) und ein Stück des Colon entnommen, in Tissue-Tek® eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Außerdem wurde die Länge der Tibia gemessen. Im Anschluss wurde das Herz weiterverarbeitet. Die Vorhöfe wurden abgetrennt und das restliche Herz quer in vier Teile geschnitten. Der Teil für die Histologie wurde in Tissue-Tek® eingebettet und wie die anderen Organe auf Trockeneis gegeben. Die anderen Teile, die für Protein- und Nukleinsäureextraktion vorgesehen waren, wurden auf der Feinwaage gewogen und schließlich in einem fest verschlossenen Eppendorfröhrchen in flüssigen Stickstoff gegeben. Das Stückchen, das für die Nukleinsäureextraktion bestimmt war, wurde zudem vor dem Einfrieren noch in RNAlater®, welches die RNA im Gewebe für einen späteren Gebrauch stabilisiert, getaucht.

Das vierte Gewebestückchen wurde für die Bestimmung der NO-Konzentration im Herzgewebe genutzt. Hierfür wurde es zunächst gewogen und mit dem 20-fachen an PBS in ein Glasröhrchen überführt. In diesem wurde das Gewebestückchen genauso wie bei der Proteinextraktion homogenisiert.

3.2.7 NO-Messung im Herzgewebe

Die Messung der Stickstoffmonoxidkonzentration im Herzgewebe erfolgte direkt im Anschluss an die Organentnahme. Es wurde das Nitric Oxide Assay Kit von QuantiChrom™ verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Zur Deproteinisierung wurden die Proben sowie auch die nach Protokoll angemischten Standards mit Zinksulfat und NaOH versetzt und anschließend zentrifugiert. 100 µl der Überstände wurden nachfolgend mit 200 µl des frisch angemischten Working Reagent versetzt und bei 60 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die

Proben auf eine 96-well Platte überführt und die optische Dichte bei 540 nm gemessen. Für die Messung wurde der Dynex MRX TC Plate Reader verwendet.

Mit den gemessenen Werten der Standards wurde eine Standardkurve gebildet. Daraus ließen sich schließlich die NO-Konzentrationen der Proben berechnen. Die Steigung der Standardkurve wurde durch lineare Regression ermittelt.

$$\text{Nitric Oxide} = \frac{OD(\text{Probe}) - OD(\text{Blank})}{\text{Steigung der Standardkurve}}$$

3.2.8 DNA-/RNA-Extraktion

Mit Hilfe des „All Prep DNA/RNA Mini Kits“ kann sowohl DNA als auch RNA aus einer Gewebeprobe gewonnen werden. Das Herzgewebe wurde zunächst homogenisiert und nach Protokoll des Herstellers zur DNA-/RNA-Extraktion weiter verarbeitet.

Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop® 2000 analog zur Messung der Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.9 Ermittlung der Parasitenlast im Gewebe durch Real-Time PCR

Um die Parasitenlast im Herzgewebe zu ermitteln, wurde mit der aus dem Herzgewebe extrahierten DNA eine Real-Time PCR durchgeführt.

Die Primersequenzen für die Amplifikation der *T. cruzi*-DNA war F: 5'-GGCTGCAGAGGTCAGGTGTT-3' R: 5'-GCATATCGGCAAACCAGCA-3'. Als Positivkontrolle diente aus *T. cruzi*-Lysaten gewonnene DNA. Mit dieser DNA wurde eine Verdünnungsreihe (1 bis 1:10000) hergestellt. Die DNA-Proben wurden zunächst auf die gleiche DNA-Konzentration von 11 ng/µl gebracht und vorgelegt. Aus den weiteren Bestandteilen wurde ein Mastermix vorbereitet.

Tabelle 32: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR *T. cruzi*

Inhaltsstoffe	Menge
DNA-Probe (11 ng/µl)	4 µl
Forward-Primer	0,1 µl
Reverse-Primer	0,1 µl
SYBR Green Fluor qPCR Mastermix (Quiagen®)	12,5 µl
RT PCR grade water	Ad 25 µl

Zunächst wurde 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und im Anschluss 40 PCR-Zyklen (95 °C für 15 Sek., 58 °C für 1 Min., 72 °C für 1 Min.) durchgeführt.

Als Referenzgen für die Normalisierung wurde Beta-Aktin verwendet.

Tabelle 33: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR Beta-Aktin

Inhaltsstoffe	Menge
DNA-Probe (11 ng/μl)	4 μl
RT ² qPCR Primer Assay for Mouse Actb, Quiagen, Katalog Nr. PPM02945B	1 μl
SYBR Green Fluor qPCR Mastermix (Quiagen®)	12,5 μl
RT PCR grade water	Ad 25 μl

Zunächst wurde 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und im Anschluss 40 PCR-Zyklen (95 °C für 15 Sek., 60 °C für 1 Min.) durchgeführt.

Während der Amplifikation werden in jedem Zyklus Fluoreszenzsignale gemessen. Als „threshold cycle“ (Ct-Wert) wird dabei der Zyklus bezeichnet, ab dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen übersteigt. Je mehr DNA in einer Probe enthalten ist, desto früher zeigt sich ein Fluoreszenzsignal, desto niedriger ist also der Ct-Wert. Mittels der delta-delta-Ct Methode kann die in der Probe enthaltene Parasiten-DNA relativ quantifiziert werden. Um den delta-Ct-Wert zu erhalten, werden Ct-Werte des Referenzgens von denen des Zielgens subtrahiert. Den delta-delta-Ct-Wert erhält man durch die Subtraktion des delta-Ct-Wertes der Kontrollgruppe von dem der behandelten Gruppe. Aus diesem Wert lässt sich wiederum die n-fache Expression (behandelte Gruppe zu Kontrollgruppe) bestimmen [33].

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.10 Gewebeschnitte

Die in Tissue-Tek® eingebetteten Herzen wurden am Kryotom in 10 μm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

3.2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um das Myokard bezüglich Parasitendichte und entzündlicher Infiltrate begutachten zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Bei der HE-Färbung wird das Präparat in zwei Färbevorgängen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen angefärbt. Hämatoxylin ist ein kationischer Farbstoff und färbt negativ geladene

Strukturen (z. B. Zellkern) an. Eosin hingegen ist negativ geladen und färbt kationische Komponenten wie das Zytoplasma.

Die Schnitte wurden zunächst 3 Minuten in Aceton fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Hämatoxylin-Färbelösung gegeben. Nach einer Färbedauer von 8 Minuten wurden die Schnitte aus der Hämatoxylin-Lösung herausgenommen und wieder mit destilliertem Wasser gespült. Im Anschluss daran wurden diese in fließendem Leitungswasser gewässert. Durch diesen Vorgang entwickelt das Hämatoxylin seine blaue Farbe. Nach anschließendem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Färbung in der Eosin-Lösung für 12 Minuten.

Die vollständig gefärbten Schnitte wurden schließlich mit destilliertem Wasser gespült und darauf erst kurz in 100 % Alkohol und dann in ein Gemisch aus 50 % Alkohol und 50 % Xylol getaucht. Danach wurden sie erst für 10 Minuten in Xylol und für weitere 10 Minuten in Rothistol gegeben. Als letzter Schritt erfolgte das Eindecken der Schnitte. Im Anschluss wurden diese unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

3.2.10.2 Bestimmung der Kardiomyozytengröße – Cardiomyocyte cross sectional area

Für die Bestimmung der Kardiomyozytengröße wurden Herzgewebeschnitte mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Für die Färbung der Zellmembran wurde der Farbstoff Red Wheat Agglutinin, für die Färbung des Zellkerns der Farbstoff DAPI genutzt. Red Wheat Agglutinin ist ein Leptin, das an Sialinsäure und an N-Acetylglucosaminyl-Reste – Bausteine der Zellmembran – bindet und diese somit relativ spezifisch anfärbt. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) bindet an der kleinen Furche der DNA-Helix. Durch seine blaue Fluoreszenz macht der Farbstoff DNA spezifisch sichtbar.

Die Schnitte wurden zunächst mit 4 % PFA für 17 Minuten fixiert. Nach der Fixation wurden sie in PBS gewaschen. Anschließend wurde für 10 Minuten 2 % Nonidet P40 auf die Schnitte gegeben, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und sie damit durchlässig für die Farbstoffe zu machen. Darauf folgte die Inkubation mit dem Farbstoffgemisch aus DAPI und Red Wheat Agglutinin für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und im Dunklen. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount Mounting Medium eingedeckelt.

Für die Aufnahme der Bilder wurde das Fluoreszenzmikroskop genutzt. Standardmäßig wurden die quer angeschnittenen Zellen des Ventrikelseptums fotografiert. Pro Herz wurden 100 Zellen mit dem Programm Image J ausgemessen.

3.2.11 Western Blot Analysen

3.2.11.1 Proteinextraktion aus Herzgewebe

Das Herz wurde bereits unmittelbar nach der Organentnahme in vier Teile geteilt. Das Stückchen, das für die Proteinextraktion vorgesehen war, wurde gewogen und in einem Eppendorfröhrchen bei -80 °C gelagert.

Dividiert man das Gewicht des Gewebestückchens durch 0,06, erhält man die Menge an MHC-Puffer, die für die Proteinextraktion benötigt wird.

Das Eppendorfröhrchen mit dem Gewebestückchen wurde zunächst kurz in flüssigen Stickstoff gegeben. Das gefrorene Gewebestückchen und die ermittelte Menge MHC-Puffer wurden dann in einem Glasröhrchen mit dem Homogenisator bei circa 1200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Sobald das Gewebestückchen vollkommen homogenisiert war, wurde die Lösung wieder in ein Eppendorfröhrchen gegeben und bei 1500 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der nach dem Zentrifugieren entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und die Proteinkonzentration mittels NanoDrop® ermittelt.

3.2.11.2 Ermittlung der Proteinkonzentration mittels NanoDrop® 2000

Nach der Proteinextraktion wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des NanoDrop® 2000 ermittelt. Dies ist ein Spektrophotometer, das in sehr geringen Probenvolumina (0,5–2 µl) DNA-, RNA- und Proteinkonzentrationen messen kann.

Hier wurden nun zunächst 2 µl MHC-Puffer als Referenz auf den Probenhalter aufgebracht. Daraufhin wurden jeweils 2 µl Probe auf den Probenhalter pipettiert, die Absorption gemessen und die Proteinkonzentration ermittelt. 1 Absorptionseinheit bei 280 nm entspricht dabei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

3.2.11.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot

Um die Expression der verschiedenen NO-Synthasen im Herzgewebe unter PETN-Einfluss und Infektion mit *T. cruzi* zu bestimmen, wurden Western Blot Analysen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Bezüglich der NOS-Expression wurden

Herzgewebe unbehandelter nicht infizierter (WT), unbehandelter infizierter (*T. cruzi*) und behandelter infizierter (PETN + *T. cruzi*) Versuchsmäuse verglichen.

Zunächst wurden hierfür die Proben, bei denen bereits die Proteinkonzentration bestimmt worden war, auf identische Proteinkonzentrationen eingestellt. Danach wurden diese mit 3 x Blue Loading Buffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben mit jeweils 20–50 µg Gesamtprotein auf 10–15%iges Acrylamidgel aufgetragen und mit einer anliegenden Spannung von 90 Volt in Einzelproteine aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte über Nacht bei 100 mA. Im Anschluss daran wurde die Membran für mindestens zwei Stunden mit Blocklösung, die unspezifische Antikörperbindungen verhindern soll, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der Primärantikörper, der an das gesuchte Protein binden soll, wurde über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran gründlich (mindestens 3 x 5 Minuten) in PBS/Tween gewaschen, bevor sie mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert wurde. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde die Membran wieder gründlich gewaschen und schließlich für eine Minute in ECL (GE Healthcare) gegeben. Um ein Signal zu erhalten, wurde zunächst für 2 Minuten ein Film aufgelegt und im Anschluss entwickelt. Die so erhaltenen Banden wurden eingescannt und mit dem Programm Scan Pack auf die Ladekontrolle normiert und ausgewertet.

3.3 Zellkultur – Neonatale Rattenkardiomyozyten

In diesem Versuchsteil sollte zum einen die Wirkung von endogen produziertem NO auf die Infektion der Kardiomyozyten mit *T. cruzi* (T) beurteilt werden. Hierfür wurden die Kardiomyozyten mit Lipopolysaccharid (LPS; in den Abbildungen L), das die Expression der iNOS und damit die NO-Produktion induziert, behandelt. Zudem wurden zwei verschiedene NOS-Inhibitoren, NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester (L-NAME; in den Abbildungen N) und S-Methyl-L-thiocitrullin (SMLT; in den Abbildungen S), getestet. Zum anderen wurde den Kardiomyozyten Glyceroltrinitrat (Nitrolingual), ein NO-Donator, hinzugefügt, um die Wirkung von exogenem NO zu untersuchen.

Die Kardiomyozyten wurden in der Arbeitsgruppe nach dem modifizierten Protokoll von Simpson und Savion aus neonatalen Ratten isoliert und uns zur Verfügung gestellt [30, 51, 55]. Sie wurden entweder auf Chamber slides (2×10^5 Kardiomyozyten pro well) oder 6-well Platten ($1,5 \times 10^6$ Kardiomyozyten pro well) ausgesät und in MEM mit 5 % FCS im Brutschrank bei 37 °C und 1 % CO₂ kultiviert. Drei Tage nach Präparation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit *T. cruzi* im Verhältnis Parasiten:Kardiomyozyten = 10:1. Um die iNOS und damit die endogene NO-Produktion der Kardiomyozyten zu induzieren, wurden pro ml Medium 5 µg LPS hinzugefügt. Außerdem wurde um die Wirkung der NOS-Inhibitoren L-NAME und SMLT zu testen jeweils 5 µg L-NAME bzw. 300 nmol SMLT zur Nährlösung hinzugegeben. Der Effekt von exogen zugeführtem NO auf die Infektion mit *T. cruzi* wurde durch die tägliche Zugabe zweier verschiedener Konzentrationen (NO1: 0,05 mM, NO10: 0,5 mM) Glyceroltrinitrat (Nitrolingual) zum Medium untersucht. Die Parasiten im Überstand der Kardiomyozyten wurden täglich gezählt. Drei Tage nach Infektion wurde der Versuch beendet. Im Überstand wurde mittels des Nitric Oxide Assay Kit von QuantiChrom™ (s. NO-Messung) die Konzentration von Stickstoffmonoxid gemessen. Die Zellen auf den Chamber slides wurden mit 4 % PFA fixiert und analog zu 3.1.3 mit Giemsa gefärbt. Die Kardiomyozyten auf den 6-well Platten wurden am dritten Tag nach Infektion abgeerntet und die Proteine extrahiert (s. Proteinextraktion aus Zellkultur), mit denen schließlich Western Blot Analysen (s. 3.2.11.3) durchgeführt wurden.

3.3.1 Ermittlung der Parasitenzahl im Überstand

Um die Trypanosomen besser zählen zu können, wurde zunächst der Überstand im Verhältnis 1:100 mit 1 x PBS verdünnt. Anschließend wurden die Parasiten mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt. Die absolute Zahl der Parasiten pro well ergab sich aus der Zahl der in der Neubauerkammer gezählten *T. cruzi* multipliziert mit dem Faktor 2,5, dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen des Mediums.

3.3.2 Ermittlung der Parasitenlast im Kardiomyozyt

Die Kardiomyozyten wurden mit Giemsa gefärbt, im Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Pro Gruppe wurden jeweils 100 Zellkerne und die Trypanosomen in den

dazugehörigen Zellen gezählt. Im Anschluss wurde das Verhältnis der Anzahl der Trypanosomen pro Zellkern berechnet.

3.3.3 Ermittlung der Parasitenlast mittels Real-Time PCR

Analog zu 3.2.8 wurde aus den neonatalen Rattenkardiomyozyten DNA extrahiert. Im Anschluss wurde analog zu 3.2.9 eine Real-Time PCR zur Ermittlung der Parasitenlast durchgeführt. Hier wurden jeweils 10 ng als Template eingesetzt.

Tabelle 34: Reaktionsmix PCR T. cruzi

Inhaltsstoffe	Menge
DNA-Probe	10 ng
Forward-Primer	0,1 µl
Reverse-Primer	0,1 µl
SYBR Green Fluor qPCR Mastermix (Quiagen®)	12,5 µl
RT PCR grade water	ad 25 µl

Tabelle 35: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR Beta-Aktin

Inhaltsstoffe	Menge
DNA-Probe	10 ng
RT ² qPCR Primer Assay for Mouse Actb, Quiagen, Katalog Nr. PPM02945B	1 µl
SYBR Green Fluor qPCR Mastermix (Quiagen®)	12,5 µl
RT PCR grade water	ad 25 µl

3.3.4 Western Blot Analysen

3.3.4.1 Proteinextraktion aus Zellkultur

Zunächst wurde das gesamte Medium von den Zellen entfernt. Um die Zellen zu trocknen, wurden sie etwa fünf Minuten stehen gelassen. Danach wurden 150 µl MHC-Puffer auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurden diese mit einem Zellschaber aus der Zellkulturschale gelöst und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Diese wiederum wurden, um die Proteine aus den Zellen zu lösen, für 15 Minuten in einem Ultraschallbad homogenisiert.

3.3.4.2 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot

Um die Expression der induzierbaren NO-Synthase unter Behandlung mit LPS zu beurteilen, wurden mit den aus der Zellkultur extrahierten Proteinen analog zu 3.2.11 Western Blot Analysen durchgeführt.

3.3.5 NO-Messung

Der Frage, ob die vermehrte iNOS-Expression auch zu einer erhöhten NO-Produktion führe, wurde mit einer NO-Messung nachgegangen. Die NO-Messung erfolgte analog zu 3.2.7. Hier wurden jedoch direkt die Überstände der Zellen verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Tierversuch

12 Balb/c-Mäuse wurden mit jeweils 10^5 Parasiten infiziert. 6 der Tiere wurden zusätzlich mit PETN behandelt. An Tag 10, 20, 35 und 85 nach Infektion wurde die Parasitenlast im Blut mittels PCR kontrolliert.

Eine der nicht mit PETN behandelten Kontrollmäuse verstarb aus unklarer Ursache. Alle anderen Mäuse überlebten die Infektion mit *T. cruzi* bis zum Versuchsende an Tag 85 nach Infektion. In keiner der Blutproben konnten durch PCR Parasiten nachgewiesen werden.

4.1.1 NO-Messung

Im Herzgewebe beider Versuchstiergruppen wurden die Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) gemessen. In der PETN-Gruppe zeigte sich eine durchschnittliche NO-Konzentration von $121,1 \mu\text{mol/l}$ während in der unbehandelten Kontrollgruppe der Spiegel bei $51,7 \mu\text{mol/l}$ lag (Abb. 11). In der mit PETN behandelten Gruppe ist die NO-Konzentration also tendenziell höher als in der unbehandelten. Eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch aufgrund der sehr kleinen Gruppengrößen nicht.

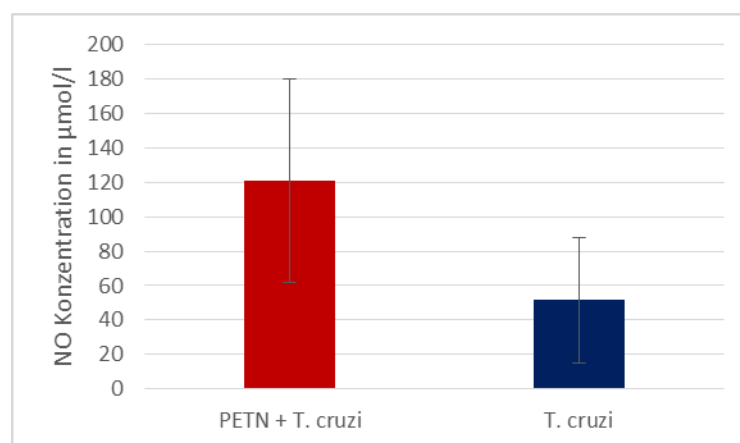


Abbildung 11: **NO-Konzentration im Myokard.** In den mit PETN behandelten Mäusen ($n = 5$) ist NO höher als in den unbehandelten ($n = 4$). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM an.

4.1.2 Parasitenlast im Herzgewebe

Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit PETN eine Auswirkung auf die Parasitenlast im Herzgewebe hat. In der hierzu durchgeführten lichtmikroskopischen

Untersuchung zeigten sich im Gewebe weder Hinweise auf Parasiten noch auf entzündliche Infiltrate.

Auch die mit DNA aus Herzmuskelgewebe durchgeführte Real-Time PCR, mit der auch geringe Mengen an Trypanosomen-DNA detektiert werden können, ergab keinen Nachweis von *T. cruzi*-DNA. Die Ct-Werte der Proben befanden sich alle im Bereich des Ct-Werts der Negativkontrolle.

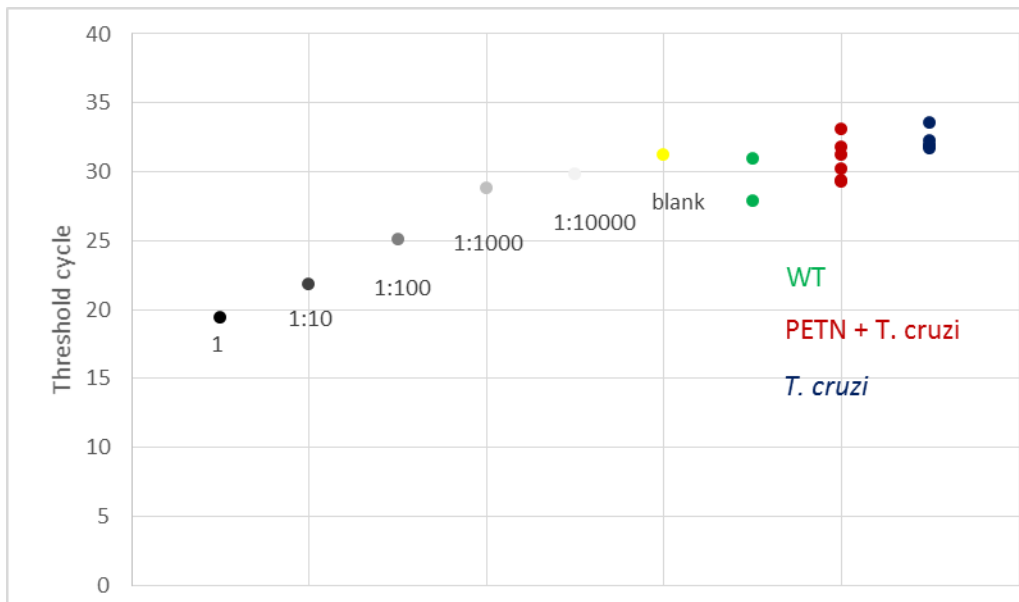


Abbildung 12: **Real-Time PCR zur Detektion von *T. cruzi*-DNA – Zykluszahlen.** Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (1 bis 1:10000), Negativkontrolle (blank), DNA aus Herzen nicht infizierter Wildtypmäuse (grün, WT), behandelte infizierte Mäuse (rot, PETN + *T. cruzi*) und unbehandelte infizierte Mäuse (blau, *T. cruzi*)

4.1.3 Beurteilung der Herzen

Im Rahmen der Infektion mit *T. cruzi* kann es zu einer Hypertrophie des Herzens kommen. Um Auswirkungen von PETN auf die Herzgröße der infizierten Mäuse zu beurteilen, wurden Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht berechnet und die durchschnittliche Größe eines Kardiomyozyten bestimmt.

4.1.3.1 Herzgewicht/Mausgewicht

Ein erhöhter Quotient könnte einen Hinweis auf eine Herzhypertrophie geben. Hier konnte jedoch kein Unterschied im Herzgewicht/Mausgewicht-Quotienten beobachtet werden.

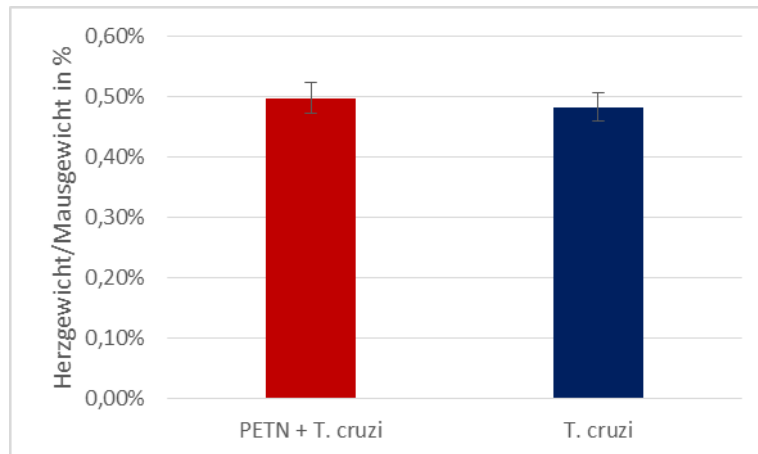


Abbildung 13: **Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht.** Es sind keine Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrollgruppe zu sehen. Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der Herzgewicht/Mausgewicht-Quotienten, die für jede Maus berechnet wurden, an.

4.1.3.2 Kardiomyozytengröße

Auch die Vergrößerung der einzelnen Herzzellen kann auf eine Hypertrophie des gesamten Herzens hinweisen. Die Kardiomyozyten der behandelten Mäuse erscheinen geringfügig kleiner als die der unbehandelten.

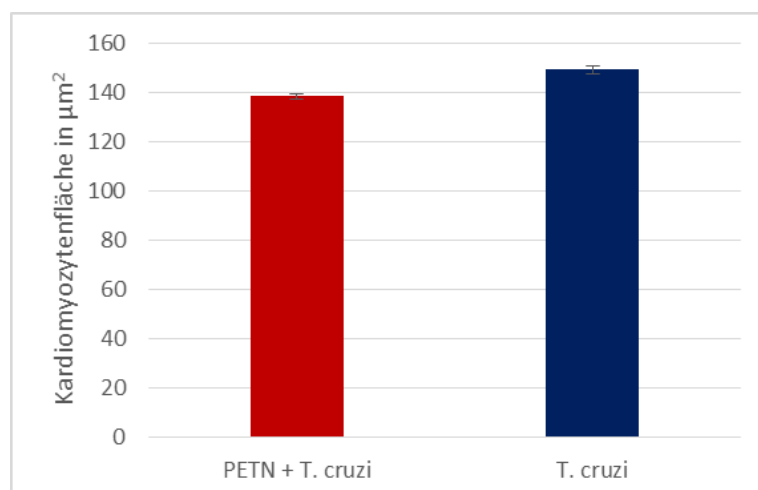


Abbildung 14: **Durchschnittliche Kardiomyozytengröße.** Die durchschnittliche Fläche eines Kardiomyozyten der behandelten Gruppe (PETN + T. cruzi) ist etwas kleiner als die der unbehandelten (T. cruzi). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM von jeweils 100 gemessenen Zellen pro Maus an.

4.1.4 Expression der NO-Synthasen im Herzgewebe

Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression der NOS-Isoformen im Herzgewebe untersucht.

4.1.4.1 iNOS-Expression

Bezüglich der mittels Western Blot untersuchten iNOS-Expression zeigte sich in der densitometrischen Expressionsanalyse beider Gruppen im Vergleich zur Ladekontrolle Aktin kein Unterschied.

Über die iNOS-Bande der Wildtypmaus (WT) lässt sich hier keine Aussage treffen, da die iNOS-Positivkontrolle (iNOS+) diese überschattet.

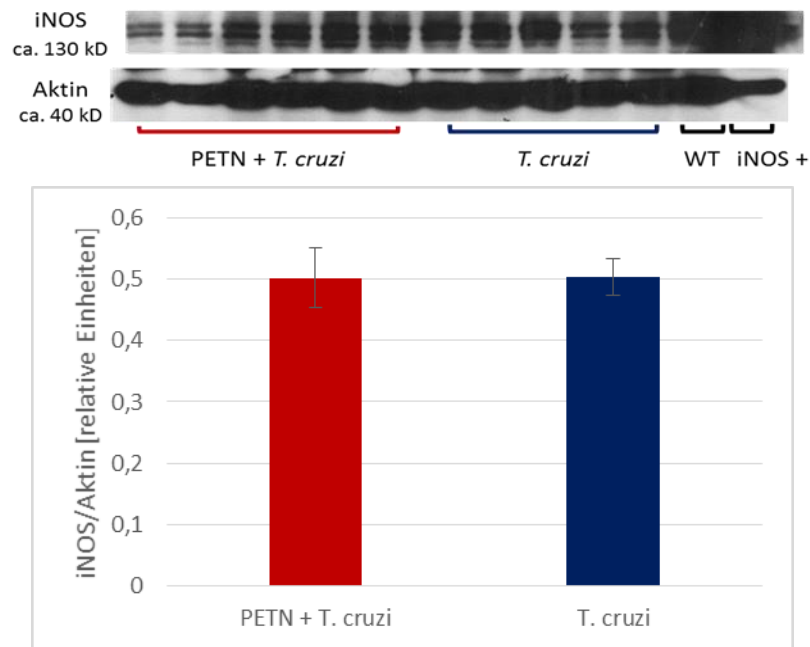


Abbildung 15: **iNOS-Expression.** Western Blot Analyse der iNOS-Expression und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in der behandelten (PETN + T. cruzi, n = 6) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (T. cruzi, n = 5). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der densitometrischen Analysen der jeweiligen Gruppe an.

4.1.4.2 nNOS-Expression

Eine Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) konnte weder im Herzgewebe der behandelten Mäuse noch der Kontrollmäuse nachgewiesen werden. Die Funktion des nNOS-Antikörpers war zuvor in den Experimenten zum Mausmodell mit nNOS-Überexpression getestet worden.

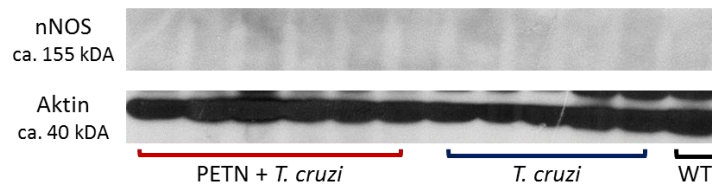


Abbildung 16: **nNOS-Expression.** Die Expression der nNOS konnte mittels Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden.

4.1.4.3 eNOS-Expression

Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht im Hinblick auf die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS). In der nicht-infizierten Wildtypmaus scheint die eNOS geringer exprimiert zu sein. Da hier allerdings nur eine Probe betrachtet wurde, lässt sich darüber keine fundierte Aussage treffen.

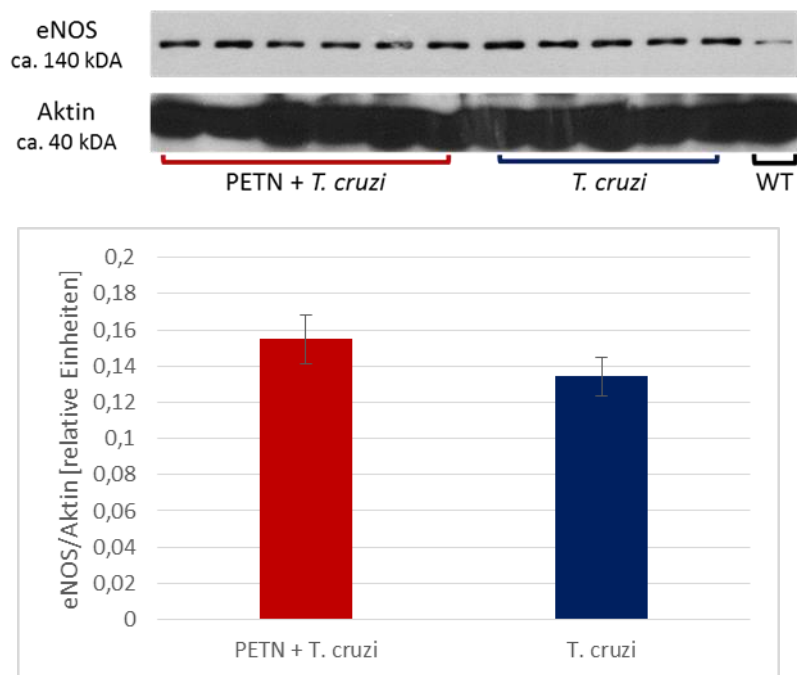


Abbildung 17: **eNOS-Expression.** Western Blot Analyse der eNOS-Expression und densitometrische Analyse der eNOS-Expression in der behandelten (PETN + T. cruzi, n = 6) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (T. cruzi). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der densitometrischen Analysen der jeweiligen Gruppe an.

4.2 Zellkulturversuche

Um die Rolle von NO und der induzierbaren NO-Synthase weiter zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten mit *T. cruzi* infiziert und mit verschiedenen Substanzen behandelt.

4.2.1 Expression der iNOS in infizierten vs. nicht-infizierten Kardiomyozyten

Um einen möglichen Effekt der Infektion mit *T. cruzi* auf die Expression der iNOS zu detektieren, wurden Western Blot Analysen mit aus Kardiomyozyten isolierten Proteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich die iNOS in den infizierten Kardiomyozyten stärker exprimiert als in nicht-infizierten. Normalisiert auf die Aktin-Expression zeigt sich ein Anstieg der iNOS-Expression auf das 12,7-Fache.

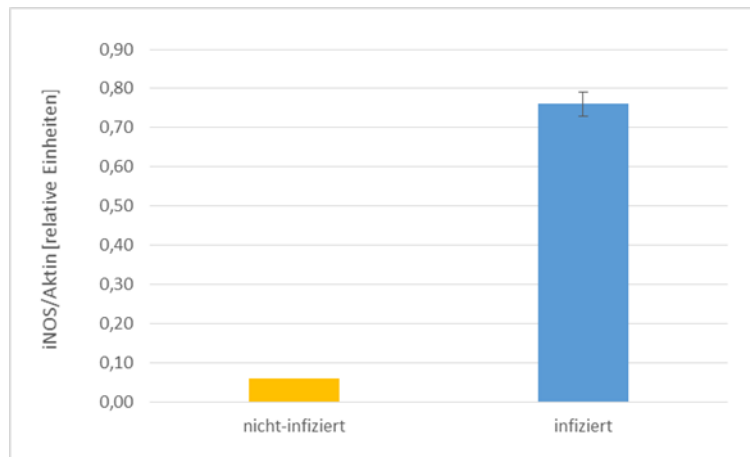


Abbildung 18: **iNOS-Expression.** Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in mit *T. cruzi* infizierten und nicht-infizierten Kardiomyozyten.

4.2.2 NO-Produktion in infizierten vs. nicht-infizierten Kardiomyozyten

Daraufhin interessierte, ob sich die erhöhte iNOS-Expression in der NO-Konzentration im Zellkulturüberstand bemerkbar macht. In der durchgeführten NO-Messung zeigten sich mit 2,84 μM im Zellkulturüberstand der nicht-infizierten und 3,04 μM in der infizierten Gruppe jedoch annähernd gleiche NO-Konzentrationen.

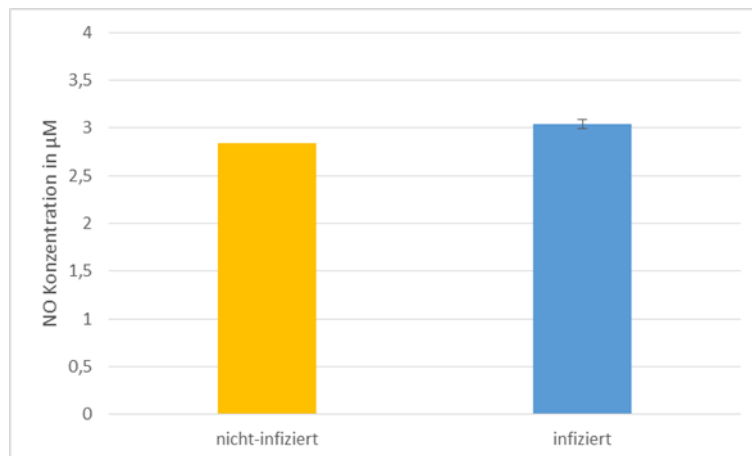


Abbildung 19: **NO-Konzentration im Zellkulturüberstand.** NO-Konzentration im Überstand nicht-infizierter und infizierter Kardiomyozyten.

4.2.3 Einfluss von LPS auf die iNOS-Expression

In der Literatur ist die Induktion von iNOS durch LPS beschrieben [56]. Um einen Vergleichswert zur iNOS-Induktion durch Infektion mit *T. cruzi* zu erhalten, wurden Kardiomyozyten mit LPS und dem NOS-Inhibitor L-NAME behandelt und im Anschluss die iNOS-Expression mittels Western Blot Analysen untersucht.

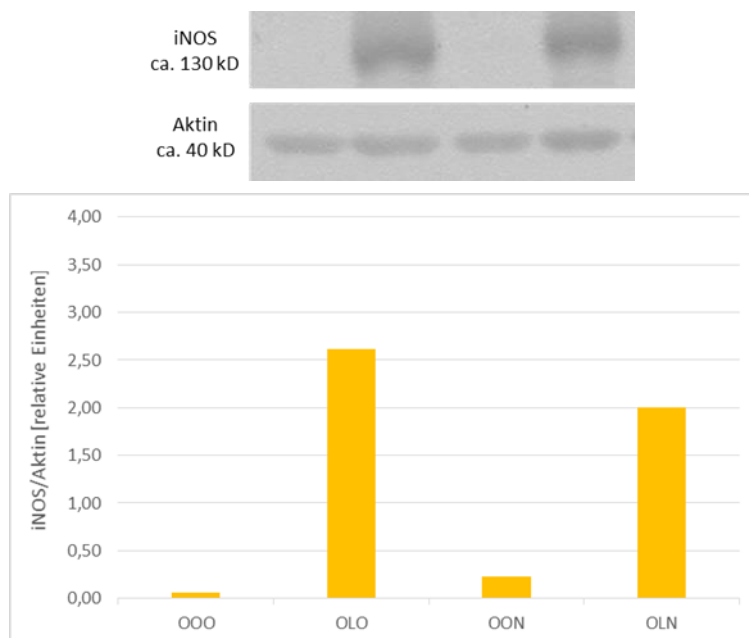


Abbildung 20: **iNOS-Expression.** Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression unter Behandlung mit LPS (L) und L-NAME (N). OOO: unbehandelt, OLO: Behandlung mit LPS, OON: Behandlung mit L-NAME, OLN: Behandlung mit LPS und L-NAME.

Unter Behandlung mit LPS (OLO) kam es zu einer ausgeprägten iNOS-Induktion mit einem Anstieg der iNOS-Expression auf das 45-fache im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (OOO). Die weitere Zugabe von L-NAME (OLN) verringerte die iNOS-Induktion wiederum um etwa ein Fünftel.

4.2.4 NO-Produktion unter Behandlung mit LPS

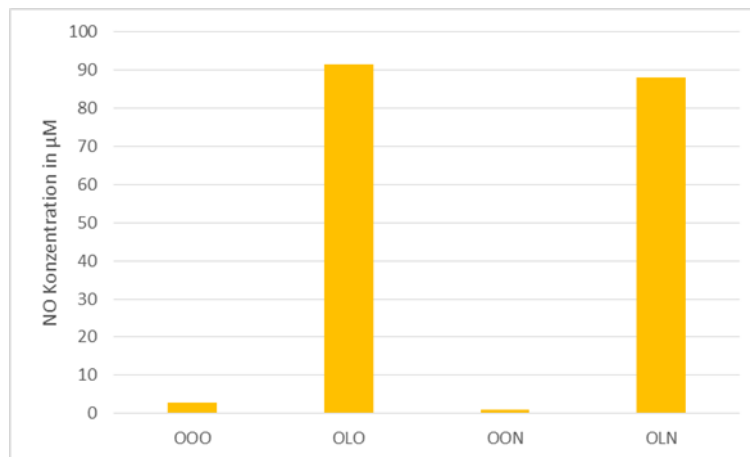


Abbildung 21: **NO-Konzentration im Überstand.** NO-Konzentration unter Behandlung mit LPS und L-NAME. OOO: unbehandelt, OLO: Behandlung mit LPS, OON: Behandlung mit L-NAME, OLN: Behandlung mit LPS und L-NAME

Von den mit LPS behandelten Kardiomyozyten wird deutlich mehr NO freigesetzt als in unbehandelten. In der mit L-NAME und LPS (OLN) behandelten Gruppe wurden annähernd gleiche Werte gemessen wie in der nur mit LPS behandelten (OLO). Die Verringerung der iNOS-Induktion durch L-NAME spiegelt sich somit nicht in der NO-Produktion wider.

4.2.5 Expression der iNOS in mit LPS behandelten, infizierten Kardiomyozyten

Die Behandlung infizierter Kardiomyozyten mit L-NAME (TON) und SMLT (TOS) führt zu einer Reduktion der durch die Infektion mit *T. cruzi* induzierten iNOS-Expression. Die gleichzeitig durch Behandlung mit LPS und Infektion mit *T. cruzi* induzierte iNOS-Expression (TLO) wird durch Zugabe von L-NAME (TLN) oder SMLT (TLS) nicht reduziert, sondern bleibt im Falle von SMLT gleich. Durch Zugabe von L-NAME scheint sie sogar gesteigert zu werden.

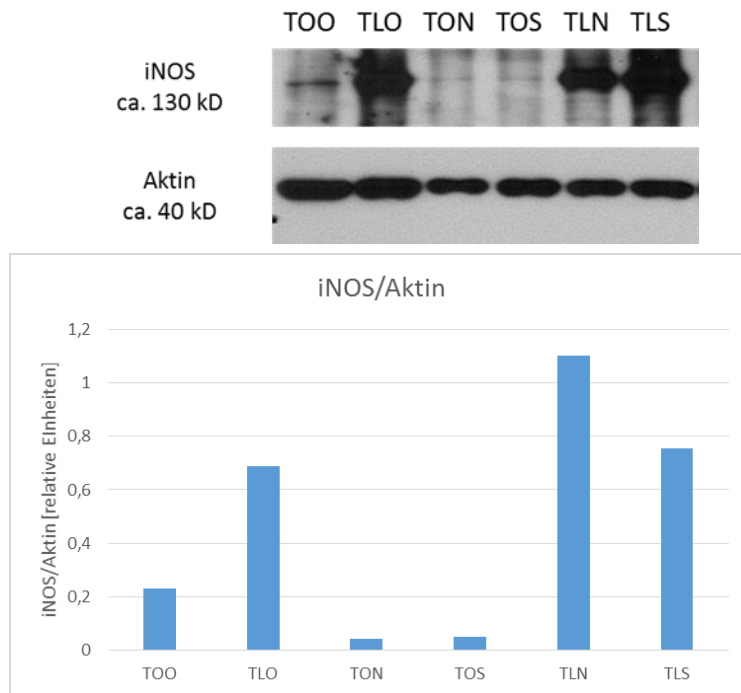


Abbildung 22: **iNOS-Expression.** Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in infizierten Kardiomyozyten unter Behandlung mit LPS (L) und NOS-Inhibitoren L-NAME (N) und SMLT (S) TOO: Infektion mit *T. cruzi* ohne Behandlung, TLO: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS, TON: *T. cruzi* + Behandlung mit L-NAME, TOS: *T. cruzi* + Behandlung mit SMLT, TLN: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS und L-NAME, TLS: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS und SMLT.

4.2.6 NO-Produktion in infizierten, mit LPS behandelten Kardiomyozyten

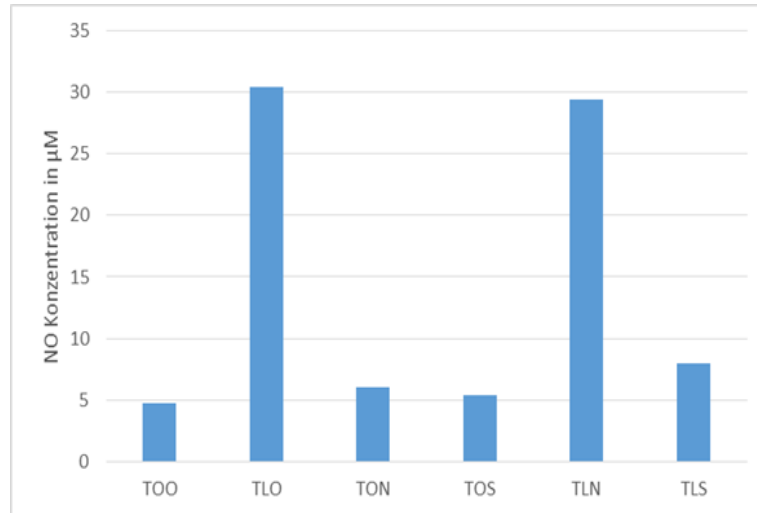


Abbildung 23: **NO-Konzentration im Überstand.** TOO: Infektion mit *T. cruzi* ohne Behandlung, TLO: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS, TON: *T. cruzi* + Behandlung mit L-NAME, TOS: *T. cruzi* + Behandlung mit SMLT, TLN: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS und L-NAME, TLS: *T. cruzi* + Behandlung mit LPS und SMLT.

Im Überstand der mit LPS behandelten infizierten Kardiomyozyten (TLO) wurden deutlich höhere NO-Konzentrationen gemessen als in unbehandelten (TOO). Die weitere Zugabe von L-NAME wirkte sich jedoch nicht auf die NO-Konzentration im Überstand aus (TLN). Die zusätzliche Behandlung mit SMLT hingegen, führte zu einer Verringerung der NO-Konzentration (TLS). Eine Behandlung infizierter Zellen nur mit L-NAME (TON) oder SMLT (TOS) hatte hier keinen Einfluss auf die NO-Konzentration.

4.2.7 Einfluss der LPS-Behandlung auf das Infektionsausmaß

4.2.7.1 Parasiten im Überstand

Die niedrigste Parasitenzahl zeigte sich im Überstand der nur mit LPS behandelten Kardiomyozyten (TLO). Die Überstände der unbehandelten und ausschließlich mit NOS-Inhibitoren behandelten Kardiomyozyten enthielten größere Anzahlen an Trypanosomen, die sich untereinander nicht unterschieden (TOO, TON, TOS). Die Parasitenzahlen im Überstand der gleichzeitig mit LPS und L-NAME behandelten Kardiomyozyten (TLN) waren höher als in der nur mit LPS behandelten Gruppe, jedoch niedriger als in der unbehandelten Gruppe. Die Zugabe von SMLT (TLS) zur LPS-Behandlung führte zu einem weiteren Anstieg der Parasitenzahl im Überstand.

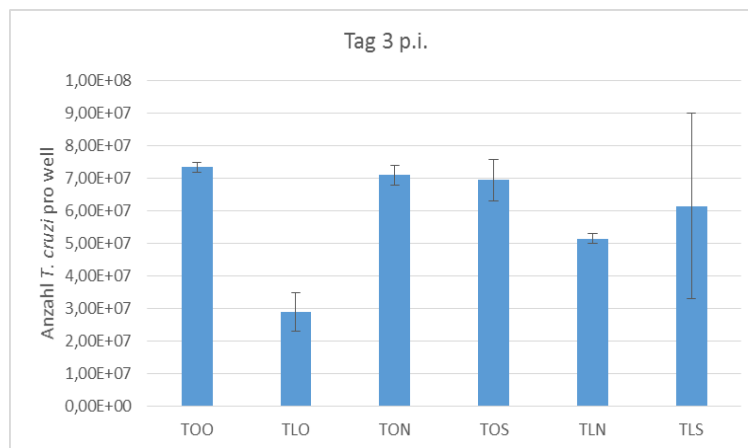


Abbildung 24: **Parasitenzahl im Überstand der Kardiomyozyten.** Die Säulen geben jeweils den Mittelwert aus zwei Proben \pm den Standardfehler des Mittelwertes an.

4.2.7.2 Parasiten pro Kardiomyozyt

Da die Anzahl der Trypanosomen im Überstand das Ausmaß der Infektion der Kardiomyozyten nicht ausreichend genau widerspiegelt, wurden die Kardiomyozyten angefärbt und mikroskopiert. Der Großteil der Kardiomyozyten enthielt keine oder wenige Parasiten (rechts), nur einzelne zeigten sich komplett gefüllt mit amastigoten *T. cruzi* (links).

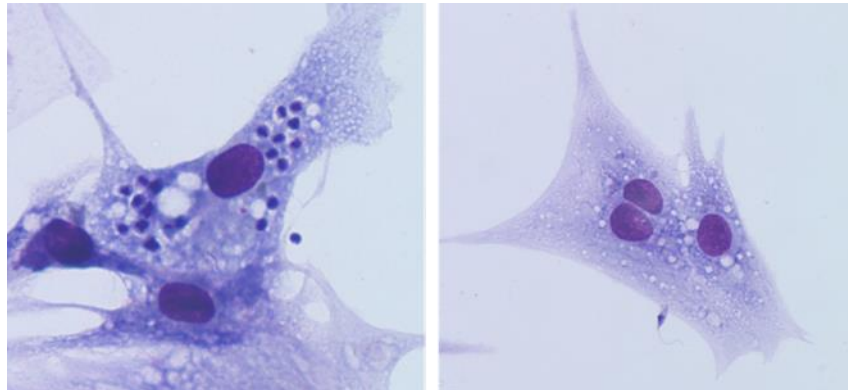


Abbildung 25: **Kardiomyozyten mit Giemsa gefärbt.** links: gefüllt mit zahlreichen amastigoten *T. cruzi*, rechts: keine Amastigoten

Das Zählen der intrazellulären Trypanosomen pro Kardiomyozytennucleus erschien daher nicht sinnvoll.

4.2.7.3 Relative Quantifizierung der Parasiten-DNA mittels Real-Time PCR

Zur zuverlässigeren Quantifizierung der Parasitenlast und zum objektiveren Vergleich der Behandlungsgruppen wurde mit aus den kultivierten Zellen isolierter DNA eine Real-Time PCR durchgeführt.

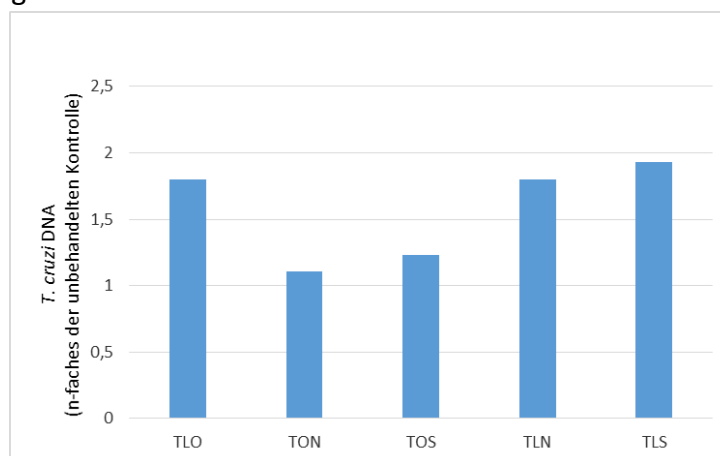


Abbildung 26: Vergleich der *T. cruzi*-DNA-Menge der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der unbehandelten Kontrolle (TLO), die Säulen geben die n-fache Expression von *T. cruzi*-DNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle an.

In den unbehandelten Kardiomyozyten wurde die geringste Menge Trypanosomen-DNA nachgewiesen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigen alle mit LPS behandelten Gruppen eine 1,8–1,9-fache Konzentration an *T. cruzi*-DNA. In den mit NOS-Inhibitoren behandelten Gruppen beträgt die *T. cruzi*-DNA-Menge das 1,1–1,2-fache der Kontrollgruppe.

4.2.7.4 ANP Western Blot

Das Atriale natriuretische Peptid (ANP) dient als prognostischer Marker bei Herzinsuffizienz. Im Rahmen einer Herzinsuffizienz, insbesondere auch bei der Chagas-Kardiomyopathie, ist das im Blut zirkulierende ANP erhöht [45]. Um herauszufinden, ob die Infektion mit *T. cruzi* auch in einzelnen Kardiomyozyten Einfluss auf das ANP-Level hat, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hier zeigten sich in den infizierten Kardiomyozyten deutlich geringere ANP-Level als in den nicht-infizierten.

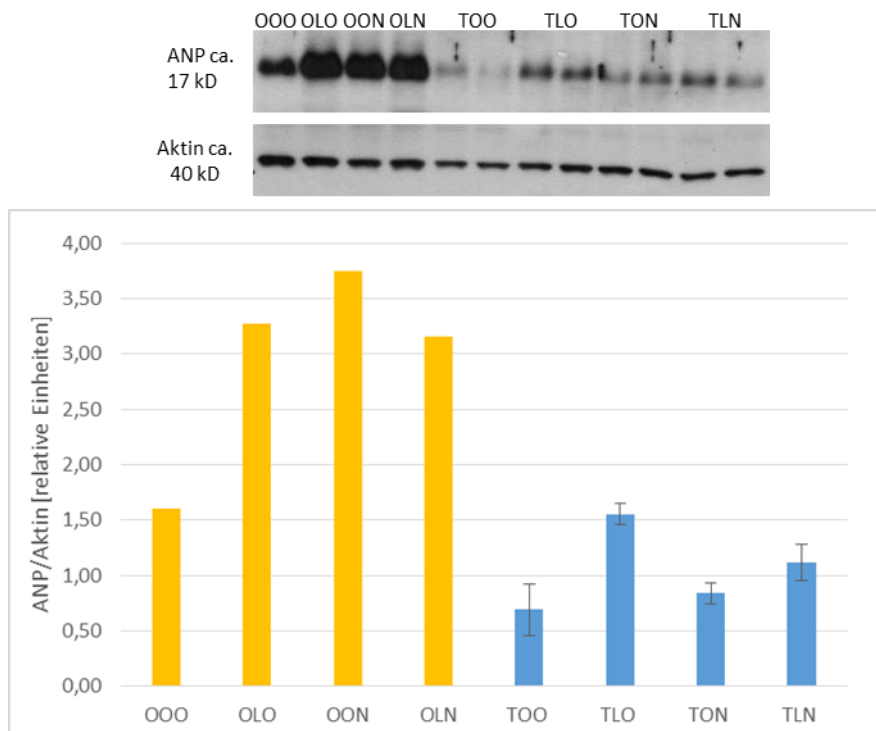


Abbildung 27: **ANP-Level.** Western Blot und densitometrische Analysen in nicht-infizierten und infizierten Kardiomyozyten

4.2.8 Einfluss des NO-Donators auf das Infektionsausmaß

4.2.8.1 Parasiten im Überstand

Unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat ist die Anzahl der Parasiten im Überstand tendenziell etwas geringer als ohne Behandlung.

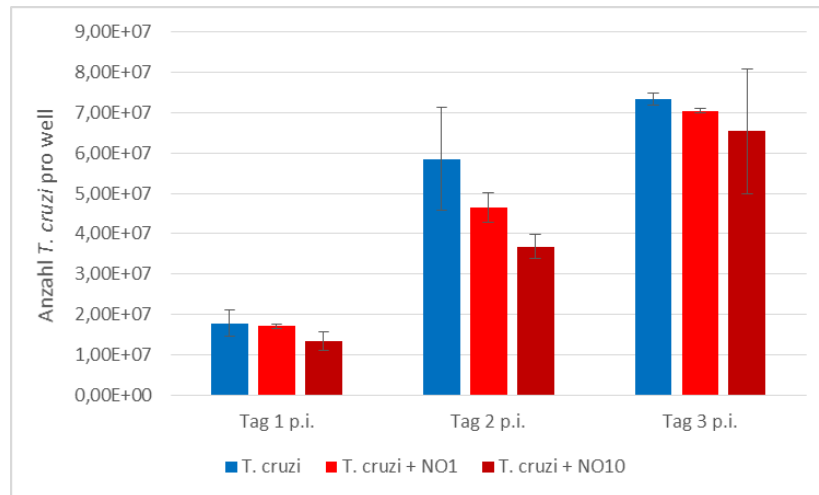


Abbildung 28: **Parasitenzahl im Überstand der Kardiomyozyten.** Die Säulen geben jeweils den Mittelwert aus zwei Proben \pm den Standardfehler des Mittelwertes an. NO1: 0,05 mM Glyceroltrinitrat, NO2: 0,5 mM Glyceroltrinitrat

4.2.8.2 Relative Quantifizierung der Parasiten-DNA mittels Real-Time PCR

Auch hier wurde zur besseren Quantifizierung der Parasitenlast eine Real-Time PCR mit DNA aus Kardiomyozyten durchgeführt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe weisen die mit Glyceroltrinitrat behandelten Gruppen die 1,54-fache bzw. 1,46-fache Menge an *T. cruzi*-DNA auf.

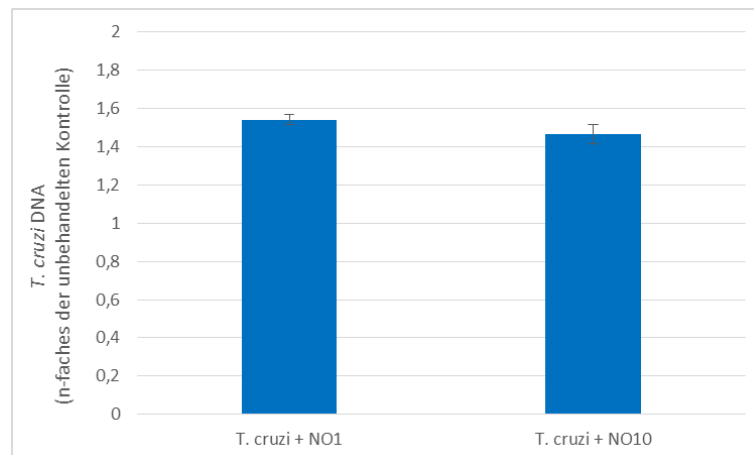


Abbildung 29: **Vergleich der *T. cruzi*-DNA Menge der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der unbehandelten Kontrolle.** Die Säulen geben die n-fache Expression von *T. cruzi*-DNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle an.

4.2.8.3 Expression der iNOS unter Behandlung mit NO-Donator Glyceroltrinitrat

Auch hier kann in den infizierten Kardiomyozyten eine höhere iNOS-Expression nachgewiesen werden als in den nicht-infizierten. Unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat zeigt sich in infizierten Kardiomyozyten eine etwas geringere iNOS-Expression als in den unbehandelten, infizierten Kardiomyozyten.

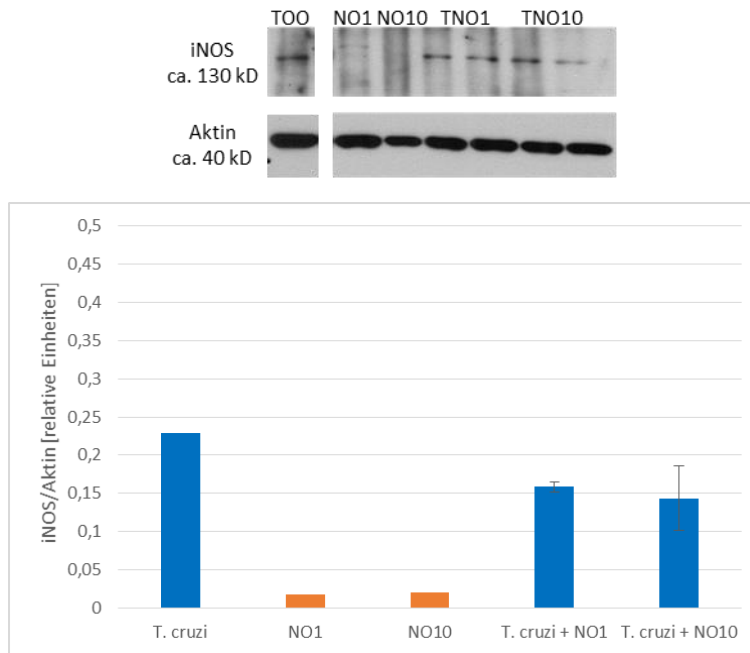


Abbildung 30: **iNOS-Expression**. Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in infizierten Kardiomyozyten unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat. NO1: 0,05 mM Glyceroltrinitrat, NO2: 0,5 mM Glyceroltrinitrat

4.2.8.4 ANP Western Blot

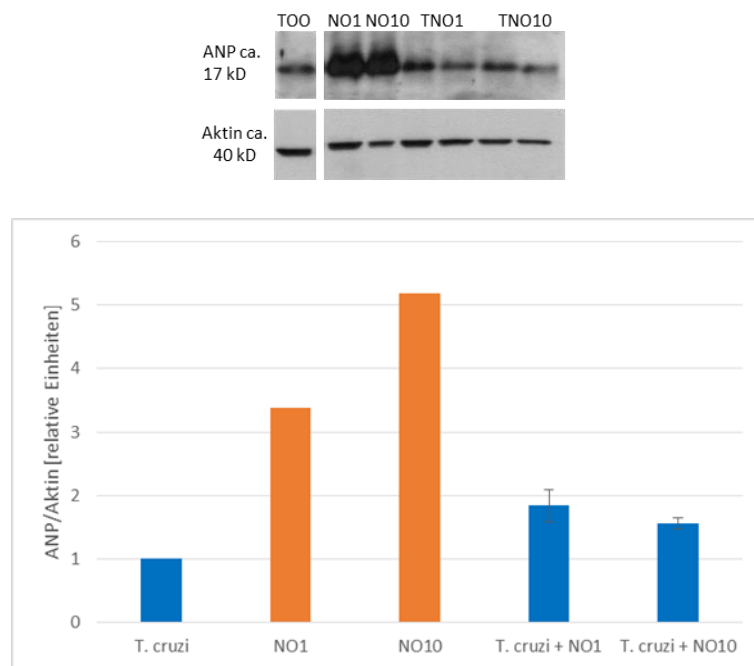


Abbildung 31: **ANP-Level.** Western Blot und densitometrische Analysen in nicht-infizierten und infizierten Kardiomyozyten und unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat.

Auch hier wurden die intrazellulären ANP-Level mittels Western Blot Analysen ermittelt. Erneut ergab sich der Hinweis darauf, dass in den infizierten Kardiomyozyten weniger ANP nachweisbar ist als in den nicht-infizierten. In infizierten Kardiomyozyten wurde unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat etwas mehr ANP gemessen als in unbehandelten, infizierten Kardiomyozyten.

5 Diskussion

Die Chagas-Krankheit hat auch über 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung durch Carlos Chagas noch nicht an Bedeutung verloren. *Pecoul et al.* schätzen, dass innerhalb der nächsten 5 Jahre etwa 200.000 Menschen an den Komplikationen der Chagas-Krankheit sterben werden [49]. Der Großteil von ihnen stammt dabei aus der ärmsten Bevölkerungsschicht Südamerikas. Viele Autoren sehen darin den Grund dafür, dass die Chagas-Krankheit für die Pharmaindustrie von eher geringem Interesse ist [16]. Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils der derzeit zugelassenen Medikamente und deren mangelnder Wirksamkeit in der chronischen Phase der Erkrankung ist die Forschung an neuen Medikamenten jedoch unbedingt notwendig. Bereits therapeutisch genutzte NO-Donatoren könnten sich als mögliche Medikamente anbieten.

5.1 Tierversuch

In diesem Versuchsteil sollte die Auswirkung des NO-Donators PETN auf die Chagas-Kardiomyopathie in Mäusen untersucht werden. Dazu wurden 12 Balb/c-Mäuse mit *T. cruzi* infiziert. 6 der Mäuse erhielten PETN mit dem Futter.

Eine erfolgreiche Infektion der Mäuse mit *T. cruzi* konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Mausmyokard ließen sich weder durch Real-Time PCR noch lichtmikroskopisch Parasiten nachweisen. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen:

Zum einen könnten sich die Versuchstiere zum Zeitpunkt der Organentnahme an Tag 85 nach Infektion in der indeterminanten Phase der Krankheit befunden haben. In dieser Phase lassen sich weder Parasiten noch Krankheitssymptome nachweisen. Viel mehr noch sprechen die Ergebnisse jedoch für eine insuffiziente Infektion der Mäuse. Dies wird durch die ebenfalls negativen Ergebnisse der PCR zur Bestimmung der Parasitämie bekräftigt, die an den Tagen 10, 25 und 35 nach Infektion durchgeführt wurde. In diesem Zeitraum der akuten Chagas-Krankheit ist normalerweise die höchste Parasitämie zu erwarten.

Als Grund für das Ausbleiben einer Chronifizierung der Chagas-Krankheit in den Versuchstieren kommt die mangelnde Infektiosität des Parasiten in Frage. Durch die Kultivierung in Medium kann *T. cruzi* an Infektiosität verlieren [8],[17],[37]. Um diese

erneut zu steigern, wären aufwändige Passagen in immunsupprimierten Mäusen notwendig [36].

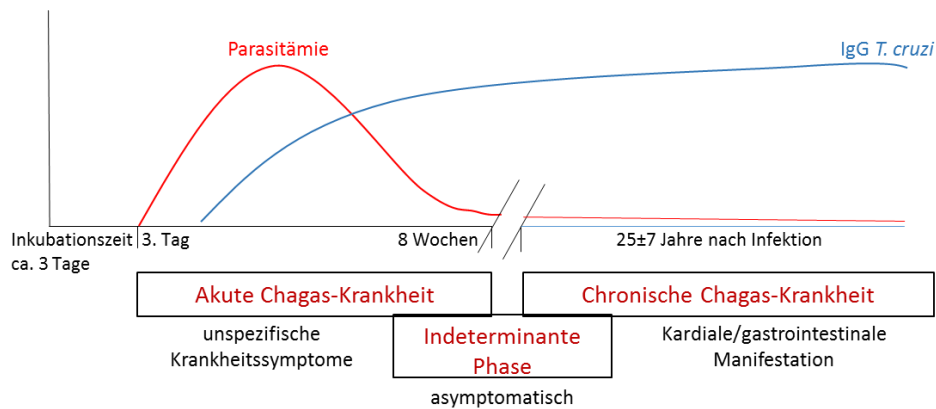


Abbildung 32: Natürlicher Verlauf der Chagas-Krankheit beim Menschen, nach [57]

Da schon die Infektion der Mäuse zweifelhaft ist, kann hier über die Wirkung von PETN im Rahmen einer experimentellen Chagas-Kardiomyopathie keine Aussage getroffen werden. Es bleibt jedoch die Möglichkeit, die PETN-Wirkung auf die Herzen der Versuchstiere zu betrachten. Auf die Größe der Mäuserherzen hat die Behandlung mit PETN keine Auswirkungen, dies konnte durch das Bestimmen des Quotienten aus Herz- und Mäusgewicht gezeigt werden. Betrachtet man allerdings die Größe einzelner Kardiomyozyten, ist ein geringer Unterschied festzustellen. Die Kardiomyozyten der behandelten Mäuse sind kleiner als die der unbehandelten. Möglicherweise wirkt die Behandlung mit PETN einer Herzhypertrophie entgegen.

Die Verabreichung von PETN und die daraus resultierende Freisetzung von NO im Myokard könnten zudem Veränderungen in der Expression der einzelnen NO-Synthasen hervorrufen. Die Expressionsanalysen der NO-Synthasen mittels Western Blot konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen detektieren. Die Zufuhr von PETN scheint sich somit nicht auf die Expression von iNOS, eNOS und nNOS auszuwirken.

PETN sollte jedoch weiter beforscht werden. Als schon lange bekannter NO-Donator könnte dieses Pharmakon die Chagas-Erkrankung positiv beeinflussen. Jedoch müssten am Versuchsaufbau einige Verbesserungen durchgeführt werden. Die Infektion der Versuchstiere sollte mit trypanomastigoten *T. cruzi*, die aus Frischblut infizierter Mäuse isoliert wurden, erfolgen. Werden die Parasiten in Kultur gehalten, ist die Infektiosität

in der Regel zu gering. Die Parasitämie sollte zudem engmaschiger kontrolliert werden. Auch wären serologische Tests zum Nachweis der *T. cruzi*-Infektion sinnvoll. Der Versuch müsste noch deutlich mehr Versuchstiere umfassen. Außerdem sollten die Mausherzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht werden, um genauere Informationen zu den einzelnen Erkrankungsphasen zu erhalten.

5.2 Zellkulturversuche

In diesem Versuchsteil wurde die Wirkung von NO auf die Infektion mit *T. cruzi* anhand infizierter Kardiomyozyten genauer untersucht.

5.2.1 Die iNOS in infizierten vs. nicht-infizierten Kardiomyozyten

Zunächst sollte dabei die Rolle der induzierbaren NO-Synthase genauer betrachtet werden. Wie bereits zu Beginn der Arbeit erwähnt, gibt es in der Literatur diesbezüglich widersprüchliche Ansichten. In dieser Arbeit konnte übereinstimmend mit *Chandrasekar et al.* in infizierten Kardiomyozyten eine erhöhte iNOS-Expression nachgewiesen werden [15]. Die erhöhte iNOS-Expression zeigte hier aber keine Auswirkung auf die im Zellkulturüberstand messbare NO-Konzentration. Sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten Kardiomyozyten wurden vergleichbare NO-Konzentrationen im Zellkulturüberstand gemessen.

NO kann durch die Zellmembran diffundieren und so im Zellkulturüberstand messbar werden, aber auch in den NO-produzierenden Zellen seine antiparasitäre Wirkung entfalten. Werden beispielsweise Makrophagen von *M. tuberculosis* infiziert, wird die Expression der iNOS induziert. iNOS ist dabei aber nicht homogen im Zytoplasma der Zelle verteilt, sondern wird in der Nähe der die Bakterien enthaltenden Phagosomen positioniert, was für die bakterizide Wirkung von NO entscheidend ist [21].

Intrazelluläre Konzentrationen von NO oder dessen Reaktionsprodukte könnten daher noch mehr Aufschluss über die Bedeutung der iNOS-Induktion liefern.

5.2.2 Einfluss einer iNOS-Überexpression auf die Infektion mit *T. cruzi*

Kardiomyozyten wurden mit Lipopolysaccharid, einem Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und starkem iNOS-Induktor, behandelt. Dadurch wurden deutlich höhere Expressionslevel der iNOS erhalten. Der Quotient iNOS/Aktin erreichte fast 1 bei infizierten Kardiomyozyten und über 2,5 bei Behandlung der

Kardiomyozyten mit LPS. Nun zeigten sich auch stark erhöhte NO-Konzentrationen unter der Behandlung mit LPS im Zellkulturüberstand. Das von den Kardiomyozyten produzierte NO zeigt gemäß der Erwartungen auch Auswirkungen auf *T. cruzi*.

Im Überstand der mit LPS behandelten Zellen wurden weniger Parasiten gezählt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass endogen produziertes NO in hohen Konzentrationen einen schädlichen Effekt auf *T. cruzi* hat und die Infektiosität des Erregers verringern kann. Jedoch spiegelt die Parasitenzahl im Überstand nicht wider, ob und in welchem Ausmaß die Kardiomyozyten infiziert sind. Um dies zu beurteilen, muss die Anzahl der amastigoten *T. cruzi*, die sich in den Kardiomyozyten befinden, gezählt werden. Dies gelingt durch die lichtmikroskopische Betrachtung mit Giemsa gefärbter Zellen. Der Nachweis amastigoter *T. cruzi* in den gefärbten Kardiomyozyten bestätigte eine gelungene Infektion. Jedoch waren auf den Chamber slides nur wenige mit Trypanosomen gefüllte Zellen zu finden. Es ist möglich, dass viele der infizierten Zellen beim Waschen vor dem Färben verloren gingen, da diese infektionsbedingt keine ausreichende Adhäsion erzeugen konnten. Die Werte, die für die Anzahl der Trypanosomen pro Zellkern erhoben wurden, erscheinen daher nicht aussagekräftig. Eine zuverlässigere Methode wäre für diese Fragestellung wünschenswert. Hier wurde eine Real-Time PCR mit der aus den Kardiomyozyten isolierten DNA gewählt. Das Ergebnis dieser Untersuchung erscheint jedoch zunächst widersprüchlich:

Während unter Behandlung mit LPS eine verminderte Parasitenzahl im Überstand zu beobachten ist, ist die mittels PCR quantifizierte intrazelluläre Parasitenlast im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht. Die niedrigste Parasitenzahl findet sich in der unbehandelten Kontrolle.

Während extrazelluläres NO den Erreger hemmt und damit zu einer Verringerung der Infektiosität führt, scheint es intrazellulär auf die amastigoten Trypanosomen keine schädlichen Auswirkungen zu haben.

5.2.3 Hemmung der NO-Produktion durch NOS-Inhibitoren

Zusätzlich zu LPS wurden die Kardiomyozyten mit zwei verschiedenen NOS-Inhibitoren behandelt. L-NAME ist ein L-Arginin-Analogon, das bevorzugt konstitutive NOS-Isoformen inhibiert. Die Selektivität ist dabei jedoch nur gering. Im Gegensatz dazu ist

SMLT ein L-Citrullin-Analogon und als ein potenter Inhibitor der nNOS beschrieben, der die iNOS nur gering beeinflusst [31]. Letzteres konnte hier jedoch nicht bestätigt werden. Während die Zugabe von L-NAME die NO-Produktion durch iNOS nicht zu beeinflussen scheint, zeigen sich unter Behandlung mit SMLT erniedrigte NO-Konzentrationen.

5.2.4 Einfluss des NO-Donators Glyceroltrinitrat auf die Infektion mit *T. cruzi*

Für Glyceroltrinitrat konnte kein starker schädlicher Effekt auf *T. cruzi* nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem NO-Donator führte lediglich zu einer geringen, nicht-signifikanten Reduktion der Trypanosomenzahl im Überstand. Auch eine Dosissteigerung um das 10-fache konnte nicht die erhoffte Wirkung erzielen.

Die Zufuhr von NO könnte zudem einen Einfluss auf die Expression der iNOS haben. Durch die Behandlung wurde jedoch keine relevante Verringerung des ohnehin schon niedrigen iNOS-Expressionslevels bewirkt.

5.2.5 ANP als prognostischer Marker bei Infektion mit *T. cruzi*

ANP dient als prognostischer Marker bei Herzinsuffizienz und insbesondere auch bei Chagas-Kardiomyopathie. Je schwerer die Ausprägung der Kardiomyopathie, desto mehr ANP zirkuliert im Blut des Patienten. Hier wurden die intrazellulären ANP-Level in infizierten und nicht-infizierten Kardiomyozyten gemessen. Die niedrigeren ANP-Level in infizierten Kardiomyozyten im Vergleich zu nicht-infizierten Kardiomyozyten legen die Vermutung nahe, dass auch in Zellkultur infizierte Zellen vermehrt ANP ausschütten. Das ANP-Level scheint somit negativ mit dem Ausmaß der *T. cruzi*-Infektion zu korrelieren und könnte als Messparameter für das Infektionsausmaß genutzt werden.

5.3 Stickstoffmonoxid und die Chagas-Krankheit

Stickstoffmonoxid ist eine Verbindung mit vielfältigen Eigenschaften. In hohen Konzentrationen dient es der Abwehr von Infektionserregern. Hohe NO-Konzentrationen werden durch die Infiltration infizierter Gewebe durch Makrophagen bewirkt. In der akuten Phase der Chagas-Krankheit hat dies einen positiven Effekt auf die Kontrolle des Parasiten. Dauert die iNOS-Überexpression und die damit verbundene Produktion hoher NO-Konzentrationen in infiziertem Gewebe jedoch bis in die chronische Phase an, wirkt sich die schädliche Wirkung von NO auch negativ auf die

Wirtszellen aus. Dies wurde bereits im Affenmodell bestätigt [12]. Daraus ließe sich auch schlussfolgern, dass auch eine Behandlung mit hochdosierten NO-Donatoren nur in der akuten Chagas-Krankheit sinnvoll wäre, um dort die Parasitenzahl zu verringern. In der chronischen Phase der Chagas-Krankheit, in der sich oft nur noch eine geringe Parasitenlast im Gewebe zeigt, würde wohl auch hier der schädliche Effekt auf die Wirtszelle überwiegen. *Carvalho et al.* postulieren daher sogar einen positiven Effekt von NOS-Inhibitoren in der chronischen Chagas-Kardiomyopathie [12].

6 Zusammenfassung

Die Chagas-Krankheit ist in Südamerika eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Durch Bevölkerungsbewegungen gewinnt die Erkrankung auch in den USA und Europa immer mehr an Bedeutung. Auch über 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung durch Carlos Chagas ist die Chagas-Krankheit noch wenig beforscht. Insbesondere im Hinblick auf die Therapie bedarf es neuer Erkenntnisse. Die derzeit für die Therapie der Chagas-Krankheit verwendeten Medikamente, Benznidazol und Nifurtimox, sind schon seit mehr als 40 Jahren zugelassen, haben zahlreiche Nebenwirkungen und sind in der chronischen Krankheitsphase nur unzureichend wirksam. Für Stickstoffmonoxid und den therapeutischen Einsatz von NO-Donatoren zeigten sich bereits in anderen Arbeitsgruppen vielversprechende Ergebnisse. Bis zur Zulassung dieser Substanzen für die Therapie am Menschen ist es jedoch noch ein weiter Weg.

In dieser Arbeit sollte daher mit Pentalong ein bereits für die Therapie der Koronaren Herzkrankheit zugelassener NO-Donator im Hinblick auf die Chagas-Krankheit neu beleuchtet werden. Es kam hier jedoch aufgrund mangelnder Infektiosität der Trypanosomen in den Versuchstieren nicht zu einer sicheren Chronifizierung der Chagas-Krankheit. Daher lassen sich über den Einfluss von Pentalong auf die Chagas-Krankheit keine Aussagen treffen. Dieser Ansatz sollte aber weiter verfolgt werden. Dabei sollten Trypanosomen mit höherer Infektiosität eingesetzt werden, um Mausmodelle für die chronifizierte Chagas-Krankheit zu erhalten.

Die Experimente mit Kardiomyozyten konnten zeigen, dass eine Infektion mit *T. cruzi* zur Induktion der induzierbaren NO-Synthase führt. Diese Induktion jedoch bewirkt keine höheren extrazellulären NO-Konzentrationen. Ob anhand dessen jedoch auf die intrazellulären NO-Level geschlossen werden darf, bleibt unklar. Letztlich sollte dies und die durch intrazelluläres NO angestoßenen Prozesse Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In infizierten Kardiomyozyten konnten deutlich niedrigere ANP-Level gemessen werden als in nicht-infizierten Kardiomyozyten. Ob ANP nicht nur als prognostischer Marker in der Chagas-Kardiomyopathie, sondern auch als Parameter für das Infektionsausmaß genutzt werden könnte, sollte weiter beforscht werden.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Bern, C., *Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2527-34.
2. Bern, C., et al., *Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review*. JAMA, 2007. **298**(18): p. 2171-81.
3. Biolo, A., A.L. Ribeiro, and N. Clausell, *Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years?* Prog Cardiovasc Dis, 2010. **52**(4): p. 300-16.
4. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
5. Bogdan, C., *Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update*. Trends Immunol, 2015. **36**(3): p. 161-78.
6. Bonney, K.M. and D.M. Engman, *Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?* Curr Mol Med, 2008. **8**(6): p. 510-8.
7. Bourguignon, S.C., C.R. Alves, and S. Giovanni-De-Simone, *Detrimental effect of nitric oxide on Trypanosoma cruzi and Leishmania major like cells*. Acta Trop, 1997. **66**(2): p. 109-18.
8. Brener, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol, 1973. **27**: p. 347-82.
9. Bruckdorfer, R., *The basics about nitric oxide*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(1-2): p. 3-31.
10. Burkard, N., et al., *Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. e32-44.
11. Burkard, N., et al., *Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia/reperfusion*. Circulation, 2010. **122**(16): p. 1588-603.
12. Carvalho, C.M., et al., *Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of Trypanosoma cruzi-infected rhesus monkeys: association with heart injury*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(5): p. e1644.
13. Castro, J.A., M.M. de Mecca, and L.C. Bartel, *Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)*. Hum Exp Toxicol, 2006. **25**(8): p. 471-9.
14. CDC. *American Trypanosomiasis*. 2017/12/19 2018/02/12]; Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>.
15. Chandrasekar, B., et al., *Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(1): p. 112-9.
16. Clayton, J., *Chagas disease 101*. Nature, 2010. **465**(7301): p. S4-5.
17. Contreras, V.T., A.R. De Lima, and G. Zorrilla, *Trypanosoma cruzi: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998. **93**(6): p. 753-60.
18. Coura, J.R. and P.A. Vinas, *Chagas disease: a new worldwide challenge*. Nature, 2010. **465**(7301): p. S6-7.
19. Culotta, E. and D.E. Koshland, Jr., *NO news is good news*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1862-5.
20. Cummings, K.L. and R.L. Tarleton, *Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of Trypanosoma cruzi infection in mice*. Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4081-9.
21. Davis, A.S., et al., *Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes*. PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e186.
22. Docampo, R., *Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs*. Chem Biol Interact, 1990. **73**(1): p. 1-27.
23. Durand, J.L., et al., *Role of NO synthase in the development of Trypanosoma cruzi-induced cardiomyopathy in mice*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(5): p. 782-7.
24. Feasey, N., et al., *Neglected tropical diseases*. Br Med Bull, 2010. **93**: p. 179-200.
25. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
26. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
27. Friedrich, E.B. and M. Bohm, *[Pentaerythritol tetranitrate]*. Dtsch Med Wochenschr, 2006. **131**(14): p. 749-50.

28. Gazzinelli, R.T., et al., *The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2501-6.
29. Guedes, P.M., et al., *Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN)NO] as a possible therapeutic approach for Chagas' disease*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 270-82.
30. Hammes, A., et al., *Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats*. Circ Res, 1998. **83**(9): p. 877-88.
31. Hobbs, A.J., A. Higgs, and S. Moncada, *Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 191-220.
32. Holscher, C., et al., *Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1208-15.
33. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(2): p. 120-126.
34. Hughes, D.F.N., *NEW DRUGS*. Can Med Assoc J, 1959. **80**(12): p. 997-8.
35. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298**(Pt 2): p. 249-58.
36. Leguizamon, M.S., et al., *Reversion of culture-induced virulence-attenuation in Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1993. **88**(1): p. 161-2.
37. Luban, N.A. and J.A. Dvorak, *Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 3. Selection for biological characteristics following intracellular passage*. Exp Parasitol, 1974. **36**(1): p. 143-9.
38. Machado, F.S., et al., *Chagas heart disease: report on recent developments*. Cardiol Rev, 2012. **20**(2): p. 53-65.
39. Machado, F.S., et al., *Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 3003-8.
40. Machado, F.S., H.B. Tanowitz, and A.L. Ribeiro, *Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(5): p. e000539.
41. Machado, F.S., H.B. Tanowitz, and M.M. Teixeira, *New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 258-9.
42. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
43. Marin-Neto, J.A., et al., *The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 319-24.
44. Melikian, N., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(8): p. 256-62.
45. Moreira Mda, C., et al., *Prognostic value of natriuretic peptides in Chagas' disease: a head-to-head comparison of the 3 natriuretic peptides*. Congest Heart Fail, 2009. **15**(2): p. 75-81.
46. Morillo, C.A., et al., *Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2015. **373**(14): p. 1295-306.
47. Oppermann, M., et al., *Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase*. Br J Pharmacol, 2008. **155**(3): p. 335-42.
48. Oswald, I.P., et al., *NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines*. Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1994. **108**(1): p. 11-8.
49. Pecoul, B., et al., *The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here?* PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(2): p. e0004343.
50. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
51. Ritter, O., et al., *AT2 receptor activation regulates myocardial eNOS expression via the calcineurin-NF-AT pathway*. FASEB J, 2003. **17**(2): p. 283-5.
52. Schairer, D.O., et al., *The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents*. Virulence, 2012. **3**(3): p. 271-9.

53. Silva, J.J., et al., *In vitro and in vivo antiproliferative and trypanocidal activities of ruthenium NO donors*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(1): p. 112-21.
54. Silva, J.S., F.S. Machado, and G.A. Martins, *The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s314-25.
55. Simpson, P. and S. Savion, *Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol*. Circ Res, 1982. **50**(1): p. 101-16.
56. Stuehr, D.J. and M.A. Marletta, *Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7738-42.
57. Teixeira, A.R., et al., *Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(3): p. 592-630.
58. Umar, S. and A. van der Laarse, *Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart*. Mol Cell Biochem, 2010. **333**(1-2): p. 191-201.
59. Urbina, J.A. and R. Docampo, *Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances*. Trends Parasitol, 2003. **19**(11): p. 495-501.
60. Vespa, G.N., F.Q. Cunha, and J.S. Silva, *Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 5177-82.
61. WHO. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 2016 2016/03 2016/09/12]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>.
62. Zhang, Y.H., et al., *Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology*. J Physiol, 2014. **592**(15): p. 3189-200.
63. Ziolo, M.T., M.J. Kohr, and H. Wang, *Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(5): p. 625-32.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Raubwanze, aus [50]	1
Abbildung 2: Romaña-Zeichen, übernommen aus [50].....	1
Abbildung 3: Verschiedene Ausprägungen der Chagas-Krankheit: Megacolon, Kardiomegalie, Aneurysma der Herzspitze, aus [50]	2
Abbildung 4: Die Pathogenese der chronischen Chagas-Kardiomyopathie, adaptiert aus [3].....	2
Abbildung 5: Lebenszyklus von T. cruzi übernommen aus [14]	3
Abbildung 6: Strukturformel Stickstoffmonoxid.....	5
Abbildung 7: NOS-Reaktion, adaptiert aus [35]	6
Abbildung 8: Strukturformel Pentaerythryltetranitrat.....	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung der morphologischen Stadien von T. cruzi	20
Abbildung 10: links – epimastigote T. cruzi, mittig: amastigote T. cruzi, rechts: trypomastigote T. cruzi .20	
Abbildung 11: NO-Konzentration im Myokard . In den mit PETN behandelten Mäusen (n = 5) ist NO höher als in den unbehandelten (n = 4). Die Säulen geben den Mittelwert ± SEM an.	32
Abbildung 12: Real-Time PCR zur Detektion von T. cruzi-DNA – Zykluszahlen . Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (1 bis 1:10000), Negativkontrolle (blank), DNA aus Herzen nicht infizierter Wildtypmäuse (grün, WT), behandelte infizierter Mäuse (rot, PETN + T. cruzi) und unbehandelte infizierter Mäuse (blau, T. cruzi)	33

Abbildung 13: Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht. Es sind keine Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrollgruppe zu sehen. Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der Herzgewicht/Mausgewicht-Quotienten, die für jede Maus berechnet wurden, an.	34
Abbildung 14: Durchschnittliche Kardiomyozytengröße. Die durchschnittliche Fläche eines Kardiomyozyten der behandelten Gruppe (PETN + T. cruzi) ist etwas kleiner als die der unbehandelten (T. cruzi). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM von jeweils 100 gemessenen Zellen pro Maus an.	34
Abbildung 15: iNOS-Expression. Western Blot Analyse der iNOS-Expression und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in der behandelten (PETN + T. cruzi, n = 6) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (T. cruzi, n = 5). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der densitometrischen Analysen der jeweiligen Gruppe an.....	35
Abbildung 16: nNOS-Expression. Die Expression der nNOS konnte mittels Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden.....	36
Abbildung 17: eNOS-Expression. Western Blot Analyse der eNOS-Expression und densitometrische Analyse der eNOS-Expression in der behandelten (PETN + T. cruzi, n = 6) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (T. cruzi). Die Säulen geben den Mittelwert \pm SEM der densitometrischen Analysen der jeweiligen Gruppe an.....	36
Abbildung 18: iNOS-Expression. Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in mit T. cruzi infizierten und nicht-infizierten Kardiomyozyten.	37
Abbildung 19: NO-Konzentration im Zellkulturüberstand. NO-Konzentration im Überstand nicht-infizierter und infizierter Kardiomyozyten.	38
Abbildung 20: iNOS-Expression. Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression unter Behandlung mit LPS (L) und L-NAME (N). OOO: unbehandelt, OLO: Behandlung mit LPS, OON: Behandlung mit L-NAME, OLN: Behandlung mit LPS und L-NAME.....	38
Abbildung 21: NO-Konzentration im Überstand. NO-Konzentration unter Behandlung mit LPS und L-NAME. OOO: unbehandelt, OLO: Behandlung mit LPS, OON: Behandlung mit L- NAME, OLN: Behandlung mit LPS und L-NAME.....	39
Abbildung 22: iNOS-Expression. Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in infizierten Kardiomyozyten unter Behandlung mit LPS (L) und NOS-Inhibitoren L-NAME (N) und SMLT (S)	40
Abbildung 23: NO-Konzentration im Überstand. TOO: Infektion mit T. cruzi ohne Behandlung, TLO: T. cruzi + Behandlung mit LPS, TON: T. cruzi + Behandlung mit L-NAME, TOS: T. cruzi + Behandlung mit SMLT, TLN: T. cruzi + Behandlung mit LPS und L-NAME, TLS: T. cruzi + Behandlung mit LPS und SMLT.	41
Abbildung 24: Parasitenzahl im Überstand der Kardiomyozyten. Die Säulen geben jeweils den Mittelwert aus zwei Proben \pm den Standardfehler des Mittelwertes an.	42
Abbildung 25: Kardiomyozyten mit Giemsa gefärbt. links: gefüllt mit zahlreichen amastigoten T. cruzi, rechts: keine Amastigoten.....	43

Abbildung 26: Vergleich der T. cruzi-DNA-Menge der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der unbehandelten Kontrolle (TOO), die Säulen geben die n-fache Expression von T. cruzi-DNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle an.....	43
Abbildung 27: ANP-Level . Western Blot und densitometrische Analysen in nicht-infizierten und infizierten Kardiomyozyten.....	44
Abbildung 28: Parasitenzahl im Überstand der Kardiomyozyten . Die Säulen geben jeweils den Mittelwert aus zwei Proben ± den Standardfehler des Mittelwertes an. NO1: 0,05 mM Glyceroltrinitrat, NO2: 0,5 mM Glyceroltrinitrat	45
Abbildung 29: Vergleich der T. cruzi-DNA Menge der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der unbehandelten Kontrolle . Die Säulen geben die n-fache Expression von T. cruzi-DNA bezogen auf die unbehandelte Kontrolle an.....	45
Abbildung 30: iNOS-Expression . Western Blot und densitometrische Analyse der iNOS-Expression in infizierten Kardiomyozyten unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat. NO1: 0,05 mM Glyceroltrinitrat, NO2: 0,5 mM Glyceroltrinitrat.....	46
Abbildung 31: ANP-Level . Western Blot und densitometrische Analysen in nicht-infizierten und infizierten Kardiomyozyten und unter Behandlung mit Glyceroltrinitrat.	47
Abbildung 32: Natürlicher Verlauf der Chagas-Krankheit beim Menschen, nach [57]	49

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste S3-Labor	11
Tabelle 2: Geräteliste Labor ZEMM	11
Tabelle 3: Giemsa	12
Tabelle 4: Hämatoxylin	12
Tabelle 5: Eosin.....	12
Tabelle 6: 4 % PFA (Paraformaldehyd)	13
Tabelle 7: Permeabilisierungslösung Nonidet 2 %	13
Tabelle 8: DAPI	13
Tabelle 9: Mattei-Medium für T. cruzi.....	13
Tabelle 10: Medium für Fibroblastenkultur	14
Tabelle 11: Medium für neonatale Rattenkardiomyozyten	14
Tabelle 12: PBS für Zellkultur	14
Tabelle 13: SMLT-Stammlösung	14
Tabelle 14: L-NAME-Stammlösung	14
Tabelle 15: LPS-Stammlösung	15
Tabelle 16: MHC-Puffer	15
Tabelle 17: 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8.....	15
Tabelle 18: 1,0 M Tris-Puffer pH 6,8.....	15

Tabelle 19: 10 % SDS pH 8,0	15
Tabelle 20: Trenngel	16
Tabelle 21: Sammelgel	16
Tabelle 22: 5 x PBS.....	16
Tabelle 23: 5 x Elektrophorese-Puffer pH 8,3.....	16
Tabelle 24: Transfer-Puffer pH 8,3	16
Tabelle 25: Waschlösung	17
Tabelle 26: Blocklösung	17
Tabelle 27: 50 x TAE-Puffer	17
Tabelle 28: Primärantikörper	17
Tabelle 29: Sekundärantikörper	18
Tabelle 30: Kommerzielle Kits	18
Tabelle 31: Reaktionsmix PCR T. cruzi	22
Tabelle 32: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR T. cruzi	24
Tabelle 33: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR Beta-Aktin.....	25
Tabelle 34: Reaktionsmix PCR T. cruzi	30
Tabelle 35: Reaktionsmix SYBR Green Real-Time PCR Beta-Aktin.....	30

7.4 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BENEFIT	Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	threshold cycle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS=NOS3	endotheliale NO-Synthase
et al.	und andere
F	Forward
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetal Calf Serum, Fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
g	gramm, Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
iNOS=NOS2	induzierbare NO-Synthase
K	Kalium
k	kilo
kDA=kD	Kilodalton
KO	Knockout
l	Liter
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli/Meter
M	Molar
M.	Musculus, Mycobacterium
MEM	Minimum Essential Medium
Min.	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molecular Weight, Molekulargewicht
n	nano/Anzahl
Na	Natrium
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
nNOS=NOS1	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

O ₂ -	Superoxid
OD	Optische Dichte
ONOO-	Peroxyinitrit
p.i.	post infectionem, nach Infektion
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PETN	Pentaerythryltetranitrat
PFA	Paraformaldehyd
PKG	Proteinkinase G
R	Reverse
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
S3	Sicherheitsstufe 3
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean, Standardfehler des Mittelwertes
sGC	soluble Guanylate Cyclase, zytosolische Guanylatzyklase
SMLT	S-methyl-L-thiocitrullin
SNAP	S-nitroso-acetyl-penicillamin
T.	Trypanosoma
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt
vs.	gegenüber
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
XOR	Xanthinoxidoreduktase
z. B.	zum Beispiel
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin

Danksagung

An erster Stelle möchte ich **Prof. Dr. med. Oliver Ritter** für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Dr. med. Jörn Strasen**, der mir mit viel Geduld zahlreiche wissenschaftliche Methoden beigebracht hat. Danke, dass Du trotz Deiner knappen Zeit immer ein offenes Ohr für meine vielen Fragen hattest.

Ebenso möchte ich mich bei **Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh** für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei der **Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg** möchte ich mich für die Gewährung eines Stipendiums zur Förderung der Promotion bedanken.

Zudem möchte ich mich beim **Zentrum für Infektionsforschung Würzburg** dafür bedanken, dass ich das S3-Labor für die Arbeit mit den Trypanosomen nutzen durfte.

Mein Dank gilt ebenfalls dem **Schweizerischen Tropen- und Public Health-Institut** in Basel für die Überlassung der Trypanosomen.

Ein großes Dankeschön gilt der gesamten **Arbeitsgruppe Ritter**. Vielen Dank für Eure zahlreichen Ratschläge und Eure Unterstützung.

Meiner **Familie**, meinen **Freunden** und Dir **Christian** möchte ich ganz besonders danken.

Ohne Eure stetige Motivation und Bestärkung wäre die Fertigstellung der Promotionsarbeit nahezu unmöglich gewesen.