

**Aus der Tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik
Würzburg**

Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg

Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. August Stich

**Experimentelle Untersuchungen und Hypothesen zur Zytotoxizität
von Naphtylisochinolin-Alkaloiden bei *Trypanosoma brucei***

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Jörn Strasen
aus Würzburg**

Würzburg, April 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. August Stich

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Heidrun Moll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2011

Der Promovend ist Arzt

Für Anne, Tim, Rolf und Margit – meine Familie

hinc illa infelicis monumenti inscriptio: turba se medicorum perisse

Daher die Inschrift auf dem Grab eines Unglücklichen:
„Die Vielzahl der Ärzte hat mich das Leben gekostet.“
(Plinius der Ältere, *naturalis historia*, Kapitel 29)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einführung	1
1.	Daten und Fakten	1
2.	Die Krankheit	2
3.	Der Parasit	5
4.	Therapie	9
5.	Bedeutung in den betroffenen Regionen und Ausblick	14
6.	Naphthylisochinolinalkalolide	16
7.	Zielsetzung dieser Arbeit	18
II.	Material und Methoden	19
1.	Allgemein	19
1.1.	Parasiten	19
1.2.	Kultur	19
1.3.	Medium	20
1.3.1.	Baltz-Medium Basis Lösung	20
1.3.2.	Baltz-Medium Komplett-Lösung	20
1.4.	Antitrypanosomale Wirkstoffe	21
1.4.1.	Amphotericin B	21
1.4.2.	Eflornithin	22
1.4.3.	GBAP 94	22
1.4.4.	GBAP 146	23
1.5.	Mikroskope und FACS®	24
1.5.1.	Olympus® CX40	24
1.5.2.	Olympus® CK2	24
1.5.3.	Zeiss Axioskop 40	25
1.5.4.	Fluoreszenzmikroskop Zeiss® AxioTech 100	25
1.5.5.	Durchflußzytometrie - FACS® - Facscalibur®	25
1.6.	Sonstige Materialien	26
1.6.1.	Sterile Werkbank	26
1.6.2.	Weitere Reagenzien	27
1.6.2.1.	PBS	27

1.6.2.2.	Paraformaldehyd-Lösung	27
1.6.3.	Zentrifugen	27
1.6.4.	Agarose	27
1.6.5.	Objektträger	28
1.6.6.	Bildbearbeitung	28
1.6.7.	Textverarbeitung	28
2.	Vitalitätstestung	29
3.	Lichtmikroskopie	30
3.1.	Färbungen	30
3.1.1.	Giemsa-Färbung	30
3.1.2.	Trypanblau-Färbung	31
4.	Fluoreszenzmikroskopie	32
4.1.	Färbungen	33
4.1.1.	GBAP 94 und GBAP 146	33
4.1.2.	DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	33
4.1.3.	LysoTracker [®] green	34
4.1.4.	Rhodamine-B-Hexylester	35
4.1.5.	FM 4-64 [®]	35
5.	FACS [®]	37
5.1.	Fluoreszenzfärbungen für FACS [®]	37
5.1.1.	Vybrant [®] Apoptosis Assay Kit #3	37
III.	Ergebnisse	40
1.	Auswahl der GBAP-Substanzen	40
2.	Immobilisation	42
2.1.	Agarose	42
2.2.	PBS	43
3.	Lichtmikroskopie	43
4.	Fluoreszenzmikroskopie	46
4.1.	Wirkstoffe ohne weitere Farbstoffe	46
4.2.	Etablierung der Fluoreszenz-Färbungen / Ergebnisse ohne Wirkstoff	48

4.2.1.	DAPI	48
4.2.2.	LysoTracker [®] green	49
4.2.3.	Rhodamine-B-Hexylester	49
4.2.4.	LysoTracker [®] green und Rhodamine-B-Hexylester	50
4.2.5.	FM 4-64 [®]	51
4.3.	LysoTracker green [®] - Färbungen mit Wirkstoffen	52
4.3.1.	LysoTracker green [®] - Färbungen mit GBAP 94 oder GBAP 146	52
4.3.2.	LysoTracker [®] green mit Amphotericin B	53
4.4.	Rhodamine-B-Hexylester mit Wirkstoffen	54
4.4.1.	Rhodamine-B-Hexylester mit GBAP 94 oder GBAP 146	54
4.4.2.	Rhodamine-B-Hexylester mit Amphotericin B	56
4.4.3.	Rhodamine-B-Hexylester mit Eflornithin	56
4.5.	LysoTracker [®] green und Rhodamine-B-Hexylester mit Wirkstoff	57
4.5.1.	LysoTracker [®] green und Rhodamine-B-Hexylester mit GBAP 94 oder GBAP 146	57
4.5.2.	LysoTracker [®] green und Rhodamine-B-Hexylester mit Amphotericin B	59
4.6.	FM 4-64 [®] mit Wirkstoff	60
4.6.2.	FM 4-64 [®] mit GBAP 94	61
4.6.2.	FM 4-64 [®] mit Amphotericin B	61
5.	FACS [®]	61
5.1.	Fluoreszenzmikroskopische Färbekontrolle	61
5.1.1	Annexin V-FITC	61
5.1.2.	Propidium-Jodid	63
5.2.	I. FACS [®] -Versuch (Pilot)	64
5.3.	II. FACS [®] -Versuch (WDH.-Pilot)	67

5.4.	II. FACS [®] -Versuch (Zeitreihe)	71
5.5.	IV. FACS [®] -Versuch (späte Apoptose)	85
VI.	Diskussion	91
1.	Zeitpunkt der Wirkung	91
2.	Wirkmechanismus	92
3.	Vergleich GBAP 94 mit GBAP 146	94
IV.	Zusammenfassung	95
V.	Ausblick	97
VI.	Anhang	98
1.	Literaturverzeichnis	98
2.	Abkürzungsverzeichnis	114
Danksagung		
Lebenslauf		

I. Einführung

1. Daten und Fakten

Die „Afrikanische Schlafkrankheit“ steht an erster Stelle des WHO-Programms zur Erforschung von Krankheiten, die unverhältnismäßig stark arme und benachteiligte Menschen betreffen [171]. Sie ist von der CDC als „emerging disease“ eingestuft [43]. Die WHO definiert eine Krankheit als emerging disease, wenn sie entweder zum ersten Mal ausbricht oder sich in der Bevölkerung oder geographisch deutlich ausbreitet [172]. Nach offiziellen Angaben verstarben

allein im Jahr 2004 17616 Menschen an der Schlafkrankheit [168]. Die tatsächlichen Fallzahlen sind sehr wahrscheinlich deutlich höher. So geht die WHO

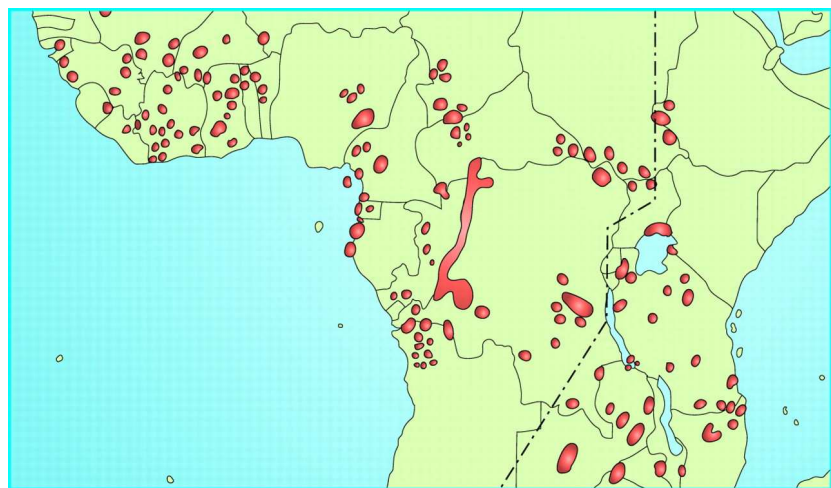


Abb.1: Verteilung der Foci innerhalb des Tse-Tse Gürtels nach [151]

von ca. 300000 - 500000 Betroffenen im gleichen Zeitraum aus [5, 173].

Aktuell sind 36 afrikanische Länder von der Schlafkrankheit betroffen. Die Ausbreitung verteilt sich auf etwas mehr als 260 foci [173]. Diese liegen alle südlich der Sahara. Nach dem Vektor, der Tse-Tse-Fliege (*Glossina spp.*), wird dieses Gebiet Tse-Tse-Gürtel genannt. Es erstreckt sich ungefähr vom 14. nördlichen bis zum 29. südlichen Breitengrad [12].

Die Anzahl der Menschen in den Risikogebieten für Schlafkrankheit ist in den letzten Jahren relativ konstant geblieben. Im Jahr 1986 lebten ca. 70 Millionen Menschen in diesem Gebiet, im Jahr

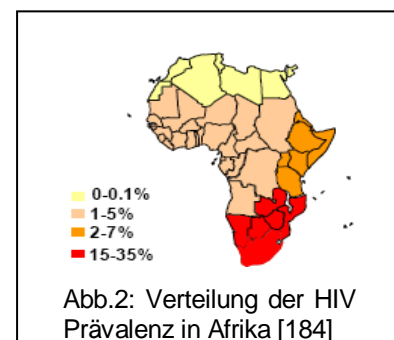


Abb.2: Verteilung der HIV Prävalenz in Afrika [184]

2000 50 – 60 Millionen.

Die Afrikanische Schlafkrankheit hat in einigen Gebieten sogar einen größeren Anteil an der Mortalität, als die HIV/AIDS-Epidemie. Dies ist bemerkenswert, denn auch die HIV/AIDS-Epidemie hat im gleichen Teil des afrikanischen Kontinents katastrophale Ausmaße angenommen und stellt vor Ort häufig das Gesundheitsproblem Nummer eins dar [183].

2. Die Krankheit

Erreger der Schlafkrankheit sind eukaryontische, einzellige Parasiten der Gattung *Trypanosoma* (griechisch Bohrkörper [τρυπανο σωμα]). Unterschieden werden *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*) [142]. Die ostafrikanische Schlafkrankheit wird durch *T.b. rhodesiense* verursacht. Diese Form verursacht ein zum Teil fulminantes Krankheitsbild, das unbehandelt innerhalb von 6-9 Monaten zum Tode führt. Bei der westafrikanischen Schlafkrankheit verursacht *T.b. gambiense* eine chronische Infektion, die zum Teil über Jahre andauert. Auch in diesem Fall endet die Infektion immer tödlich, wenn sie nicht behandelt wird.

Beide Parasiten sind einander biologisch sehr ähnlich, folglich gibt es viele Gemeinsamkeiten in den Pathomechanismen. Dennoch unterscheiden sich die Krankheitsbilder teilweise erheblich.

Die Übertragung erfolgt durch den Stich einer Tse-Tse-Fliege, in der die Trypanosomen einen Teil ihres Entwicklungszyklus unterlaufen (siehe Abb. 7). Diese injiziert die Parasiten zusammen mit gerinnungshemmenden Substanzen aus ihren Speicheldrüsen in die Einstichstelle. Von hier gelangen die metazyklischen Trypomastigoten in den Wirt. Innerhalb von ein bis zwei Wochen kann sich dann an der Einstichstelle der so genannte Trypanosomen-Schanker bilden. Diese anfangs makuläre Hautläsion

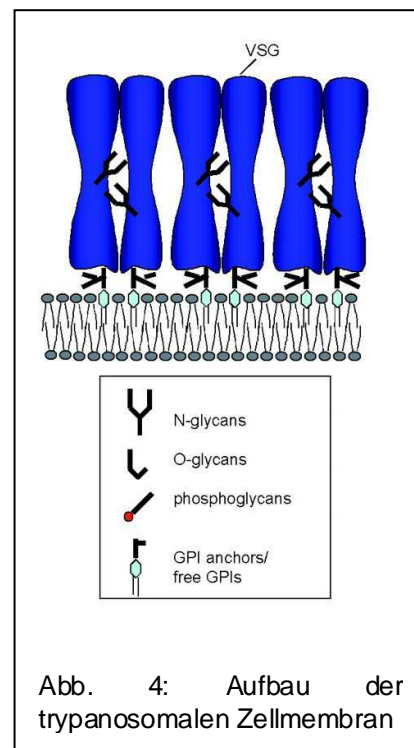


Abb. 3: Tse-tse Fliege (*Glossina morsitans*) nach [23]

ist üblicherweise gerötet, schmerzhaft und breitet sich bis auf 3 cm Durchmesser aus. Bei *T.b. gambiense*-Infektionen wird der Schanker nur selten beobachtet. Ebenso tritt er bei Afrikanern selten auf. Er verschwindet üblicherweise nach zwei bis drei Wochen wieder [125].

Mit der folgenden Ausbreitung der Trypanosomen durch die Blutbahn kommt es zu einer generellen Aktivierung des Immunsystems. Die Folge ist eine ca. einwöchige Episode mit meist hohem Fieber. Gleichzeitig beginnt bei der westafrikanischen Variante eine Schwellung der zervikalen und nuchalen Lymphknoten. Dies wird nach seinem Erstbeschreiber Winterbottom-Zeichen genannt [123]. Sehr typisch ist auch ein Hautausschlag, besonders bei hellhäutigen Patienten. Die nicht juckende Rötung ist rund bis oval mit einer Abblassung im Zentrum. Sie ist sehr häufig am Stamm zu finden und hat einen Durchmesser von ca. 10 cm [7]. In mehr als der Hälfte der Fälle tritt im Laufe der Erkrankung ein starker Juckreiz auf.

Trypanosoma brucei (*T. brucei*) lebt im Gegensatz zu *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) oder *Leishmanien* ausschließlich extrazellulär. Der Parasit bevorzugt das lymphatische System, kommt aber auch in Blut oder Liquor vor. Folglich sind die Parasiten ständig dem Immunsystem des Wirtes ausgesetzt. Das Immunsystem produziert ständig Antikörper gegen Trypanosomen, um diese zu eliminieren. Die Trypanosomen haben einen Mechanismus entwickelt dieser Immunantwort zu entgehen. Sie schützen ihre essentiellen Oberflächenmoleküle vor dem Zugriff der Antikörper. Auf ihrer gesamten Oberfläche befinden sich große Glykoproteine, englisch variant surface glycoproteins (VSG), deren Masse ca. 65 kDa beträgt [50]. Die VSG überragen



ragen und decken so die essentiellen Oberflächenproteine ab, sind aber selbst den Antikörpern zugänglich. Das Immunsystem produziert nach dem Neuauftreten eines neuen VSG-Klons hauptsächlich Antikörper gegen dessen VSG und

nur zu einem geringen Teil gegen die essentiellen Oberflächenstrukturen. Die Anzahl der Parasiten wird dennoch deutlich reduziert. Ein kleiner Teil der Trypanosomenpopulation hat zu diesem Zeitpunkt schon zu anderen VSG-Subtypen auf seiner Oberfläche gewechselt (VSG-switch). So entgeht dieser neue Klon der Antikörper-Antwort des Immunsystems solange bis spezifische Antikörper gegen diesen zweiten VSG-Subtyp gebildet wurden. Im Genom von *T. brucei* sind insgesamt einige hundert unterschiedlicher VSG-Gene codiert. Diese werden einzeln an- oder abgeschaltet [158]. So entstehen die einzelnen VSG-Klone. Dies ist ein Grund für die dauerhafte Persistenz des Parasiten.

Letztlich führt die Trypanosomiasis zu einer Immunsuppression, da der menschliche Körper zum Selbstschutz die überschießende Immunreaktion eindämmt [158]. Dieses Phänomen wird als „immune exhaustion“ bezeichnet. Es führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, da die gesamte Immunabwehr herunterreguliert wird.

Auch andere, biologisch völlig unterschiedliche Krankheitserreger wie *Plasmodium falciparum*, *Candida albicans* oder *Borrelia spp.* nutzen die Antigen-Variation auf ihrer Oberfläche, um der Immunantwort zu entgehen [24, 53, 187]. Hierfür nutzen die unterschiedlichen Spezies verschiedene Mechanismen. Zuerst beschrieben wurde das Prinzip der Antigen-Variation als Überlebenstrategie von Krankheitserregern bei Trypanosomen.

Die Fieberschübe während der weiteren Erkrankung sind die Folge der Immunreaktion auf einen neuen VSG-Klon. Während der Fieberschübe ist der Erreger mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit im peripheren Blut nachzuweisen. Um sich in hohem Maße teilen zu können, benötigt er die hier enthaltenen Nährstoffe. Zudem wird der neue Klon über das Blut gleichzeitig im ganzen Körper verteilt.

Eine weitere Folge der extremen Immunstimulation sind Autoantikörper. Sie greifen unter anderem die Myelinscheiden der Neurone im Gehirn an und tragen damit zu den neurologischen Symptomen bei. Auch die Parasiten selbst überwinden die Blut-Hirn-Schranke. Die Folge sind Infiltrate aus Trypanosomen, B-Lymphozyten und Plasmazellen in den Meningen und im Hirnparenchym [19]. Welche Mechanismen außerdem zu den vielfältigen neurologischen Ausfällen

führen, ist bislang nicht vollständig geklärt. Hierzu gehören Konzentrationsstörungen, motorische Symptome wie Tremor oder Faszikulationen und rein neurologische Störungen, wie Ataxie oder Reflexabnormitäten. Typisch sind zudem psychiatrische Symptome: extreme Stimmungsschwankungen, Verhaltensänderungen und sexuelle Enthemmung.

Anders als der Name Schlafkrankheit suggeriert, schlafen die Betroffenen, zumindest in der ersten Zeit nach der Infektion, nicht mehr als andere Menschen. Es findet jedoch eine Veränderung des Schlaf-/Wachrhythmus statt. Die Schlafdauer selbst verändert sich nur wenig. Erst in späten Stadien werden die Patienten komatös. Ohne Therapie versterben die Patienten im weiteren Verlauf der Erkrankung.

3. Der Parasit

Erreger der Schlafkrankheit sind zwei Unterarten der Art *Trypanosoma brucei*: *T.b. gambiense* und *T.b. rhodesiense*. Die Art ist benannt nach Sir David Bruce. Er hat diese Erreger zwar nicht als erster entdeckt, aber bahnbrechende Entdeckungen zu Lebenszyklus, Epidemiologie sowie Prävention und Therapie gemacht [34-37, 142]. Im Jahre 1901 entdeckte Dutton einen Erreger, den er als *Trypanosoma gambiense* bezeichnete, im Blut eines Patienten mit undulierendem Fieber [136]. 1910 wurde dann von J. W. Stephens in Zusammenarbeit mit Fantham *Trypanosoma brucei rhodesiense* beschrieben [96].

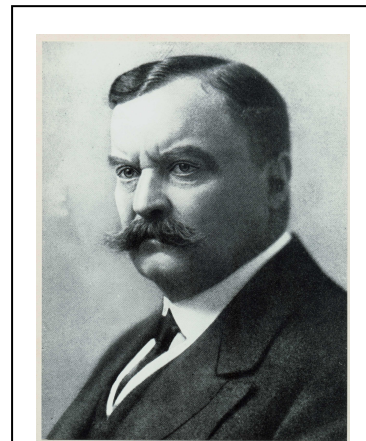


Abb. 5: Sir David Bruce; Namensgeber von *Trypanosoma brucei* [150]

T.b. gambiense und *T.b. rhodesiense* gehören in die Ordnung Kinetoplastida. In dieselbe Ordnung gehören noch andere humanpathogene Erreger, die *Leishmanien*. Diese verursachen die kutane („Orientbeule“) und viszerale Form („Kala-Azar“) der Leishmaniose. Es gibt weitere wichtige Arten und Unterarten von *Trypanosoma*. Der wichtigste ist *T. cruzi*, der Erreger der Chagas-Krankheit, die

in weiten Teilen Süd- und Mittelamerikas endemisch ist. Sie unterscheidet sich sowohl biologisch, als auch klinisch komplett von der Schlafkrankheit.

Ein weiterer wichtiger Vertreter ist *Trypanosoma evansi*. Der Erreger gehört wie *Trypanosoma brucei* dem Stamm der *Salivaria* an. *Trypanosoma evansi* ist verantwortlich für die Surra, eine Tierseuche, die hauptsächlich in Asien und zum Teil auch in Afrika vorkommt. Betroffen sind vor allem Pferde, Büffel und Rinder [51, 121]. Der wirtschaftliche Schaden ist enorm. Ohne Kontrollmaßnahmen würden zum Teil über zehn Prozent des Viehbestandes an Surra verenden [143].

Trypanosoma brucei brucei ist einer von 5 Erregern der Nagana, ebenfalls einer Tierseuche [35, 140, 141]. Betroffen von *T. brucei brucei* sind diverse verschiedene Säugtierarten [116]. Die Infektion von Pferden und Rindern hat eine äußerst wichtige wirtschaftliche Bedeutung. Sie ist ein wichtiger Grund, weshalb auf den afrikanischen Savannen diese Tiere nicht in kommerziellem Ausmaß gehalten werden können, wie in ähnlichen Gebieten auf anderen Kontinenten. Studien zeigen, dass bis zu 50% einer Rinderherde innerhalb eines Vierteljahres infiziert werden [155].

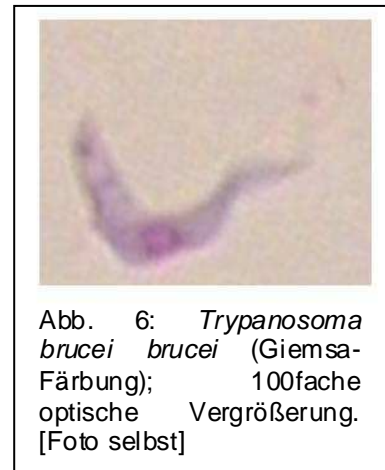


Abb. 6: *Trypanosoma brucei brucei* (Giemsa-Färbung); 100fache optische Vergrößerung. [Foto selbst]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Parasiten der Gattung *Trypanosoma brucei brucei* statt der humanpathogenen verwendet. Eine morphologische Unterscheidung dieser Arten ist nicht möglich. Sie können nur durch serologische oder molekularbiologische Methoden, wie PCR, differenziert werden [79]. *Trypanosoma brucei brucei* und *T.b. rhodesiense* können selbst mit diesen Methoden nicht immer eindeutig unterschieden werden.

Die Körper der Parasiten sind in der trypomastigoten Form ca. 20 µm – 25 µm lang, mit Flagelle sind es ca. 30 µm. Sie vermehren sich klonal durch Zweiteilung.

Die Trypanosomen durchlaufen dabei einen Zyklus, der zum Teil in der Tse-Tse-Fliege, zum Teil im Menschen oder anderen betroffenen Säugern abläuft [44]. Bei ihrer Blutmahlzeit nimmt die Fliege trypomastigote Trypanosomen auf.

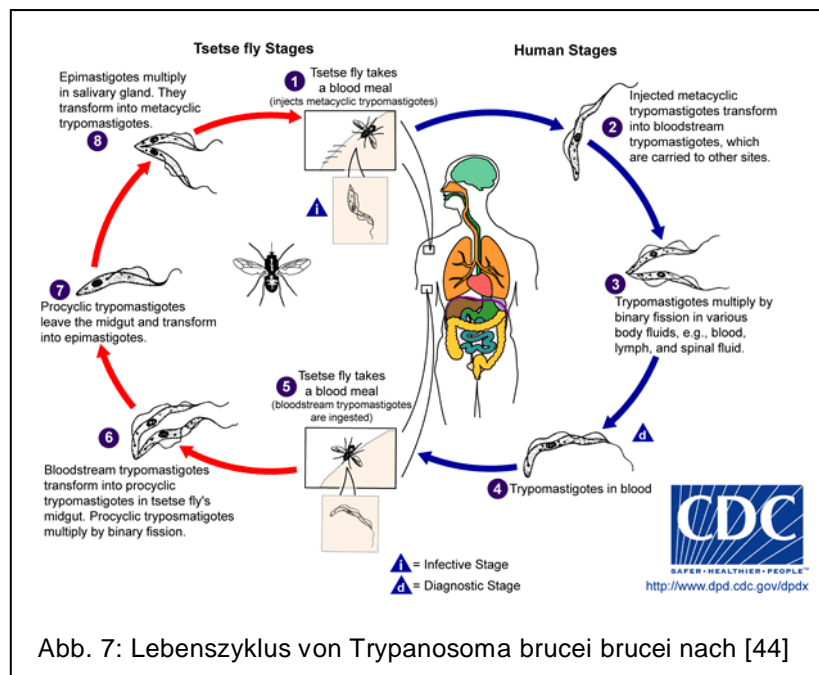


Abb. 7: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei brucei* nach [44]

Diese gelangen in ihren Darm. Hier nehmen die Parasiten die promastigote Form an, die sich direkt zweiteilen kann. Nach der Verwandlung in Epimastigote wandern die Parasiten in die Speicheldrüsen der Tse-Tse-Fliege. Hier entsteht die metacyclische Form. Sie werden bei dem nächsten Stich auf den Wirt übertragen und nehmen die so genannte Blutstromform an.

Hiervon gibt es in zwei Varianten: die „lange schlanke Form“ (engl. long slender) und die „kurze plumpe Form“

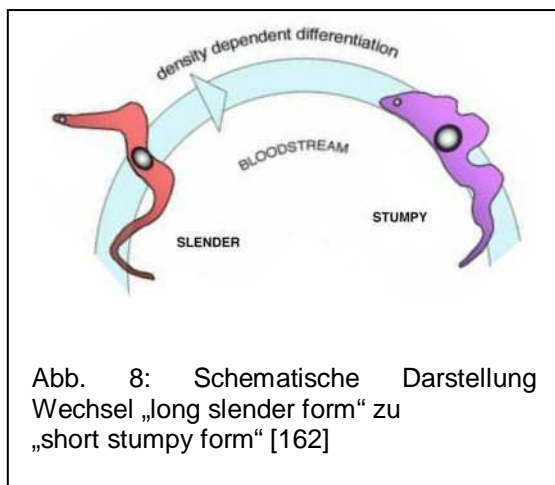
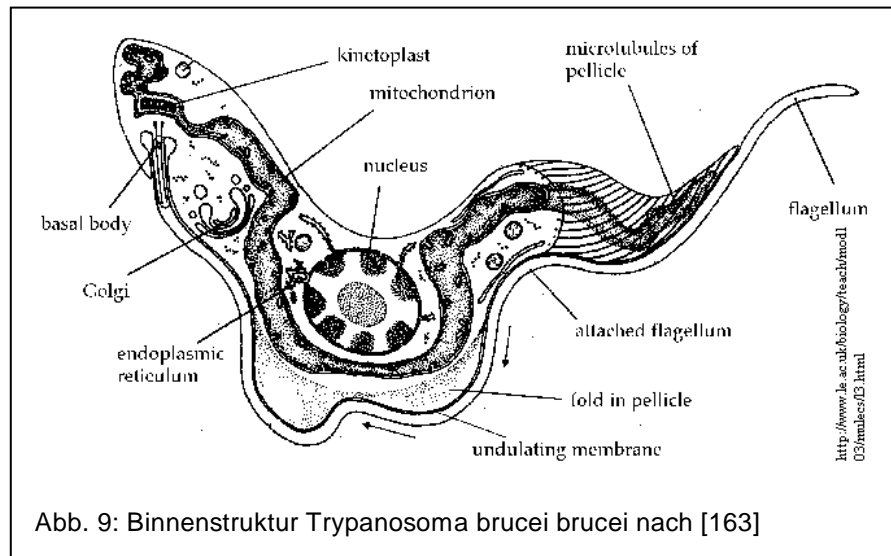


Abb. 8: Schematische Darstellung Wechsel „long slender form“ zu „short stumpy form“ [162]

(engl. short stumpy). Beide Formen kommen nebeneinander vor. Das Verhältnis zueinander hängt unter anderem von dem Nährstoffangebot ab. Die „long slender forms“ vermehren sich im Körper durch Zweiteilung, während die „short stumpy forms“ sich nicht teilen können und schon für die Aufnahme durch die Tse-Tse-Fliege vorbereitet sind.

Trypanosomen sind einzellige eukaryontische Parasiten. Der Grundaufbau entspricht dem anderer eukaryontischer Zellen. Der Nukleus enthält $3,5 \times 10^7$ bp.



Der Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum und die meisten anderen Organellen unterscheiden sich kaum von denen in Mehrzellern. In jeder Zelle gibt es allerdings nur ein Mitochondrium. Dieses zieht sich von der Spitze bis zum Ende des Zytoplasmas durch den Parasiten. Es beginnt mit einer Struktur, die als Kinetoplast bezeichnet wird.

Zusätzlich gibt es noch Organellen, die für Kinetoplastida spezifisch sind. Diese eignen sich besonders als potentielle Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente [80]. Zum einen das Acidocalcisom, ein Speichervesikel besonders für Calcium und Phosphat-Verbindungen mit saurem pH-Wert. Die Funktion konnte allerdings noch nicht abschließend geklärt werden. Anders als bei *Leishmanien* scheint das Acidocalcisom nicht spezifisch für die Speicherung von Fe^{2+} zuständig zu sein [113].

Eine weitere mögliche Zielstruktur ist die so genannte „flagellar pocket“. Diese Struktur kommt ausschließlich in Trypanosomen vor. In dieser Einstülpung der Zellmembran inserieren die Mikrotubuli aus dem Kinetoplast in die Flagelle. Sie treten dort aus dem Zytoplasma aus und sind mit dem Rest der Zelle durch eine undulierende Membran verbunden, die nach hinten über den Parasiten hinausreicht. Hierdurch bewegen sich die Trypanosomen aktiv. Außerdem werden die makromolekularen Nährstoffe über die „flagellar pocket“ aufgenommen [80].

4. Therapie

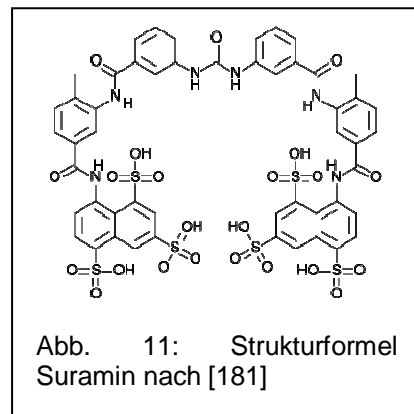
Die Afrikanische Schlafkrankheit ist eine Erkrankung, die unbehandelt immer zum Tode führt. Zur Behandlung stehen hauptsächlich fünf Wirkstoffe zur Verfügung: Suramin, Pentamidin, Melarsoprol, Eflornithin und Nifurtimox [40, 48, 134].

Suramin wurde 1916 als „Bayer 205[®]“ von Oskar Dressel und Richard Kothe für die Bayer AG[®] gezielt zur Therapie der Schlafkrankheit entwickelt. Es war das erste spezifische antiparasitäre Medikament überhaupt. Friedrich Karl Kleine, ein Schüler Robert Kochs, führte mit „Bayer 205[®]“ umfangreiche Tests in der deutschen Kolonie Tanganjika (Ostafrika) durch [92]. Wesentlich unterstützt wurde er dabei von Sir David Bruce. Unter dem Handelsnamen Germanin[®] erlangte das Medikament weite Verbreitung.

Suramin ist heute nach wie vor Standardbehandlung im Stadium I der ostafrikanischen Schlafkrankheit. Auch einige weitere Anwendungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel Prostata-Karzinom, Leberversagen oder HIV-Infektion – vor Einführung der HAART - sind beschrieben [45, 55, 148]. Es wird in einer Dosierung von 4-5 mg/kg KG am ersten Tag der Behandlung verabreicht, gefolgt von einem Zyklus von fünf Injektionen mit 20 mg/kg KG alle drei bis sieben Tage. Maximaldosis liegt bei 1 g/d. Die Applikation erfolgt intravenös. Ein Therapieversagen kommt in 25-35% der Fälle vor. Lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind in der Literatur beschrieben, aber sehr selten [95]. Häufiger kommen eine vorübergehende Niereninsuffizienz und Fieberschübe vor. Die



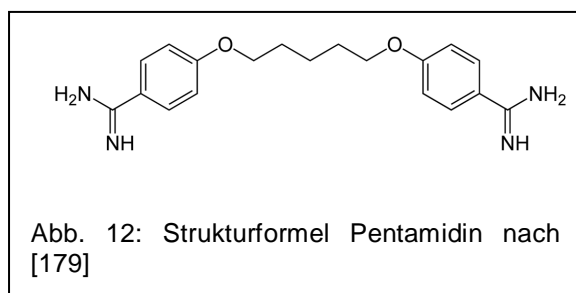
Abb. 10: 1943 entstand ein Propaganda-Film des dritten Reiches mit Luis Trenker über die Entwicklung des „deutschen“ Medikamentes Germanin [59].



IC₅₀-Dosis ist mit 10,7 ng/ml relativ hoch [63, 142]. Zwischen 1997 und 1999 stoppte die Bayer AG[®] die Produktion von Suramin [48].

Inzwischen wird es, wie Pentamidin, Melarsoprol und Eflornithin, im Rahmen eines Spendenprogramms von der Bayer AG[®] und Sanofi-Aventis[®] wieder produziert [15]. Die Medikamente werden dann der WHO zur Verfügung gestellt und von MSF gelagert [159]. Der aktuelle Spendenvertrag läuft bis 2011. Dennoch ist die Versorgung vor Ort immer noch sehr schwierig [67].

Als ein weiteres wichtiges Medikament wurde Pentamidin (Pentacarinat[®]) im Jahr 1940 in die Therapie der Schlafkrankheit eingeführt [182]. Es hat in vitro eine ausgezeichnete Aktivität gegen Trypanosomen. Die IC₅₀ liegt bei 1 – 2,5 nM oder entsprechend 0,4 ng/ml [120, 142]. Es ist die



Therapie der Wahl für das Stadium I der westafrikanischen Schlafkrankheit. Möglich ist auch die Anwendung im frühen Stadium II. Es wird bei Kontraindikationen für Suramin auch im Stadium I der ostafrikanischen Variante eingesetzt. Pentamidin wurde einige Zeit versuchsweise als Medikament zur Prophylaxe genutzt.

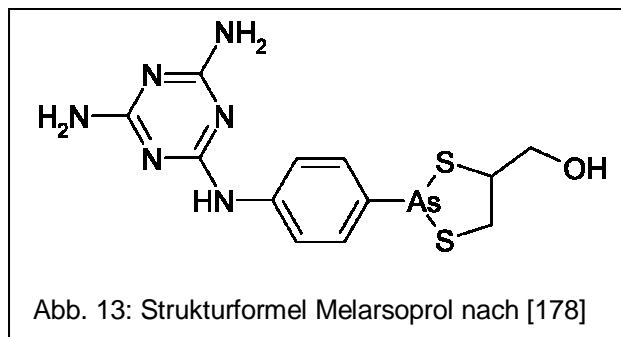
Daneben gibt es die Zulassung für weitere Indikationen. Es sind dies die Therapie und Prophylaxe der *Pneumocystis-jiroveci*-Preumonie sowie die Therapie von Infektionen durch Antimon-resistente Leishmanien [138].

Das übliche Therapieprotokoll umfasst sieben bis zehn Injektionen, die jeden oder jeden zweiten Tag verabreicht werden. Die Dosis ist 4 mg/kg KG [40]. Bei intravenöser Infusion tritt sehr häufig eine schwere Hypotonie auf [61]. Deshalb wird Pentamidin langsam intravenös appliziert. Trotzdem sind Hypotonien eine häufige Nebenwirkung [8]. Ebenso häufig sind Nierenschädigungen, Leukopenie und Leberfunktionsstörungen. Zu beachten sind außerdem Blutzuckerentgleisungen bis hin zum persistierenden Diabetes mellitus. Die Heilungsraten sind im Stadium I bei Infektionen mit *T.b. gambiense* mit 94 % sehr hoch und auch im frühen Stadium II werden 69% erreicht [58, 96]. Bei *T.b. rhodesiense*-

Infektionen im Stadium I sind die Erfolge gut, wenn auch geringer als die bei *T.b. gambiense*. Bislang sind keine Resistenzen bekannt.

Die Einführung des Melarsoprol (Arsobal®) 1949 war ein Meilenstein in der Therapie der Schlafkrankheit [69].

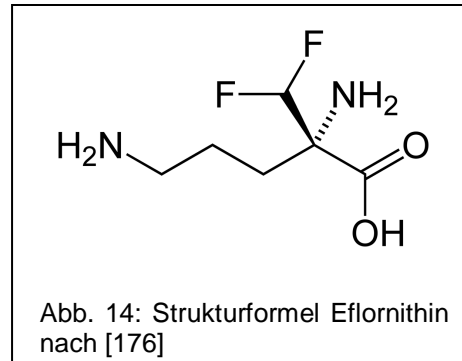
Erst jetzt war es möglich auch die zerebrale Schlafkrankheit zu heilen. Im Stadium II der ostafrikanischen Schlafkrankheit ist es nach wie vor der einzige Wirkstoff, der zur Verfügung steht. Bei der



westafrikanischen Form war es lange Zeit die Therapie der Wahl. Melarsoprol ist hochwirksam. Es ist in der Lage innerhalb von 24 h nach der ersten Injektion die Anzahl von Trypanosomen in Blut und Liquor unter die mikroskopische Nachweisgrenze zu drücken. Die IC_{50} liegt mit 0,7 ng/ml (Molekulargewicht: 398,33 g/Mol) etwas höher als die von Pentamidin, das aber wesentlich schlechter liquorgängig ist.

Leider ist Melarsoprol hochgiftig. Eine Zulassung für Europa existiert bis heute nicht. Gründe hierfür sind der Arsengehalt und das Lösungsmittel Propylen-Glykol. Ebenso sind die Häufigkeit und die Schwere der Nebenwirkungen beträchtlich. Es versterben aktuell immer noch bis zu 6,5% der Patienten wegen der Therapie [9]. Sehr gefürchtet ist die Encephalopathie, die bei 5-10% der Patienten vorkommt und eine Letalität von bis zu 70% zur Folge haben kann [170]. Eine begleitende Kortikoid-Medikation trägt zur Senkung des Risikos bei [14]. Typische Symptome sind Krampfanfälle, Psychosen, Verlust der Orientierung und Koma. Beinahe alle Patienten leiden während der Gabe unter Kopfschmerzen, Fieber und Schwächegefühl. Eine strikt intravenöse Gabe ist zwingend erforderlich. Es gibt sehr viele verschiedene Therapieprotokolle für Melarsoprol. Sie unterscheiden sich je nach Trypanosomen-Unterart und nationalen Vorgaben deutlich. Die Dauer liegt zwischen 10 und 35 Tagen und beinhaltet neun bis zwölf Gaben in meist ansteigenden Dosierungen [40]. Weiterhin problematisch ist die in Studien angegebene Resistenzquote von bis zu 20% der isolierten Stämme [13].

Anfang der 1980er Jahre tauchte plötzlich nach über drei Jahrzehnten wieder ein neues Medikament zur Therapie der Schlafkrankheit auf [104, 119]. Mit α -Difluoromethyleflornithin (DMFO), kurz Eflornithin, gab es plötzlich die weitere Möglichkeit Patienten mit *T.b. gambiense*-Infektionen zu heilen. Dies gelang sogar bei Melarsoprol-resistenten Infektionen im Stadium II [128]. Eflornithin, Handelsname Ornidyl[®], bekam schnell das Etikett des Wundermedikamentes. Anders als alle vorherigen Medikamente wurde der Wirkstoff nicht zur



Behandlung der Schlafkrankheit entwickelt. Es war vielmehr ein Zufallsfund. Entwickelt wurde Eflornithin als Zytostatikum zur Tumorbehandlung, konnte sich dort bislang aber nicht etablieren [102]. Die unerwünschten Wirkungen sind typisch für Zytostatika. Störung der Blutbildung mit Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie treten häufig (25-50%), gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall seltener (ca.10%) auf [127]. Eine terato- oder mutagene Wirkung konnte bislang nicht belegt werden. Eine typische Nebenwirkung ist zudem Haarausfall, in ca. 10%. Dies sollte sich als Glücksfall erweisen. Nachdem sich ab Anfang der 1990er Jahre Eflornithin in der Therapie der Schlafkrankheit etabliert hatte, wurde schon 1995 die Produktion wieder einge-

stellt. Die Produktion von injizierbarem Eflornithin ist wegen der Fluorchemie aufwendig und teuer. Aufgrund der finanziellen Gegebenheiten in den Ländern des Tse-tse-Gürtels ist es nicht möglich einen Eflornithin dort gewinnbringend zu

	Westafrikanische Schlafkrankheit (<i>T. b. gambiense</i>)	Ostafrikanische Schlafkrankheit (<i>T. b. rhodesiense</i>)
Stadium I	1. Wahl: Pentamidin 2. Wahl: Suramin	1. Wahl: Suramin 2. Wahl: Melarsoprol
Stadium II	1. Wahl: Eflornithin Ggf. + Nifurtimox 1. Wahl: Melarsoprol	1. Wahl: Melarsoprol 2. Wahl: Melarsoprol + Nifurtimox

Tab.1: Stadien- / und erregergerechte antitrypanosomale Therapie. Nach [47, 134, 151]
Je nach Staat und Verfügbarkeit der Medikamente gibt es stark abweichende Therapieschemata.

vertreiben. Ursprünglich wurde Ornidyl[®] von der Firma Merrell[®] hergestellt und vertrieben. Merrell[®] ging in Hoechst Marion Roussel[®] auf, das wiederum später zu einem Teil von Sanofi-Aventis[®] wurde.

2001 wurde Vaniqa[®], eine Creme gegen Hirsutismus, von Bristol-Myers-Squibb[®] und Gillette[®] auf den Markt gebracht. Vaniqa[®] enthält 13,9% Eflornithin [33]. Nun war dieser Wirkstoff weltweit ausschließlich zur Behandlung des Damenbartes verfügbar. Das Fehlen desselben Wirkstoffes in Afrika führte zu tausenden Toten. Dieses makabre Paradoxon ermöglichte es, den öffentlichen Druck auf die Pharmaunternehmen entscheidend zu erhöhen und eine Einbindung in das bereits oben genannte WHO-MSF-Programm zu erreichen [130, 153].

Standard ist im Moment eine Therapie über 14 Tage bei neu aufgetretenen Fällen und über 7 Tage bei Rezidiven [126]. Die übliche Dosis sind 100 mg/kg KG alle 6 h. Sie kann sowohl intravenös als auch oral gegeben werden. Die orale Applikation ist bei geringer oraler Bioverfügbarkeit von 54% und insgesamt unsicherer Resorption als ungünstig einzustufen [39]. Die Wirkung setzt im Vergleich zu den anderen antitrypanosomalen Wirkstoffen langsam ein. Erst nach vier Tagen lassen sich keine Parasiten mehr im Blut der Patienten nachweisen. Grund hierfür ist der trypanostatische Effekt, der durch die Hemmung der Ornithin-Decarboxylase erreicht wird.

Nifurtimox wird unter dem Handelsnamen Lampit[®] von der Firma Bayer[®] zur Therapie der Chagas-Krankheit produziert und seit 1967 eingesetzt. Eine Monotherapie mit diesem Wirkstoff gegen *Trypanosoma brucei* ist nicht ausreichend wirksam [20, 89]. Nifurtimox wirkt durch Hemmung der Nitrofurant-Reduktase. Dieses Enzym ist für die Bindung freier Radikale verantwortlich [62]. Zunächst wurde der Wirkstoff erfolgreich bei melarsoprol-resistenten *T. brucei gambiense* eingesetzt [129]. Es folgten kleinere Studien zur Kombinationstherapie von Eflornithin mit Nifurtimox. Die Kombination mit Eflornithin oder Melarsoprol zeigte darin Vorteile durch eine Reduktion von deren Nebenwirkungen zu haben [47, 134, 135, 151]. In der NECT-Studie zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Kombination aus Eflornithin und Nifurtimox gegenüber der Eflornithin-Monotherapie bei *T. brucei gambiense*-Infektionen [122, 134, 186]. Die

schon sehr hohen Heilungsraten von 92% im Stadium II konnten auf 97% gesteigert werden. Zudem ist bei diesem Therapieschema eine deutliche geringere Anzahl von Infusionen erforderlich. Die Patienten müssen weniger Tage in stationärer Behandlung bleiben. Durch weniger Infusionen sinken die Kosten für medizinische Verbrauchsmaterialien. Der logistische Aufwand sinkt insgesamt. Hierdurch kann neben besserer Wirksamkeit gleichzeitig eine Senkung der Kosten erreicht werden.

Leider ist die aktuelle Liste der möglichen neuen Medikamente sehr kurz. Der vielversprechendste Kandidat war einige Zeit DB 75 (furamidin dihydrochlorid; 2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochlorid). Der Wirkstoff entsteht aus dem oralen Prodrug DB 289 (2,5-bis[4-(*N*-methoxyamidino)phenyl]furan monomaleat) [94, 103]. Nach Abschluss der Studien musste dieser Wirkstoff angesichts seiner erheblichen Nebenwirkungen zurückgezogen werden [106].

5. Bedeutung in den betroffenen Regionen und Ausblick

Die afrikanische Trypanosomiasis hat ihren Schrecken aus der Zeit Robert Kochs und Paul Ehrlichs nicht verloren. Der Kampf gegen die Schlafkrankheit schien gegen Ende der 1960er Jahre des letzten Jahrhunderts schon fast gewonnen [142]. Hierfür bietet die afrikanische Schlafkrankheit damals wie heute einige gute Voraussetzungen. Die Krankheit ist bereits in frühen Stadien diagnostizierbar und kann selektiv behandelt werden.

Die Übertragung ist an den Vektor Tse-Tse-Fliege gebunden und somit Vektor-kontrollprogrammen gut zugänglich. So gelang es die Tse-Tse-Fliege auf Sansibar auszurotten [165].

Allerdings kamen in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts noch zwei Dinge hinzu. Die damaligen Kolonialmächte hatten aus eigenen wirtschaftlichen Interessen heraus das Bestreben die Krankheit unter Kontrolle zu bekommen. Mit intensiven Screening- und Therapieprogrammen mit den damals neuen – und extra hierfür entwickelten - Medikamenten Pentamidin, Suramin und Melarsoprol konnte diese Krankheit auf einige wenige Neuerkrankungen pro Jahr zurückgedrängt werden [168].

Inzwischen habe die Fallzahlen annähernd das Niveau der Zeit, vor Einführung der genannten Medikamente erreicht [38, 167, 169]. Im Jahr 2005 beobachtete die WHO drei große Ausbrüche in Angola, der Demokratischen Republik Kongo und dem Sudan [1, 168]. Durch das Ende der Kolonialzeit, die darauf folgenden

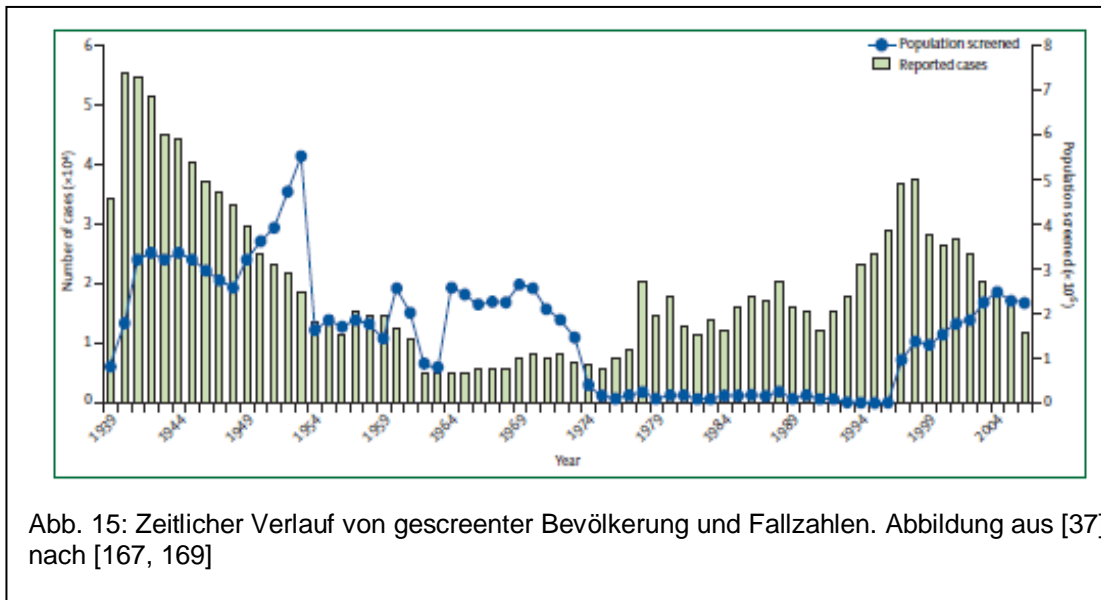


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf von gescreenter Bevölkerung und Fallzahlen. Abbildung aus [37] nach [167, 169]

Bürgerkriege und den damit verbundenen Zusammenbruch aller staatlichen Ordnung wurde der Boden für die Rückkehr der Schlafkrankheit bereitet. Dieser Zusammenhang besteht auch weiterhin. Der über Jahrzehnte dauernde Bürgerkrieg in Angola konnte 2002 beendet werden. Die beiden anderen Staaten befanden sich 2005 noch im Kriegszustand.

Hinzu kommt das Fehlen eines weiten öffentlichen Interesses in der westlichen Welt, da hier die Schlafkrankheit nur als seltene importierte Infektion auftritt [64, 90, 107].

Selbst volkswirtschaftlich wäre die Ausrottung der Trypanosomiasis eine sehr sinnvolle Sache. Der Gesamtschaden wird auf 4,5 Milliarden US\$ jährlich geschätzt [160]. Durchschnittlich verliert ein Todesopfer der Schlafkrankheit 23 DALYs, ein erfolgreich Behandelter nur 0,21 DALYs. Umgerechnet ergibt dies bei einer Behandlung mit Melarsoprol Kosten von circa 8 US\$ pro gewonnenem DALY.

Rechnet man noch die Therapie von Nutztieren, besonders der Rinder ein, werden die Kosten der Therapie durch den volkswirtschaftlichen Nutzen deutlich übertroffen [146]. Denn die Behandlung der Tiere bringt diverse positive

Effekte, wie zum Beispiel die Reduktion der Hyänen-Opfer in Kuhherden auf 1/6 [68].

Trypanosomen werden weltweit intensiv erforscht. Sie sind aufgrund ihrer unkomplizierten Züchtung Modellorganismen für eukaryontische Zellen. Viele wichtige Erkenntnisse zu Genregulation, RNA-processing oder immunologischen Vorgängen wurden zuerst an Trypanosomen entdeckt. Leider wird im Gegensatz dazu nur in sehr geringem Ausmaß an der Entwicklung neuer und Verbesserung bekannter Therapien gearbeitet [156]. Dies spiegelt sich auch in der Zahl der hierzu veröffentlichten Fachartikel und deren Inhalten wieder [152].

6. Naphthylisochinolinalkalolide



Abb. 16: *Triphyophyllum peltatum*. Bild aus dem botanischen Garten Würzburg. [77]

Naphthylisochinolinalkalolide (NIQ) sind Naturstoffe, die aus tropischen Lianen der Familien der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae isoliert werden konnten.

Die Pflanzen kommen in den tropischen Regenwäldern Indiens und Afrikas vor. Dort werden sie als Naturheilmittel unter anderem gegen Malaria, Durchfall und Filariosen verwendet. Die Ancistrocladaceae bestehen

nur aus einer Spezies: *Ancistrocladus* mit über 20 Unterarten [27]. Die Dioncophyllaceae bestehen aus drei Spezies, von denen *Triphyophyllum peltatum* die Wichtigste ist [29]. Sie ist zum einen wegen ihrer teilweise karnivoren Lebensweise zum anderen aber wegen des Vorkommens *N,C*-gekuppelter Naphthylisochinoli-

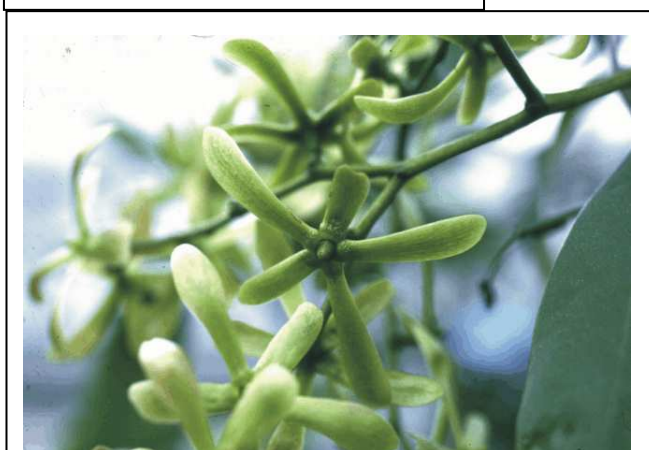
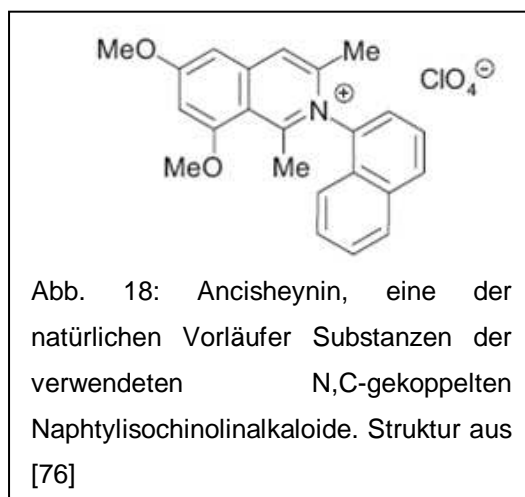


Abb. 17: Blüten von *Triphyophyllum peltatum*. Bild aus dem botanischen Garten Würzburg. [77]

nalkaloide von Bedeutung [25].

Die Isolation eines Naphthylisochinolinalkaloids gelang erstmals 1970 [73]. Professor Gerhard Bringmann vom Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg gelang im Jahr 2000 der Nachweis des Syntheseweges und die Entdeckung der meisten bislang isolierten Substanzen dieser Gruppe [30, 31, 76]. Das Grundgerüst bildet bei dieser Substanzgruppe das Isochinolin, an welches eine Naphthalin-Einheit geknüpft ist. Im Rahmen des Sonderforschungsbereich (SFB) 630 wird versucht, möglichst selektive Wirkstoffe gegen verschiedene Krankheitserreger zu synthetisieren.

Wie aus den bisherigen Ergebnissen des SFB 630 hervorgeht, haben die Naphthylisochinolinalkaloide eine breite Wirksamkeit gegen verschiedene Krankheitserreger [26, 28, 133]. Die Spezifität der Wirksamkeit hängt, ebenso wie die Toxizität, von den unterschiedlichen Substituenten ab [76]. *N,C*-verknüpfte Naphthylisochinolinalkaloide weisen im Vergleich zu den *C,C*-verknüpften eine höhere antitrypanosomale Aktivität auf. So zeigte sich bei der



Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Tanja Gulder, dass ein hydrophiler, elektronenschiebender Aryl-Teil die Selektivität für *Trypanosoma brucei brucei* deutlich steigert [76]. Ebenso ist die Stellung des Substituenten von entscheidender Bedeutung. So sind *ortho*- und *meta*-*O*-Methyl-Derivate analogen *para*-Verbindungen an Wirksamkeit deutlich überlegen. Bemerkenswert ist zudem, dass sich durch diese beiden Schritte eine deutliche Erhöhung der Selektivität im Vergleich zu *Leishmania-major*-Promastigoten erreichen lässt.

Leider sind die meisten Substanzen mit guter Wirksamkeit gegen die Parasiten auch für menschliche Zellen toxisch. Sie sind wahrscheinlich letztlich unselektiv wirksam und aufgrund der Toxizität auch als Medikament nicht einsetzbar.

7. Zielsetzung dieser Arbeit

Trypanosomen der Art *T. brucei* spp. gehören zu den am besten erforschten Organismen überhaupt [152]. Dies betrifft allerdings fast ausschließlich die Grundlagenforschung. Für das Jahr 2009 fanden sich unter dem Schlagwort „Trypanosoma brucei“ 358 Artikel in Fachzeitschriften (Stand: pubmed 06.04.2010). Hierunter waren fünf Studien zur Therapie am Menschen. Keine Studie untersuchte neue Wirkstoffe. Deshalb wurde in diesen 5 Studien die Kombination bereits bekannter Medikamente untersucht. Beinahe fatalistisch wurde von einigen Autoren die Aussicht auf neue Wirkstoffe beurteilt.

Neben allen grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen darf das letztliche Ziel, nämlich die Entwicklung neuer Therapien, nicht vergessen werden. Erfreulich ist in diesem Zusammenhang, dass sich über 10% der publizierten Artikel mit neuen Wirkstoffen befassen. Dies sind zumeist neue chemische Substanzen, die in Zellkultur antitrypanosomal wirksam sind. Dies ist die notwendige Basis zur Entwicklung neuer Medikamente. Denn nur ein Bruchteil der in Zellkultur wirksamen Substanzen erfüllt die notwendigen Voraussetzungen zur Zulassung als Medikament.

In den Zytotoxizitätstests zeigten sich einige Naphthylisochinolinalkaloide, die sowohl eine gute antitrypanosomale Wirksamkeit, als auch eine selektive Wirksamkeit auf sich vereinen konnten. Ein Ziel dieser Arbeit war nun, aus den getesteten Wirkstoffen mit antitrypanosomaler Aktivität diejenigen zu identifizieren, die eine gute Wirksamkeit mit einer möglichst hohen Selektivität verbinden. Denn diese Wirkstoffe könnten mögliche Kandidaten für die Entwicklung neuer Medikamente gegen die Schlafkrankheit sein.

Bei Beginn der Arbeit lagen nur die Daten aus den Zytotoxizitätstestungen vor. Bei bekannter Wirksamkeit war die Art und Weise der Wirkung noch unbekannt. Deshalb war das zweite Ziel dieser Arbeit, zu beginnen den Wirkmechanismus aufzuklären.

Hinweise über den Wirkmechanismus der Naphtylisochinolin-Alkaloide bei anderen Parasiten lagen zu diesem Zeitpunkt bereits vor, insbesondere zur Wirkung bei den den Trypanosomen eng verwandten Leishmanien.

II. Material und Methoden

1. Allgemein

1.1. Parasiten

Trypanosoma brucei rhodesiense und *Trypanosoma brucei gambiense*, die Erreger der humanen Afrikanischen Trypanosomiasis erfordern Laborbedingungen der Sicherheitsstufen 2 und 3. Genetisch sind die humanpathogenen Trypanosomen sehr eng mit *Trypanosoma brucei brucei* verwandt. Die Ergebnisse sind sehr wahrscheinlich auf die humanpathogenen Trypanosomen, besonders *Trypanosoma brucei rhodesiense* übertragbar [100, 149]. Der hier verwendete Erreger wird von humanem Blutplasma lysiert und ist nicht humanpathogen [124]. Deshalb ist es möglich in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 zu arbeiten. Für alle Untersuchungen wurden Trypanosomen der Gattung *Trypanosoma brucei brucei*, Stamm TC221, verwendet. Die Blutstromform ist an Kulturbedingungen gut adaptiert und eignet sich daher für *In-vitro*-Arbeiten [91]. Wie oben beschrieben ist *Trypanosoma brucei brucei* ein Erreger der Nagana, einer Tierseuche im afrikanischen Tse-Tse-Gürtel.

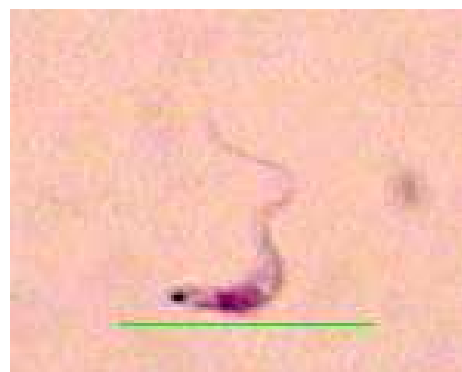


Abb. 19: Größenverhältnisse bei *Trypanosoma brucei brucei* (Giemsa-Färbung); 100fache optische Vergrößerung. Die grüne Markierung entspricht 20µm. [Foto selbst]

1.2. Kultur

Die trypomastigote Form von *Trypanosoma brucei brucei* des Laborstammes TC 221 wurde im Brutschrank Typ Heraeus Instruments® bei 36,9 °C und 4,9% CO₂ in 5 ml Baltz-Medium kultiviert. Hierzu wurden sterile Zellkulturflaschen 25 cm³ der Firma Biochrom® mit luftdurchlässigem Schraubverschluss verwendet. Die während des Wachstums der Parasiten anfallenden Stoffwechselendpro-

dukte führen zu einem verlangsamten Wachstum und dann zum Absterben der Zellen. Deshalb wurde die Kultur im Abstand von 2 Tagen mit ca. 0,1 ml Zellkultur in neues Medium überimpft.

Im Abstand von 6 Monaten wurde die Kultur durch Auftauen und Anzüchten neuer Stabilate erneuert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellkultur mindestens dreimal mit Medium gewaschen und damit restliches Glycerin aufgrund seiner toxischen Wirkung entfernt wurde. Das Abdekantieren erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 U/min für 10 Minuten [81]. Die Herstellung der Stabilate erfolgte, wie auch die weitere Anzüchtung der Kultur, wie in der Dissertation von Verena Hörr und in SOP M-Z1-007-01 beschrieben [81, 145].

1.3. Medium

1.3.1. Baltz-Medium Basis Lösung

Die Baltz-Medium Basis Lösung basierte auf 500 ml Basis MEM-Lösung (+Earle's-Reagenz, -L-Glutamin) von Gibco® [10]. In 50 ml dieser Lösung wurden die nachfolgenden Substanzen gelöst: 3 g HEPES, 500 mg Glukose-Monohydrat, 146 mg L-Gluthamin, 110 mg Natrium-Pyruvat, 14,1 mg Bathocuproninsulfonat, 10,7 mg Adenosin, 7 mg Hypoxanthin, 2 mg Thymidin. Die Substanzen stammten von Roth®. Die Lösung wurde 30 min gerührt, der pH-Wert mit 3M KCl oder 4M NaOH auf 7,5 eingestellt und steril filtriert. Nach Zusatz von 5 ml nicht-essenzieller Aminosäuren (NEAA, 100x, Gibco®) wurde mit der MEM-Lösung auf 500 ml aufgefüllt. Die Baltz-Medium-Basis-Lösung wurde bei 4 °C gelagert und war über mehrere Wochen stabil [81].

1.3.2. Baltz-Medium Komplett-Lösung

Die Baltz-Medium Komplett-Lösung bestand, wie in der Dissertation von Verena Hörr beschrieben, aus 40 ml Baltz-Medium Basis Lösung, 8 ml inaktiviertem Kälberserum 0,4 ml β -Mercaptoethanol-Stammlösung und 0,4 ml Penicillin/Streptomycin (Fertiglösung von Biochrom®) [10]. Das Medium wurde bis zu

seiner Verwendung, aber maximal 14 Tage, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert [81].

Das inaktivierte Kälberserum wurde von der Firma Biochrom® bezogen. Die 500 ml Flaschen wurden in 50 ml Portionen aliquotiert und bei -30 °C tief gefroren. Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Danach erfolgte bei 56 °C für 30 Minuten die Inaktivierung.

Die β -Mercaptoethanol-Stammlösung bestand aus β -Mercaptoethanol der Firma Sigma®. Davon wurden 14,2 μ l mit 10 ml H₂O verdünnt und steril filtriert.

1.4. Antitrypanosomale Wirkstoffe

1.4.1. Amphotericin B

Amphotericin B ist ein seit Jahren etabliertes und weitverbreitetes antiinfektives Medikament. Das Molekulargewicht beträgt 924,08 g/mol. Amphotericin B ist ein Naturprodukt und stammt von Actinobakterien der *Streptomyces* spp.. Es gehört zur Gruppe der Polyen-Antimykotika [147]. Durch Bindung an Sterole, besonders Ergosterol, hemmt es die Bildung der Zell-

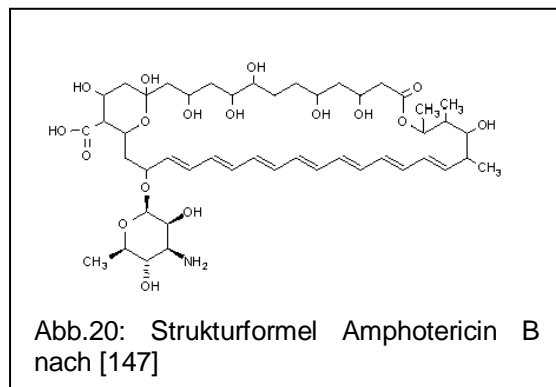


Abb.20: Strukturformel Amphotericin B nach [147]

membran und führt zur Porenbildung. Dadurch bricht der osmotische Gradient der Zellen [22, 164]. Amphotericin B war lange Zeit Therapie der Wahl bei invasiven Mykosen. Inzwischen wurde es aufgrund seiner Toxizität bei vielen Indikationen von den neueren Antimykotika der Azolgruppe abgelöst [49]. Bei sehr schweren Verläufen oder immuninkompetenten Patienten ist es weiterhin Therapie der Wahl. Außerdem kann es zur Therapie verschiedener anderer Infektionserreger wie der Leishmaniose eingesetzt werden [21].

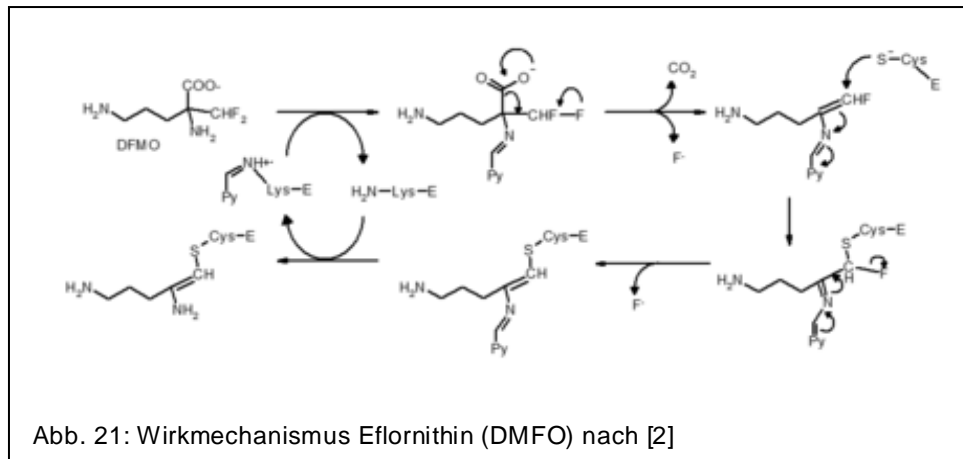
Für Amphotericin B ist eine apoptose-induzierende Wirkung auf Trypanosomen beschrieben [52]. Der Wirkstoff wurde als Positivkontrolle für Apoptose in den einzelnen Versuchen benutzt. Soweit nicht anders dargestellt, wurde der Litera-

turwert von 0,18 µg/ml in den Proben hergestellt. Das Pulver wurde in DMSO gelöst und bei 4 °C gelagert. Bezogen wurde es von Sigma-Aldrich®.

1.4.2. Eflornithin

Eflornithin ist eine wichtige Säule in der Therapie der Schlafkrankheit [9]. Der Wirkme-

chanis-
mus be-
steht in
der irre-
versiblen
Blockade
der Or-
nithin-

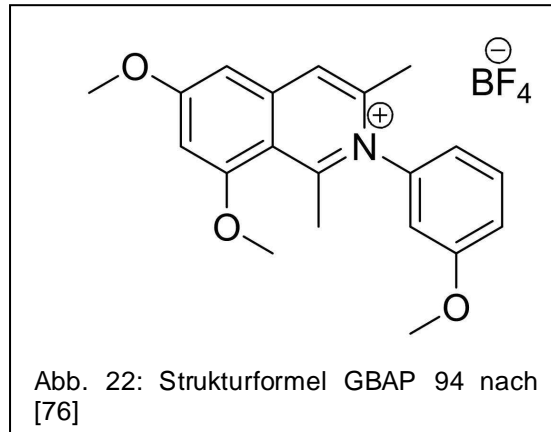


Decarboxylase und ist trypanostatisch [8]. Eine apoptose-induzierende Wirkung ist für Eflornithin nicht beschrieben. Die Molmasse beträgt 182 g/mol. Eflornithin wurde als nicht apoptose-induzierender Wirkstoff zur Kontrolle eingesetzt. Die IC₅₀ liegt bei 22,9±4,6 µM, gemessen an *Trypanosoma brucei brucei* im Missionsärztlichen Institut von Verena Hörr [81]. Der Literaturwert liegt bei 11,5 µM [109]. In den Versuchen wurde aufgrund dieser Ergebnisse eine Konzentration von 22 µM verwendet. Der Wirkstoff wurde von Aventis® bezogen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Hierunter ist es einen Monat haltbar.

1.4.3. GBAP 94

GBAP 94 ist ein Arylisochinolin aus der Gruppe der *N,C*-gekuppelten Naphtylisochinolin-Alkaloide. Die systematische Bezeichnung ist *N*-(3'-Methoxyphenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtetrafluoroborat. GBAP94 ist ein weißes Öl. Die Summenformel ist C₂₀H₂₂BF₄NO₃. D. Die Molmasse beträgt 411,20 g/mol.

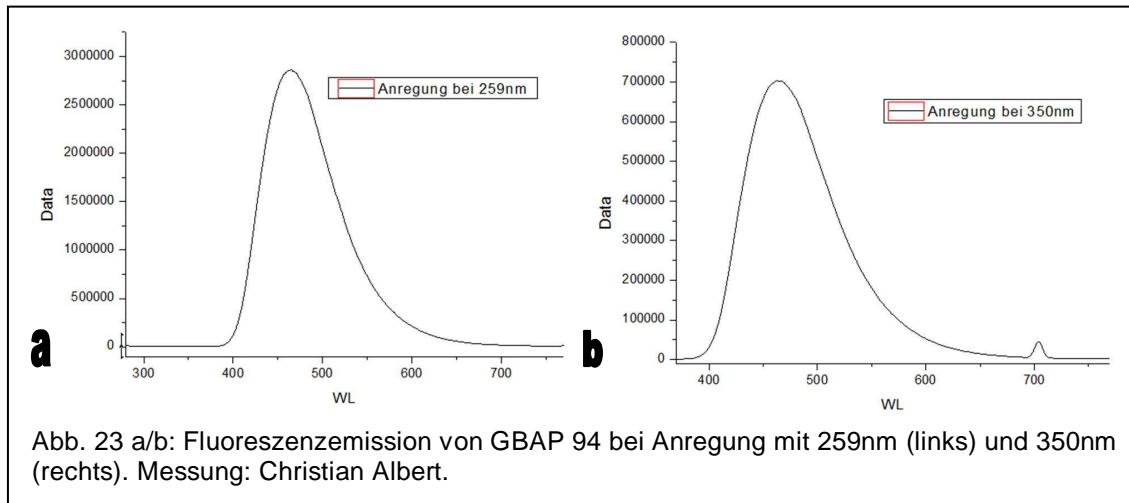
Bei dem Wirkstoff sind – wie auch bei GBAP 146 – der Naphtyl- und der Chinolin-Anteil über eine N-C-Achse gekoppelt. GBAP 94 besitzt zwei Fluoreszenzmaxima bei einer Anregung mit 350 nm Wellenlänge bei 465 nm, und bei Anregung mit 259 nm bei 463 nm. Die Substanz



wurde mit DMSO verdünnt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Eine Untersuchung von Tanja Gulder nach 15 Monaten ergab, dass die Substanz zu diesem Zeitpunkt weiterhin stabil war.

Die übliche Endkonzentration des Stoffes bei den Versuchen betrug 0,383 µmol/l, diese entspricht der IC₅₀ für Trypanosomen.

Der Wirkstoff wurde von Tanja Gulder aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gerhard Bringmann im Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg entwickelt und mir im Rahmen des SFB 630 zur Verfügung gestellt.

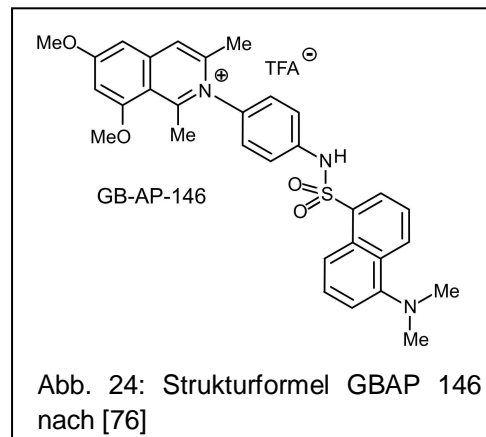


1.4.4. GBAP 146

N-(4'-*N*'-Dansylaminophenyl)-6,8-dimethoxy-1,3-dimethylisochinoliniumtrifluoroacetat ist ein hellgelber Feststoff. Die der IC_{50} für Trypanosomen liegt bei 0,289 $\mu\text{mol/l}$. In dieser Konzentration wurde der Wirkstoff verwendet. Die molare Masse beträgt: 618 g/mol. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Substanz ist mit einer IC_{50} bei Makrophagen von 4,98 $\mu\text{mol/l}$ relativ toxisch. Sie ist deshalb kein Kandidat für ein Medikament. In den ersten lichtmikroskopischen Versuchen zeigte sich kein morphologischer Unterschied zu GBAP 94. Aufgrund deutlich besserer Fluoreszenzeigenschaften wurde GBAP 146 besonders für die ersten fluoreszenzmikroskopischen Versuche verwendet. GBAP 146 fluoresziert blau. Die Fluoreszenzmaxima liegen im Bereich derer von GBAP 94. Im Verlauf wurde GBAP 146 durch GBAP 94 auch hier

ersetzt. Es zeigten sich allerdings auch hier keine morphologischen Unterschiede, so dass ein ähnlicher Wirkmechanismus beider NIQs bei Trypanosomen durchaus möglich ist. Ungeklärt ist, wie dabei der große Dosisunterschied in der Wirkung auf menschliche Zellen zustande kommt.



1.5. Mikroskope und FACS®

1.5.1. Olympus® CX40

Die meisten Vorversuche wurden an diesem Mikroskop gemacht und gegebenenfalls mit der angeschlossenen Olympus® C-5060 Digitalkamera dokumentiert.

1.5.2. Olympus® CK2

Mit diesem inversen Mikroskop wurde orientierend das Wachstum und der Zustand der Trypanosomen in den Kulturflaschen untersucht.

1.5.3. Zeiss Axioskop 40

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zu den morphologischen Veränderungen der Trypanosomen wurden an diesem Mikroskop durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit der eingebauten Digitalkamera des Typs „JVC Color video digital“. Die Auswertungen wurden mit dem Computerprogramm Hund MicroCom 2.2.4.1 der Firma Hund Wetzlar durchgeführt.

1.5.4. Fluoreszenzmikroskop Zeiss® AxioTech 100

Für alle fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde das Mikroskop Zeiss AxioTech 100 verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einer Zeiss-AxioCam HR® Kamera gemacht und mit der zugehörigen Software gespeichert.

1.5.5. Durchflußzytometrie - FACS® - Facscalibur®

FACS® ist ein Akronym und Handelsmarke der Firma Becton Dickinson®. Es steht für fluorescence activated cell sorting [18, 118]. Anders, als das Akronym vermuten lässt, werden die Zellen nicht sortiert, sondern nur gemessen und gezählt. Innerhalb des Gerätes gelangen die Zellen in die Durchflusszelle, den Hauptteil. Dies ist eine sehr feine Kapillare, durch die die Zellen einzeln hintereinander fließen. In der Durchflusszelle werden die Zellen dann von einer Laser-Lichtquelle angestrahlt und das emittierte Licht mittels verschiedener Detektoren für jede Zelle einzeln gemessen. Es ist so möglich zwei Parameter aufzuzeichnen: Forward Scatter (= FSC) und Sidewards Scatter (= SSC). Beim FSC wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel bestimmt. Der FSC ist ein

Maß für die Größe der Zelle. Beim SSC werden die Zellen im 90°-Winkel angestrahlt. Der SSC ist ein Maß für die Granulierung der Zelle.

Passieren die Zellen nicht nur einen Laser, sondern mehrere in verschiedenen Farben, ist es möglich einer Zelle mehrere Marker zuzuordnen. Hierzu ist es nötig die Zellen vorher mit Fluoreszenzmarkern zu markieren. Als Detektoren werden in der Regel Photomultiplier verwendet, die die eingehenden Signale verstärken und auf verschiedene Detektoren für die einzelnen Spektralbereiche aufgliedern. Die Signale werden dann mittels Computer aufgezeichnet und ausgewertet.

Wie auch bei der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich mittels selektiver Farbstoffe oder markierter Antikörper spezifisch zu färben. Allerdings steht nicht die Markierung bestimmter Kompartimente der Zellen im Vordergrund, sondern die spezifische Markierung der Zellen.

Die Durchflußzytometrie besitzt zwei große Vorteile gegenüber der manuellen Auszählung am Fluoreszenzmikroskop. Der eine ist die Möglichkeit bis zu 1000 Zellen pro Sekunde zu zählen und so wesentlich einfacher und schneller große Datenmengen zu erhalten. Zweitens ist es leichter möglich, Doppelmarkierungen der Zellen zu quantifizieren.

Die Hauptanwendung neben der molekularbiologischen Forschung besteht in der Verwendung in der Labormedizin, beispielweise zur Erstellung von Differentialblutbildern oder der selektiven Auszählung von CD4⁺-T-Zellen bei HIV-Patienten.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde ein Gerät des Typs Facscalibur[®] der Firma Becton Dickinson[®] benutzt. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit der zugehörigen Software CellquestPro[®].

1.6. Sonstige Materialien

1.6.1. Sterile Werkbank

Alle Pipetierschritte für den AlamarBlue[®]-Assay, das Umsetzen der Trypanosomenkultur in frisches Medium und das Aliquotieren des Wirkstoffe wurden unter einer sterilen Werkbank vorgenommen.

1.6.2. Weitere Reagenzien

1.6.2.1. PBS

PBS ist die Abkürzung für die englische Bezeichnung: „phosphate buffered saline“, übersetzt Phosphat-gepufferte Salzlösung. PBS ist eine häufig verwendete Pufferlösung, die isotonisch und für Zellen nicht toxisch ist. Die Eigenschaft als Pufferlösung ermöglicht das Arbeiten bei einem konstanten pH-Wert. Sie enthält 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphat und ist auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. PBS wurde als Fertiglösung von der Firma Gibco[®] bezogen.

1.6.2.2. Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd ist eine Sammelbezeichnung für kurzkettige Polymere des Formaldehyds. Paraformaldehyd wird häufig zur Fixierung von Geweben oder Zellkulturen verwendet. Die Fixierung entsteht durch reversible Vernetzung der Proteine. Paraformaldehyd-Lösung ist ein gängiges Fixans für Trypanosomen [131]. Es ist gesundheitsschädlich und möglicherweise krebserregend.

Paraformaldehyd wurde in einer Konzentration von 4% von der Firma Roth[®] bezogen.

1.6.3. Zentrifugen

Als Zentrifugen wurden Heraeus[®] Biofuge 15, Hettich[®] Potanta TRC oder Heraeus[®] Multifuge genutzt. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Trypanosomen bei 1300 U/min 10 min lang zentrifugiert.

1.6.4. Agarose

Für die Versuche wurde Low-melt-Agarose der Firma Roth[®] verwendet. Die Schmelztemperatur liegt bei 65,5°C, die Geliertemperatur bei ca. 28°C [41]. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Agarose wurde im Wasserbad auf Schmelztemperatur erhitzt und 100 µl daraus anschließend auf einen Objektträger pipetiert. In diesen Tropfen wurden 20 µl Trypanosomen aus Kultur gegeben. Mittels eines Deckgläschens wurde direkt danach das Präparat zusammengedrückt, um eine mikroskopierbare Dicke zu erreichen. Für eine ausreichende Immobilisation musste eine Konzentration von 7% benutzt werden.

1.6.5. Objektträger

Es wurden handelsübliche unbeschichtete Objektträger im Format 24x50 mm oder 24x60 mm der Firmen Roth[®], Menzel-Gläser[®] und Star-Frost[®] benutzt.

1.6.6. Bildbearbeitung

Die Photos wurden mit den oben beschriebenen Programmen mit maximaler Auflösung im *.jpg-Format oder bitmap-Format gespeichert. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit JASC[®] Paint Shop Pro 8 Version 8.10 von JASC Software Inc..

1.6.7. Textverarbeitung

Die Textverarbeitung erfolgt mit Microsoft® Word 2002.

2. Vitalitätstestung

Zur Auswahl der geeignetsten NIQs wurden die Ergebnisse aus dem AlamarBlue®-Test verwendet. Der AlamarBlue®-Test dient der Wachstumsbestimmung von Zellen und basiert auf dem Farbstoff AlamarBlue®. Dieser ist ein Reduktions-oxidations-(REDOX)-Indikator. Durch seine Interaktion mit den Coenzymen NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN und NADH/NAD wird der Farbstoff hauptsächlich in Glykolyse und Citrat-Zyklus von Resazurin zu Resorulfen reduziert. Im Grundzustand liegt AlamarBlue® in der oxidierten Form, als Resazurin vor. Dieses ist indigoblau und hat ein Absorptionsmaximum von 600 nm. Resorulfen ist pink, das Absorptionsmaximum 570 nm. Hierdurch kann AlamarBlue® als Stoffwechselindikator genutzt werden. Wachstum zeichnet sich visuell durch einen Farbumschlag von blau nach pink aus. Bei Hemmung des

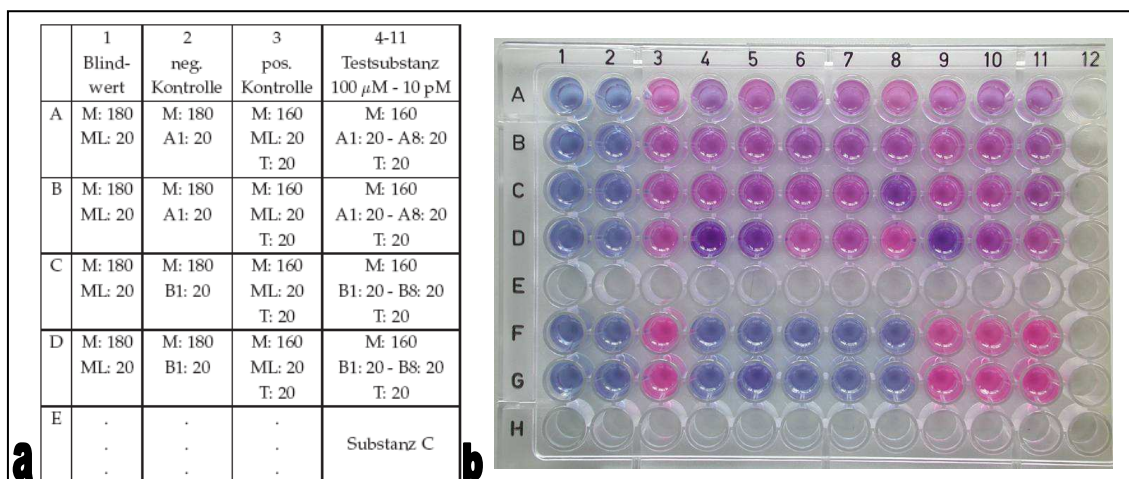


Abb. 25 a/b: a: Schematisches Pipetierprotokoll für die Zytotoxizitäts-tests bei *T. brucei brucei*. (M = Medium, ML = Medium mit 10% Lösungsmittelanteil, zumeist DMSO, T= Trypanosomensuspension mit 10^5 Zellen/ml, A, B, C: Arbeitslösungen der entsprechenden Testsubstanzen A, B, C. Die Werte in der Tabelle sind in µl angegeben. [81, 145]

b: Microtiterplatte mit Vitalitätstest. Blaue / dunkle Felder: Geringe Stoffwechselaktivität von Trypanosomen; entspricht geringer Anzahl von Trypanosomen durch hohe Aktivität des Wirkstoffes. Pinke Felder: Hohe Stoffwechselaktivität der Trypanosomen; entspricht geringer Aktivität des Wirkstoffes. Reihe 1 und 2 sind Kontrollen ohne Trypanosomen.

Wachstums fällt der Farbumschlag entsprechend schwächer aus oder entfällt ganz. Zur Quantifizierung der Farbreaktion erfolgt eine spektralphotometrische Messung nach 24 h und 48 h. Der Test erfolgt in 96-Loch Mikrotiterplatten.

Der Test wurde von Karin Merschjohann für *Trypanosoma brucei brucei* TC221 etabliert. Verena Hörr optimierte im Rahmen ihrer Dissertation in unserem Institut den Test bezüglich Zelldichte, Inkubationszeiten und die Zusammensetzung des Mediums [81, 109]. Die verwendeten Ergebnisse für Trypanosomen stammen aus Tests von Melanie Glaser nach den Protokollen von Verena Hörr [154].

3. Lichtmikroskopie

3.1. Färbungen

Ein Ziel der lichtmikroskopischen Untersuchungen war es morphologische Veränderungen nach der Behandlung mit den NIQ-Wirkstoffen zu erfassen. Außerdem sollte die Kinetik der Veränderungen verfolgt werden. Hierzu gab es einige Vorversuche, bei denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Parasiten teils nativ, teils nach Giemsa-Färbung mikroskopiert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Zeitpunkte für die genauen Messungen festgelegt.

Ein weiteres Ziel war es, die beste Methode zur Immobilisation vitaler Parasiten für die Fluoreszenzmikroskopie herauszufinden. Hierzu wurde die Trypanblau-Färbung genutzt. Aufgrund der langen Belichtungszeiten bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist eine gute Immobilisation sehr wichtig, um überlagerungsfreie Bilder zu erhalten. Die Trypanblau-Färbung ermöglichte beim Testen der unterschiedlichen Methoden relativ unkompliziert das Verhältnis vitaler zu avitalen Trypanosomen zu ermitteln.

3.1.1. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist, besonders in der Diagnostik, eine der lichtmikroskopischen Standard-Färbungen für *Trypanosoma brucei* [46, 108]. Die Giemsa-Stammlösung wurde von der Firma Merck® bezogen. Diese wurde im Verhältnis

1:10 mit Wasser verdünnt und filtriert. Die Trypanosomen wurden vor der Färbung auf einen Objektträger pipetiert und luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate 10 Sekunden in einem Methanolbad fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit der unbehandelten Seite nach oben auf eine Färbekbank gelegt. Nachfolgend wurde diese aufgefüllt bis die Präparate vollständig von unten bedeckt waren. Nach 30 min wurden die Objektträger unter fließendem Wasser vorsichtig abgespült und trocken getupft.

Für die morphologischen Untersuchungen wurden die Trypanosomen in vier verschiedenen Proben angesetzt. Aus einer unbehandelten Kultur mit 20 ml Volumen wurden je 5 ml in frische Zellkulturflaschen gefüllt. Eine Probe davon wurde als unbehandelte Kontrollgruppe genutzt. Außerdem wurde je 5 ml Ansatz mit Amphotericin B, Eflornithin und GBAP 146 hergestellt. Aus allen vier Ansätzen wurde nach einer, zwei und vier Stunden je 1 ml in ein Eppendorf-Cup überführt und 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Vom Bodensatz wurden dann 20 µl auf einen Objektträger pipetiert und dann an der Luft getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Präparate nach dem obigen Protokoll gefärbt. Die Analyse wurde am Zeiss[®] Axioskop 40 durchgeführt und umfasste die Photodokumentation mit anschließender Längen- und Breitenmessung von 100 freiliegenden Trypanosomen pro Objektträger. Außerdem wurden bei den 2 h Proben von Amphotericin B und GBAP 146 alle photographierten Parasiten gezählt und das Verhältnis derer, die morphologisch stark auffällig waren, zur Gesamtzahl bestimmt.

3.1.2. Trypanblau-Färbung

Trypanblau färbt selektiv tote Zellen blau an. Die Färbung eignet sich deshalb sehr gut zur Vitalitäts-Kontrolle [65].

Zur Färbung wurde eine Konzentration von 0,1 ml Trypanblau pro 1 ml Kultur zugegeben. Die Präparate konnten direkt mikroskopiert werden.

Ziel dieser Versuche war eine Methode zu finden, mit der man vitale, aber immobile Trypanosomen erhielt. Dies ist nötig, um trotz der relativ langen Belichtungszeit der Kamera scharfe Photos von fluoreszenzmikroskopischem Präpa-

raten machen zu können. Diese Versuche zur Immobilisierung wurden aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit am Lichtmikroskop durchgeführt.

Hierfür wurden zwei Methoden verwendet, von denen bei der Erstellung der Bilder nur die zweite zum Einsatz kam. Die erste bestand aus dem oben beschriebenen Eingießen der Trypanosomen in Agarose.

Die zweite Methode bestand in der Immobilisation durch PBS. Hierzu wurde 1 h vor dem Mikroskopieren das Medium abzentrifugiert und durch PBS ersetzt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit je 1 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Nach Abzentrifugieren des Kulturmediums wurden die Parasiten in Medien resuspendiert, die aus unterschiedlichen Verhältnissen aus PBS und Baltz-Medium bestanden. Die Konzentrationen gingen von 90% Baltz-Medium mit 10% PBS bis zu 100% PBS. Danach wurden zu den Zeitpunkten 15 min, 30 min und 60 min je 20 µl entnommen, in der obigen Konzentration mit Trypanblau gefärbt. Die ungefärbten Parasiten wurden dann orientierend auf ihre Mobilität untersucht.



Abb. 26: Totes Trypanosom, gefärbt mit Trypanblau. Positive Färbekontrolle nach Behandlung mit Paraformaldehyd.

4. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Lokalisation der NIQs innerhalb der Trypanosomen verwendet. Weitere Ziele waren der Versuch eine Co-Lokalisation eines Wirkstoffes mit spezifischen Fluoreszenz-Markern zu erreichen. Zudem sollten spezifische Veränderungen in den Parasiten aufgrund der Behandlung erfasst werden.

Die Versuche wurden an vitalen Parasiten durchgeführt. Die Trypanosomen mussten, wie oben beschrieben, immobilisiert werden. Aufgrund der Eigenbewegung der Parasiten wäre es sonst nicht möglich gewesen, scharfe Photoaufnahmen zu erhalten.

Für alle Fluoreszenz-Aufnahmen galten zudem folgende Voraussetzungen. Es wurde in 1 ml Trypanosomen-Kultur eine Parasiten-Zahl von 10^6 /µl eingestellt.

Das Medium wurde abzentrifugiert und zur Immobilisation durch PBS ersetzt. Die Farb- und Wirkstoffe wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten später hinzugefügt. Bei Versuchen mit Inkubationszeiten über einer Stunde wurde die entsprechende Konzentration des Wirkstoffes zunächst zum Medium hinzugefügt. Nach Zugabe von PBS wurde die Farb- bzw. Wirkstoffkonzentration wiederhergestellt. Die Inkubation erfolgte ebenso lichtgeschützt, wie der Transport und die Lagerung vor dem Mikroskopieren. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde bei allen Ansätzen die jeweilige Färbung mehrfach mit PBS ausgewaschen. Direkt im Anschluss wurden vom Bodensatz 20 µl auf einen Objektträger pipetiert, um eine möglichst hohe Parasitendichte zu erreichen. Direkt danach wurde dieser mikroskopiert.

Zuerst wurden die Parasiten nur mit den Wirkstoffen GBAP 94 oder GBAP 146 inkubiert, um diese innerhalb der Parasiten zu lokalisieren. Danach wurden die Trypanosomen zunächst mit den einzelnen Farbstoffen versetzt, um gegebenenfalls das Färbeprotokoll zu optimieren. Danach erfolgte die Inkubation gleichzeitig mit Wirkstoff und einem oder mehreren Farbstoffen. Ziel hierbei war die strukturellen Veränderungen durch die Behandlung mit den unterschiedlichen Wirkstoffen anhand der Fluoreszenzmarker genau zu erfassen und dadurch vergleichen zu können.

4.1. Färbungen

4.1.1. GBAP 94 und GBAP 146

Aufgrund der Eigenfluoreszenz der beiden verwendeten NIQs GBAP 94 und GBAP 146 konnten die Proben direkt nach der allgemeinen Behandlung für fluoreszenzmikroskopische Präparate untersucht werden. Als Konzentration wurde die IC_{50} der Wirkstoffe gewählt. Die IC_{50} für Trypanosomen beträgt für GBAP 94 0,383 µmol/l, für GBAP 146 0,289 µmol/l [56]. Die Inkubationszeiten wurden wegen der lichtmikroskopischen Vorergebnisse zwischen 10 min und 120 min gewählt.

4.1.2. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)

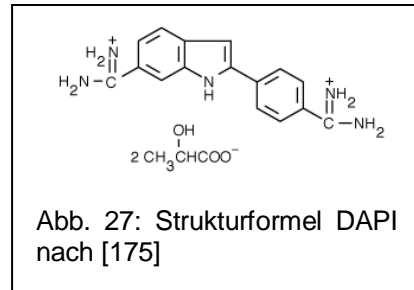
DAPI ist die Abkürzung für *4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid*. Es ist ein gelber Feststoff und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht blau. Der Farbstoff wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Der Farbstoff markiert Nukleinsäuren durch Bindung in der kleinen Furche der DNA-Helix. Er gilt

für die Emission im blauen Spektralbereich als DNA-spezifisch.

Aufgrund der DNA-Interkalation ist DAPI potentiell kanzerogen und mutagen. Er wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet und 10 min inkubiert [157].

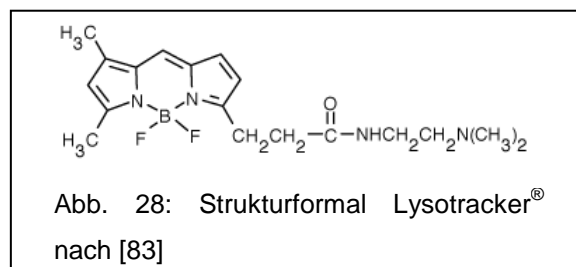
Der verwendete Farbstoff stammt von Roth®.



4.1.3. LysoTracker® green

Der Farbstoff LysoTracker® besteht aus zwei Teilen. DAMP und einem grünen Fluoreszenzmarker. DAMP (*3-[2,4,-dinitroanilino]3'amino-N-*

methyldipropylamine) ist eine farblose schwache Base, die sich selektiv in sauren Kompartimenten anreichert. Sie kann gut mit Farbstoffen



oder Antikörpern konjugiert werden [3]. Der Farbstoff wurde von der Firma Invitrogen® in einer Konzentration von 1 mM gelöst in DMSO geliefert. Diese wurden auf 10 µM in DMSO verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm (blau) wird eine Fluoreszenz im Bereich von 504 nm bis 511 nm (grün) hervorgerufen [111]. LysoTracker® green eignet sich dadurch sehr gut zur Markierung saurer Kompartimente in eukaryontischer Zellen [74]. Dies sind hauptsächlich Lysosomen [11].

Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 30 nM dem Ansatz für 30 min zugesetzt. Die Färbung wurde an unbehandelten Trypanosomen etabliert.

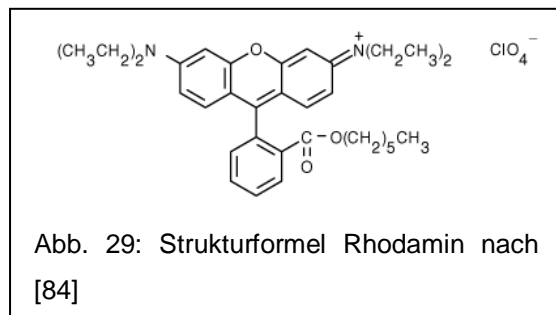
Die weiteren Versuche erfolgten nach Inkubation mit den unterschiedlichen Wirkstoffen. Als Wirkstoffe wurden GBAP 94, GBAP 146 und Amphotericin B verwendet. Auf die Verwendung von Eflornithin wurde verzichtet, da hier weder die Veränderung bestehender Lysosomen noch die Entstehung neuer Vakuolen zu erwarten war [71, 105].

Die Färbungen erfolgten sowohl mit einer alleinigen Färbung mit LysoTracker® green, als auch in Kombination mit Rhodamine-B-Hexylester.

4.1.4. Rhodamine-B-Hexylester

Der Farbstoff wurde als rote Trockensubstanz von der Firma Invitrogen® bezogen. Diese wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Die Anregung mit 568 nm oder 543 nm Wellenlänge führt zu einer Emission bei 578 nm. Das heißt Rhodamine-



B-Hexylester fluoresziert rot. Der Farbstoff färbt hauptsächlich das Mitochondrium und auch schwach nukleäre DNA, besonders bei niedrigen Konzentrationen [154]. Rhodamin ist aufgrund der DNA-Wechselwirkung wahrscheinlich kanzerogen und mutagen.

Die Färbung mit Rhodamine-B-Hexylester nach dem Protokoll des Herstellers erwies sich als zu toxisch und führte zu einer Lyse der Trypanosomen [85]. Mit deutlich geringerer Konzentration und sehr kurzer Inkubationszeit konnte dennoch eine sehr starke Färbung erreicht werden. Die Ansätze wurden für 2 min inkubiert und in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml in den Ansatz gegeben.

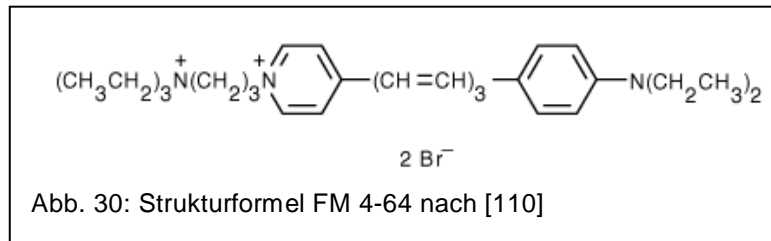
Die Färbung wurde an unbehandelten Trypanosomen etabliert. Die weiteren Versuche erfolgten nach Inkubation mit den unterschiedlichen Wirkstoffen. Diese erfolgten sowohl mit nur einer alleinigen Färbung mit Rhodamine-B-Hexylester, als auch in Kombination mit LysoTracker® green.

4.1.5. FM 4-64[®]

Der Farbstoff stammt von der Firma Molecular Probes[®]. Der systematische Name ist *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium-

dibromid. FM 4-64[®]

fluoresziert rot. Die Trockensubstanz wurde in einer Konzentra-



tion von 5 µg/ml in destilliertem Wasser gelöst. Mit grüner Fluoreszenz, aber sonst identischen Eigenschaften ist FM 1-43[®] im Handel, die Quellenangaben beziehen sich zumeist auf diesen Farbstoff [110]. FM 4-64[®] bindet an der Membran eukaryontischer Zellen und wird bei der Endozytose mit in die Vesikel aufgenommen [82, 174]. Dadurch färbt FM 4-64[®] spezifisch Endosomen an [115]. Die Färbung mit FM 4-64[®] ist für Säugetierzellen, die an dem Objektträger adhären, ausgelegt. Eine Adhäsion von vitalen Trypanosomen an einem Objektträger ist nicht möglich. Deshalb musste das Färbeprotokoll verändert werden. Ziel dieser Färbung war es zu überprüfen, ob die NIQs durch Endozytose aufgenommen werden. Als Wirkstoff wurde ausschließlich GBAP 94 genutzt.

Die Trypanosomen wurden zentrifugiert, das überstehende Medium wurde abgenommen und die Parasiten in PBS resuspendiert. Der Farbstoff wurde hinzugefügt und 30 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Gleichzeitig mit dem Farbstoff wurde der Wirkstoff zugegeben. Der Wirkstoff wurde nach jeder Zentrifugation wieder hinzugegeben. Danach wurden die Proben zentrifugiert und in frischem PBS resuspendiert, um den nicht endozytierten Farbstoff von der Oberfläche zu waschen. Die Proben wurden weiterhin im Dunkeln, aber bei Raumtemperatur für weitere 30 min inkubiert. Danach wurden die Proben auf einen Objektträger pipetiert und direkt mikroskopiert. Bei weiteren Versuchen wurde Glukose in einer Konzentration von 2 mg/ml zusätzlich zugegeben, um einen

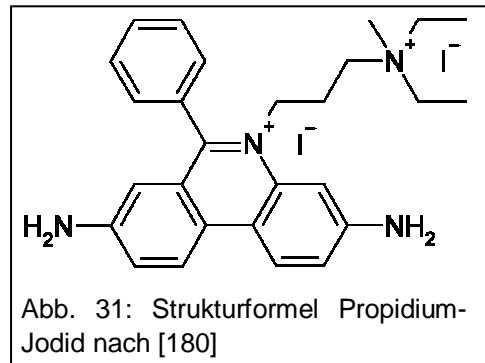
gegebenenfalls stattfindenden Glukose-abhängigen Cotransport detektieren zu können.

5. FACS®

5.1. Fluoreszenzfärbungen für FACS®

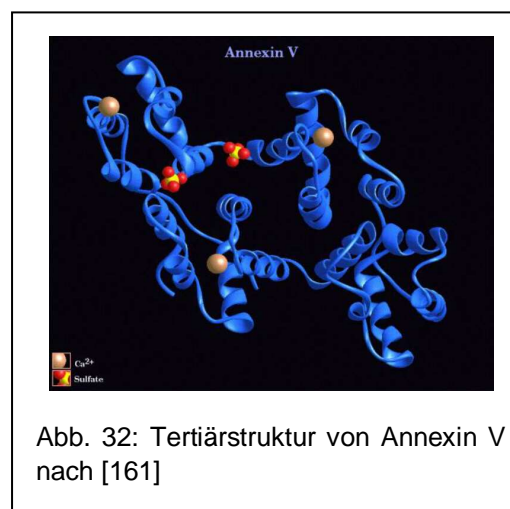
5.1.1. Vybrant® Apoptosis Assay Kit #3

Für die Analyse im FACS® wurde das Vybrant® Apoptosis Assay Kit #3 der Firma Molecular Probes® mit Annexin V-FITC und Propidium-Jodid (PI) genutzt. Die Versuche wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Annexin V wird häufig zur Detektion von Apoptose verwendet [60]. Die Methode ist für *T. brucei* etabliert [66, 101]. Im Vorfeld der FACS®-Analysen wurden die Färbung mit Annexin



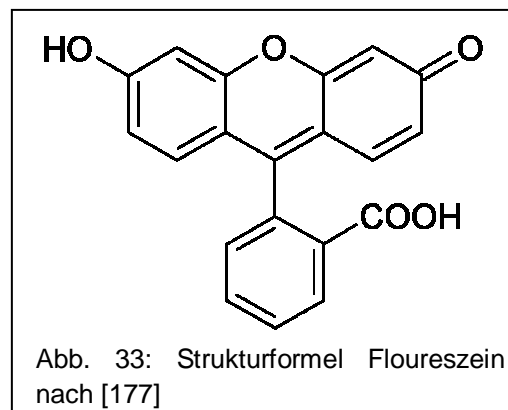
V-FITC und Propidium-Jodid unter dem Fluoreszenzmikroskop getestet. Die Färbung hierfür erfolgte ebenso nach den Angaben des Herstellers [112].

Annexin V-FITC besteht aus zwei Teilen, Annexin V, das spezifisch Membranproteine bindet, und FITC. FITC ist die Abkürzung von Fluoresceinisothiocyanat. Dieser Fluoreszenzfarbstoff entspricht in seinen Fluoreszenzeigenschaften Fluorescein. FITC kann aber besser an andere Strukturen, wie hier das Annexin V, gekoppelt werden. FITC selbst bindet keine weiteren Strukturen. Es dient ausschließlich zur Fluoreszenzmarkierung der gekoppelten Proteine. So wird deren

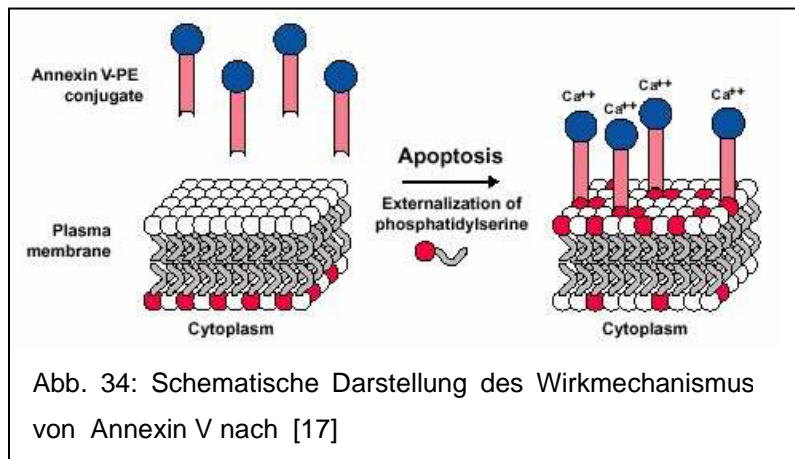


Detektion im Fluoreszenzmikroskop und in der Durchflußzytometrie ermöglicht. Das Fluoreszenzmaximum liegt mit 518 nm im grünen Spektralbereich.

Annexin V ist ein humanes Protein mit einer Masse von 35-36 kD. Es spielt eine Rolle in der physiologischen Gerinnungshemmung [4]. Es bindet Ca^{2+} -abhängig Phospholipide, vor allem Phosphatidylserin-Reste. Aufgrund der Molekülgröße kann Annexin V intakte Zellmembranen nicht überwinden.



Apoptose ist eine von den Zellen selbst und aktiv durchgeführte Form des Zelltodes, die bei eukaryontischen Zellen und Protozoen vorkommt [57, 97]. Zu einer frühen Phase der Apoptose verändert die Zelle ihre Zellmembran.



Phosphatidylserin-

Reste, die bei einer intakten Membran fast ausschließlich auf der Innenseite zu finden sind, werden jetzt nach außen geklappt. Annexin V kann nun an diese Reste binden [17, 93].

Annexin V-FITC färbt vitale Zellen schwach grün, apoptotische Zellen deutlich stärker.

In den fluoreszenzmikroskopischen Vorversuchen wurden sowohl unbehandelte Trypanosomen, als auch mit Amphotericin B und GBAP 94 behandelte Trypanosomen untersucht. Die Wirkstoffe dienen hier als apoptotische Positivkontrolle. Die Wirkstoffkonzentration entsprach jeweils der IC_{50} .

Propidium-Jodid fluoresziert rot und bindet an DNA. Der Farbstoff kann eine intakte Zellmembran nicht passieren und färbt daher nur Zellen mit deutlichen Membranschäden. Dies sind hauptsächlich tote Zellen. So sind sowohl nekroti-

sche, als auch Zellen, bei denen die Apoptose weit fortgeschritten ist, Propidium-Jodid positiv. Es wurden unter dem Mikroskop zwei Ansätze untersucht. Ein Ansatz unbehandelte Trypanosomen, und ein Ansatz, der mit insgesamt 1 Vol% 1M Paraformaldehyd-Lösung behandelt wurde. Paraformaldehyd ist ein gängiges Fixans für Trypanosomen und wurde deshalb für die Positivkontrolle benutzt [131].

Es wurden insgesamt vier Versuche mit dem FACS[®] durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde der Beginn der Inkubation so versetzt, dass alle Proben gleichzeitig gefärbt und direkt nacheinander gemessen werden konnten. Es wurde von jedem Ansatz 1 ml Kulturlösung zusammen mit dem jeweiligen Wirkstoff in ein Eppendorf-Gefäß pipetiert. Die Gefäße wurden bei geöffnetem Deckel weiter im Brutschrank inkubiert.

Für den ersten Versuch wurden fünf Ansätze erstellt: 2 h mit Amphotericin B, als Positivkontrolle für Apoptose; 2 h mit GBAP 94, 2 h mit GBAP 146 und 4 h mit Eflornithin, als nicht-apoptose-induzierender Wirkstoff. Der fünfte Ansatz bestand in einer unbehandelten Kontrolle.

Im zweiten Versuch wurden wiederum eine unbehandelte Kontrolle und eine 2 h Amphotericin B-Positivkontrolle verwendet. Für GBAP 94 wurden die Untersuchungszeitpunkte 0 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 3,25 h und 4 h nach Beginn der Inkubation gewählt. Zusätzlich wurden 4 Ansätze mit GBAP 146 zu den Zeitpunkten 1,5 h, 2 h und 4 h gemessen.

Der dritte Versuch umfasste deutlich mehr Zeitpunkte. Es wurden die gleichen Substanzen untersucht, wie in den vorherigen Versuchen. Es wurden alle Proben Propidium-Jodid gefärbt. Allerdings konnten nur einige zusätzlich mit Annexin V-FITC gefärbt werden. Es gab zwei unbehandelte Proben, wovon eine 24 h vor der Untersuchung in ein Eppendorf-Gefäß gegeben wurde, um lagerungsbedingte Artefakte auszuschließen. Für die Wirkstoffe Amphotericin B, Eflornithin und GBAP 146 wurden zwischen 7 h bis 2 h nach Beginn der Inkubation halbstündig neue Proben angesetzt. Für Eflornithin und GBAP 146 wurden zusätzlich noch für eine Inkubationsdauer von 16 h, 20 h und 24 h Proben angesetzt. Von GBAP 94 konnte nur der 24 h-Wert bestimmt werden. Die Proben

aller Wirkstoffe nach 2 h, 4 h, 7 h und später wurden auch mit Annexin V-FITC gefärbt. Zusätzlich noch die Amphotericin B 2,5 h Probe.

Beim vierten Versuch wurde nur die Wirkung von GBAP 94 und GBAP 146 untersucht. Es gab erneut zwei unbehandelte Kontrollen, die für 2 h bzw. 20 h in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurden. Die NIQs wurden 2 h, 6 h und dann jeweils 2 h länger bis 18 h inkubiert. GBAP 94 zusätzlich noch 20 h. Als Positivkontrolle diente ein 2 h-Ansatz mit Amphotericin B, der mit sowohl nur mit Annexin V, als auch nur mit PI, sowie mit beiden gefärbt wurde. Bei den unbehandelten Kontrollen wurde die 2 h-Probe aufgeteilt und je eine gefärbt und ungefärbt gemessen. Die 20 h Probe wurde nur ungefärbt gemessen. Bei den GBAP 94- und GBAP 146-Proben wurden die 2 h-Proben nur ungefärbt, die 6 h-Proben halbiert und je einmal mit und ohne Färbung gemessen.

III. Ergebnisse

1. Auswahl der GBAP-Substanzen

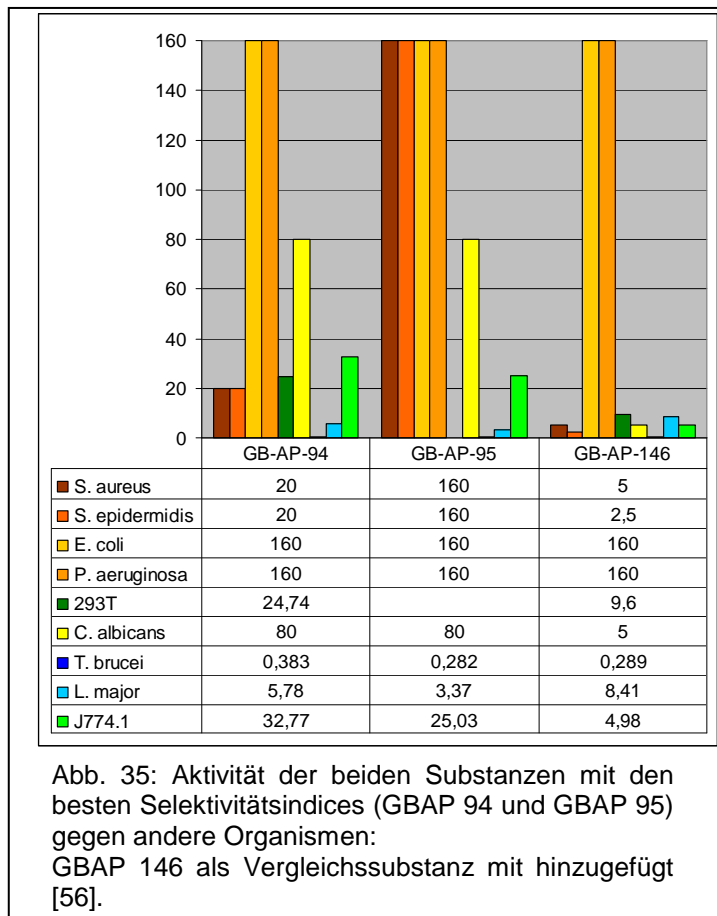
Aus den Ergebnissen der AlamarBlue®-Tests, die von Verena Hörr und Melanie Glaser durchgeführt wurden, wurden die Substanzen mit dem niedrigen IC₅₀-Werten herausgesucht. Die IC₅₀-Werte sollten im Bereich derer von Pentamidin und Melarsoprol liegen, das heißt unter 1 µM. Es konnten mehrere Substanzen gefunden werden, die diese Voraussetzung erfüllen. Die Substanz sollte allerdings nicht nur effektiv gegen Trypanosomen wirken, sondern möglichst selektiv. Deshalb wurden zudem von den vorsortierten Substanzen noch die IC₅₀-Werte für Makrophagen und Leishmanien verglichen. Ziel war es Substanzen mit einer größtmöglichen Selektivität zu finden. Hierzu wurde das Verhältnis der IC₅₀-Werte von Makrophagen zu Trypanosomen (Ma/Try), beziehungsweise Leishmanien zu Trypanosomen (Lei/Try) errechnet. Hier zeigte sich, dass die meisten NIQs, die gegen Trypanosomen aktiv waren eine hohe globale Toxizität aufwiesen. GBAP 94 und GBAP 95 erfüllten die Kriterien am besten. GBAP 94 besitzt, wie in Tab. 1 dargestellt, eine größere Selektivität gegenüber Leishmanien und fast identischen Werten für Trypanosomen und Makrophagen [56]. Die Substanz wurde deshalb ausgewählt. Für Werte weiterer Substanzen siehe Tabelle 2.

GBAP 146 wurde nicht wegen seiner IC₅₀-Werte ausgewählt. Ausschlaggebend war hierbei die starke Eigenfluoreszenz der Substanz. Anfänglich wurde befürchtet, GBAP 94 mit einem Fluoreszenzverstärker koppeln zu müssen, um

Tabelle 2: Ergebnisse ausgewählter NIQs im Alamar blue®-Zytotoxizitätstest [56]:

Name	IC50-Werte (µM)			Selektivitätsindex	
	Trypanosomen	Makrophagen	Leishmanien	Ma/Try	Lei/Try
GBAP 84	0,498	33,69	3,85	67,650602	7,73092369
GBAP 85	0,334	20,54	1,58	61,497006	4,73053892
GBAP 86	0,029	nicht bestimmbar		nicht definiert	
GBAP 94	0,383	32,77	5,78	85,561358	15,0913838
GBAP 95	0,282	25,03	3,37	88,758865	11,9503546
GBAP 101	0,601	32,84	2,45	54,642263	4,0765391
GBAP 146	0,289	4,98	8,41	17,231834	29,100346

den Wirkstoff intraparasitär detektieren zu können. Diese Befürchtung erwies sich als unbegründet. GBAP 146 wurde dennoch als Vergleichssubstanz weiter verwendet. Während der weiteren Versuche zeigte sich, dass die Wirkung der beiden ausgewählten Substanzen auf die Morphologie der Trypanosomen mit den verwendeten Methoden nicht zu unterscheiden war.



2. Immobilisation

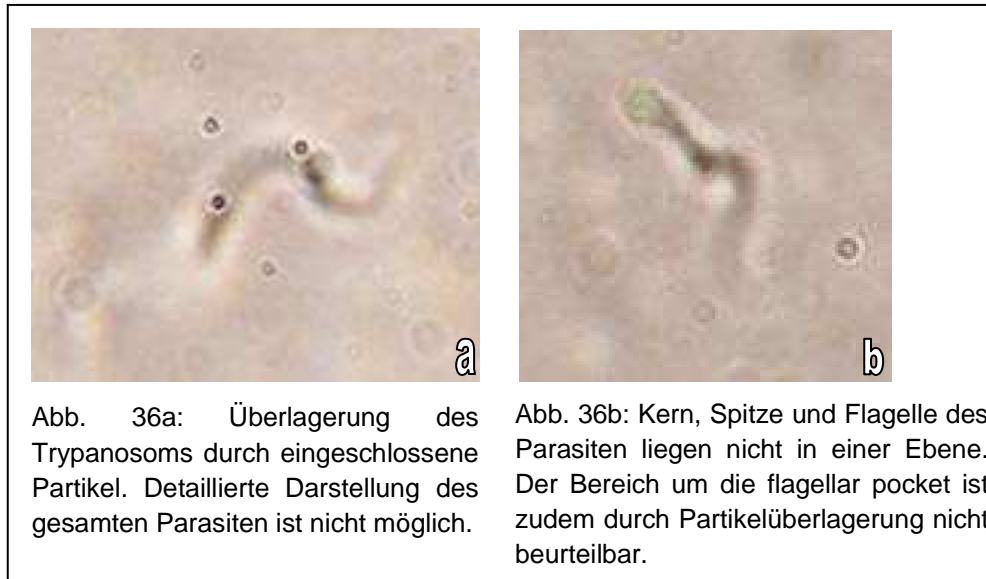
2.1. Agarose

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war wegen der notwendigen Belichtungszeiten eine Immobilisation der Trypanosomen erforderlich. Hierzu wurden unter anderem Versuche mit Agarose unternommen. Es wurde Agarose mit niedriger Schmelz- und Geliertemperatur gewählt. Hierdurch sollte die Gefahr von Denaturierung der Trypanosomen minimiert werden.

Die Trypanosomen wurden wie oben beschrieben in die Agarose eingegossen. Folgende Probleme mussten gelöst werden, um vitale Trypanosomen einzubetten. Die Konzentration der Agarose musste hoch genug sein, um eine vollstän-

dige Immobilisierung zu gewährleisten. Die Agarose musste lange genug flüssig sein. Bei

zu frühem Erkalten wurden die Trypanosomen nicht einzeln umschlo-



ssen,

sondern in großen Tropfen. Sie waren also nicht immobilisiert. Bei zu hohen Temperaturen wurden die Parasiten denaturiert. Eine gute Kontrolle der Geltemperatur war wegen der kleinen Gesamtvolumina (unter 1 ml) nicht möglich.

Es zeigte sich schnell, dass diese Methode nicht geeignet war gute Bilder von den Trypanosomen zu liefern. Das Gel war unter dem Mikroskop wegen eingeschlossener Partikel und Luftblasen nicht homogen und klar genug, um intraparasitäre Strukturen gut und sicher erkennen zu können. Das Agarose-Gel überlagerte diese. (Vergleiche Abb. 36a) Zudem waren die Trypanosomen nicht exakt genug auf dem Objektträger zu einzubetten, um eine gleichbleibend dicke Schicht Gel zwischen Objektträger und Trypanosomen zu erhalten. In der Folge war eine scharfe Darstellung des gesamten Parasiten nicht möglich. (Vergleiche Abb. 36b) Deshalb konnte diese Methode nicht sinnvoll für weitere Untersuchungen genutzt werden.

2.2. PBS

Auf der Suche nach einer anderen Möglichkeit der Immobilisation ergab sich die Überlegung, ob PBS die Motilität der Trypanosomen entscheidend einschränken könnte. Besonders die Erfahrungen von Prof. Alicia Ponte-Sucre mit

Leishmanien deuteten in diese Richtung. Auch in der Literatur fanden sich Hinweise, wenn auch nicht für *Kinetoplastida* [139]. Im 90% PBS-Ansatz konnte nach einer Stunde eine ausreichende Lähmung der Parasiten erreicht werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Kultur für alle fluoreszenzmikroskopischen Versuche eine Stunde vorher zentrifugiert und die Trypanosomen in PBS resuspendiert. Bei Ersatz des PBS durch Baltz-Medium wurde die Mobilität wieder hergestellt.

3. Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie ergab einige interessante Ergebnisse. Die Kontrolle zeigte die erwarteten schlanken leicht geschlängelten Trypanosomen (Vgl. Abb.: 18). Die behandelten Parasiten zeigten zum Teil deutliche morphologische Auffälligkeiten. Die Präparate von Amphotericin B und GBAP 146 ließen sich morphologisch nicht unterscheiden. Bei beiden Wirkstoffen zeigte sich in der Probe nach 1 h bei

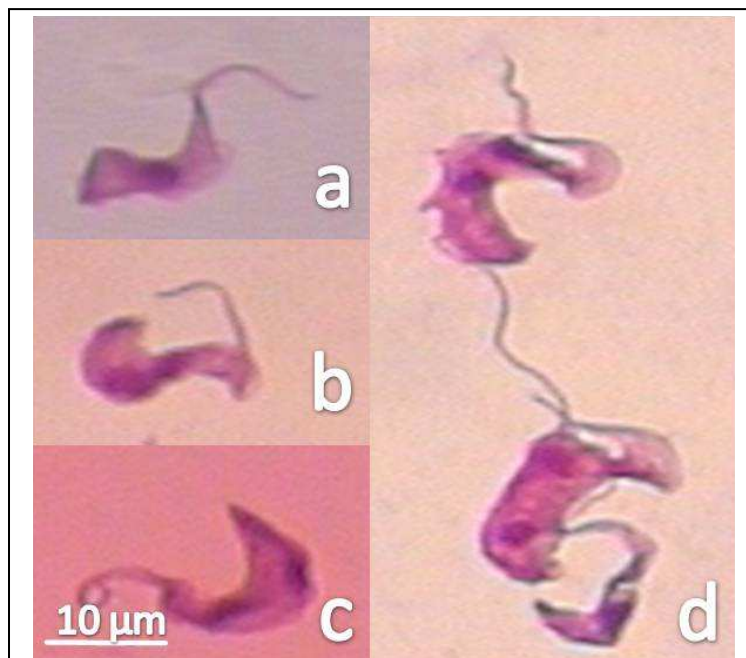


Abb. 37: Veränderte Trypanosomen nach Behandlung mit GBAP 146 (Giemsa-Färbung, 100fache optische Vergrößerung).

- a, b, c: Mäßige Verplumpung der Trypanosomen. Neuentstehende Vakuole vor dem Zellkern erkennbar.
- d: Vollständiger Formverlust der Trypanosomen. Oberer und mittlerer Parasit mit kleinen Vakuolen komplett ausgefüllt.

25,4% der Trypanosomen eine Verplumpung (Abb. 37a, b, d). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die Entstehung neuer oder Vergrößerung bestehender Vakuolen in den Parasiten. Bei den meisten betroffenen Parasiten war eine große Vakuole im vorderen Drittel der Zelle kurz hinter dem Kinetoplast zu sehen

(Abb. 37a, b, c, d). Einige aber erschienen insgesamt mit vielen kleinen Vakuolen durchsetzt (Abb. 37 d). In den Proben nach 2 h und 4 h wirkten die Vakuolen, insbesondere bei singulärem Auftreten, deutlich vergrößert. Die Zellmembran kann nicht mit dieser Entwicklung Schritt halten. Die anderen Organellen werden verdrängt (Abb. 41 g,h,i). Es entsteht eine kugelige Form. Die Flagelle wirkt geisselartig und am hinteren Teil der Zelle inserierend (Abb. 37b). Diese Maximalform war bei einzelnen Parasiten schon nach einer Stunde zu erkennen. Die Anzahl der veränderten Parasiten nahm im Verlauf allerdings auf 46,6% nach 2 h zu und stabilisierte sich dann bei 44,8% nach 4 h.

Für die durchschnittliche Länge und Breite der behandelten Parasiten ergab sich kein signifikanter Unterschied (vgl. Abb. 39). Es zeigte sich aber, dass die Messwerte der behandelten Trypanosomen-Population eine größere Streubreite hatten (Vgl. Abb. 40). Die Zellmembran war trotz Zentrifugation, soweit erkennbar,

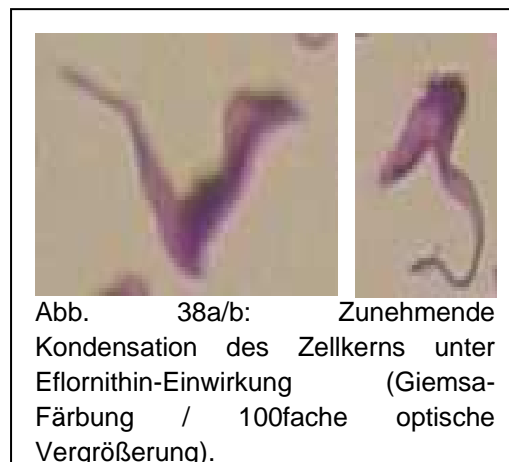


Abb. 38a/b: Zunehmende Kondensation des Zellkerns unter Eflornithin-Einwirkung (Giemsa-Färbung / 100fache optische Vergrößerung).

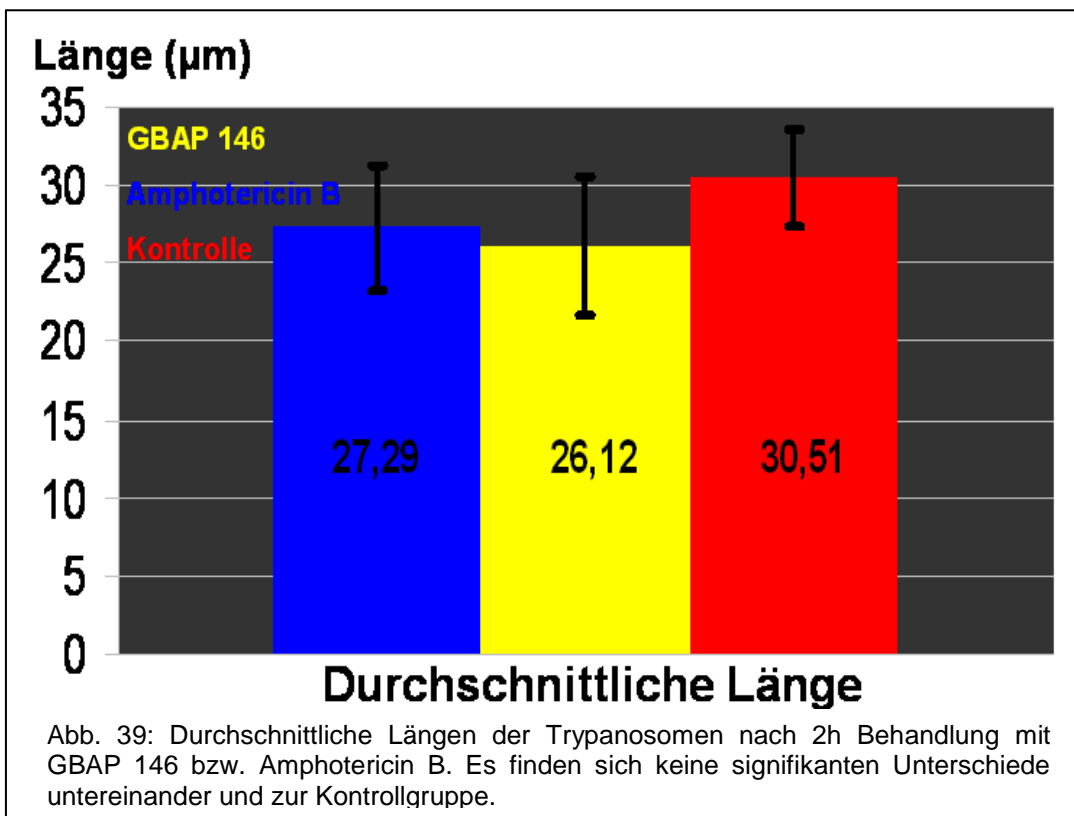
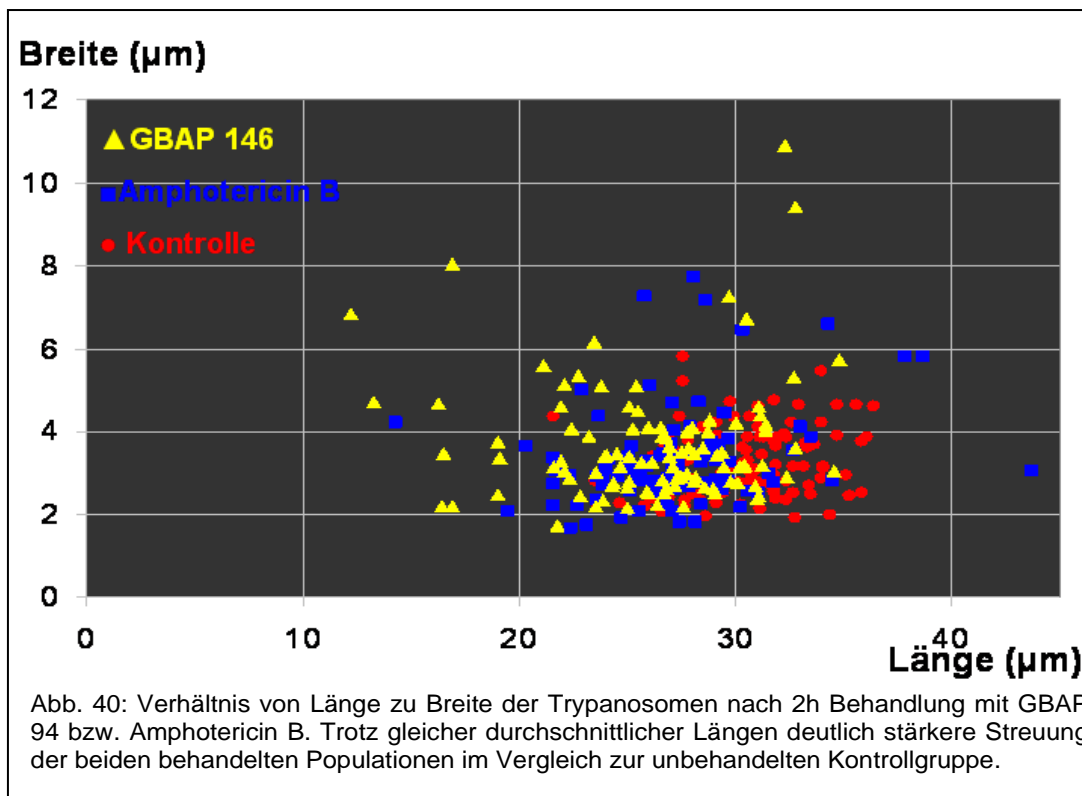


Abb. 39: Durchschnittliche Längen der Trypanosomen nach 2h Behandlung mit GBAP 146 bzw. Amphotericin B. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede untereinander und zur Kontrollgruppe.

nicht beeinträchtigt.

Die mit Eflornithin behandelten Trypanosomen stellten sich auch morphologisch verändert dar. Allerdings erschien der Kern eher kondensiert. Eine Vakuole war nicht zu erkennen. Insgesamt erschienen die Parasiten auch morphologisch nicht so stark verändert (Abb. 38a/b).



4. Fluoreszenzmikroskopie

4.1. Wirkstoffe ohne weitere Farbstoffe

Die Parasiten wurden mit einem Wirkstoff GBAP 94 oder GBAP 146 beimpft. Die Konzentration betrug jeweils IC_{50} . Die Inkubationszeiten betragen zwischen 10 min und 2 h. Die Wirkstoffe ließen sich gut in den Parasiten detektieren.

In einzelnen Trypanosomen ließ sich eine Anreicherung der Wirkstoffe schon nach 10 min erkennen. Ab ca. 30 min war bei fast allen Parasiten eine Färbung erkennbar. GBAP 94 und GBAP 146 fanden sich bei den meisten Parasiten in

mehreren kleinen Vakuolen. Deshalb wurde dieser Zeitpunkt im Weiteren bei den Colokalisationsversuchen verwendet (Abb. 41 b, c, e, f und Abb. 42 b, c, e, f, h, i). Bei vereinzelt Trypanosomen zeigte sich schon zu diesem Zeitpunkt sowohl eine homogene Verteilung des Wirkstoffes über die gesamte Zelle, als auch die Entstehung einer großen Vakuole im vorderen Bereich des Parasiten (Abb. 41 a-i). Diese war nicht durch die Wirkstoffe angefärbt. Die Beobachtungen unterschieden sich im Weiteren nicht von den lichtmikroskopischen Untersuchungen.

Nach 2 h waren dann beide Wirkstoffe relativ homogen über die Trypanosomen verteilt (Abb. 42 b, c, e, f, h, i). Bei vielen Parasiten ließ sich, wie in der Lichtmikroskopie beschrieben, eine Vergrößerung der Vakuole nachweisen. Sie war weiterhin deutlich von den NIQs ausgespart (Abb. 41 g-i).

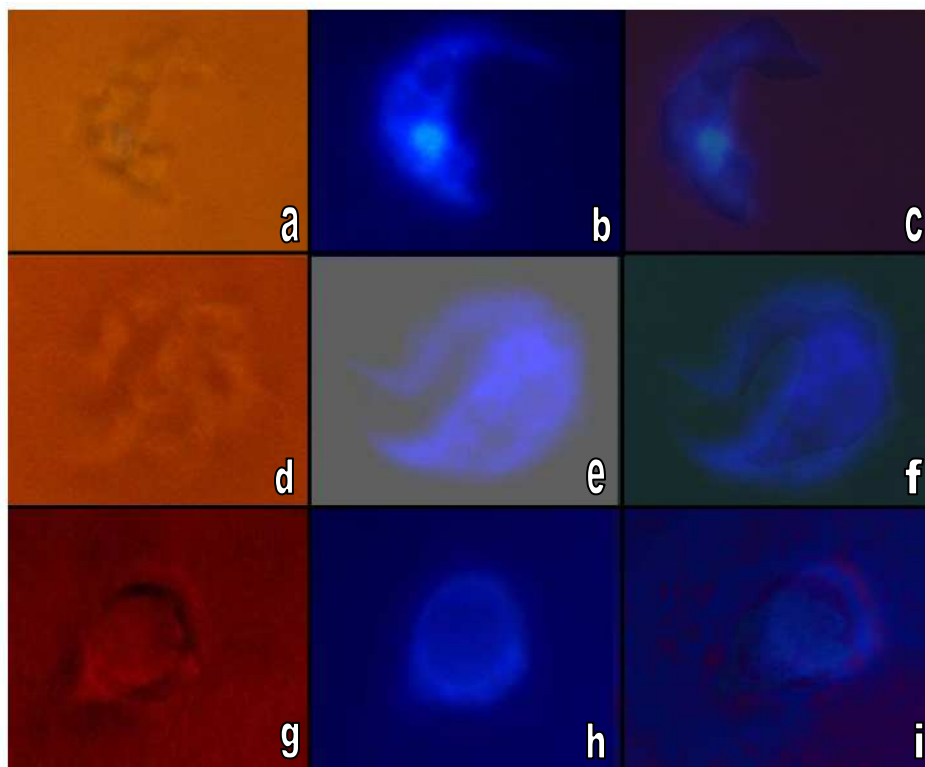


Abb. 41 a-i: Trypanosomen nach Behandlung mit GBAP 94 ($c=IC_{50}$). 100fache optische Vergrößerung.

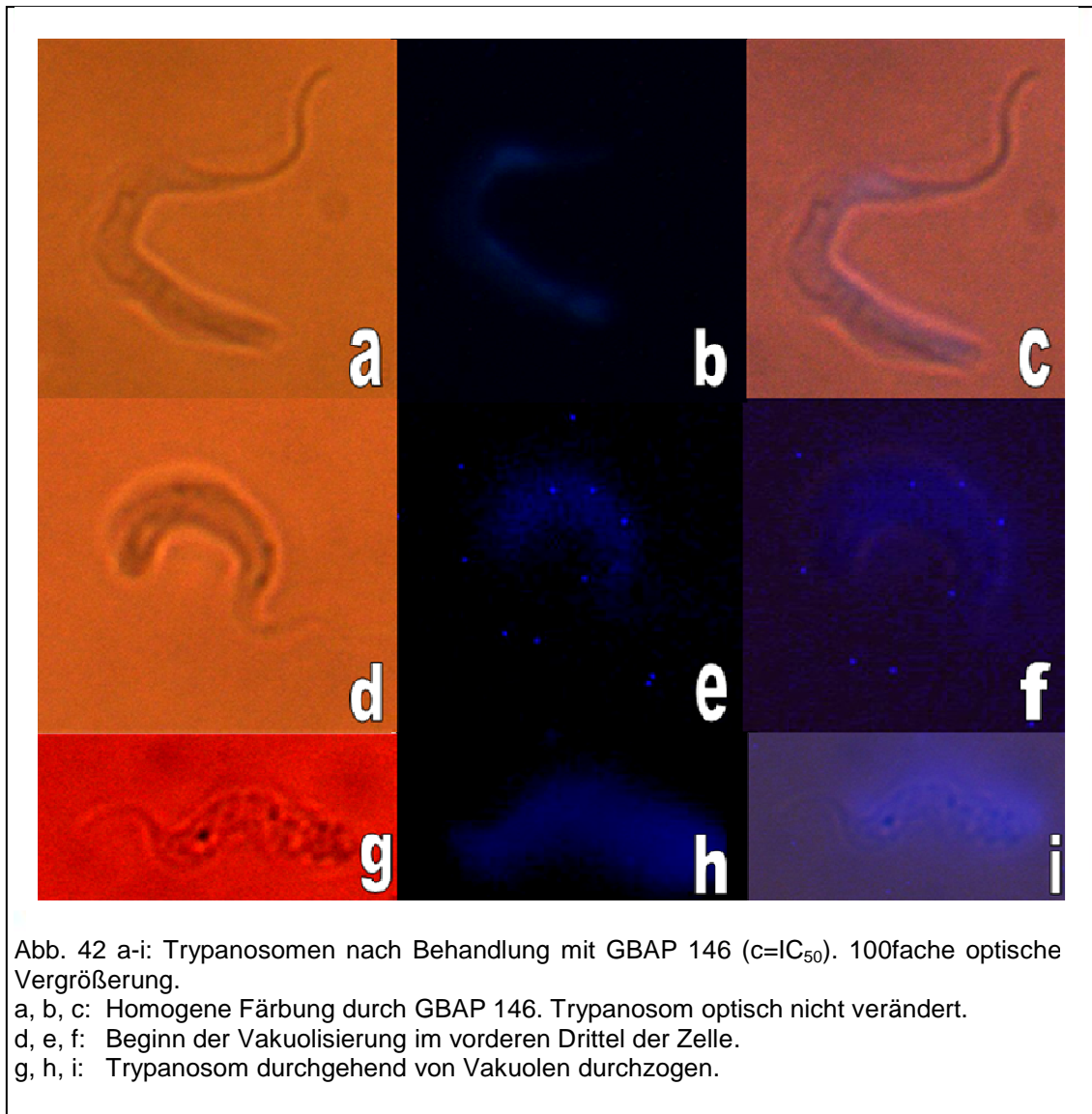
a, b, c: Nahezu homogenen Färbung des Parasiten durch GBAP 94. Starke Anreicherung in der Nähe des Zellkerns. Davor Vakuole erkennbar.

d, e, f: Deutliche Auflockerung der Färbung sichtbar. Vergrößerung der Vakuole. Beginnende Verplumpung des Trypanosoms.

g, h, i: Kompletter Formverlust des Parasiten aufgrund der Vakuole. Verdrängung aller Zellorganellen. Flagelle geisselartig an Ende der Zelle verdrängt.

Weitere morphologische Unterschiede fanden sich nicht. Die Unterschiede zwischen Beobachtungen nach 30 min und 2 h waren rein quantitativ.

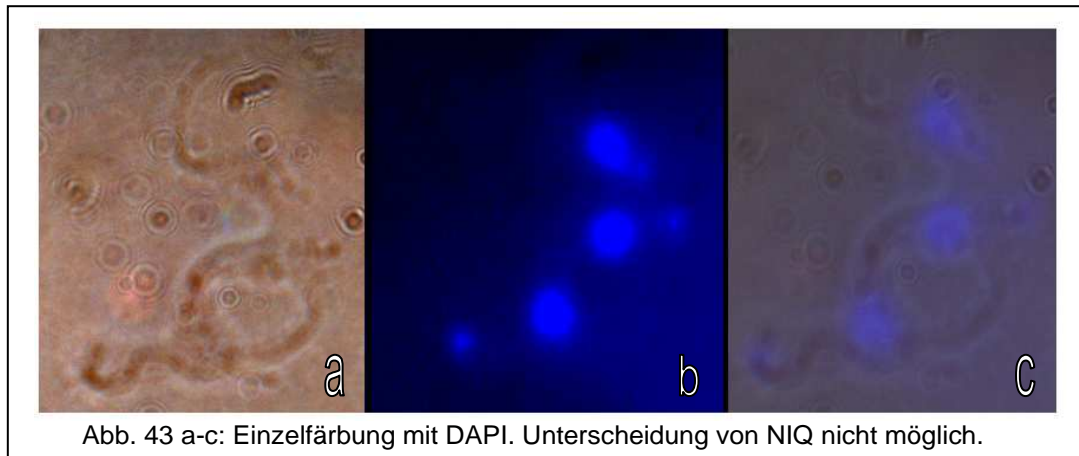
Fluoreszenzmikroskopie mit Amphotericin B oder Eflornithin alleine ist wegen fehlender Eigenfluoreszenz nicht möglich.



4.2. Etablierung der Fluoreszenz-Färbungen / Ergebnisse ohne Wirkstoff

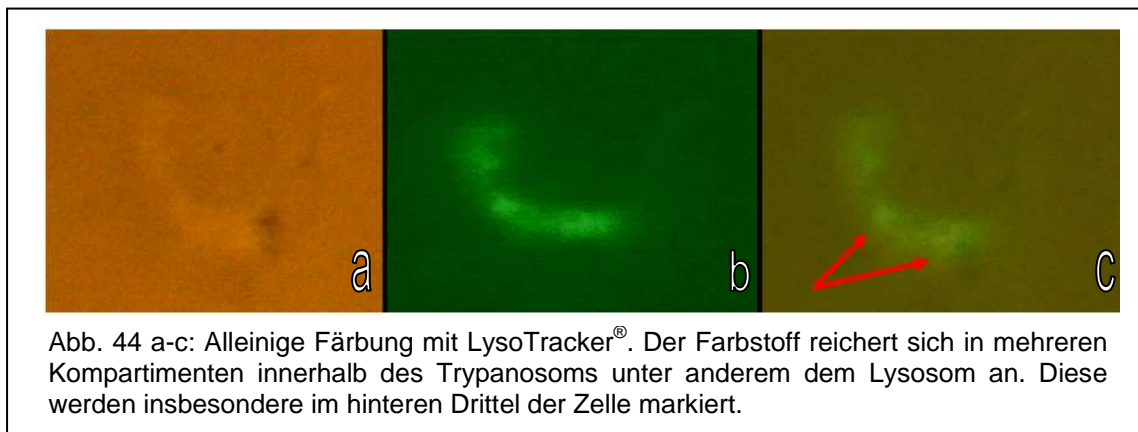
4.2.1. DAPI

DAPI wurde nach dem oben genannten Protokoll verwendet. Die verwendeten NIQs und DAPI waren leider aufgrund der großen Ähnlichkeit ihrer Fluoreszenzspektren nicht sicher zu trennen (Abb. 43 b, c). DAPI wurde deshalb nicht für weitere Kollokalisationsversuche genutzt.



4.2.2. LysoTracker® green

Bei der Färbung mit LysoTracker® green gemäß des Protokolls des Herstellers konnten bei sonst unbehandelten Trypanosomen gut einige kleine vakuolische Strukturen angefärbt werden (Abb. 44 b, c) [86]. Dies entsprach dem erwarteten Bild bei unbehandelten Trypanosomen. Die Lage der Lysosomen und der anderen sauren Kompartimente ist bei Trypanosomen nicht genau definiert [66]. Es zeigten sich keine morphologischen Veränderungen aufgrund der Färbung.



4.2.3. Rhodamine-B-Hexylester

Mit dem oben beschriebenen Protokoll waren die Parasiten gut anzufärben. Bei Färbungen gemäß des Protokolls des Herstellers ließen sich nur Bruchstücke und keine intakten Trypanosomen nachweisen. Deshalb mussten die Farbstoff-

konzentration und die Inkubationszeit deutlich reduziert werden. Unter den verwendeten Bedingungen zeigten sich keine morphologischen Veränderungen (Abb. 45 a-c).

Der Farbstoff sollte hauptsächlich genutzt werden, um Veränderungen im Mitochondrium zu erfassen [87]. Aufgrund des starken Fluoreszenzsignals konnte auch der Kern gut dargestellt werden. Die Färbung der Parasiten war insgesamt relativ stark. Die Färbung mit Rhodamine-B-Hexylester war auch durch den grünen Fluoreszenzfilter zu detektieren (Abb. 45 d, e). Das Signal überstrahlte bei Kombinationsfärbungen zum Teil das Signal des LysoTracker® green.

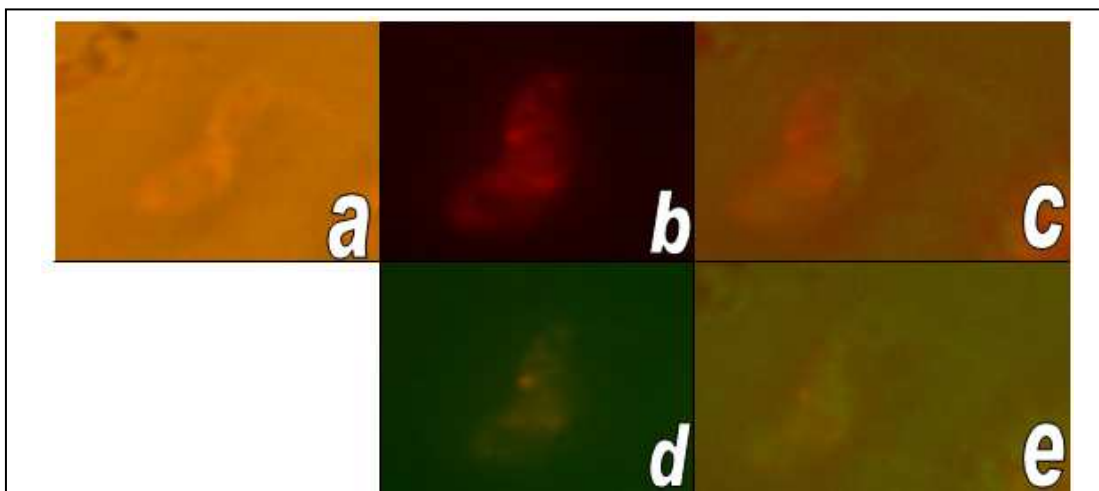


Abb. 45 a-e: Alleinige Färbung mit Rhodamine-B-Hexylester (100fache optische Vergrößerung).

a, b, c: Färbung der Ribonukleinsäuren. Starke Färbung parallel zur Flagelle entsprechend der Lage des Mitochondriums.

d, e: Identische Aufnahme durch Grünfilter. Rhodamine-B-Hexylester lässt sich auch hierdurch detektieren. Dies führte zu Problemen bei Doppelfärbungen mit LysoTracker® green.

4.2.4. LysoTracker® green und Rhodamine-B-Hexylester

Beide Färbungen wurden wie für die beiden Farbstoffe jeweils beschrieben durchgeführt. Die Einwirkzeiten mussten nicht verändert werden. Morphologische Veränderungen aufgrund der Färbung konnten nicht festgestellt werden (Abb. 46 a-d). Es fand sich, wie erwartet, keine Colokalisation der beiden Farbstoffe.

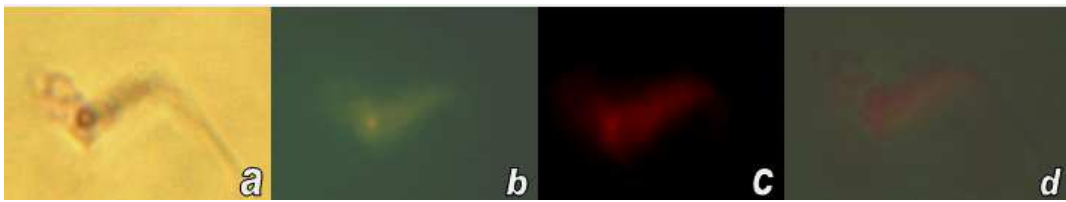


Abb. 46 a-d: Doppelfärbung mit LysoTracker green[®] und Rhodamine-B-Hexylester. (100fache optische Vergrößerung)

- a: Phasenkontrast
- b: Signal von LysoTracker green[®] und Rhodamine-B-Hexylester nicht sicher zu unterscheiden. Lediglich unterhalb des hellen Spots vermehrtes Signal im Vergleich zum Rotfilter. Hier am ehesten Lysosom zu vermuten. Sonstiges Signal nicht sicher zwischen LysoTracker green[®] und Rhodamine-B-Hexylester zu unterscheiden.
- c: Signal von Rhodamine-B-Hexylester. Stärkstes Signal wiederum entlang der Flagelle.
- d: Überlagerung: Signifikantes grünes Signal nicht sicher sichtbar. Am ehesten im Bereich des Lysosoms.

4.2.5. FM 4-64[®]

Die Färbung mit FM 4-64[®], gemäß des oben beschriebenen Protokolls, führte zur Markierung einiger Kompartimente vorwiegend im vorderen Drittel der Parasiten in der Nähe der flagellar pocket. (Abb. 47 a, b, insbesondere c) Aufgrund der Funktionsweise des Farbstoffes kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Endosomen handelt [110]. Eine Färbung der Oberfläche des Parasiten war nicht zu erkennen. Der Farbstoff wurde also während des Färbeverfahrens komplett von der Oberfläche der Zelle entfernt.

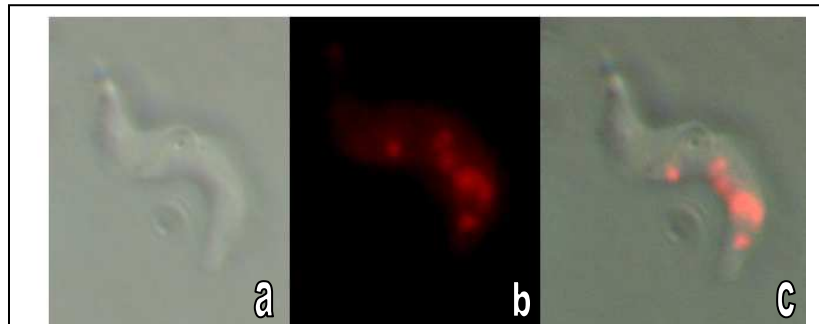


Abb. 47: Färbung mit FM 4-64[®] (100fache optische Vergrößerung). Anreicherung der Endosomen im vorderen Drittel des Trypanosoms in der Nähe der flagellar pocket.

Aufgrund der Funktionsweise des Farbstoffes kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Endosomen handelt [110]. Eine Färbung der Oberfläche des Parasiten war nicht zu erkennen. Der Farbstoff wurde also während des Färbeverfahrens komplett von der Oberfläche der Zelle entfernt.

Der Zusatz von Glucose erbrachte keine Veränderung.

4.3. LysoTracker green[®]- Färbungen mit Wirkstoffen

4.3.1. LysoTracker green[®]-Färbungen mit GBAP 94 oder GBAP 146

Durch Colokalisation von LysoTracker[®] green mit GBAP 94 und GBAP 146 sollten zwei Fragen überprüft werden. Gibt es eine Anreicherung von NIQs in sauren Kompartimenten? Und ist die im Verlauf entstehende Vakuole ein Lysosom?

Es fand sich keine Überlagerung von NIQ- und LysoTracker[®] green-Signal. Die Anreicherung der NIQ war wie oben beschrieben zu beobachten. Es waren keine Unterschiede zwischen den beiden Wirkstoffen zu beobachten. Die Anreicherung des LysoTracker[®] green unterschied sich bei morphologisch wenig veränderten Trypanosomen nicht von der Kontrollgruppe (Abb. 48 a-d). Bei morphologisch stark veränderten Trypanosomen wurden die angefärbten Kompartimente durch die neu entstehende oder sich vergrößernde Vakuole auf kleinerem Raum zusammengeschoben (Abb. 48 i-l). Eine Veränderung der gefärbten Kompartimente, insbesondere in der Größe, war nicht zu beobachten. Deshalb ist nicht von einer Anreicherung der NIQs in sauren Kompartimenten, speziell Lysosomen auszugehen. Die im Verlauf der Behandlung entstehende Vakuole ließ sich nicht mit LysoTracker[®] green anfärben. Deshalb ist hier nicht von einem Lysosom auszugehen (Abb 48 e-l). Unterschiede zwischen der Behandlung mit GBAP 94 und GBAP 146 waren nicht festzustellen.

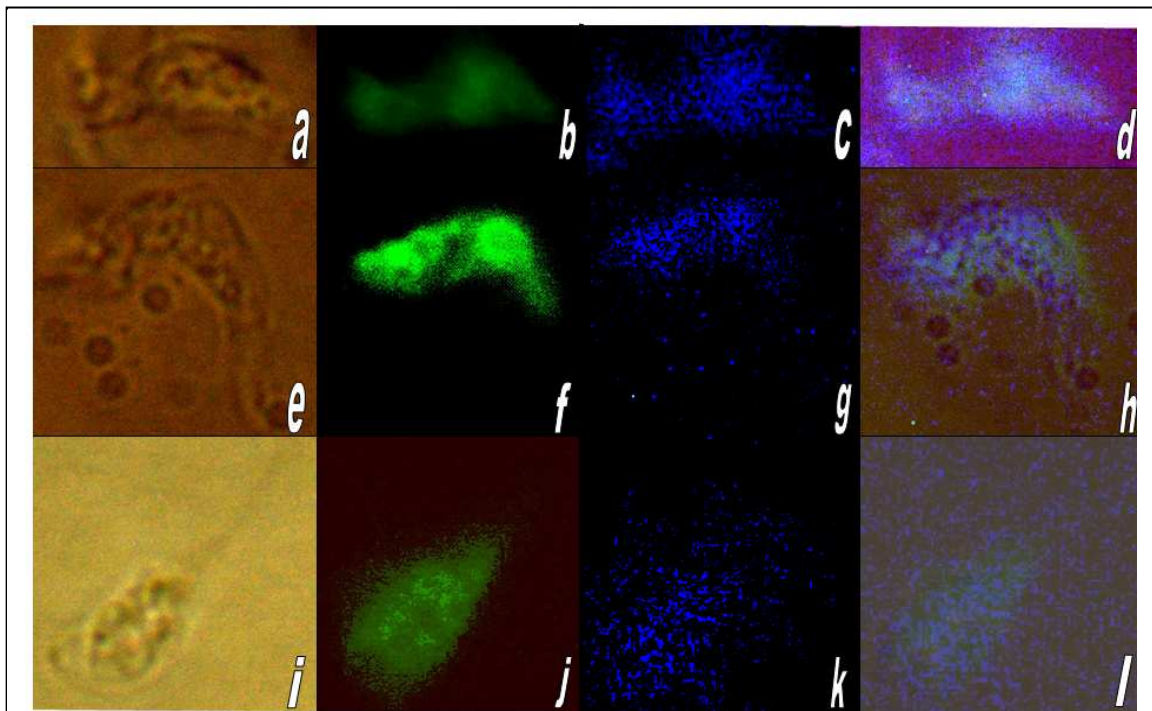


Abb. 48 a-l: GBAP 146-behandelte Trypanosomen, gefärbt mit LysoTracker green® (100fache optische Vergrößerung)

a, e, i: Phasenkontrastaufnahme.

b, f, j: Färbung mit LysoTracker green®.

c, g, k: Signal von GBAP 146.

d, h, l: Überlagerung.

a - d: Kleine Vakuole in der Mitte des Trypanosoms. Keine Färbung der Vakuole mit LysoTracker green® oder GBAP 146.

e - h: Große Vakuole in der Mitte des Trypanosoms. Keine Färbung der Vakuole mit LysoTracker green®.

i -l: Komplett verformtes Trypanosom. In der Mitte der Zelle sehr schwache Färbung mit LysoTracker green®. Gefärbte Strukturen sind an den Rand der Zelle verschoben. Insgesamt sehr schwaches Signal von GBAP 146.

4.3.2. LysoTracker® green mit Amphotericin B

Wie schon bei der Lichtmikroskopie waren keine Unterschiede zwischen den NIQs und Amphotericin B zu erkennen. Die Färbung einiger kleiner Vakuolen durch LysoTracker® green erfolgte wie in der unbehandelten Kontrolle. Ebenso zeigte sich die Entstehung oder Vergrößerung einer Vakuole. Diese ließ sich nicht mit LysoTracker® green markieren (Abb 49 a-c).

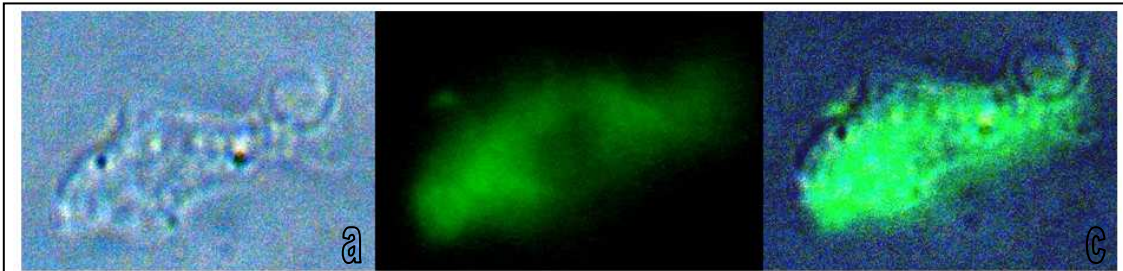


Abb. 49 a-c: Mit Amphotericin B-behandelte Trypanosomen, gefärbt mit LysoTracker green® (100fache optische Vergrößerung).
a: Phasenkontrastaufnahme.
b: Färbung mit LysoTracker® green.
c: Überlagerung. Große Vakuole im vorderen Teil des Trypanosoms erkennbar. Dort keine Färbung mit LysoTracker® green.

4.4. Rhodamine-B-Hexylester mit Wirkstoffen

4.4.1. Rhodamine-B-Hexylester mit GBAP 94 oder GBAP 146

Die Färbung mit Rhodamine-B-Hexylester sollte Veränderungen am Mitochondrium sichtbar machen, die durch GBAP 94 oder GBAP 146 verursacht werden. Es zeigte sich aber, dass beide Substanzen bei den gering morphologisch veränderten Trypanosomen zu keinen Änderungen am Mitochondrium führten. Die NIQs unterschieden sich wiederum nicht untereinander.

Bei den stark veränderten Parasiten wurde das Mitochondrium in den hinteren Teil gedrängt und dort sichtbar komprimiert. Es zeigten sich keine Anhaltspunkte, dass diese Veränderung von den Mitochondrien ausging. Eine Veränderung des Zellkerns, mit Ausnahme einer Verlagerung bei den stark veränderten Parasiten, konnte nicht beobachtet werden.

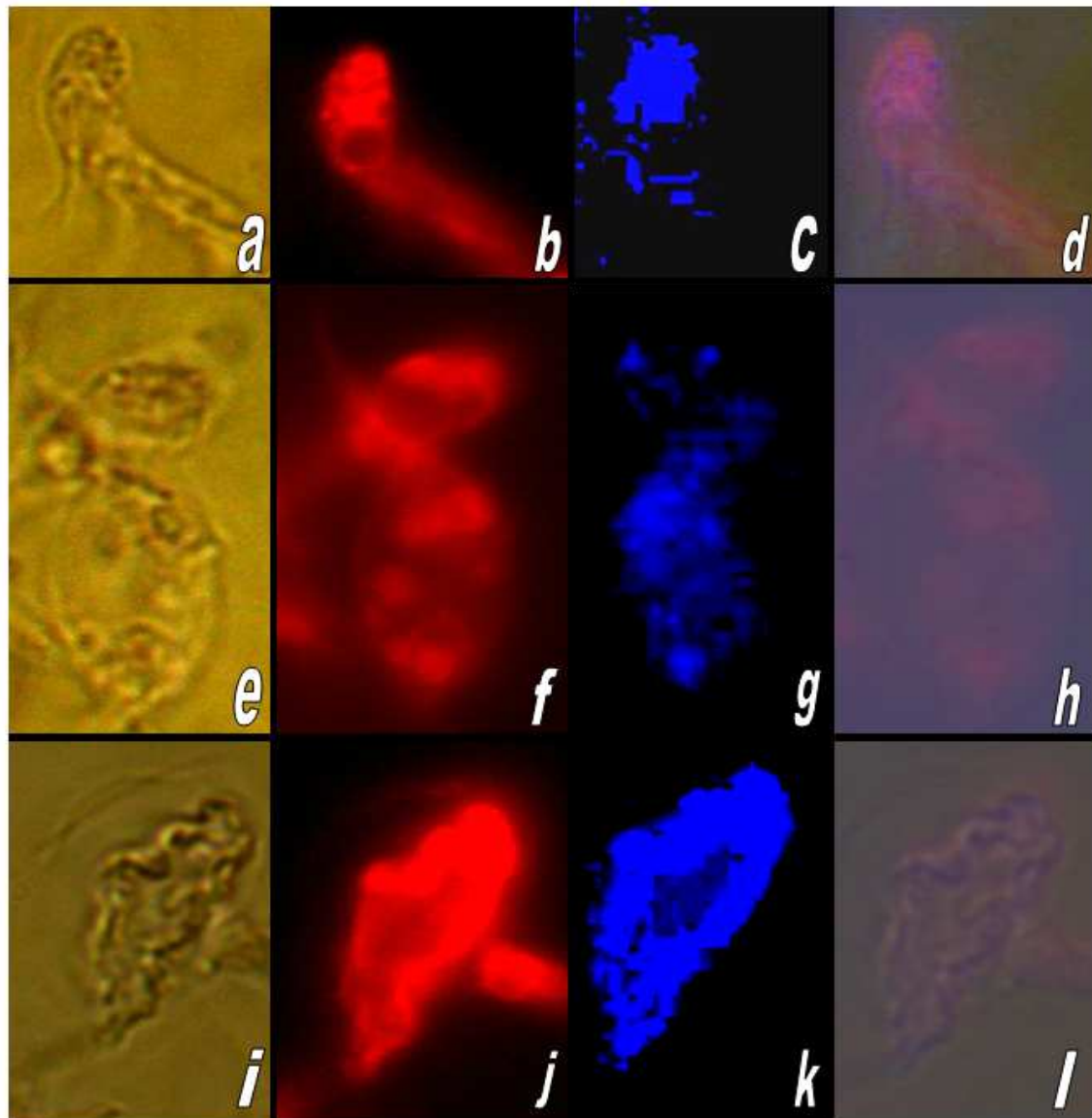


Abb. 50 a-l: Trypanosomen behandelt mit GBAP94, gefärbt mit Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung).

a, e, i: Phasenkontrastaufnahme.

b, f, j: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.

c, g, k: Signal von GBAP 94.

d, h, l: Überlagerung.

a – d: Entstehung einer Vakuole im vorderen Drittel der Zelle. Keine Färbung durch Rhodamine-B-hexylester. Aussparung des GBAP 94-Signals.

e – h: Zwei Trypanosomen. Oben: Trypanosom mit einer großen Vakuole im vorderen Drittel. Mitochondrium vor, Kern hinter Vakuole verschoben. Unten: Verplumptes Trypanosom, kompletter Verlust der Zellform, Flagelle an Zellende verlagert. Kern und Mitochondrium in kleinen Kompartimenten über die Zelle verteilt. Zentrum nahezu ungefärbt.

i – l: Trypanosom mit sehr großer Vakuole in der Zellmitte. Kompletter Verlust der Zellform, zwei Geisseln am oberen Zellpol, fraglich eine weitere am unteren. Mitochondrium an oberem Zellpol verdrängt. Signal von GBAP 94 nur vom Rand der Zelle.

4.4.2. Rhodamine-B-Hexylester mit Amphotericin B

Auch hier waren die Parasiten nach einer Behandlung mit Amphotericin B nicht von den NIQs-behandelten zu unterscheiden. Es waren keine Veränderungen am Mitochondrium oder Zellkern, außer der bereits bei den NIQs beschriebenen Verlagerung zu beobachten.

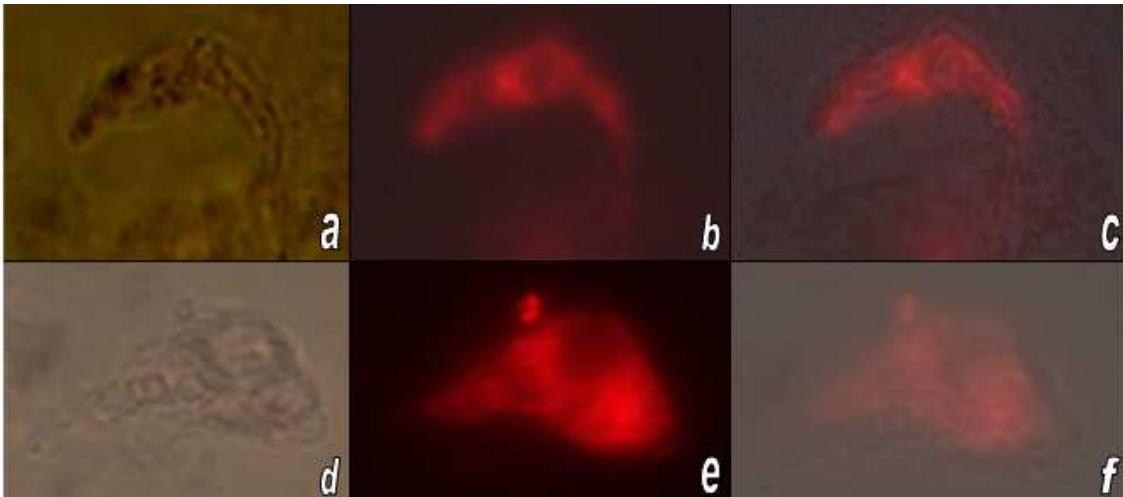


Abb. 51 a-f: Trypanosomen behandelt mit Amphotericin B, gefärbt mit Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung).

a, d: Phasenkontrastaufnahme.

b, e: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.

c, f: Überlagerung

a – c: Entstehung einer Vakuole im vorderen Drittel der Zelle. Mitochondrium oberhalb der Vakuole. Kern direkt davor. Keine Verlagerung der angefärbten Strukturen.

d – f: Trypanosom mit einer großen Vakuole im vorderen Drittel. Beginnende Verplumpung. Mitochondrium und Kern durch Vakuole verdrängt. Aufteilung von Kern und Mitochondrium in kleinere Kompartimente nicht sicher zu beurteilen.

4.4.3. Rhodamine-B-Hexylester mit Eflornithin

Die mit Eflornithin behandelten Parasiten zeigten ein deutlich anderes Aussehen. Der Farbstoff war hier homogener in der Zelle verteilt. Das Mitochondrium war trotzdem gut zu erkennen. Im Bereich des Mitochondriums zeigten sich mehrere, in der Regel zwei, stark gefärbte Spots. Mit Ausnahme dieser Anreicherungen fanden sich keine Auffälligkeiten.

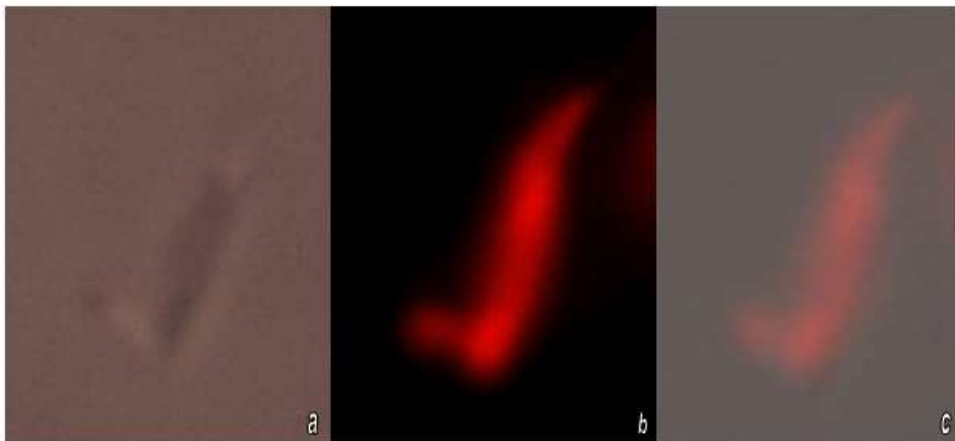


Abb. 52 a-c: Trypanosomen behandelt mit Eflornithin, gefärbt mit Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung).

a: Phasenkontrastaufnahme.

b: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.

c: Überlagerung. Keine Vakuole erkennbar. Signal von Kern und Mitochondrium erscheint verstärkt. Ein Spot im vorderen, ein Spot im hinteren Drittel des Trypanosoms.

4.5. LysoTracker® green und Rhodamine-B-Hexylester mit Wirkstoff

4.5.1. LysoTracker® green und Rhodamine-B-Hexylester mit GBAP 94 oder GBAP 146

Durch die Kombination beider Farbstoffe konnten keine neuen Informationen gewonnen werden. Auch die Colokalisation der beiden Farbstoffe am Computer ergab keine neuen Ergebnisse.

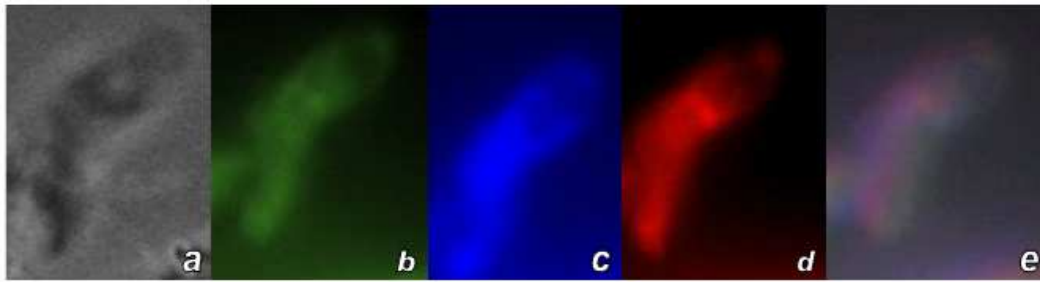


Abb. 53 a-e: Trypanosomen behandelt mit GBAP 94, gefärbt mit LysoTracker[®] green und Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung).

- a: Phasenkontrastaufnahme; entfärbt.
- b: Färbung mit LysoTracker[®] green. Gleichzeitiges Signal von Rhodamine-B-hexylester, besonders bei beiden Spots unterhalb der Vakuole.
- c: Signal von GBAP 94.
- d: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.
- e: Überlagerung.
Entstehung einer Vakuole im vorderen Drittel der Zelle. Mitochondrium oder Kern direkt unterhalb der Vakuole. Beginnende Verplumpung des vorderen Teils. Keine Anfärbung der Vakuole durch einen Marker.

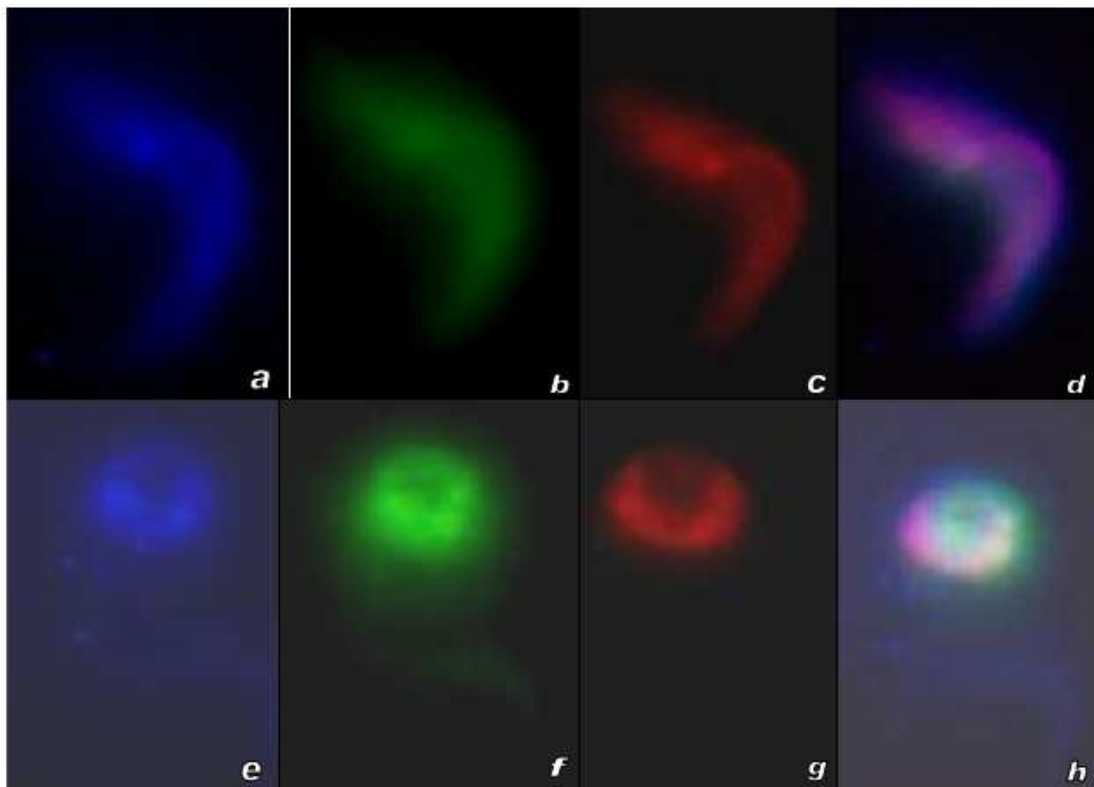


Abb. 54 a-h: Trypanosomen behandelt mit GBAP 146, gefärbt mit LysoTracker green[®] und Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung). Phasenkontrastaufnahme liegt nicht vor.

a, e: Signal von GBAP 146.

b, f: Färbung mit LysoTracker green[®]. Gleichzeitiges Signal von Rhodamine-B-hexylester. Spots dennoch in beiden Seiten trennbar.

c, g: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.

d, h: Überlagerung.

a – d: Entstehung einer Vakuole in der Mitte des Trypanosoms. Trennung von LysoTracker green[®] und Rhodamine-B-hexylester gut möglich. Keine Anfärbung der Vakuole.

e – h: Trypanosom mit Verlust der Form. Flagelle geisselartig am Ende der Zelle. Alle Zellorganellen zwischen Vakuole und Geißel verdrängt. GBAP 146 nahezu homogen um Vakuole verteilt. Zwei Rhodamine-B-hexylester-Spots, entsprechen wahrscheinlich Kern und Mitochondrium. Dazwischen LysoTracker green[®]-Spot, wahrscheinlich Lysosom. Keine Anfärbung der Vakuole durch einen Marker.

4.5.2. LysoTracker[®] green und Rhodamine-B-Hexylester mit Amphotericin B

Wie bei den NIQs fanden sich auch bei Amphotericin B-behandelten Trypanosomen keine neuen Ergebnisse durch die gleichzeitige Verwendung beider Farbstoffe.

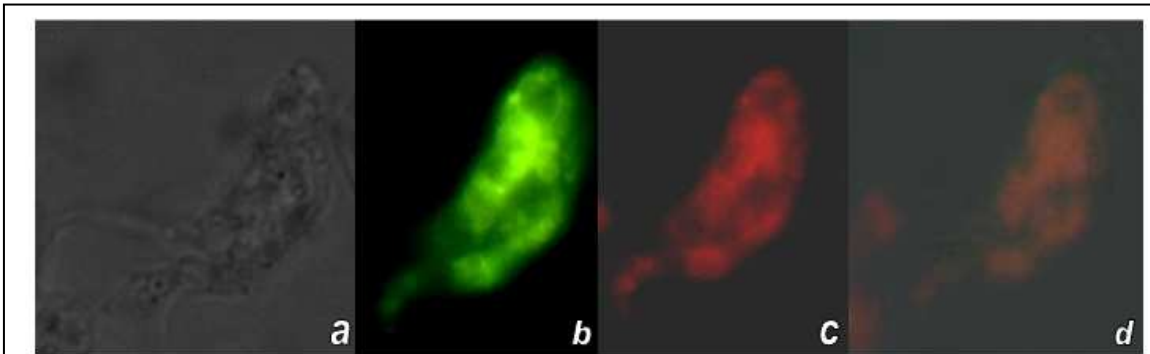


Abb. 55 a-d: Trypanosomen behandelt mit Amphotericin b, gefärbt mit LysoTracker® green und Rhodamine-B-hexylester (100fache optische Vergrößerung).

- a: Phasenkontrastaufnahme; entfärbt.
- b: Färbung mit LysoTracker® green. Gleichzeitiges Signal von Rhodamine-B-hexylester.
- c: Färbung mit Rhodamine-B-hexylester.
- d: Überlagerung.

Entstehung mehrerer Vakuolen, eine davon im vordersten Teil der Zelle. Eine große im mittleren Drittel des Parasiten. Mitochondrium und Kern zwischen diesen Vakuolen. Beginnende Verplumpung der Zelle. Keine Anfärbung der Vakuolen durch einen Marker.

4.6. FM 4-64® mit Wirkstoff

4.6.1. FM 4-64® mit GBAP 94

Die Färbung erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Es konnte eine gute Darstellung der Endosomen erreicht werden. GBAP 94 reichte sich ebenso wie oben beschrieben in den Parasiten an. Im Overlay ergaben sich keine Hinweise für eine Colokalisation.

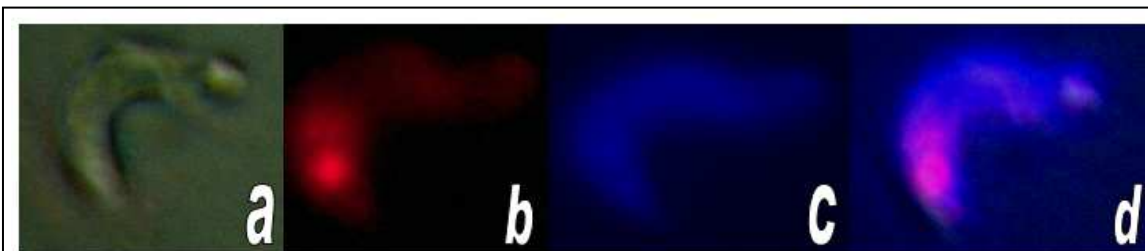
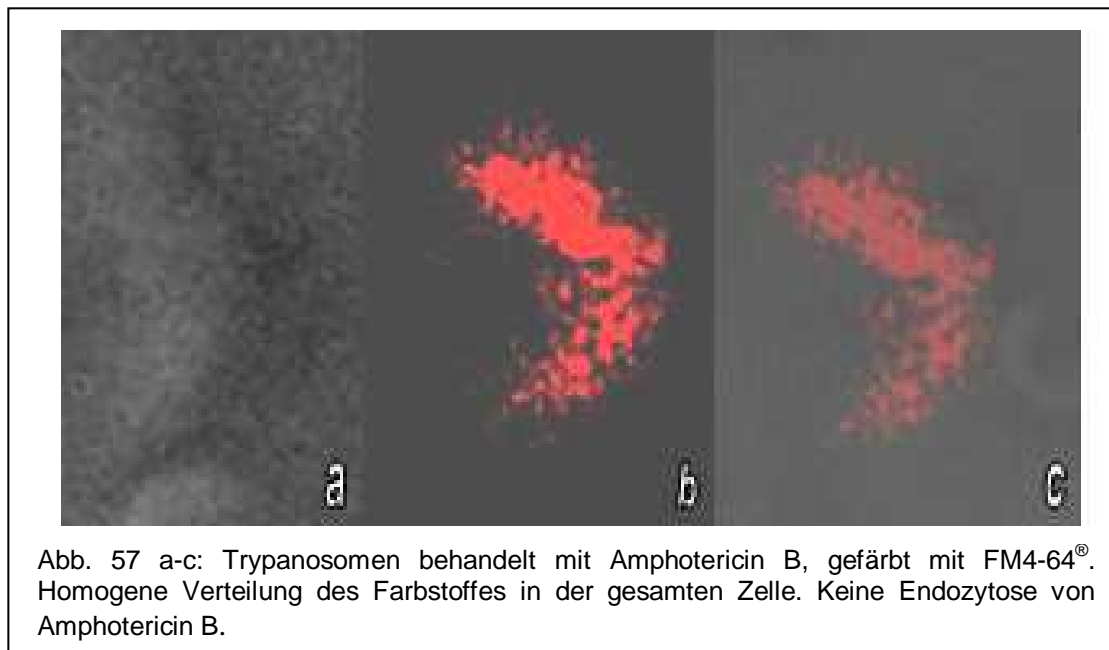


Abb. 56 a-d: Markierung mit FM 4-64® im vorderen Drittel der Zelle etwa im Bereich der flagellar pocket. Hier ein großer und zwei kleine Spots. Bei GBAP 94 findet sich neben einer weitgehend homogenen Färbung der gesamten Zelle ein Signal Spot ebenso im vorderen Drittel der Zelle. Eine Colokalisation findet sich jedoch nicht.

4.6.2. FM 4-64[®] mit Amphotericin B

In den Aufnahmen mit FM 4-64[®] bei den mit Amphotericin B behandelten Trypanosomen gelang die Darstellung der Endosomen nicht gut. Aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten konnte zudem die entstehende Vakuole nicht gleichzeitig mit dem Farbstoff detektiert werden. Eine Colokalisation der Vakuole unter Amphotericin B mit FM 4-64[®] konnte deshalb nicht gefunden werden.



5. FACS[®]

5.1. Fluoreszenzmikroskopische Färbekontrolle

5.1.1. Annexin V-FITC

Es zeigte sich, dass in der unbehandelten Negativkontrolle fast alle Zellen schwach grün angefärbt waren. Sowohl im Amphotericin B-Ansatz, als auch im GBAP 94-Ansatz konnten zwei deutlich unterschiedliche Intensitäten der Grünfärbung festgestellt werden. Besonders Zellen, die im Phasenkontrast morphologisch verändert erschienen, fluoreszierten stark.

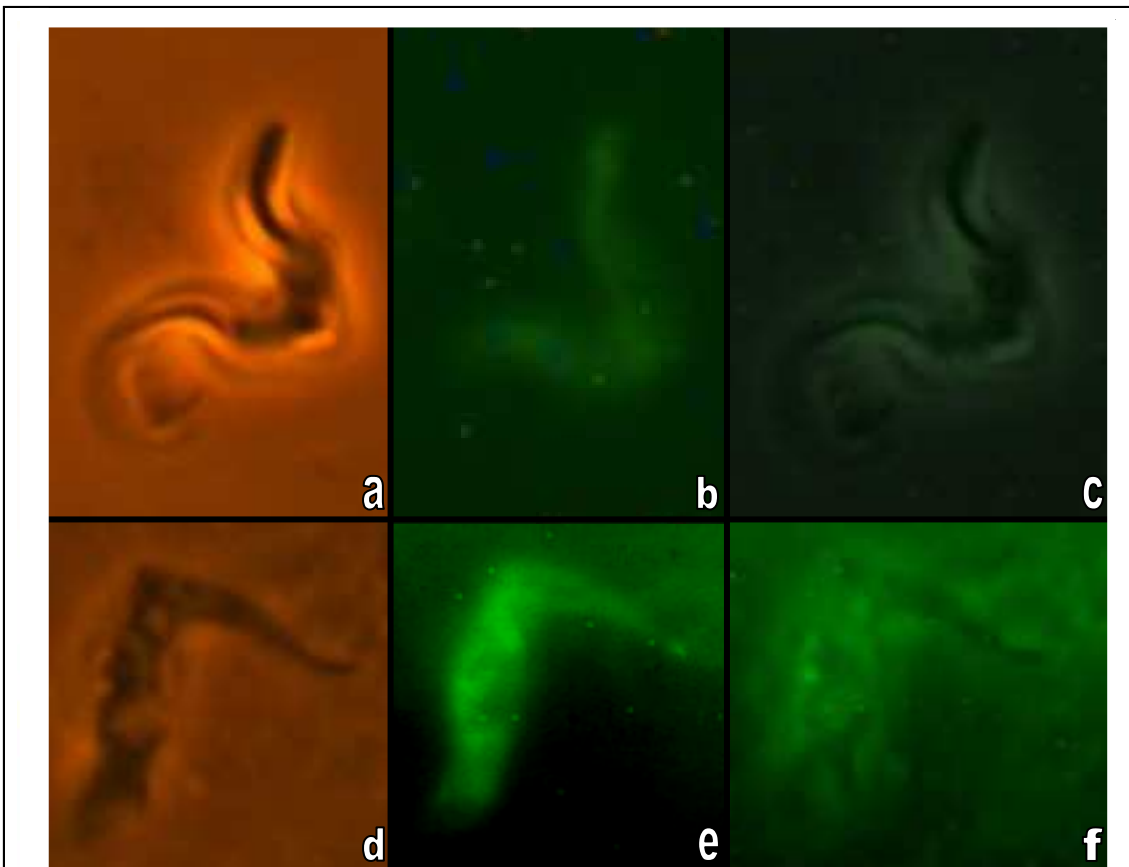


Abb. 58 a-f: Amphotericin B-behandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC (100fache optische Vergrößerung).

a, d: Phasenkontrastaufnahme.

b, e: Färbung mit Annexin V-FITC.

c, f: Überlagerung.

a – c: Morphologisch unverändertes Trypanosom. Schwache Färbung mit Annexin V-FITC.

d – f: Morphologisch mittelgradig verändertes Trypanosom mit Vakuole im Phasenkontrast. Starke Färbung mit Annexin V-FITC.

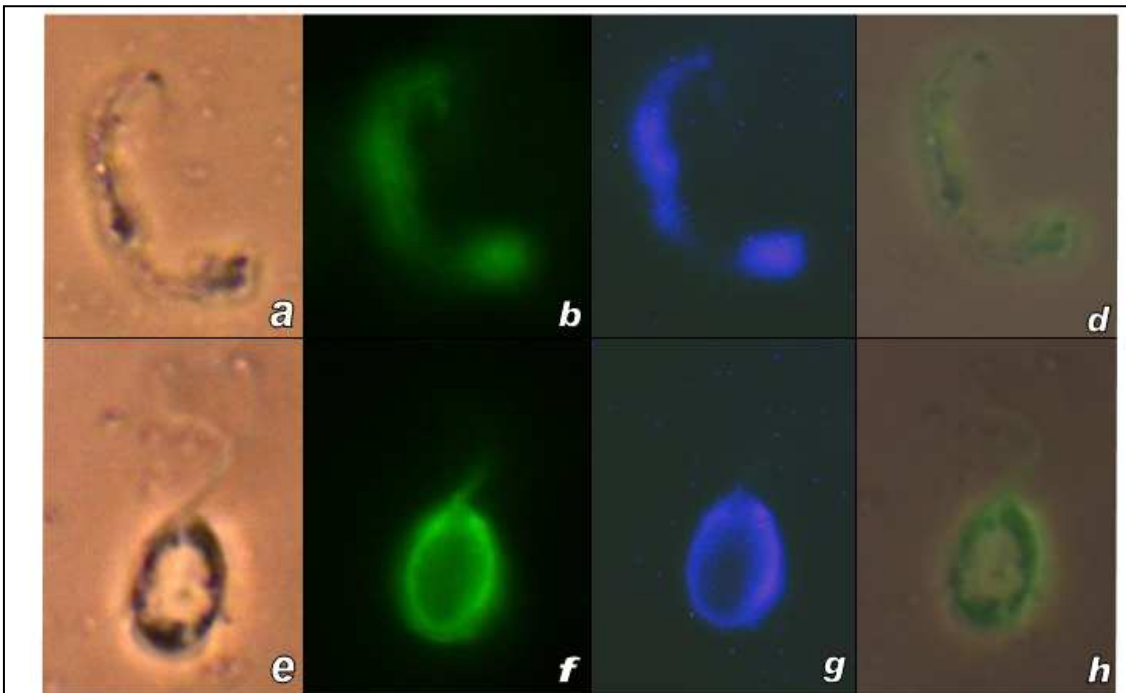


Abb. 59 a-h: Trypanosomen behandelt mit GBAP 94, gefärbt mit Annexin V-FITC (100fache optische Vergrößerung).

a, e: Phasenkontrastaufnahme.

b, f: Färbung mit Annexin V-FITC.

c, g: Signal von GBAP 94.

d, h: Überlagerung. Für die bessere eine Übersichtlichkeit nur Phasenkontrast und Annexin V-FITC.

a – d: Morphologisch geringgradig verändertes Trypanosom. Schwache Färbung mit Annexin V-FITC.

e – h: Verplumptes Trypanosom. Stärkere Färbung mit Annexin V-FITC.

5.1.2. Propidium-Jodid

Die nicht behandelten Trypanosomen färbten sich nicht oder äußerst schwach mit Propidium-Jodid. In der mit Paraformaldehyd behandelten Probe zeigte sich schon nach wenigen Minuten eine starke Färbung der meisten Parasiten.

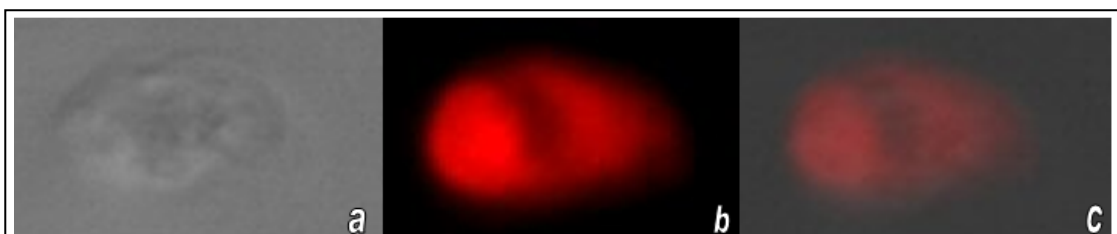


Abb. 60 a-c: Färbekontrolle Propidium-Jodid. Trypanosom zuvor mit Paraformaldehyd behandelt.

5.2. I. FACS®-Versuch (Pilot)

Die Behandlung der Trypanosomen und die Färbung erfolgten wie oben beschrieben.

Zur Auswertung wurden die Marker wie folgt eingerichtet [32]:

- Zellen im linken unteren Quadranten sind nicht signifikant positiv für Annexin V oder PI und werden als lebend betrachtet.
- Zellen im linken oberen Quadranten werden als nekrotisch betrachtet.
- Zellen im rechten unteren Quadranten werden als apoptotisch betrachtet.
- Zellen im rechten oberen Quadranten sind nicht sicher zuzuordnen.

Die Ausrichtung erfolgte an den Leerwerten für unbehandelte Zellen. Eine Überlagerung des Signals von Annexin V und PI mit der Eigenfluoreszenz der GBAP-Substanzen konnte ausgeschlossen werden (siehe auch 5.3 a, b, c, d).

Insgesamt zeigte sich, dass die Eigenfluoreszenz der NIQs insbesondere auf die Detektion der beiden verwendeten Fluoreszenzmarker Annexin V-FITC und Propidium-Jodid keinen signifikanten Einfluss hat. Allerdings zeigten sich in allen vier behandelten Proben fast ausschließlich lebende Parasiten. Die meisten PI-positiven Parasiten zeigten sich Amphotericin B-Ansatz (Vgl. Abb. 61). Es konnten in allen fünf Ansätzen nur sehr wenige selektiv Annexin V-positive Zellen gemessen werden. Ein signifikanter zweiter Annexin V-peak, als deutlicher Hinweis für Apoptose, konnte in keiner der Proben gemessen werden.

Es ergaben sich keinerlei weiterführende Informationen aus den scatter-plots.

In der overlay-Abbildung sind die Ergebnisse der Annexin V-Färbungen für Amphotericin B, GBAP 94 und GBAP 146 dargestellt.

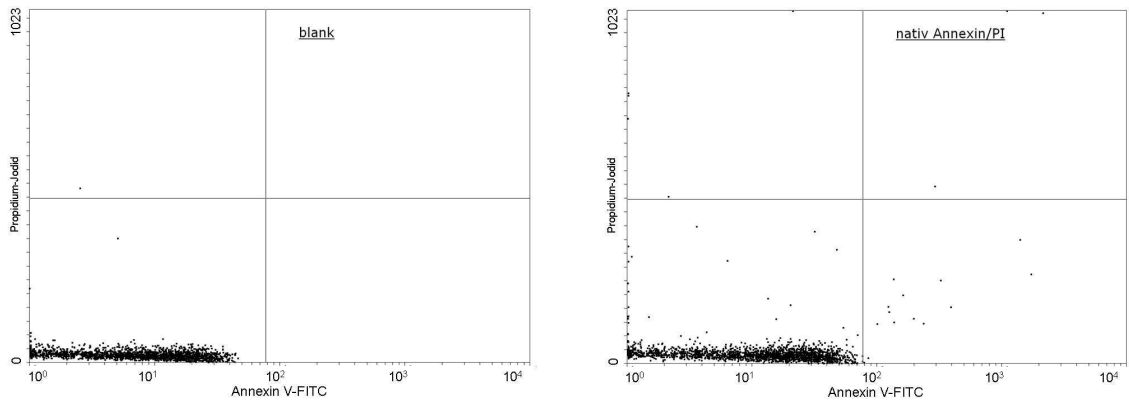


Abb 61 a/b: a: Unbehandelte Trypanosomen, ungefärbt. Fast alle Zellen befinden sich im linken unteren Quadranten (99,94%). Eine Eigenfluoreszenz von *T. brucei brucei* lässt sich nicht nachweisen.

b: Unbehandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC und PI. Auch hier befinden sich die Zellen fast ausschließlich im linken unteren Quadranten (98,83%). Ein Unterschied zu den ungefärbten Parasiten ist nicht zu sehen.

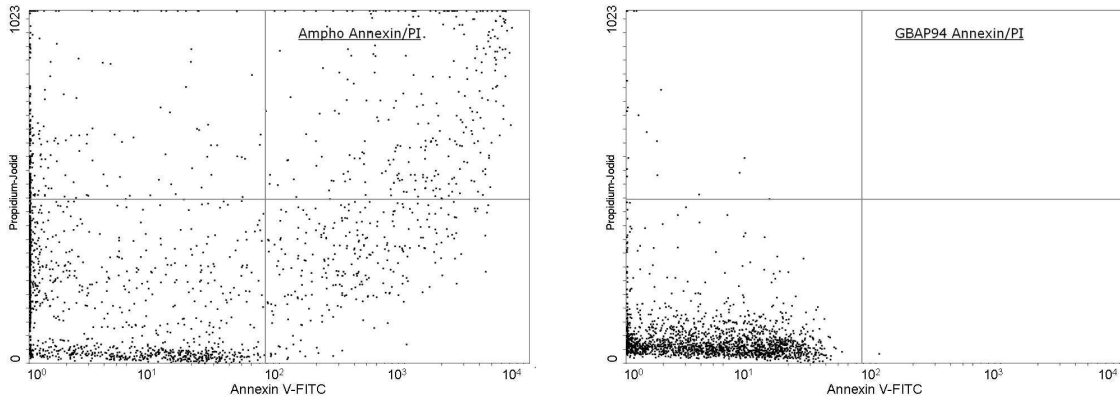


Abb. 62 a/b: a: 2h mit Amphotericin B behandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC und PI. Insgesamt deutlich größerer Anteil Annexin V-positiver Zellen bei stärkerer PI-Färbung als bei den unbehandelten Zellen. Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich im linken unteren Quadranten (58,16%). Eine große Zahl selektiv Annexin V-positiver Zellen im rechten unteren Quadranten findet sich nicht (15,48%).

b: 2h mit GBAP 94 behandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC und PI. Insgesamt sehr kleiner Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (0,55%). Ebenso sehr geringer Anteil selektiv PI-positiver Zellen (1,14%). Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich im linken unteren Quadranten (98,10%).

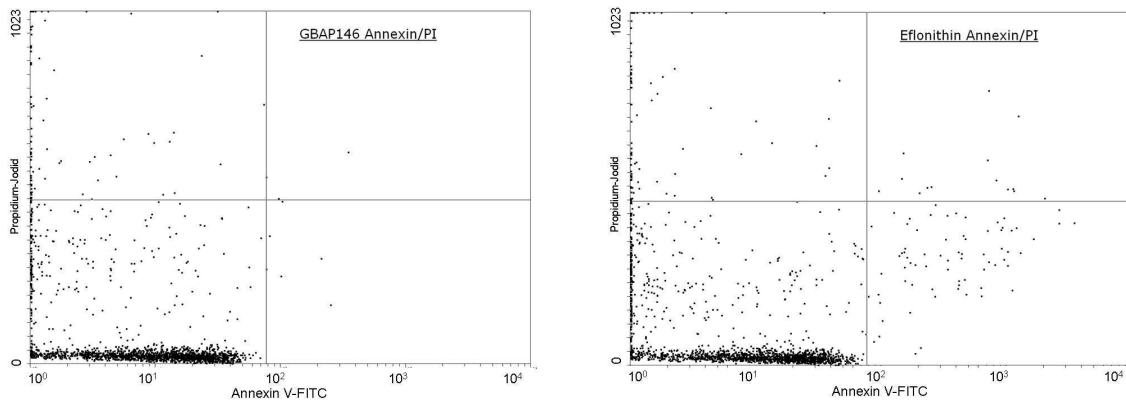


Abb. 63 a/b: 2h mit GBAP 146 behandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC und PI. Sehr kleiner Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (3,83%). Ebenso kleiner Anteil selektiv PI-positiver Zellen (3,47%). Jeweils etwas größere Anteile, als bei GBAP 94. Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich weiterhin im linken unteren Quadranten (91,48%).

b: 4h mit Eflornithin behandelte Trypanosomen, gefärbt mit Annexin V-FITC und PI. Relativ kleiner Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (9,37%). Dieser ist jedoch größer, als bei GBAP 94 und GBAP 146. Dies gilt auch für den Anteil selektiv PI-positiver Zellen (4,22%). Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich auch hier im linken unteren Quadranten (84,06%).

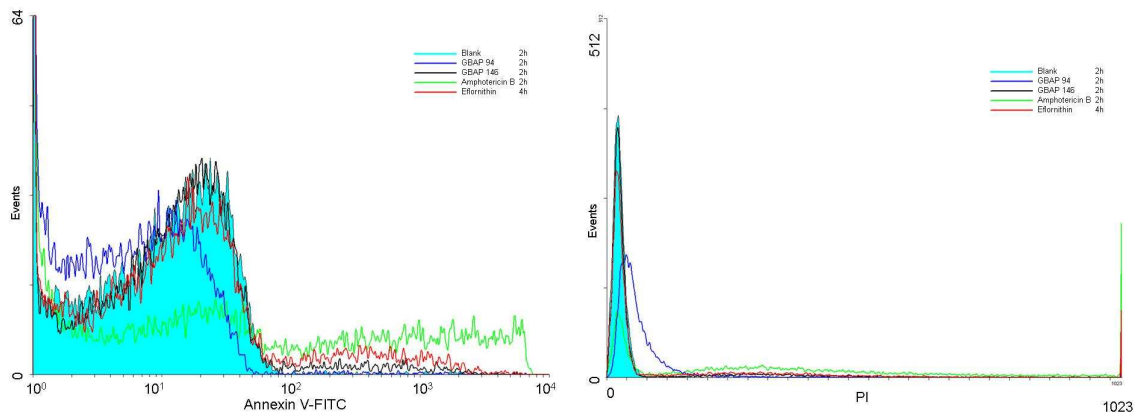


Abb. 64 a/b : Überlagerung der Annexin V-Signale (links) und PI-Signale (rechts) nach Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffe.

Unbehandelte	2h
GBAP 94	2h
GBAP 146	2h
Amphotericin B	2h
Eflornithin	4h

a: Insgesamt sehr kleiner Anteil Annexin V-positiver Zellen in allen Proben. Lediglich unter Amphotericin B ein signifikanter Anteil; dieser aber mit gleichzeitig starker PI-Intensität (Abb. b) Bei keiner Substanz ein zweiter Annexin V-peak.

b: Lediglich minimale Anteile der PI-positiven Zellen außerhalb des Referenzbereiches der unbehandelten Zellen.

Tabelle 3: Quadrantenstatistik I. FACS-Versuch

	Oben links	Oben rechts	Unten links	Unten rechts
unbehandelt	0,06%	0,00%	99,94%	0,00%
nativ / Annexin+PI	0,25%	0,17%	98,83%	0,75%
Amphotericin B 2h	10,65%	15,71%	58,16%	15,48%
GBAP 94 2h	1,14%	0,21%	98,10%	0,55%
GBAP 146 2h	3,47%	1,22%	91,48%	3,83%
Eflornithin 4h	4,22%	2,35%	84,06%	9,37%

Wie bereits unter 5.2 beschrieben hat *T. brucei brucei* keine signifikante Eigenfluoreszenz, die mit den gewählten Farbstoffen interferiert. Ebenso ist die Färbung unbehandelter Parasiten bei beiden Farbstoffen nicht stark ausgeprägt.

In der Amphotericin B-Probe zeigt sich ein signifikanter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen. Auch in der Eflornithin-Gruppe findet sich ein relevanter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen. In den mit GBAP 94 und GBAP 146 behandelten Proben finden sich fast keine spezifisch gefärbten Parasiten.

5.3. II. FACS®-Versuch (WDH.-Pilot)

Im zweiten FACS®-Versuch wurden mehr Zeitpunkte, als im ersten Versuch untersucht. Hiermit sollte vermieden werden, den Zeitpunkt des Zelltodes zu verpassen, sollte dieser nicht auf Apoptose beruhen und deshalb innerhalb eines kürzeren Zeitraumes vonstatten gehen. Es konnte dann aber in allen mit NIQs behandelten Proben ein signifikanter Anteil Annexin V-positiver Zellen nachgewiesen werden. Ein massiver Anstieg Annexin V-positiver Zellen fand sich zu keiner Zeit.

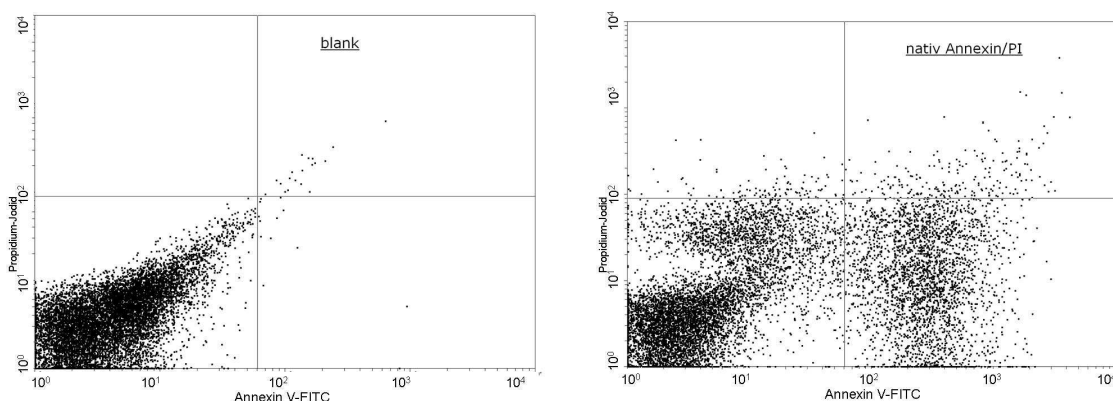


Abb. 65 a/b: a: Probe unbehandelt, ungefärbt. Die Zellen liegen fast ausschließlich im erwarteten linken unteren Quadranten (99,68%).

b: Probe unbehandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. 27,50% der Zellen sind selektiv Annexin V-positiv. Somit massiver vergrößerter Anteil dieser Zellen. Anteil der PI-positiven Zellen ist wie erwartet gering (3,11%).

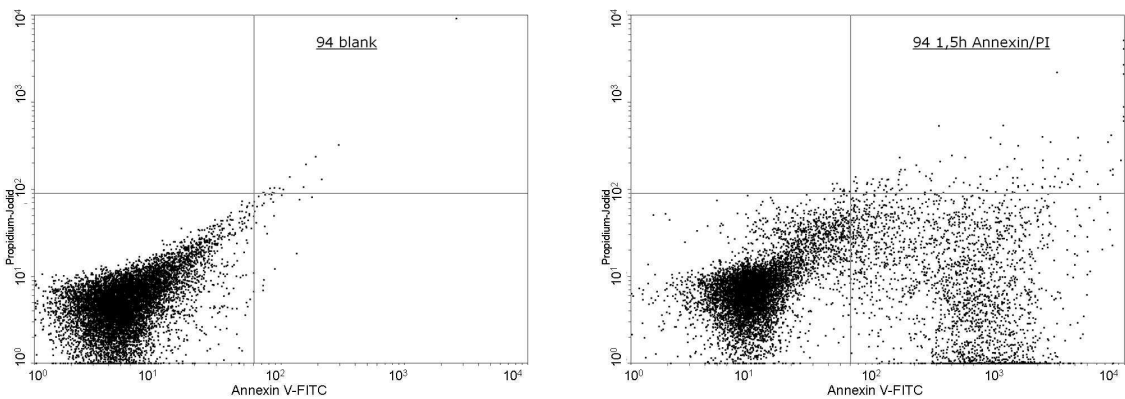


Abb. 66 a/b: a: Probe 4h mit GBAP 94 behandelt, ungefärbt. Die Zellen liegen fast ausschließlich im erwarteten linken unteren Quadranten (99,62%). Kein Veränderung des Färbeverhalten durch fluoreszierenden Wirkstoff.

b: Probe 1,5h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt deutlich vergrößerter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (24,01%). Dieser Anteil ist allerdings geringer, als in der unbehandelten Kontrolle.

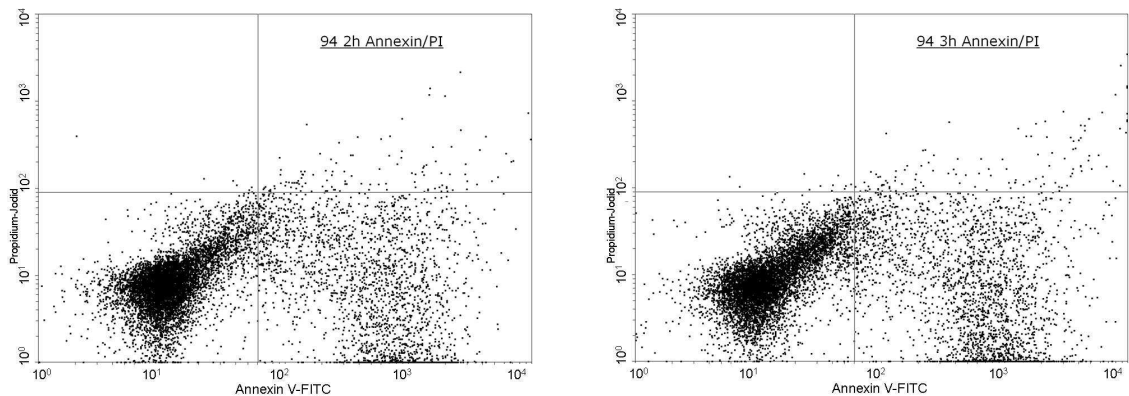


Abb. 67 a/b: a: Probe 2h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Der Anteil der Zellen im rechten unteren Quadranten liegt etwas unter dem Vorwert (22,74%). Der Anteil PI-positiver Zellen ist sehr gering (0,07%).

b: Probe 3h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Leicht vergrößerter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (26,28%). Dieser Anteil ist immer noch geringer, als in der unbehandelten Kontrolle.

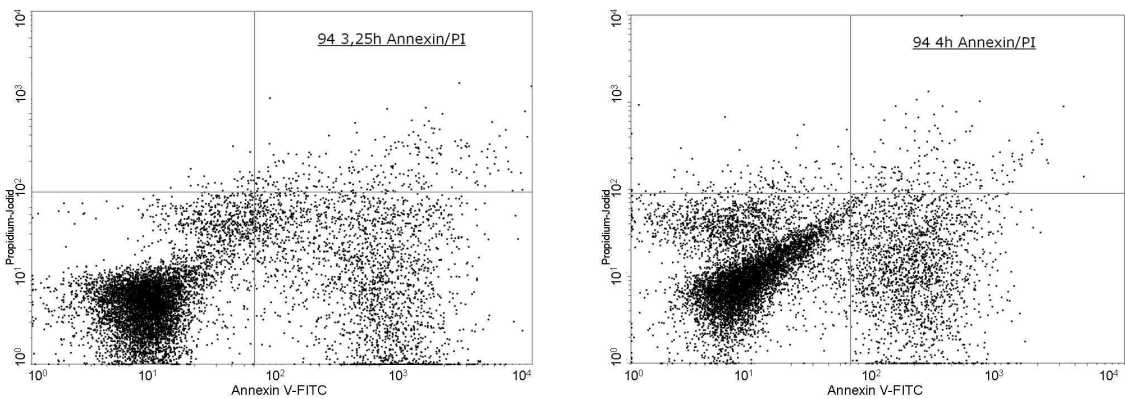


Abb. 68 a/b: a: Probe 3,25h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Niedrigerer Anteil der selektiv Annexin V-positiven Zellen im Vergleich zum Vorwert (23,63%). Der Anteil PI-positiver Zellen bleibt gering (0,32%).
 b: Probe 4h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Kleinster Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (19,64%). Entsprechend größerer Anteil an ungefärbten Zellen (77,13%).

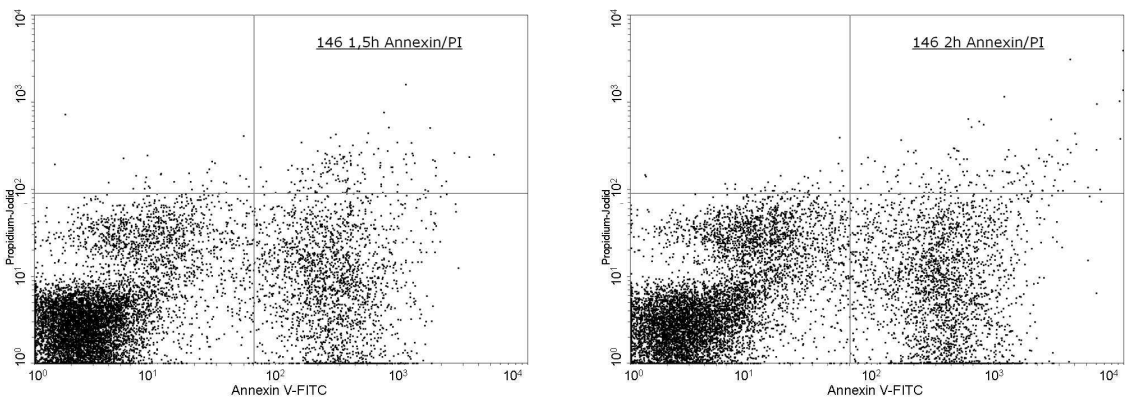


Abb. 69 a/b: a: Probe 1,5h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Anteil der selektiv Annexin V-positiven Zellen geringer, als bei den unbehandelten Zellen (20,53%). Der Anteil PI-positiver Zellen ist auch bei GBAP 146-Gruppe gering (Maximum: 1,81% nach 1,5h, Minimum: 1,63% nach 4h).
 b: Probe 2h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Größter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen in der GBAP 146-Gruppe (25,14%).

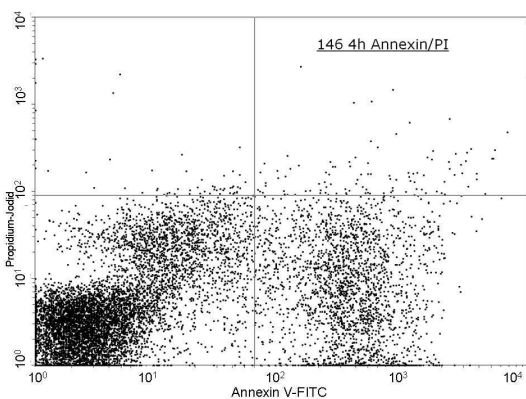


Abb. 70: Probe 4h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Etwas geringerer Anteil der selektiv Annexin V-positiven Zellen als nach 2h (24,38%). Werte auch sonst sehr ähnlich wie nach 2h.

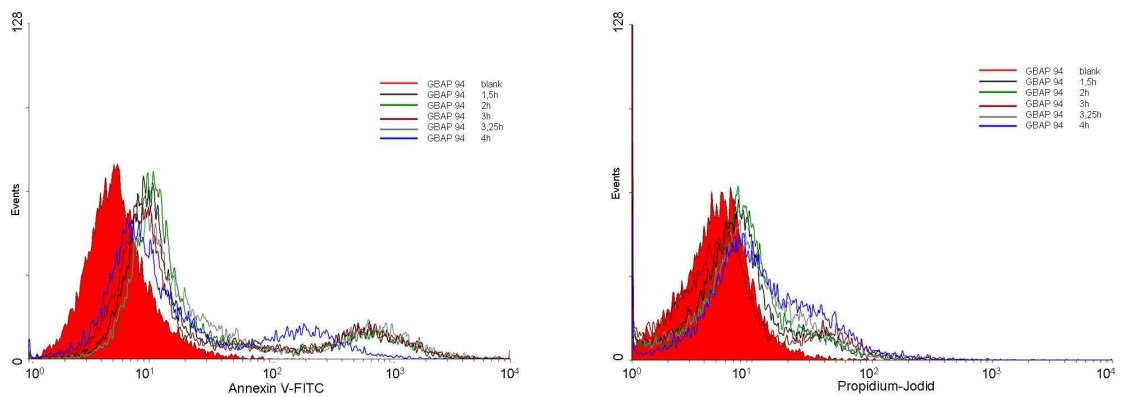


Abb. 71 a/b: Überlagerung der Annexin V- (a) und PI-Signale (b) nach Behandlung mit GBAP 94 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten:

- █ GBAP 94 ungefärbt
- █ GBAP 94 1,5h
- █ GBAP 94 2h
- █ GBAP 94 3h
- █ GBAP 94 3,25h
- █ GBAP 94 4h

a: In der Annexin V-Färbung zeigt sich in allen Proben, mit Ausnahme der ungefärbten, ein zweites Intensitätsmaximum. Dieses ist jedoch nur gering ausgeprägt. Das Maximum in der 4h Probe liegt bei etwas niedrigerer Intensität, als bei den anderen 4 Proben, die parallel verlaufen.

b: In der PI-Färbung findet sich bei allen Proben ein relativ breites Maximum. Der Anteil der signifikant gefärbten Zellen ist sehr gering.

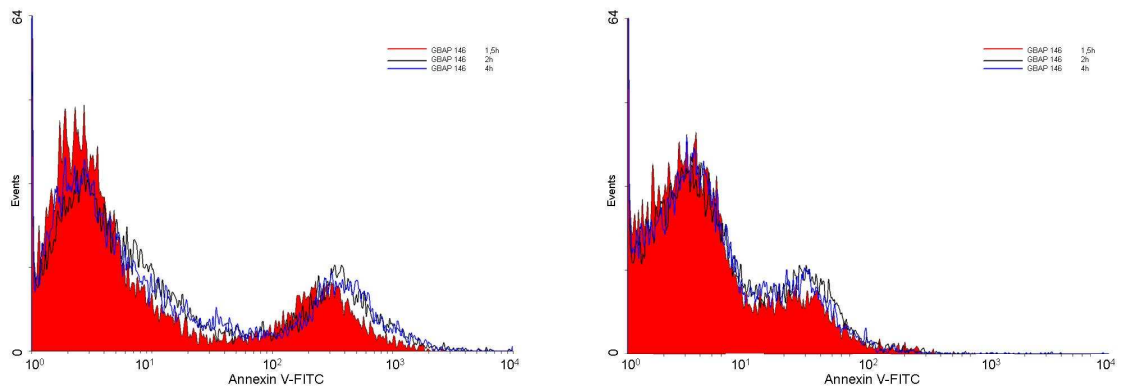


Abb. 72 a/b: Überlagerung der Annexin V- (a) und PI-Signale (b) nach Behandlung mit GBAP 146 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten:

- █ GBAP 146 1,5h
- █ GBAP 146 2h
- █ GBAP 146 4h

a: In der Annexin V-Färbung zeigt sich in allen 3 Proben ein deutliches zweites Intensitätsmaximum. Es finden sich zwischen den 3 Proben keine wesentlichen Unterschiede.

b: In der PI-Färbung findet sich bei allen Proben ein relativ breites 1. Maximum. Zusätzlich zeigt sich ein deutlich niedrigeres 2. Maximum direkt im Anschluß. Dennoch ist der Anteil der signifikant PI-gefärbten Zellen auch hier sehr gering.

Tabelle 4: Quadrantenstatistik II. FACS-Versuch

	Oben links	Oben rechts	Unten links	Unten rechts
blank	0,00%	0,19%	99,68%	0,13%
blank Annexin+PI	1,03%	2,09%	69,38%	27,50%
GBAP146 1,5h	0,34%	1,47%	77,66%	20,53%
GBAP146 2h	0,38%	1,41%	73,07%	25,14%
GBAP146 4h	0,58%	1,05%	73,99%	24,38%
GBAP94 blank	0,00%	0,15%	99,62%	0,23%
GBAP94 1,5h	0,09%	1,21%	74,69%	24,01%
GBAP94 2h	0,07%	1,17%	76,02%	22,74%
GBAP94 3h	0,12%	1,20%	72,40%	26,28%
GBAP94 3,25h	0,32%	2,67%	73,38%	23,63%
GBAP94 4h	1,30%	1,93%	77,13%	19,64%

Es zeigt sich in allen Proben, die mit Annexin V-FITC gefärbt sind, ein großer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen. Die Unterschiede zwischen den unbehandelten und mit GBAP 94- bzw. GBAP 146-behandelten Trypanosomen ist sehr gering.

Der Anteil selektiv PI-positiver Zellen ist in allen Proben sehr klein.

Zwischen allen untersuchten Proben gibt es in der Quadrantenverteilung nur geringe Unterschiede.

5.4. III. FACS®-Versuch (Zeitreihe)

Bei dem dritten Versuch wurde nur ein Teil der Proben neben PI auch mit Annexin V-FITC gefärbt.

Es zeigte sich, dass sich bei den Amphotericin B behandelten Trypanosomen nach zwei Stunden der größte Teil (93,73%) Propidium-Jodid positiv darstellte. Danach fiel der Anteil der PI-positiven Zellen deutlich ab. Ähnlich verhielt es sich in der Eflornithin-Gruppe. Der Abfall kam allerdings erst nach der 3,5h Messung und war deutlich ausgeprägter. Völlig anders verhielten sich die mit GBAP 146-behandelten Zellen. Hier dauerte es über 3h bis ein deutlicher Anstieg der PI-Positivität zu sehen war.

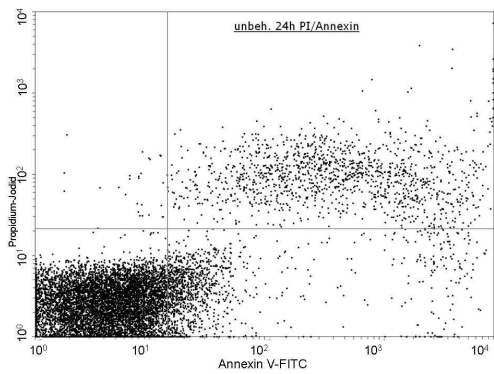
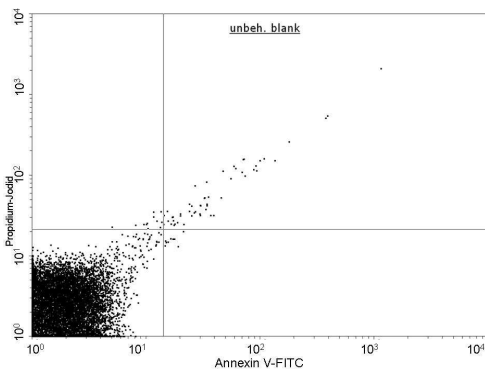


Abb. 73 a/b: a: Probe unbehandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Die Zellen liegen fast ausschließlich im erwarteten linken unteren Quadranten.
 b: Probe 24h unbehandelt in offenem Eppendorf-Gefäß statt in Kulturflasche bebrütet, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt deutlich vergrößerter Anteil Annexin V- und PI-positiver Zellen.

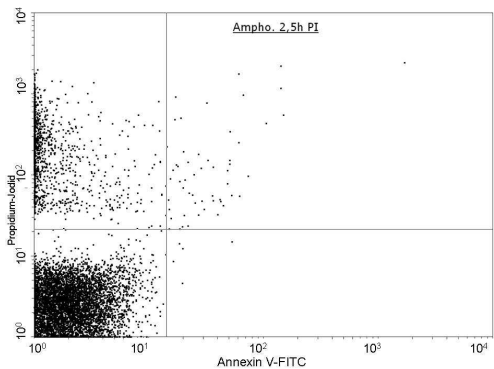
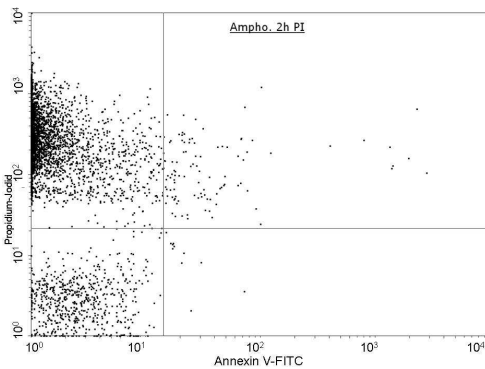


Abb. 74 a/b: a: Probe 2h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein sehr großer Anteil PI-positiver Zellen (93,67%).
 b: Probe 2,5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Insgesamt deutlich geringerer Anteil PI-positiver Zellen (36,03%).

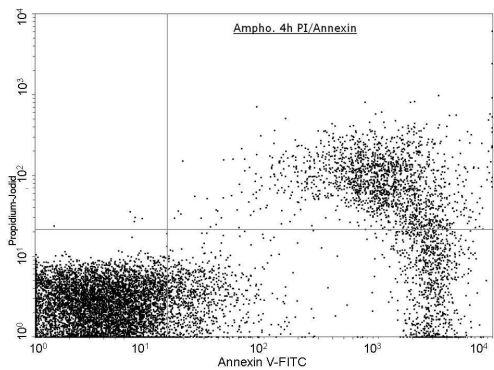
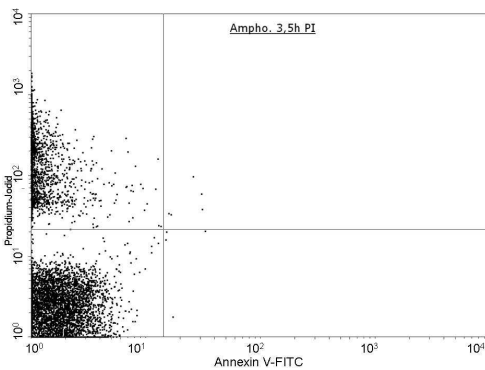


Abb. 75 a/b: a: Probe 3,5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (56,52%) im Vergleich zu 2,5h.
 b: Probe 4h mit Amphotericin B behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Großer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (64,16%) bei sehr geringerem Anteil selektiv PI-positiver Zellen (0,05%).

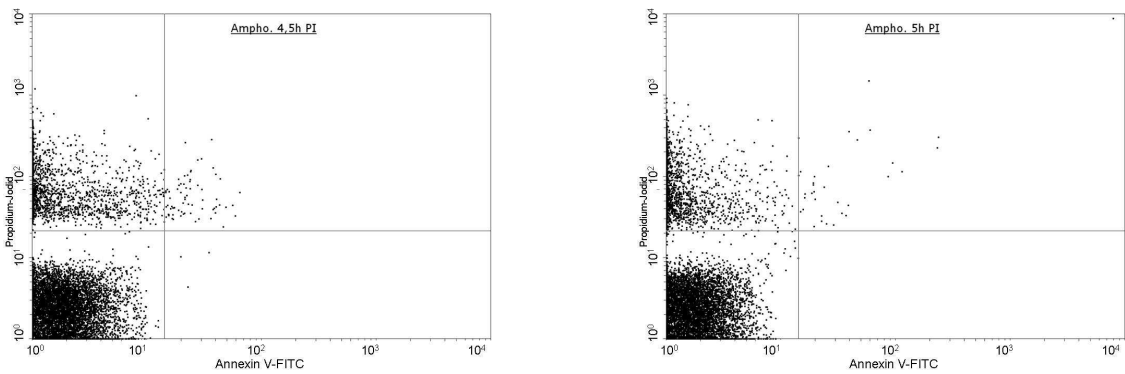


Abb. 76 a/b: a: Probe 4,5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (26,47%) im Vergleich zu 4h.
b: Probe 5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Konstant großer Anteil PI-positiver Zellen (29,92%).

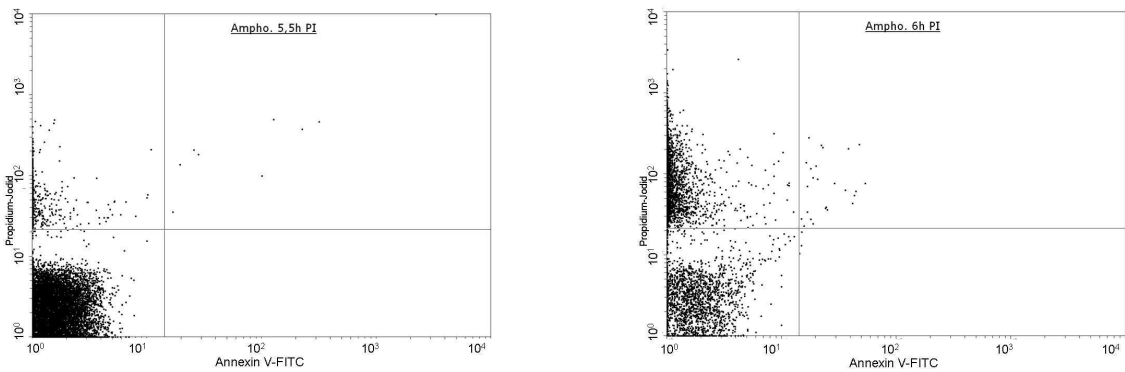


Abb. 77 a/b: a: Probe 5,5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein deutlicher Abfall des Anteils PI-positiver Zellen (6,45%) im Vergleich zu den Vorwerten.
b: Probe 6h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Massiver Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (81,92%).

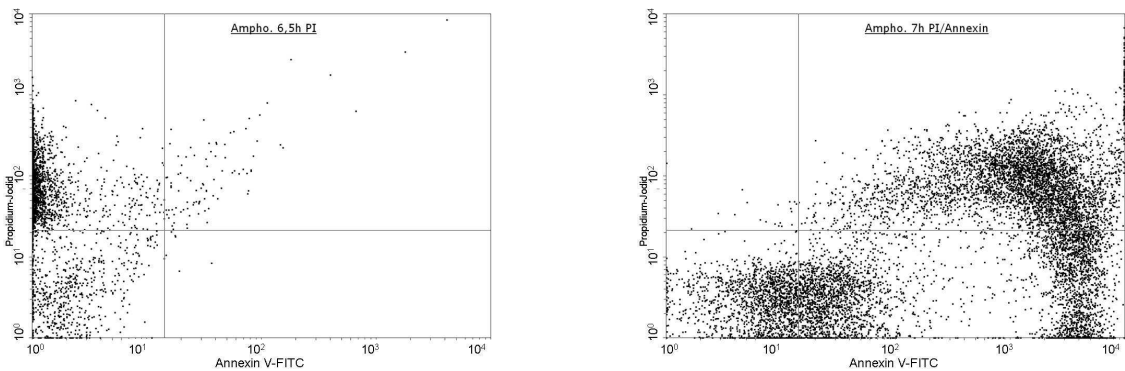


Abb. 78 a/b: a: Probe 6,5h mit Amphotericin B behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein weiterer Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen auf ein absolutes Maximum (93,09%).
b: Probe 7h mit Amphotericin B behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Halbierung des Anteils PI-positiver Zellen bei sehr geringerem Anteil selektiv PI-positiver Zellen (0,19%). Die meisten PI-positiven Zellen sind ebenso Annexin V-positiv. Zusätzlich gibt es einen großen Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (38,41%).

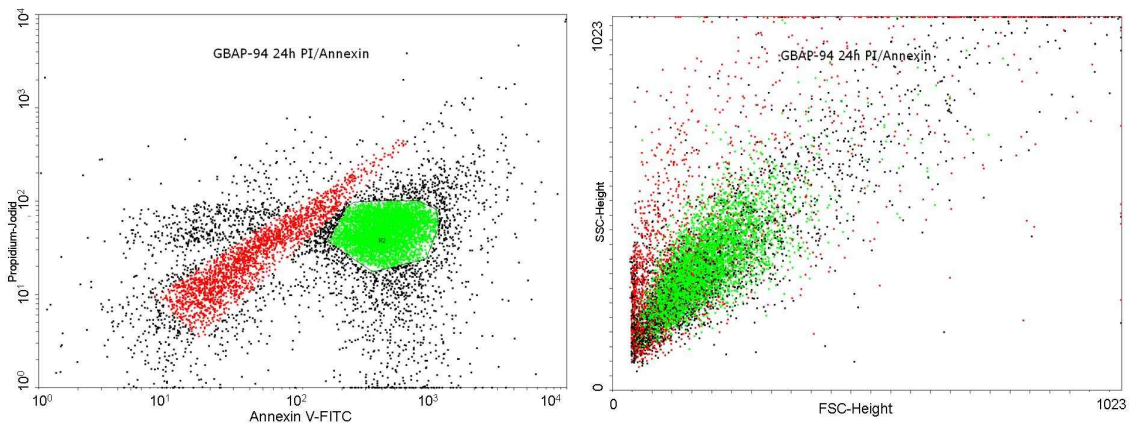


Abb. 79 a/b: a: Probe 24h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigen sich 2 Populationen (rot und grün eingefärbt), die beide zum größten Teil Annexin V- und PI-positiv sind. Im FSC/SCC-dot-Plot unterscheiden sich beide weder untereinander noch im Vergleich zu den nicht in den beiden Gates erfassten Trypanosomen. Insgesamt hoher Anteil doppelt positiver Zellen (76,25%). Der Anteil der selektiv Annexin V-positiven Zellen ist wesentlich geringer (17,67%). Der Anteil selektiv PI-positiver (1,45%) und ungefärbter Zellen (4,63%) ist nochmals deutlich geringer.

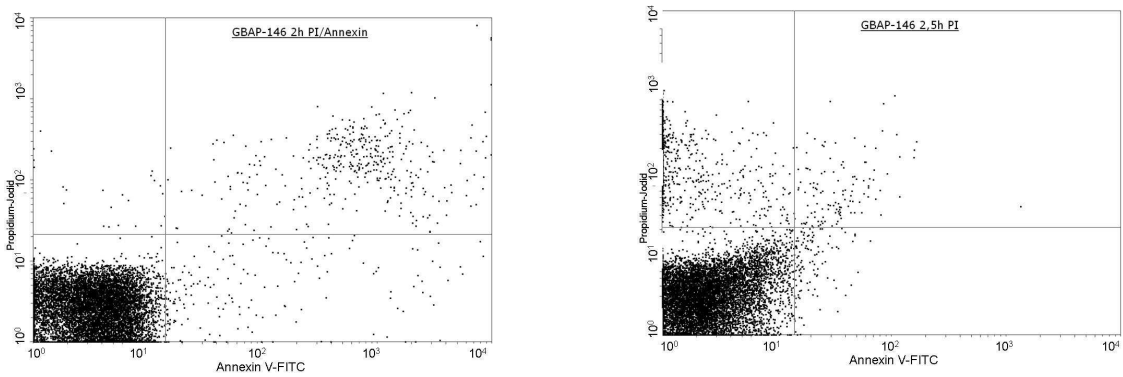


Abb. 80 a/b: a: Probe 2h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Der größte Anteil der Zellen liegt im Quadranten „unten links“ (94,06%) und ist somit negativ für beide Färbungen.
 b: Probe 2,5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen im Vergleich zu 2h von 4,09% auf (89,22%).

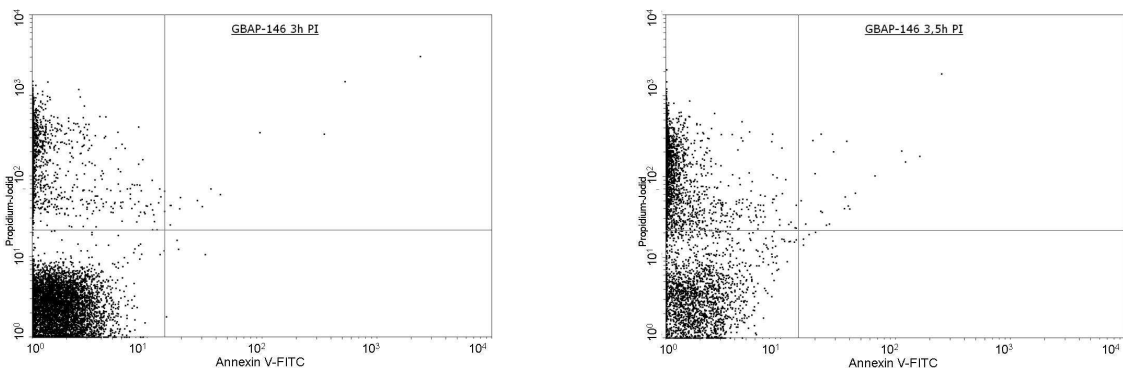


Abb. 81 a/b: a: Probe 3h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein weiterer Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (36,99%) auf mehr als das Dreifache der Vorwerte.
 b: Probe 3,5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Nochmalige Verdopplung des Anteils PI-positiver Zellen (79,79%).

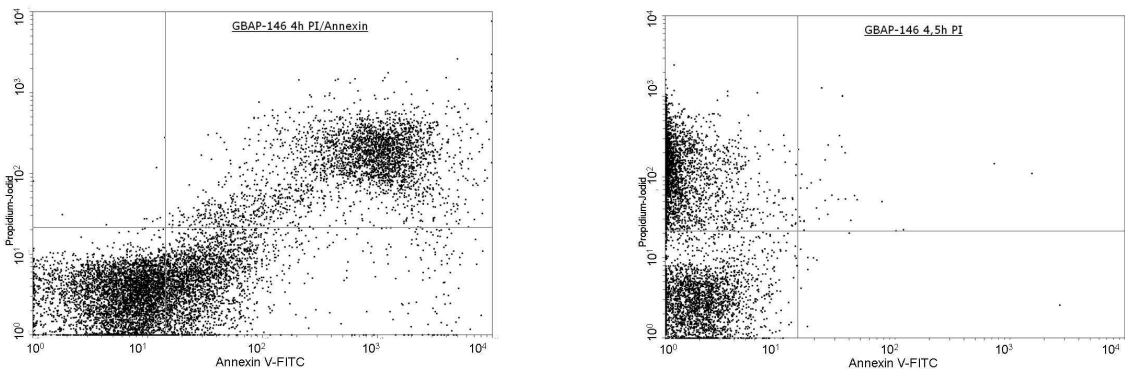


Abb. 82 a/b: a: Probe 4h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigt sich ein großer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (25,21%) ebenso ein großer Anteil doppelt positiver Zellen (30,08%). Der Anteil selektiv PI-positiver Zellen ist sehr gering (0,10%). Ebenso zeigt sich im Vergleich zu den Werten von 3,5h bis 5,5h der geringste Anteil an PI-positiven Zellen (30,18%).

b: Probe 5,5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Deutlicher Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (76,13%).

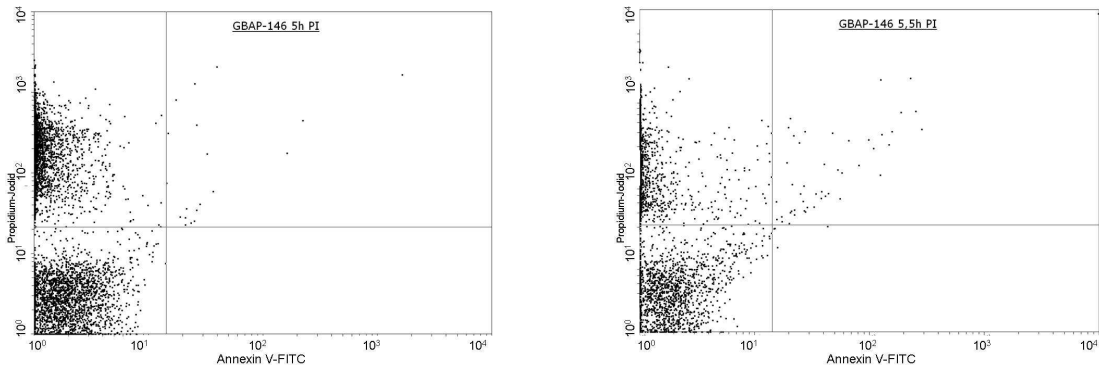


Abb. 83 a/b: a: Probe 5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein nahezu konstanter Anteil PI-positiver Zellen (76,09%).

b: Probe 5,5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Deutlicher Abfall des Anteils PI-positiver Zellen (71,09%) im Vergleich zu den Vorwerten.

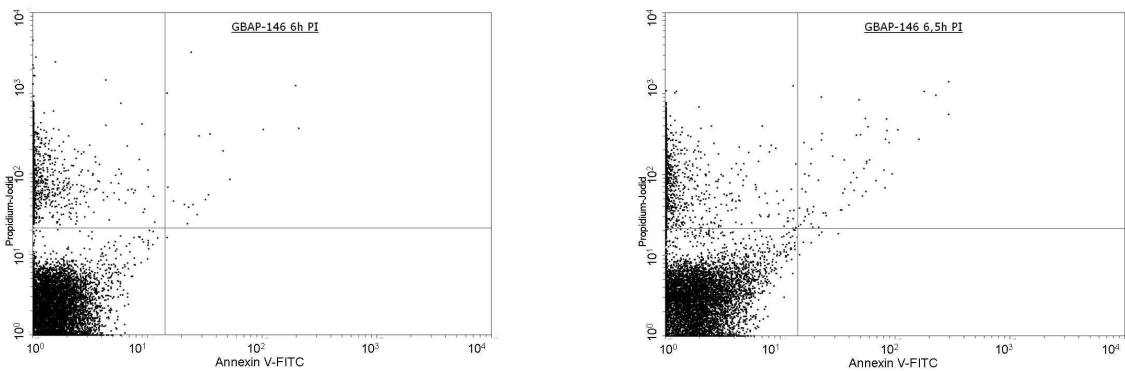


Abb. 84 a/b: a: Probe 6h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein massiver Abfall des Anteils PI-positiver Zellen auf 24,62%.

b: Probe 6,5h mit GBAP 146 behandelt, mit PI gefärbt. Leichter Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (29,06%).

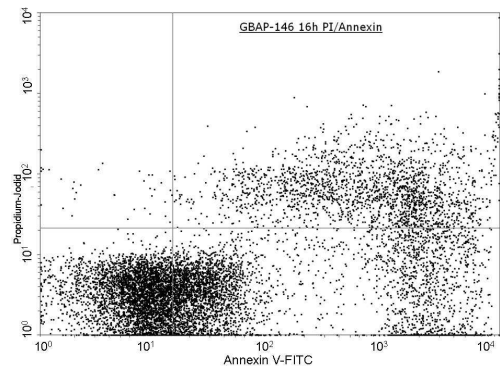
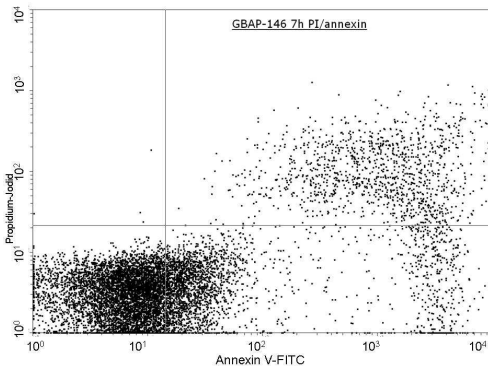


Abb. 85 a/b: a: Probe 7h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigt sich ein konstanter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (26,67%) im Vergleich zum 4h Wert.

Der Anteil doppelt positiver Zellen (12,40%) hat sich mehr als halbiert. Der Anteil selektiv PI-positiver Zellen bleibt sehr gering (0,04%). Insgesamt geht so der Anteil PI-positiver Zellen um mehr als die Hälfte zum Vorwert (6,5h) zurück (12,44%).

b: Probe 16h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Deutlicher Anstieg sowohl des Anteils der selektiv Annexin V-positiven Zellen (39,23%), als auch des Anteils PI-positiver Zellen (20,49%) im Vergleich zum 7h-Wert.

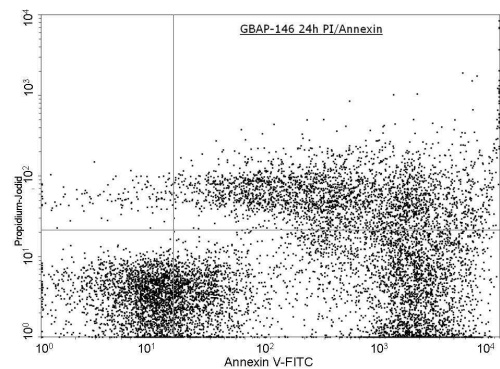
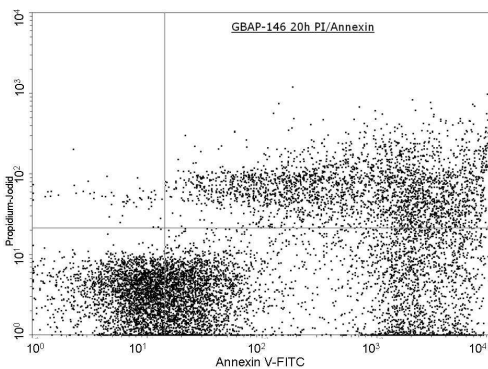


Abb. 86 a/b: a: Probe 20h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigt sich ein Anstieg selektiv Annexin V-positiver Zellen (39,23%) im Vergleich zum Vorwert. Ebenso vergrößert sich der Anteil doppelt positiver Zellen (29,96%).

Der Anteil PI-positiver Zellen steigt auf 30,53% an.

b: Probe 24h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Weiterer Anstieg des Anteils selektiv Annexin V-positiver Zellen auf fast die Hälfte der Gesamtzellen (48,18%). Dieser Anstieg kommt fast ausschließlich durch einen entsprechenden Abfall der ungefärbten Zellen zustande. Die Anteile der doppelt positiven und selektiv PI-positiven Zellen und folglich auch der PI-positiven insgesamt bleiben nahezu konstant.

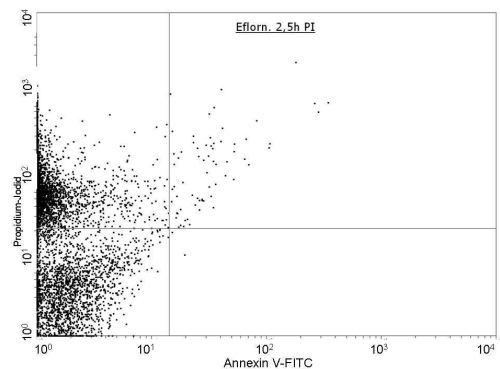
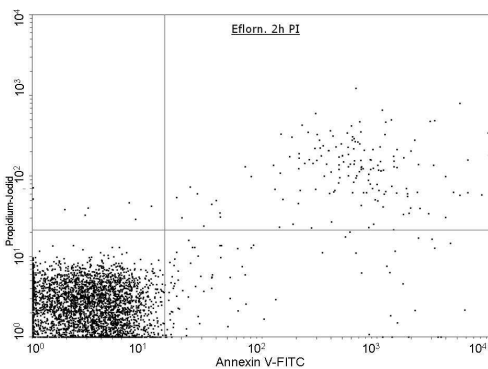


Abb. 87 a/b: a: Probe 2h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Der Anteil PI-positiver Zellen ist sehr gering und liegt bei 4,77%.

b: Probe 2,5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein massiver Anstieg des Anteils der PI-positiven Zellen auf 78,17%.

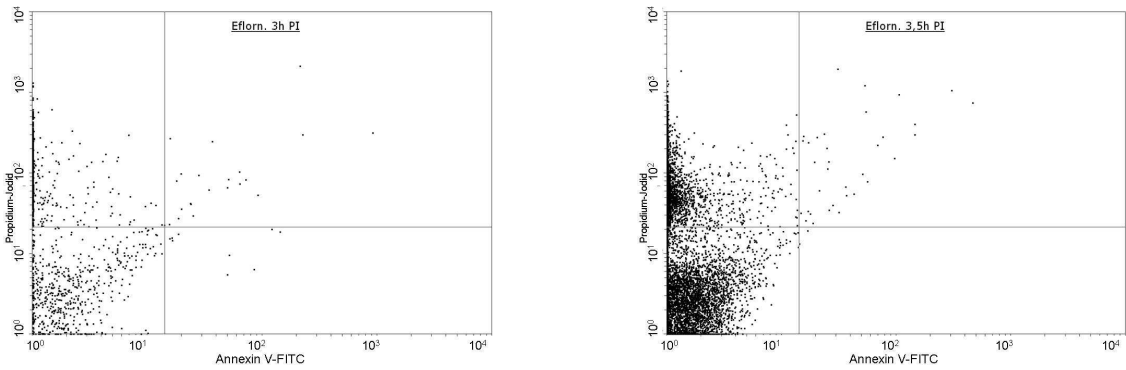


Abb. 88 a/b: a: Probe 3h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang des Anteils PI-positiver Zellen (48,65%).
 b: Probe 3,5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Leichter Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen auf 59,31%.

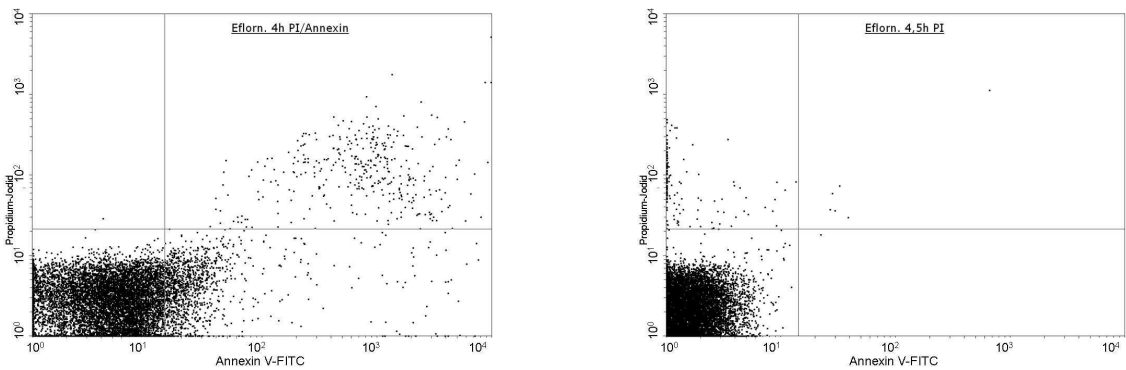


Abb. 89 a/b: a: Probe 4h mit Eflornithin behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigt sich ein geringer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen (12,44%). Der Anteil doppelt positiver Zellen liegt bei 3,54%. Minimaler Anteil selektiv PI-positiver Zellen (0,01%). Somit insgesamt geringer Anteil PI-positiver Zellen (3,55%).
 b: Probe 4,5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Hier weiterer Abfall des Anteils PI-positiver Zellen auf 1,50%.

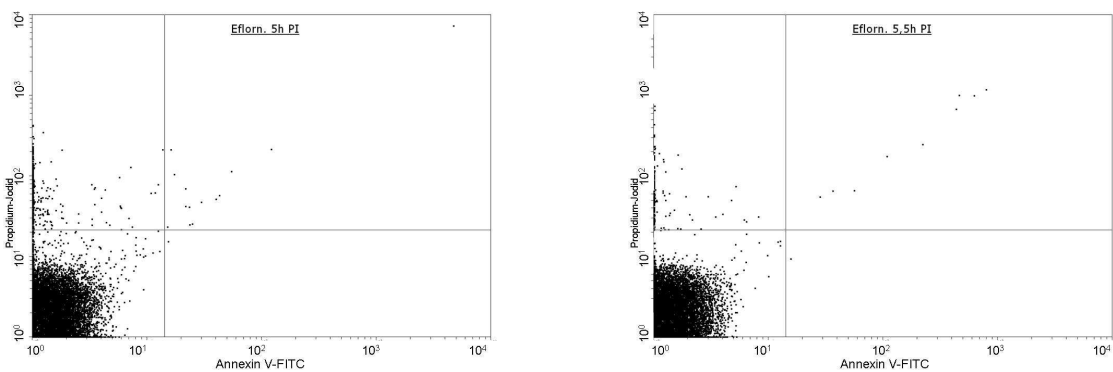


Abb. 90 a/b: a: Probe 5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Minimale Zunahme des Anteils PI-positiver Zellen um 2% auf 3,50%.
 b: Probe 5,5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Geringer Rückgang des Anteils PI-positiver Zellen 1,65%.

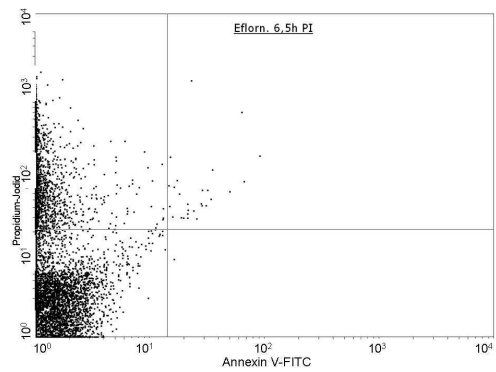
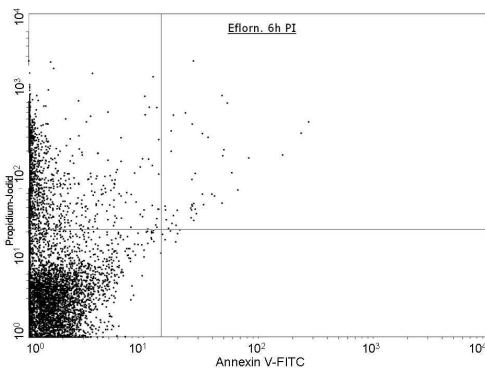


Abb. 91 a/b: a: Probe 6h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen um mehr als das 30fache auf 54,56%.
b: Probe 6,5h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Weiterer leichter Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen auf 63,32%.

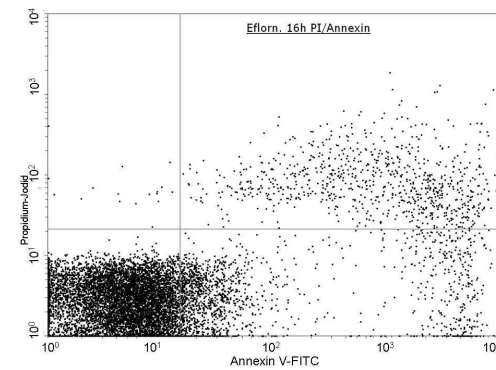
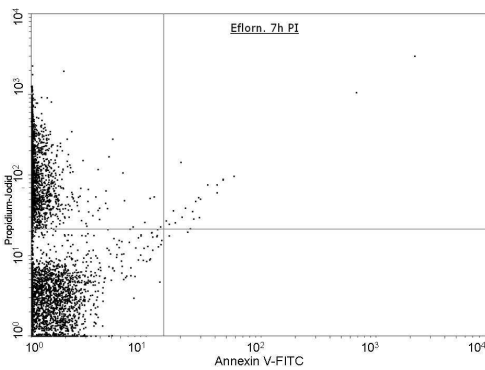


Abb. 92 a/b: a: Probe 7h mit Eflornithin behandelt, mit PI gefärbt. Es zeigt sich weiterer Anstieg des Anteils PI-positiver Zellen (78,03%).
b: Probe 16h mit Eflornithin behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Starker Rückgang des Anteils PI-positiver Zellen insgesamt auf 8,84%.
Im Vergleich zu 4h Eflornithin zeigt sich ein Anstieg der selektiv Annexin V-positiven wie auch der doppelt positiven Zellen. Der Anteil der selektiv PI-Positiven bleibt gering (0,17%).

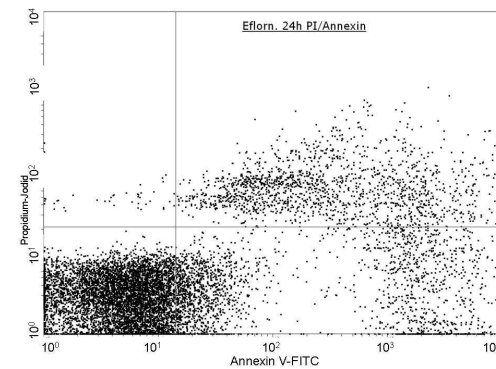
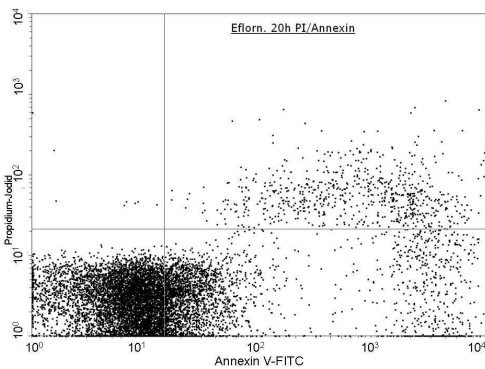


Abb. 93 a/b: a: Probe 20h mit Eflornithin behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Es zeigt sich ein konstanter Anteil PI-positiver Zellen im Vergleich zum Vorwert (7,31%). Die selektiv PI-positiven und auch die doppelt positiven Zellen bleiben ebenso konstant. Der Anteil der selektiv Annexin V-positiven Zellen (27,72%) steigt auf Kosten des Anteils der ungefärbten Zellen deutlich an (64,89%).
b: Probe 24h mit Eflornithin behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Deutlicher Anstieg des Anteils selektiv PI-positiver Zellen (16,13%) mit konsekutiver Verminderung der selektiv Annexin V-positiven Zellen (20,51%). Die beiden anderen Quadranten bleiben nahezu konstant.

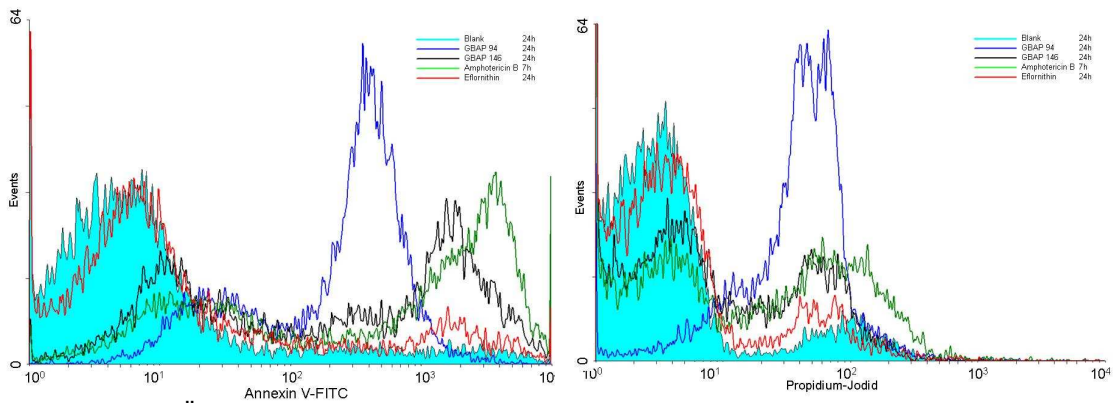


Abb. 94 a/b: Überlagerung der Annexin V-Signale (links) und PI-Signale (rechts) nach Behandlung mit den verschiedenen Wirkstoffen nach der maximal untersuchten Zeitspanne.

Unbehandelte	24h
GBAP 94	24h
GBAP 146	24h
Amphotericin B	24h
Eflornithin	24h

Bei GBAP 94 deutlicher Peak im Bereich der Annexin V-positiven Zellen. Schwächer ausgeprägt auch bei GBAP 146 und Amphotericin B. Trotz relativ großem Anteil spezifisch Annexin V-positiver Zellen bei Eflornithin und den unbehandelten Zellen kein zweiter Peak.

Aufgrund des bei GBAP 94 großen Anteils an doppelt positiven Zellen im dot-Plot zeigt sich auch in im PI-Histogramm ein deutlicher Peak. Bei den Proben mit GBAP 146, Amphotericin B und Eflornithin zeigen sich lediglich kleine 2. Maxima.

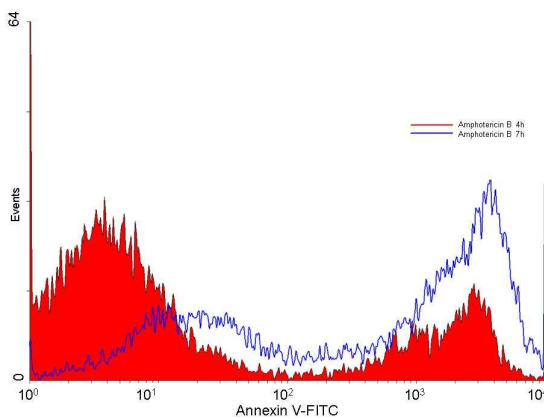


Abb. 95: Überlagerung der Annexin V-Signale nach Behandlung mit Amphotericin B zu den Zeitpunkten 4h und 7h.

Amphotericin B 7h
Amphotericin B 4h

Bei beiden Proben deutlich jeweils 2. Maximum der Annexin-V-positiven Zellen zu sehen. Dieses ist nach 7h deutlich stärker ausgeprägt als nach 4h.

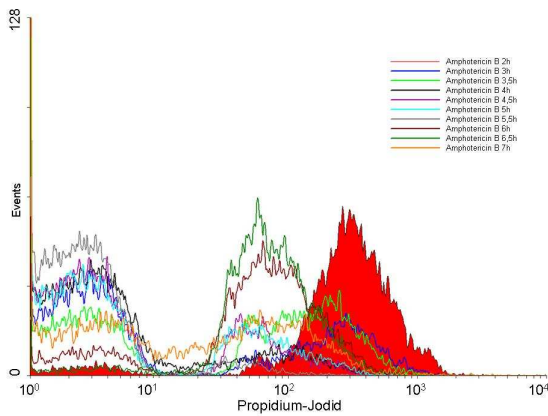


Abb. 96: Überlagerung der PI-Signale nach Behandlung mit Amphotericin B zu den unterschiedlichen Zeitpunkten:

- Amphotericin B 2h
- Amphotericin B 3h
- Amphotericin B 3,5h
- Amphotericin B 4h
- Amphotericin B 4,5h
- Amphotericin B 5h
- Amphotericin B 5,5h
- Amphotericin B 6h
- Amphotericin B 6,5h
- Amphotericin B 7h

Es lassen sich 3 unterschiedliche Muster erkennen. Nach 2h, 6h und 6,5h ist der PI-Peak deutlich im positiven Bereich. Nach 3,5h und 7h gibt es 2 etwa gleich hohe Maxima. Bei den anderen Werten zeigt sich ein PI-Peak im Bereich der schwach gefärbten Zellen.

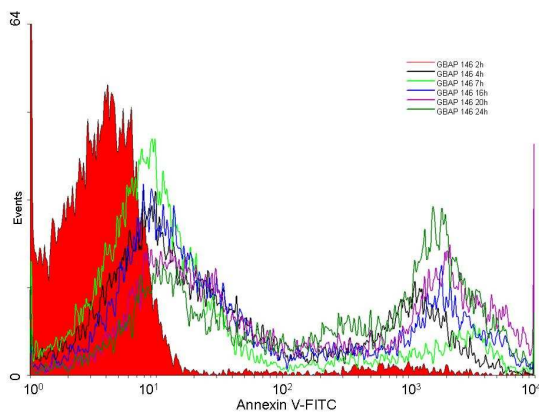


Abb. 97: Überlagerung der Annexin V-Signale nach Behandlung mit GBAP 146 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

- GBAP 146 2h
- GBAP 146 4h
- GBAP 146 7h
- GBAP 146 16h
- GBAP 146 20h
- GBAP 146 24h

Mit Ausnahme der Probe nach 2h zeigt sich in allen Proben ein 2. Annexin V-Peak. Dieser ist bei 7h sehr schwach ausgeprägt. Bei den 16h bis 24h nimmt die Intensität des 2. Peak mit fortlaufender Zeit zu. Die Intensität des 4h-Wertes entspricht in etwa der nach 16h.

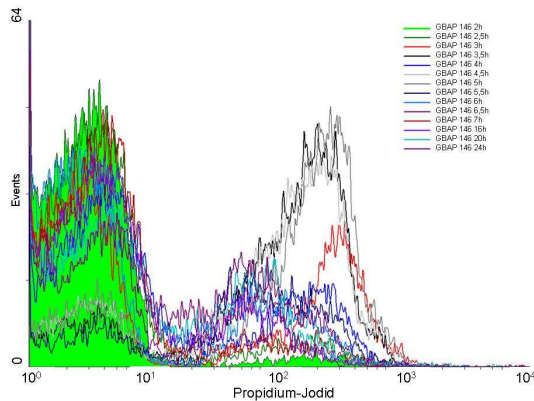


Abb. 98: Überlagerung der PI-Signale nach Behandlung mit GBAP 146 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

- GBAP 146 2h
- GBAP 146 2,5h
- GBAP 146 3h
- GBAP 146 3,5h
- GBAP 146 4h
- GBAP 146 4,5h
- GBAP 146 5h
- GBAP 146 5,5h
- GBAP 146 6h
- GBAP 146 6,5h
- GBAP 146 7h
- GBAP 146 16h
- GBAP 146 20h
- GBAP 146 24h

Es lassen sich erneut 3 unterschiedliche Muster erkennen. Nach 3,5h, 5h und 5,5h liegt der PI-Peak deutlich im positiven Bereich. Bei 3h zeigen sich 2 Maxima. Je eines im gefärbten und ungefärbten Bereich. Bei allen anderen Proben liegt dieser deutlich im ungefärbten Bereich.

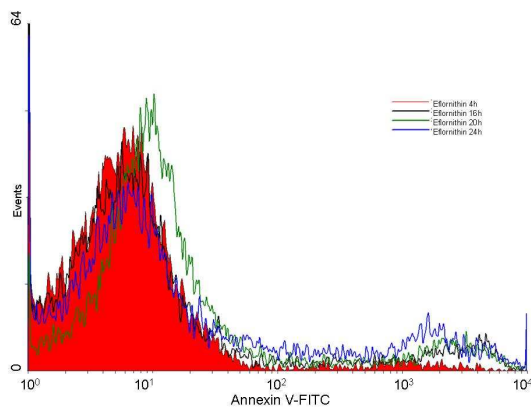


Abb. 99: Überlagerung der Annexin V-Signale nach Behandlung mit Eflornithin zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

- Eflornithin 4h
- Eflornithin 16h
- Eflornithin 20h
- Eflornithin 24h

Es zeigt sich bei keiner Probe ein 2. Annexin V-Peak. Auch wenn der Anteil der PI-positiven Zellen nach 24h Eflornithin 16,55% beträgt.

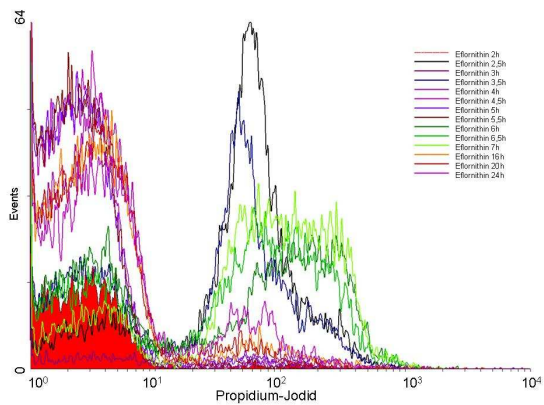


Abb. 100: Überlagerung der PI-Signale nach Behandlung mit Eflornithin zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

- Eflornithin 2h
- Eflornithin 2,5h
- Eflornithin 3h
- Eflornithin 3,5h
- Eflornithin 4h
- Eflornithin 4,5h
- Eflornithin 5h
- Eflornithin 5,5h
- Eflornithin 6h
- Eflornithin 6,5h
- Eflornithin 7h
- Eflornithin 16h
- Eflornithin 20h
- Eflornithin 24h

Es lassen sich 3 unterschiedliche Muster erkennen. Nach 2,5h und 3,5h zeigt sich ein starker PI-Peak im positiven Bereich. Zwischen 6h und 7h zeigt sich jeweils ein sehr breites Maximum im positiven Bereich. Bei allen anderen Proben liegt der PI-Peak im ungefärbten Bereich.

Tabelle 5: Quadrantenstatistik III. FACS-Versuch

	Oben links	Oben rechts	Unten links	Unten rechts
blank 24h	0,28%	13,00%	74,83%	11,89%
Amphotericin B 4h	0,05%	17,71%	64,16%	18,08%
Amphotericin B 7h	0,19%	45,62%	15,78%	38,41%
GBAP 94 24h	1,45%	76,25%	4,63%	17,67%
GBAP 146 2h	0,23%	3,86%	94,09%	1,82%
GBAP 146 4h	0,10%	30,08%	44,61%	25,21%
GBAP 146 7h	0,04%	12,40%	60,89%	26,67%
GBAP 146 16h	0,36%	20,49%	39,92%	39,23%
GBAP 146 20h	0,57%	29,96%	25,58%	43,89%
GBAP 146 24h	1,21%	29,22%	21,39%	48,18%
Eflornithin 4h	0,01%	3,54%	84,01%	12,44%
Eflornithin 16h	0,17%	8,67%	74,90%	16,26%
Eflornithin 20h	0,08%	7,31%	64,89%	27,72%
Eflornithin 24h	0,42%	16,13%	62,94%	20,51%

Es zeigt sich in allen Proben, mit Ausnahme von GBAP 146 nach 2h, ein großer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen. Bei einem gleichzeitig geringen Anteil selektiv PI-positiver Zellen.

Bei Amphotericin B zeigt sich ein deutlicher Anstieg sowohl der selektiv Annexin V-positiven Zellen, als auch der selektiv PI-positiven Zellen zwischen 4h und 7h.

Bei GBAP 94 zeigt sich ein signifikanter Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen, bei gleichzeitig hohem Anteil doppelt positiver Zellen und geringem Anteil selektiv PI-positiver und ungefärbter Zellen.

Bei GBAP 146 steigt der Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen durchgängig an. Insbesondere zwischen 2h und 4h findet sich ein massiver Anstieg. Parallel dazu steigt der Anteil der selektiv PI-positiven Zellen an. Der Anteil der ungefärbten Zellen nimmt entsprechend ab. Der Anteil der doppelt Positiven ist konstant niedrig.

In der Eflornithin-Gruppe findet sich interessanterweise durchgängig ein relativ großer Anteil selektiv Annexin V-positiver Zellen, obwohl für Eflornithin keine apoptose-induzierende Wirkung beschrieben ist. Der Anteil an doppelt gefärbten Zellen steigt, bei entsprechender Abnahme der ungefärbten. Die selektiv PI-positiven Zellen haben einen minimalen Anteil.

Tabelle 6: Markerstatistik III. FACS-Versuch

	Oben	Unten
blank	0,65%	99,35%
blank 24h	13,28%	86,72%
Amphotericin B 2h	93,67%	6,33%
Amphotericin B 2,5h	36,03%	63,97%
Amphotericin B 3,5h	56,52%	43,48%
Amphotericin B 4h	17,76%	82,24%
Amphotericin B 4,5h	26,47%	73,53%
Amphotericin B 5h	29,92%	70,08%
Amphotericin B 5,5h	6,45%	93,55%
Amphotericin B 6h	81,92%	18,08%
Amphotericin B 6,5h	93,09%	6,91%
Amphotericin B 7h	45,81%	54,19%
GBAP 146 2h	4,09%	95,91%
GBAP 146 2,5h	10,78%	89,22%
GBAP 146 3h	36,99%	63,01%
GBAP 146 3,5h	79,79%	20,21%
GBAP 146 4h	30,18%	69,82%
GBAP 146 4,5h	76,13%	23,87%
GBAP 146 5h	76,09%	23,91%
GBAP 146 5,5h	71,09%	28,92%
GBAP 146 6h	24,62%	75,38%
GBAP 146 6,5h	29,06%	70,94%
GBAP 146 7h	12,44%	87,56%
GBAP 146 16h	20,85%	79,15%
GBAP 146 20h	30,53%	69,47%
GBAP 146 24h	30,43%	69,57%
GBAP 94 24h	77,70%	22,30%
Eflornithin 2h	4,77%	95,23%
Eflornithin 2,5h	78,17%	21,83%
Eflornithin 3h	48,65%	51,35%
Eflornithin 3,5h	59,31%	40,69%
Eflornithin 4h	3,55%	96,45%
Eflornithin 4,5h	1,50%	98,50%
Eflornithin 5h	3,50%	96,50%
Eflornithin 5,5h	1,65%	98,35%
Eflornithin 6h	54,56%	45,44%
Eflornithin 6,5h	63,32%	36,68%
Eflornithin 7h	78,03%	21,97%
Eflornithin 16h	8,84%	91,16%
Eflornithin 20h	7,39%	92,61%
Eflornithin 24h	16,55%	83,45%

Nur ein Teil der Proben wurde mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. In Tab. 6 sind die Werte für PI-Färbung dargestellt. Im Abschnitt „Oben“ ist der Anteil der PI-positiven Zellen im Abschnitt „Unten“ der Anteil der PI-negativen Zellen aufgeführt.

Bei den unbehandelten (blank) Trypanosomen zeigt sich nach 24h ein signifikanter Anteil an PI-positiven Zellen.

Bei den mit Amphotericin B-behandelten Parasiten findet sich nach 2h, und nach 6h bis 6,5h ein sehr großer Anteil an PI-positiven Zellen. Nach dem 2h Maximum folgt ein stetiger Abfall, mit Ausnahme des 3,5h-Wertes, bis zum Zeitpunkt 5,5h. Danach kommt es zu einem massiven Anstieg nach 6h mit einem Maximum nach 6,5h. Es folgt nach 7h ein erneuter deutlicher Abfall.

Bei GBAP 146 zeigt sich nach einem initialen Anstieg ein stabiler Anteil von PI-positiven Zellen zwischen 3,5h und 5,5h. Ausnahme hiervon ist der Wert nach 4h. In den 16h bis 20h-Werten zeigt sich ein stabiler Anteil von PI-positiven Zellen bei, wie in Tab. 5 zu sehen, hohem Anteil selektiv Annexin V-Positiven.

Bei GBAP 94 zeigt sich ein großer Anteil PI-positiver Zellen, der fast ausschließlich auf gleichzeitig Annexin V und PI-positiven Trypanosomen beruht (siehe Tab. 5).

In der Eflornithin-Gruppe finden sich 2 Plateaus von Werten mit hohem Anteil PI-positiver Zellen. Diese liegen zwischen 2h und 3,5h und zwischen 6h und 7h. Dazwischen findet sich insgesamt ein niedriger Anteil PI-positiver Zellen.

5.5. IV. FACS®-Versuch (späte Apoptose)

Die ungefärbten Kontrollen waren in beiden Fällen unauffällig. Die unbehandelte 2h-Kontrolle zeigte keine signifikante Färbung mit Annexin V oder PI. Bei den Amphotericin B-Kontrollen fand sich ebenso das erwartete Muster. Auch die nicht gefärbten NIQ-Proben (2h und 6h) waren wie erwartet ohne Verschiebung durch die fluoreszierenden Farbstoffe.

Für die Gruppe der mit GBAP 94-behandelten Trypanosomen zeigte sich nach 6h eine große Anzahl Annexin V-positiver Zellen. Die Anzahl PI-positiver Zellen war deutlich geringer. Beide Werte nahmen nach 8h und nochmals nach 10h deutlich ab, stiegen nach 12h wieder deutlich an und fielen erneut bei 14h und weiter nach 16h. Nach 18h zeigte sich wiederum ein deutlicher Anstieg, erneut von einem Abfall nach 20h gefolgt (siehe Tabelle 7).

Dem gleichen Muster einer 6h-Periode folgten die GBAP 146-Proben. Hier waren allerdings die Unterschiede zwischen der Anzahl Annexin V- und PI-positiver Zellen nicht so deutlich und auch der absolute Anteil der Annexin V-positiven Zellen nicht so hoch (siehe Tabelle 7).

Sowohl für die Annexin V-gefärbten, als auch für die Propidium-Jodid-gefärbten Zellen wurde erneut ein Marker definiert. Der Bereich innerhalb des Markers wurde als signifikanter Unterschied zum Leerwert betrachtet.

Es wurde in den 6h und 8h Messungen von GBAP 94 ein gate gesetzt, um die Population, die Annexin V-positiv und gleichzeitig Propidium-Jodid negativ ist, im scatter-Plot zu markieren. Hier zeigte sich, übereinstimmend mit der Lichtmikroskopie, dass die Größe der behandelten Trypanosomen sich nicht signifikant von der Normalpopulation unterscheidet. Allerdings zeigte sich auch hier eine größere Streuung der Werte.

Für den Verlauf der Annexin V- und PI-Intensität von GBAP 94 und GBAP 146 wurden overlays errechnet. Hierdurch ist der Anstieg und Abfall der Annexin V und Propidium-Jodid-Werte noch etwas besser zu sehen.

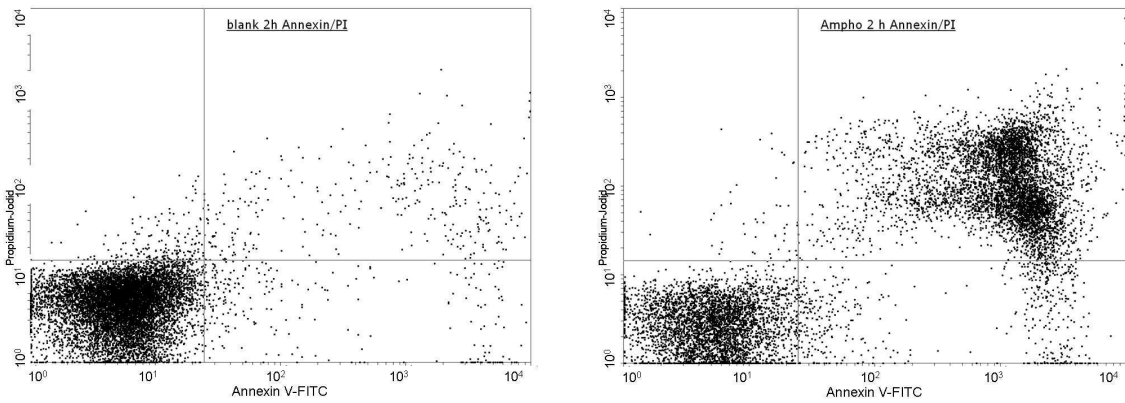


Abb. 101 a/b: a: dot-Plot; Probe ausschließlich mit Annexin V-FITC und PI gefärbt.
 b: Probe 2h Amphotericin B behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt.
 Beide Proben zusammen lieferten die Referenzwerte zur Festlegung der Quadranten.

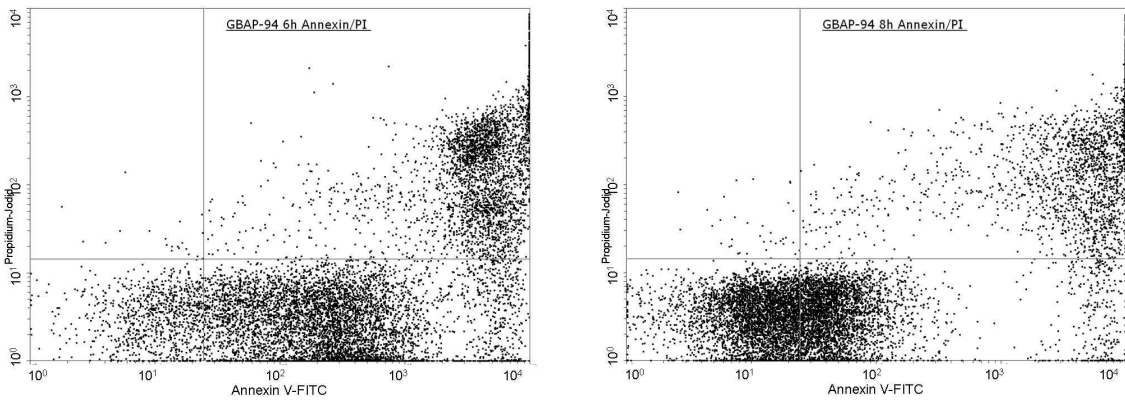


Abb. 102 a/b: a: Probe 6h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Sehr großer Anteil ausschließlich Annexin V-positiver Zellen.
 b: Probe 8h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt geringerer Anteil Annexin V-positiver Zellen.

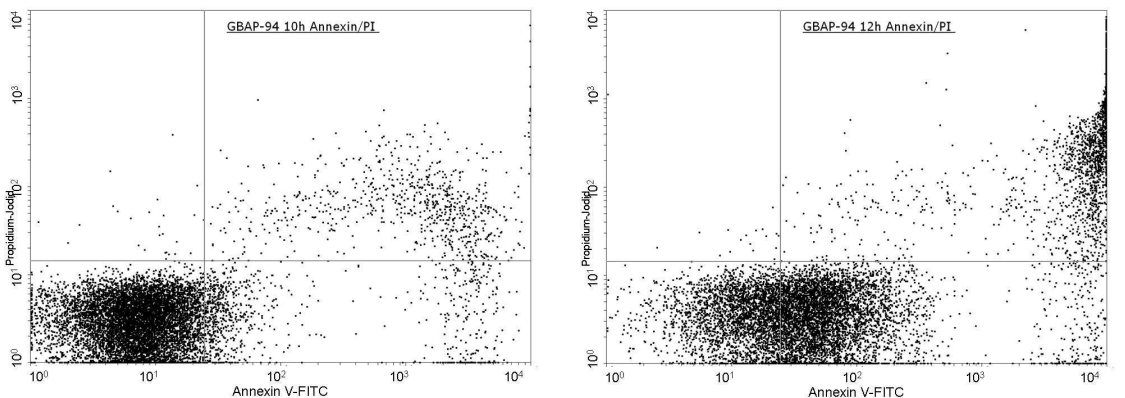


Abb. 103 a/b: a: Probe 10h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Noch geringerer Anteil ausschließlich Annexin V-positiver Zellen als nach 8h. Bei insgesamt wenigen PI-positiven Zellen.
 b: Probe 12h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Erneuter Anstieg des Anteils Annexin V-positiver Zellen.

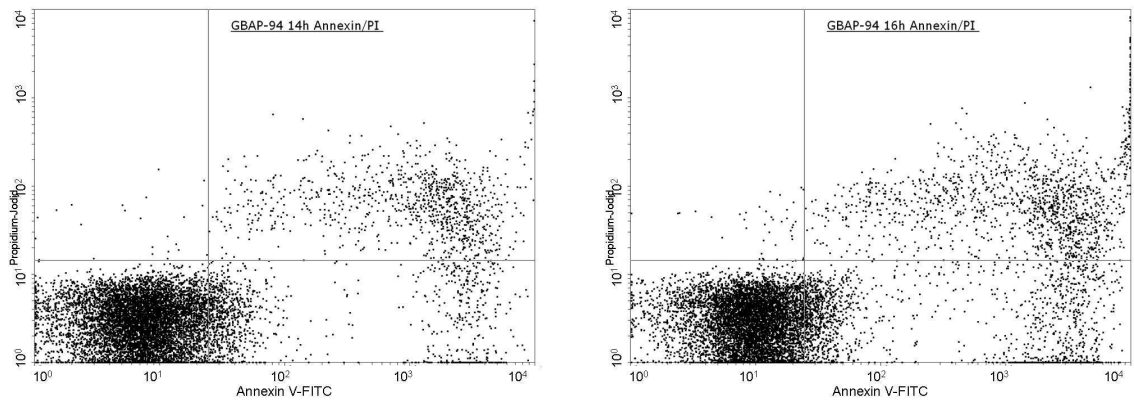


Abb. 104 a/b: a: Probe 14h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Erneuter starker Abfall des Anteils selektiv Annexin V-positiver Zellen im Vergleich zum 12h-Wert.
 b: Probe 16h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Leichter Anstieg des Anteils Annexin V-positiver Zellen.

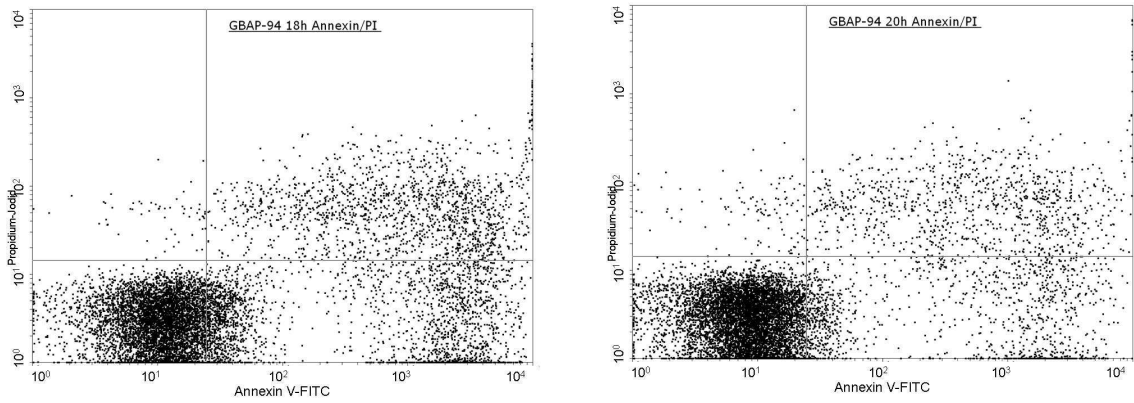


Abb. 105 a/b: a: Probe 18h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Erneuter Anstieg des Anteils ausschließlich Annexin V-positiver Zellen. Insgesamt geringer ausgeprägt, als nach 6h und 12h.
 b: Probe 20h mit GBAP 94 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Erneuter leichter Abfall des Anteils Annexin V-positiver Zellen.

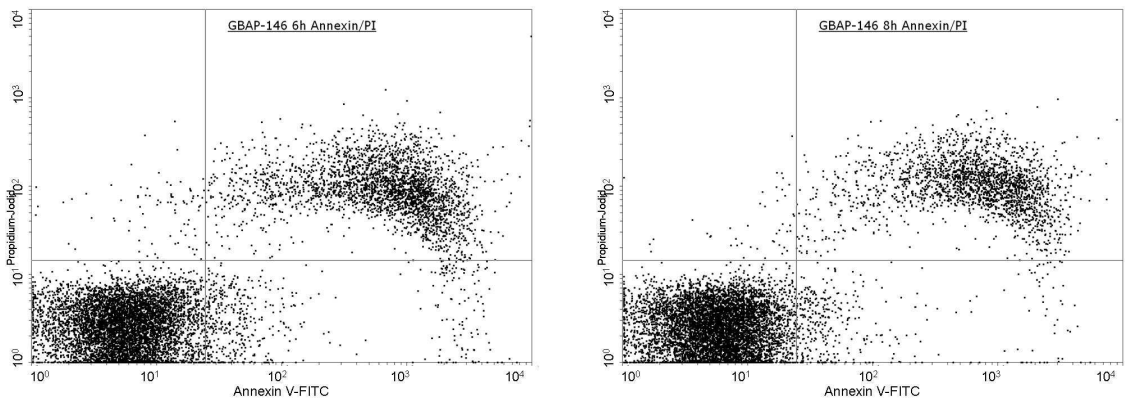


Abb. 106 a/b: a: Probe 6h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt geringer Anteil signifikant Annexin V-positiver Zellen, als bei GBAP 94.
 b: Probe 8h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Leichter Abfall des Anteils Annexin V-positiver Zellen.

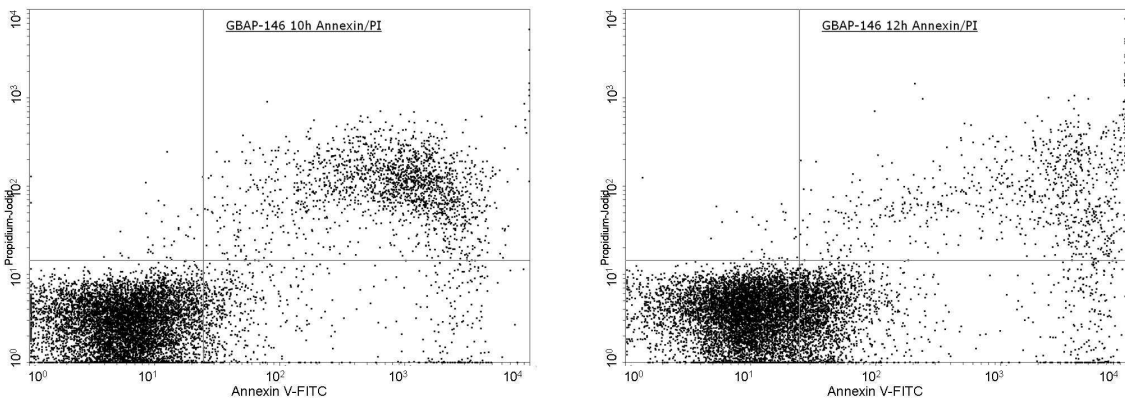


Abb. 107 a/b: a: Probe 10h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt wieder etwas größerer Anteil signifikant Annexin V-positiver Zellen, als nach 8h.
 b: Probe 12h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Deutlicher Anstieg des Anteils Annexin V-positiver Zellen.

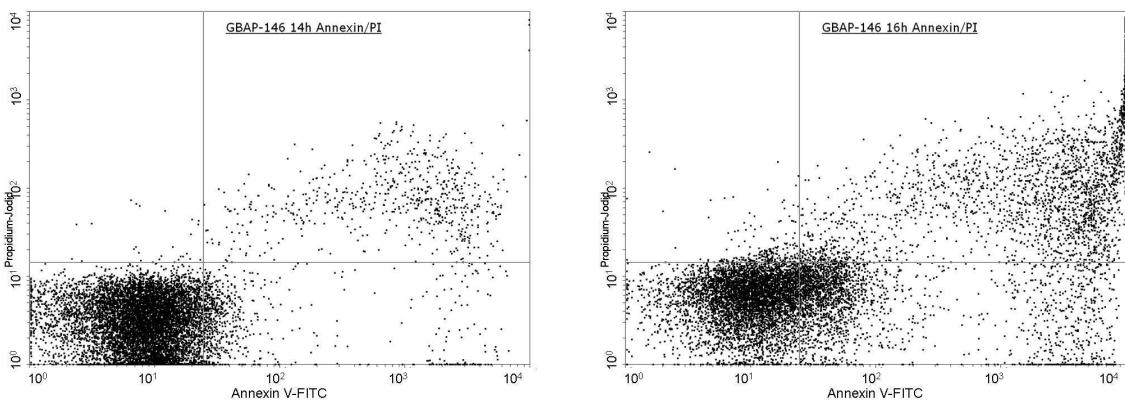


Abb. 108 a/b: a: Probe 14h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Insgesamt deutlicher Abfall der signifikant Annexin V-positiven Zellen.
 b: Probe 16h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Erneuter und starker Anstieg des Anteils signifikant Annexin V-positiver Zellen.

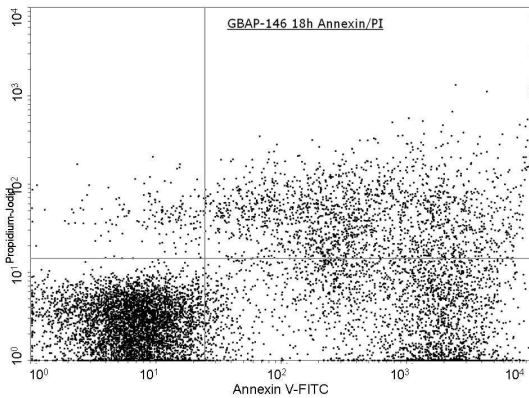
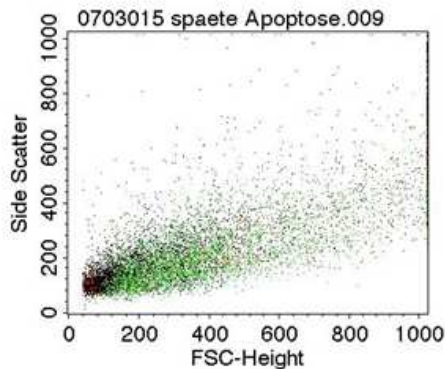
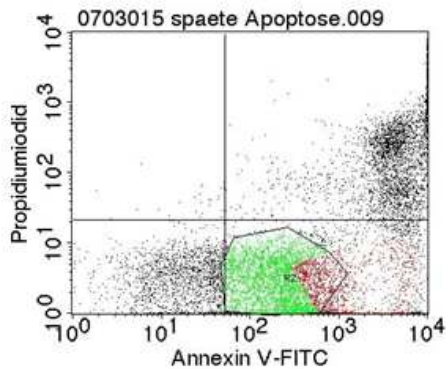


Abb. 109: Probe 18h mit GBAP 146 behandelt, mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Weiterer Anstieg der signifikant Annexin V-positiven Zellen.

GBAP 94 6h Annexin V-FITC/PI



GBAP 94 8h Annexin V-FITC/PI

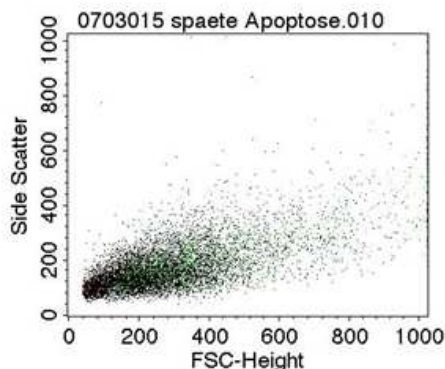
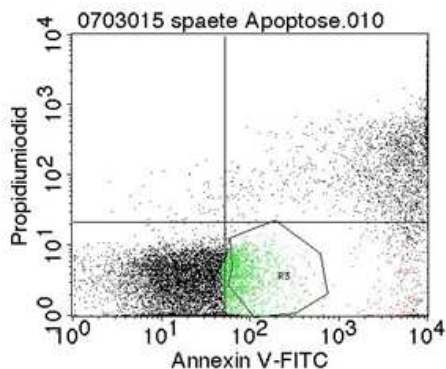


Abb. 110 a-d: In den beiden linken dot-Plots sind zwei Populationen in je ein Gate zusammengefasst. Das rote Gate umfasst die stark Annexin V-markierte und gleichzeitig Propidium-Jodid negative Population. Das grüne Gate umfasst die restliche signifikant Annexin V-markierte und gleichzeitig Propidium-Jodid negative Population. In den jeweils rechten scatter-Plots zeigt sich, dass beide in Gates zusammengefassten Populationen sich in der Größe nicht von den nicht markierten Zellen unterscheiden.

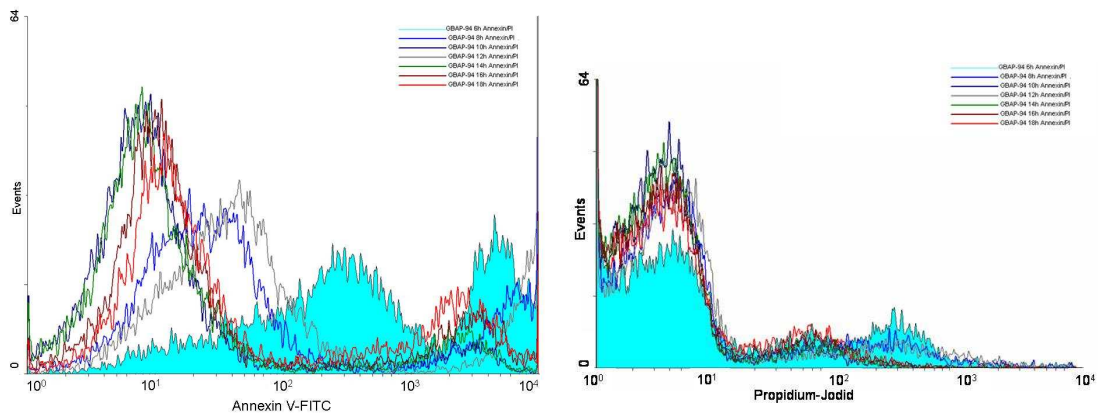


Abb. 111 : Überlagerung der Annexin V-Signale (links) und PI-Signale (rechts) nach Behandlung mit GBAP 94 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

- nach 6h
- nach 8h
- nach 10h
- nach 12h
- nach 14h
- nach 16h
- nach 18h

Insbesondere nach 6h sehr großer Anteil der Annexin V-positiven Zellen. In den 8h und 10h-Werten zeigt sich ein deutlicher Abfall der Annexin V-positiven Zellen. Erneuter Anstieg nach 12h und nach erneutem zwischenzeitlichem Abfall nach 18h.

Insgesamt relativ niedriger Anteil PI-positiven Zellen mit Spitzen insbesondere nach 8h, 12h und 18h.

Tabelle 7: Quadrantenstatistik IV. FACS-Versuch

	Oben links	Oben rechts	Unten links	Unten rechts
blank ungefärbt	0,16%	0,10%	99,45%	0,29%
nativ	0,91%	2,64%	93,96%	2,49%
nativ 20h	0,13%	0,26%	99,58%	0,03%
Amphotericin B 2h	0,45%	54,39%	39,30%	5,86%
GBAP 94 6h	0,20%	28,84%	10,47%	60,49%
GBAP 94 8h	0,34%	19,28%	46,45%	33,93%
GBAP 94 10h	0,23%	7,01%	85,11%	7,65%
GBAP 94 12h	0,17%	16,87%	34,50%	48,46%
GBAP 94 14h	0,21%	9,13%	81,01%	9,65%
GBAP 94 16h	0,37%	12,93%	72,22%	14,48%
GBAP 94 18h	0,65%	14,32%	60,84%	24,19%
GBAP 94 20h	1,06%	8,97%	77,08%	12,89%
GBAP 146 6h	0,93%	29,25%	63,48%	6,34%
GBAP 146 8h	0,48%	21,68%	74,42%	3,42%
GBAP 146 10h	0,32%	17,71%	76,16%	5,81%
GBAP 146 12h	0,23%	7,93%	74,34%	17,50%
GBAP 146 14h	0,19%	5,93%	89,03%	4,85%
GBAP 146 16h	0,86%	20,68%	57,01%	21,45%
GBAP 146 18h	1,77%	16,67%	51,84%	29,72%

In der Tabelle ist die Quadrantenstatistik für die vorausgegangenen dot-Plots, entsprechend der eingezogenen Marker (wie in 5.2. beschrieben).

Es zeigt sich ein sehr großer Anteil Annexin V- positiver Zellen bei der Behandlung mit GBAP 94 nach 6h, mit erneuten Maxima nach 12h und 18h.

Für GBAP 146 fallen die Maxima Annexin V-positiver Zellen insgesamt kleiner aus. Sie liegen bei 12h und 18h und somit erneut in einem 6h Abstand.

Der Anteil rein PI-positiver Zellen ist bei allen Proben sehr gering.

IV. Diskussion

1. Zeitpunkt der Wirkung

Nach den vorliegenden Ergebnissen können einige Erkenntnisse über den Verlauf der morphologischen Veränderungen gewonnen werden. Innerhalb der ersten 30 min sind keine Veränderungen mit dem Lichtmikroskop oder mit den verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Markern zu sehen. Danach steigt die Zahl der veränderten Trypanosomen an. Zwischen zwei und vier Stunden bleibt diese Zahl konstant.

Die Untersuchungen mittels FACS[®] legen einen Zusammenhang mit dem Zellzyklus nahe. Die Zahl der Annexin V-positiven Trypanosomen steigt und fällt in einer 6-8h Periodik. Dies entspricht etwa der Dauer eines Zellzyklus bei Trypanosomen [185].

2. Wirkmechanismus

Funktionell scheint der Tod der Trypanosomen durch Apoptose bedingt zu sein. Der definitive Beweis muss noch geführt werden. Allerdings widerspricht bislang keines der gewonnenen Ergebnisse dieser Vermutung. So ist die Vakuolisierung von Trypanosomen im Verlauf der Apoptose von Figarella et al. beschrieben [66]. Ebenso ist bekannt, dass eukaryontische Zellen allgemein in Apoptose gehen, wenn im Zellzyklus bestimmte Voraussetzungen nicht erreicht werden konnten [66, 185]. Nicht zu behebbende Störungen im Zellzyklus sind bislang die plausibelste Erklärung für den periodischen Anstieg und Abfall apoptotischer Trypanosomen in den FACS[®]-Untersuchungen. Die Färbung mit Annexin V gilt auch für Trypanosomen als spezifisch für Apoptose [101]. Denkbar sind allerdings auch andere Wirkungen, durch die Alkaloide zur Apoptose führen können [137]. Die apoptose-induzierende Wirkung anderer Alkaloide in Trypanosomen ist inzwischen durch Rosenkranz et al. belegt [137]. Auch in den promastigoten Formen von *Leishmania major* wird eine apoptose-induzierende Wirkung der NIQs durch Ponte-Sucre et al. vermutet [133].

In einigen Publikationen wird ein signifikanter Anstieg der Annexin-V-positiven Zellen bereits als Beweis für Apoptose betrachtet [101].

Es können außerdem einige morphologische Veränderungen beobachtet werden. In den Parasiten entsteht eine Vakuole im vorderen Drittel der Zelle in der Nähe des Zellkerns. Die Vakuole vergrößert sich im Verlauf deutlich. Es entsteht eine kugelige Form. Die Zellmembran kann nicht mit dieser Entwicklung Schritt halten. Die anderen Organellen werden verdrängt. Dies führt zu einer zunehmenden Verplumpung der Trypanosomen. Die Flagelle wirkt geisselartig. Ob und wie diese Veränderungen mit dem Absterben der Trypanosomen zusammenhängen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Unklar ist im Moment noch die Zielstruktur der NIQs. Zwar sind die NIQs nach kurzer Zeit bereits innerhalb der Parasiten nachweisbar. Ebenso lassen sich die oben beschriebenen Vakuolen schon sehr früh nachweisen. Ihre Genese kann bislang nur vermutet werden. Sich vergrößernde Lysosomen oder Endosomen können nach den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden. In den Färbungen mit LysoTracker[®] und FM 4-64[®] zeigte sich keinerlei Färbung der Vakuole.

Diverse andere vakuolische Strukturen im sauren pH-Bereich, wie die Proteasomen sind ebenso unwahrscheinlich. Sie wären ebenso mit LysoTracker[®] markiert worden.

Das Acidocalcisom ist ein möglicher Kandidat für die Zielstruktur [117]. Das Acidocalcisom ist ein Kationen-, insbesondere Fe²⁺-Speicher. Es ist spezifisch für Trypanosomatiden. Dies könnte die Selektivität der ausgewählten Substanzen erklären [54]. Ponte-Sucre diskutierte das Acidocalcisom bereits als Zielstruktur der NIQ bei Leishmanien [132]. Abgesehen davon ist auch Apoptose durch eine allgemeine Störung des Kationen-Haushaltes aufgrund von Alkaloiden bekannt [144].

Weiterhin möglich ist eine Hemmung des Ausschleusens von neugebildeter Zellmembran. Hiermit ließe sich die Nähe der Vakuole zur flagellar pocket erklären. Hier wird neugebildete Zellmembran ausgeschleust und später wiederaufgenommen [78]. Trypanosomen reagieren sehr empfindlich auf Störungen in der Oberflächen- und somit VSG-Homöostase [75]. Wie von Gruszynski et al.

beschrieben führt eine Störung in diesem Bereich zum Arrest des Zellzyklus [75]. Dies könnte auch die zunehmende Angleichung des Zellzyklus zwischen den einzelnen Parasiten mit nachfolgender Apoptose erklären.

Ob die oben beschriebenen Vakuolen ursächlich oder nur ein Epiphänomen im Verlauf der Apoptose in Trypanosomen sind, ist ebenso unklar und konnte auch durch andere Gruppen bislang nicht gelöst werden [66]. Sollte bei jeder Form der Apoptose eine Vakuolisierung auftreten, sind auch andere Wirkmechanismen von Alkaloiden zu diskutieren, die zu Apoptose führen [166, 184].

Dies ist zum Beispiel Mitosehemmung, wie bei den als Zytostatika bereits in der Klinik eingesetzten Alkaloiden, wie den Vincaalkaloiden oder den Taxanen [99]. Von Isochinolinalkaloiden ist zudem eine DNA-Interkalation beschrieben [72]. Eine DNA-Interkalation kann Apoptose zur Folge haben [114].

Aufgrund der chemischen Struktur der NIQs ist eine Blockade von nukleären Transportprozessen ebenso eine Möglichkeit [42].

Insgesamt kann bei der Vielzahl der möglichen Wirkmechanismen selbst beim Nachweis einer apoptose-induzierenden Wirkung durch die NIQ bei Trypanosomen nur spekuliert werden.

Im Verlauf weiterhin zu klären ist, weshalb die Parasiten synchron die Apoptose durchlaufen. In einer unbehandelten Trypanosomen-Kultur befinden sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zyklus. Der synchrone Ablauf der Apoptose ist nur erklärbar, wenn man postuliert, dass sich innerhalb der ersten Stunden der Inkubationszeit die Zyklen der jeweils überlebenden Parasiten aneinander angleichen. Bei nicht-synchronen Zellen stiege der Anteil apoptotischer Zellen zunächst linear an und bliebe danach konstant. Eine definitive Erklärung für das periodische Absterben der Parasiten konnte bislang nicht gefunden werden. Wie oben beschrieben, gibt es allerdings einige Modelle für Wirkmechanismen, die dies erklären könnten. Allerdings wurde bislang für andere Wirkstoffe bei Trypanosomen ein synchroner Zelltod nicht beschrieben.

3. Vergleich GBAP 94 mit GBAP 146

Bei den morphologischen Untersuchungen waren die beiden verwendeten NIQ nicht zu unterscheiden. Auch in den FACS[®]-Versuchen war der Unterschied gering. Der deutlichste Unterschied ist die deutlich niedrigere Zytotoxizität von GBAP 94 gegenüber GBAP 146 bei sehr ähnlicher Wirkung auf Trypanosomen. Dies spricht für eine selektivere Wirkung von GBAP 94. Ebenso weist der höhere Anteil von Annexin V-positiven Zellen bei GBAP 94 auf eine spezifischer antitrypanosomale Wirkung hin. Die Wirkung von GBAP 146 scheint neben dem gleichen Mechanismus wie dem von GBAP 94 auch auf einem allgemeinen toxischen Effekt zu beruhen.

IV. Zusammenfassung

Die Schlafkrankheit hat ihren Schrecken seit den Zeiten Robert Kochs und Paul Ehrlichs nicht verloren. Die zielgerichtete Entwicklung neuer Medikamente ist für die Menschen in den Endemiegebieten damals wie heute von elementarer Bedeutung. Die Naphtylisochinolin-Alkaloide stellen eine neue chemische Substanzklasse dar, die gute Kandidaten für die Entwicklung neuer Medikamente enthält. Mit GBAP 94 im speziellen liegt eine Substanz vor, die gute Startvoraussetzungen hierfür mitbringt. Diese sind eine sehr gute Wirksamkeit gegen Trypanosomen, gepaart mit einer hohen Selektivität durch einen sehr wahrscheinlich relativ spezifisch anti-trypanosomalen Wirkmechanismus.

Die verwendeten Naphtylisochinolin-Alkaloide GBAP 94 und GBAP 146 wurden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgewählt. GBAP 94 wurde aufgrund seiner guten antitrypanosomalen Wirkung und seiner hohen Selektivität für Trypanosomen ausgewählt. Die IC_{50} liegt mit $0,383 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich zu den aktuell verwendeten Medikamenten sehr niedrig. Die Selektivitätsindices (IC_{50} *Trypanosoma brucei brucei* / IC_{50} Makrophagen J774.1) mit 85,6 und (IC_{50} *Trypanosoma brucei brucei* / IC_{50} *Leishmania major*) mit 15,1 liegen in einem sehr günstigen Bereich.

GBAP 146 wurde hauptsächlich wegen seiner guten Fluoreszenzeigenschaften ausgewählt. Die antitrypanosomale Aktivität ist mit einer IC_{50} von $0,289 \mu\text{mol/l}$ zwar sehr gut, eine große Selektivität ist aber nicht gegeben.

Die beiden Alkaloide waren aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz gut fluoreszenzmikroskopisch in den Parasiten zu detektieren. Nach 10 min war in den ersten Trypanosomen die Anreicherung der Wirkstoffe erkennbar. Nach 30 min war bei fast allen Parasiten eine Färbung erkennbar. Die Wirkstoffe reicherten sich zunächst in mehreren kleinen Vakuolen an. Bei längeren Inkubationszeiten zeigte sich eine fast homogene Verteilung innerhalb des kompletten Parasiten. Durchgängig ausgespart blieb eine vakuolische Struktur. Diese entwickelte oder vergrößerte sich im Verlauf der Inkubationszeit im vorderen Drittel des Parasiten, etwa im Bereich des Kinetoplasten. Diese Vakuole konnte auch lichtmikroskopisch in der Giemsa-Färbung nachgewiesen werden. Der Anteil der veränderten

Trypanosomen lag bei diesen Untersuchungen nach 1 h bei 25,4%, stieg bis zum Zeitpunkt 2 h auf 46,6% und stabilisierte sich nach 4 h bei 44,8%. Die vakuolische Struktur führte durch ihre Vergrößerung zur zunehmenden Verplumpung der Trypanosomen bis zu einer kugelförmigen Zellform mit geißelartig wirkender Flagelle. Aufgrund der veränderten Form wurden die Zellorganellen verdrängt. Dies konnte durch die Fluoreszenzmarkierung des Mitochondriums mit Rodamine B Hexylester und der sauren Kompartimente, besonders des Lysosoms, mit LysoTracker[®] green gezeigt werden. Die Vakuolisierung von Trypanosomen im Zusammenhang mit Apoptose ist bekannt [66].

Die neu entstehende Vakuole konnte weder mit LysoTracker[®] green, noch mit dem endosomalen Farbstoff FM 4-64 angefärbt werden. Damit können eine lysosomale und eine endosomale Herkunft der Vakuole ausgeschlossen werden. Eine genaue Klärung der Genese der Vakuole steht noch aus.

In den Untersuchungen mit Annexin V und Propidium-Jodid im FACS[®] konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der NIQs sehr wahrscheinlich Apoptose induziert. Annexin V ist auch bei Trypanosomen als Marker für Apoptose etabliert [101]. Zudem zeigte sich ein Anstieg der Anzahl apoptotischer Trypanosomen mit Periode von 6 h – 8 h. Diese Dauer entspricht ungefähr der Dauer des trypanosomalen Zellzyklus. Ein Eingriff der NIQs in den Zellzyklus ist somit sehr wahrscheinlich. Eine Hemmung von Teilen des Zellzyklus ist als Auslöser für Apoptose bekannt [66, 185]. Über die genaue Zielstruktur der NIQs kann allerdings nur spekuliert werden.

Die apoptose-induzierende Wirkung anderer Alkaloide auf Trypanosomen ist inzwischen nachgewiesen [137]. Ein weiteres Indiz ist, dass die Ergebnisse von Ponte-Sucre mit den NIQs bei Leishmanien ebenfalls in Richtung Apoptose weisen [133].

V. Ausblick

Die beiden verwendeten NIQs scheinen Apoptose in den Trypanosomen zu induzieren. Darauf deuten die morphologischen Veränderungen, die mit Licht- und Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden konnten, hin. Durch Untersuchung mittels FACS[®] konnte dieser Verdacht erhärtet werden. Bislang steht keines der gewonnenen Erkenntnisse dem entgegen. Dennoch: Der letztendliche Beweis des apoptotischen Zelltodes steht noch aus. Dieser könnte durch einen „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated desoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling test“ kurz TUNEL-Ansatz erbracht werden [66, 70]. Hierbei werden die freien Enden von Doppelstrang-DNA markiert. Diese entstehen während der Apoptose in signifikant höherem Ausmaß als bei allen anderen Vorgängen in der Zelle wie zum Beispiel Zellteilung oder Nekrose. Die Durchführung eines TUNEL-Versuches war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Neben der Klärung des genauen Wirkmechanismus sind noch sehr viele weitere Untersuchungen auf dem Weg zu einem neuen Medikament notwendig. Diese dienen zwei unterschiedlichen Zwecken. Zum einen muss die Wirksamkeit außerhalb der reinen *T. brucei brucei*-Kultur belegt werden. Erste Schritte hierzu sind der Nachweis im Tiermodell. Ein Wirkungsnachweis in Zellkulturen kann in diesem speziellen Fall nicht geführt werden, da sich die Parasiten nicht innerhalb von Zellen aufhalten. Nach einem erfolgreichen Wirkungsnachweis im Tiermodell ist von dieser Seite aus der Start einer Testung im Menschen der nächste logische Schritt.

Zuvor muss allerdings die Toxizität des Wirkstoffes auf gesundes Gewebe untersucht werden. Bei dem hier untersuchten Wirkstoff GBAP 94 ist die sehr gute Wirksamkeit in vitro in den Zytotoxizitätstests gezeigt worden [56]. Jedoch sind viele der NIQs stark zytotoxisch. Eine starke zytotoxische Wirkung auf Makrophagen konnte für GBAP 94 ausgeschlossen werden [56]. Die globale Toxizität auf andere Zellen ist bislang nicht untersucht. Schon hier könnte das Ende von GBAP 94 auf dem Weg vom Wirkstoff zum Medikament liegen.

VI. Anhang

1. Literaturverzeichnis

- [1] Abel PM, Kiala G, Lôa V, Behrend M, Musolf J, Fleischmann H, Théophile J, Krishna S, Stich A. Retaking sleeping sickness control in Angola. *Trop Med Int Health*. 9 (1/2004): 141-8. Erratum in: *Trop Med Int Health*. 9 (2/2004): 314.
- [2] absoluteastronomy.com: Eflornithine: <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Eflornithine>; Stand 17.09.2009
- [3] Anderson RG, Orci LA. View of acidic intracellular compartments. *J Cell Biol*. 106 (3/1988): 539-43.
- [4] Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*. 265 (9/1990): 4923-8.
- [5] Antoine-Moussiaux N, Büscher P, Desmecht D. Host-parasite interactions in trypanosomiasis: on the way to an antidisease strategy. *Infect Immun*. 77 (4/2009): 1276-84. Review.
- [6] Apted FIC. Clinical manifestations and diagnosis of sleeping sickness. In Mulligan HW (ed.) *The African Trypanosomiasis*. London: G. Allen and Unwin, 1970, pp. 661-83.
- [7] Atouguia JLM, Kennedy PGE. Neurological aspects of human African trypanosomiasis. In: Davies, LE, Kennedy, PGE (eds.), *Infectious Diseases of the Nervous System*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000, pp. 321-72.
- [8] Bacchi CJ, Yarlett N. Effects of antagonists of polyamine metabolism on African trypanosomes. *Acta Trop*. 54 (3-4/1993): 225-36. Review.
- [9] Balasegaram M, Harris S, Checchi F, Ghorashian S, Hamel C, Karunakara U. Melarsoprol versus eflornithine for treating late-stage Gambian trypanosomiasis in the Republic of the Congo. *Bull World Health Organ*. 84 (10/2006): 783-91.
- [10] Baltz T, Baltz D, Giroud C, Crockett J. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO J*. 4 (5/1985): 1273-7.

- [11] Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*. 352 (6330/1991): 70-3.
- [12] Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet*. 362 (9394/2003): 1469-80. Review.
- [13] Barrett MP. The fall and rise of sleeping sickness. *Lancet*. 353 (9159/1999): 1113-4.
- [14] Barrett MP. The rise and fall of sleeping sickness. *Lancet*. 367 (9520/2006): 1377-8.
- [15] Bayer® AG: Bayer and the WHO: Agreement for donation of drugs to treat sleeping sickness signed; Pressemeldung vom 11. November 2002
- [16] Bayer® AG: Meilensteine in der Geschichte der Bayer AG, Wuppertal; www.pharma-und-chemiepark.de/de/pdf_meilensteine.pdf. Stand: 09.09.2009
- [17] BD Biosciences: Annexin V: http://www.bdbiosciences.ca/canada/pharming/en/product_pages/annexin_v/; Stand: 04.11.09
- [18] BD BIOSCIENCES®: Application note: Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry. Stand April 2002
- [19] Bienzle U, Mockenhaupt F. Trypanosomen/Trypanosomiasis in Suttrop N, Mielke M, Kiehl W, Stück B (Hrsg.). *Infektionskrankheiten*, Stuttgart: Thieme 2004, p. 499.
- [20] Bisser S, N'Siesi FX, Lejon V, Preux PM, Van Nieuwenhove S, Miaka Mia Bilenge C, Būscher P. Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J Infect Dis*. 195 (3/2007): 322–9.
- [21] Boecken G, Weitzel T, Sunderkötter C, Fischer M, von Stebut-Borschitz E, Bogdan C, Pietras M, Anders G, Harms-Zwingenberger G, Burchard G, Bialek R, Lippert U, Grobusch M, Erkens K, Fleischer B, Löbermann M, Schunk M, Sterzik B. S1 Leitlinie Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin. Stand: 18. Dezember 2007.
- [22] Bolard J, How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta*. 864 (3-4/1986): 257-304. Review.

- [23] Bowles DE, Swaby JA. Field Guide to Venomous and Medically Important Invertebrates Affecting Military Operations: Identification, Biology, Symptoms, Treatment Version 2.0, 31 July 2006; http://www.afpmb.org/pubs/Field_Guide/field_guide.htm; Stand: 14.04.2010
- [24] Brannan LR, Turner CM, Phillips RS., Malaria parasites undergo antigenic variation at high rates in vivo. *Proc Biol Sci.* 256 (1345/1994): 71-5.
- [25] Bringmann G, Assi LA, François G, Schlauer J. The Alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae). *Chimia.* 52: 18-28.
- [26] Bringmann G, Hoerr V, Holzgrabe U, Stich A. Antitrypanosomal naphthylisoquinoline alkaloids and related compounds. *Pharmazie.* 58 (2003): 343–6.
- [27] Bringmann G, Holenz J, Assi LA, Zhao C, Hostettmann K. Molluscicidal activity of naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum* and *Ancistrocladus* species. *Planta Med.* 62 (6/1996): 556-7.
- [28] Bringmann G, Saeb W, God R, Schäfer M, François G, Peters K, Peters EM, Proksch P, Hostettmann K, Assi LA. 5-O- Demethyldioncophylline A, a new antimalarial alkaloid from *Triphyophyllum peltatum*. *Phytochemistry.* 49 (1998): 1667–73.
- [29] Bringmann G, Schlauer J, Wolf K, Rischer H, Buschbom U, Kreiner A, Thiele F, Duschek M, Assi LA. Cultivation of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae), the part-time carnivorous plant. *Carnivorous Plant Newsletter* 28 (1/1999): 7–13.
- [30] Bringmann G, Spuziak J, Faber JH, Gulder T, Kajahn I, Dreyer M, Heubl G, Brun R, Mudogo V. Six naphthylisoquinoline alkaloids and a related benzopyranone from a Congolese *Ancistrocladus* species related to *Ancistrocladus congolensis*. *Phytochemistry.* 69 (4/2008):1065-75. Epub: 2007 Dec 4
- [31] Bringmann G, Wohlfarth M, Rischer H, Grüne M, Schlauer J. Ein neuer Biosyntheseweg zu Alkaloiden in Pflanzen: acetogenine Isochinoline. *Angew. Chem.* 112 (2000): 1523-5.
- [32] Brink A, Schulz B, Kobras K, Lutz WK, Stopper H. Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutation Research.* 603 (2006): 121–8.
- [33] Bristol-Myers Squibb: Produktinformation Vaniqa®; Stand 27.7.2000 auf <http://www.fda.gov/cder/foi/label/2000/21145lbl.pdf>

- [34] Bruce D. Further report on sleeping sickness in Uganda.-Rep. Sleeping Sickness. Comm. R. Soc. 4 (1903): 3–6.
- [35] Bruce D. Note on the discovery of a new trypanosoma. Lancet. 159 (4097/1902): 664.
- [36] Bruce D. Preliminary report on the tsetse fly disease or Nagana in Zululand. Durban: Bennett and David, 1895.
- [37] Bruce D. The advance in our knowledge of the causation and methods of prevention of stock diseases in South Africa during the last ten years. Science. 22 (558/1905): 289-99.
- [38] Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. Lancet. 375 (9709/2010): 148-59.
- [39] Burri C, Brun R. Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. Parasitol Res. 90 (1/2003): 49-52.
- [40] Burri C, Stich A, Brun R, Current Chemotherapy of Human African Trypanosomiasis, In Maudlin I, Holmes PH and Miles MA (eds.) The Trypanosomiasis. London CAB international 2004, pp. 403-419.
- [41] Carl Roth®: Gebrauchsanweisung Rotigarosen®. Stand: unbekannt
- [42] Casanova M, Portalès P, Blaineau C, Crobu L, Bastien P, Pagès M. Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. Cell Death Differ. 15 (12/2008): 1910-20. Epub 2008 Sep 12.
- [43] CDC: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/eid/disease_sites.htm;
Stand 09.09.2009
- [44] CDC: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>;
Stand 09.09.2009
- [45] Chandra P, Vogel A, Gerber T. Inhibitors of retroviral DNA polymerase: their implication in the treatment of AIDS. Cancer Res. 45 (9/1985): 4677-84. Review.
- [46] Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Büscher P. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. Clin Microbiol Rev. 18 (1/2005): 133-46. Review.
- [47] Checchi F, Barrett MP. African sleeping sickness. BMJ. 336 (2008): 679–80.

- [48] Checchi F, Diap G, Karunakara U. Médecins Sans Frontières Campaign for Access to Essential Medicines. Human African Trypanosomiasis - Facing the challenges caused by neglect: The need for new treatment and diagnostics. Pressemitteilung November 2006.
- [49] Cornely OA, Böhme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M, Krause SW, Krüger W, Maschmeyer G, Penack O, Ritter J, Ruhnke M, Sandherr M, Sieniawski M, Vehreschild JJ, Wolf HH, Ullmann AJ. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica*. 2008 Dec 9. [Epub ahead of print]
- [50] Cross GA. Antigenic variation in trypanosomes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 202 (1146/1978): 55-72. Review.
- [51] Davison HC, Thrusfield MV, Muharsini S, Husein A, Partoutomo S, Rae PF, Masake R, Luckins AG. Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol Infect*. 123 (1/1999): 149-55.
- [52] Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol*. 33 (3/2003): 257-67. Review.
- [53] Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61 (3/1997): 281-93. Review.
- [54] Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today*. 15 (11/1999): 443-8. Review.
- [55] Doggrell SA. Suramin: potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs*. 13 (10/2004): 1361-3. Review.
- [56] Durchführung AlamarBlue[®]-Test: Bakterien, Candida, Biofilm, Zytotoxizität 293T: Elena Katzowitsch, AK Tobias Ölschläger, SFB 630, Uni Würzburg. Leishmanien, Zytotoxizität Makrophagen: Martina Schultheis, AK Heidrun Moll, SFB 630, Uni Würzburg. Trypanosomen: Melanie Glaser, AK August Stich, SFB 630, Missionsärztliches Institut.
- [57] Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol*. 22 (11/2006): 536-42. Epub 2006 Aug 30.

- [58] Doua F, Miezan TW, Sanon Singaro JR, Boa Yapo F, Baltz T. The Efficacy of Pentamidine in the Treatment of Early-Late Stage *Trypanosoma brucei gambiense* Trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 55(1996): 586-8.
- [59] Ebay AG: [http://kleinanzeigen.ebay.de/anzeigen/s-Anzeige: OFFER/Seite:2/kolonial/k0](http://kleinanzeigen.ebay.de/anzeigen/s-Anzeige:OFFER/Seite:2/kolonial/k0); Stand 17.09.2009
- [60] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 31 (1/1998): 1-9. Review.
- [61] Fairlamb AH. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol.* 19 (11/2003): 488-94. Review.
- [62] Fairlamb AH. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. I. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84(1990): 613–7.
- [63] Fairlamb AH, Carter NS, Cunningham M, Smith K. Characterisation of melarsen-resistant *Trypanosoma brucei brucei* with respect to cross-resistance to other drugs and trypanothione metabolism. *Mol Biochem Parasitol.* 53 (1-2/1992): 213-22.
- [64] Faust SN, Woodrow CJ, Patel S, Snape M, Chiodini PL, Tudor-Williams G, Hermione Lyall EG. Sleeping sickness in brothers in London. *Pediatr Infect Dis J.* 23 (9/2004): 879-81.
- [65] Fernandes EC, Granjeiro JM, Aoyama H, Fonseca FV, Meyer-Fernandes JR, Vercesi AE. A metallo phosphatase activity present on the surface of *Trypanosoma brucei* procyclic forms. *Vet Parasitol.* 118 (1-2/2003): 19-28.
- [66] Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, Madeo F, Wesselborg S, Duszenko M. Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ.* 12 (4/2005): 335-46.
- [67] Forero, A, Brockmeyer H, Stich A. ART in children in rural Zimbabwe. 27. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Tropenpädiatrie; Würzburg, 31.01.2009.
- [68] Fox RG, Mmbando SO, Fox MS, Wilson A., Effect on herd health and productivity of controlling tsetse and trypanosomiasis by applying deltamethrin to cattle. *Trop Anim Health Prod.* 25 (4/1993): 203-14.

- [69] Friedheim EA. Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 29 (2/1949): 173-80.
- [70] Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A. Conservation of the proapoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *J Cell Sci.* 121 (1/2008): 99-109. Epub 2007 Dec 11.
- [71] de Gee AL, Carstens PH, McCann PP, Mansfield JM. Morphological changes in *Trypanosoma brucei rhodesiense* following inhibition of polyamine biosynthesis in vivo. *Tissue Cell.* 16 (5/1984): 731-8.
- [72] Giri P, Kumar GS. Isoquinoline Alkaloids and their Binding with Polyadenylic Acid: Potential Basis of Therapeutic Action. *Mini Rev Med Chem.* 2010 Mar 11. [Epub ahead of print]
- [73] Govindachari, TR, Parthasarathy, PC. Ancistrocladine, a Novel Isoquinoline Alkaloid from *Ancistrocladus heyneanus*. *Ind. J. Chem.* 8 (1970): 567-8.
- [74] Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell.* 52 (3/1988): 329-41.
- [75] Gruszynski AE, DeMaster A, Hooper NM, Bangs JD. Surface coat remodelling during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 278 (27/2003): 24665-72.
- [76] Gulder T. Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten: *N,C-Gekuppelte Naphthylisochinolin-alkaloide*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2008.
- [77] Fotos: Tanja Gulder
- [78] Hall BS, Smith E, Langer W, Jacobs LA, Goulding D, Field MC. Developmental variation in Rab11-dependent trafficking in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 4 (5/2005): 971-80.
- [79] Hide G, Tait A. Genetics and Molecular Epidemiology of Trypanosomes. In Maudlin I, Holmes P.H and Miles M.A. (eds.) *The Trypanosomiases* London. CAB international. 2004, p 83.
- [80] Hill KL, Hutchings NR, Russell DG, Donelson JE. A novel protein targeting domain directs proteins to the anterior cytoplasmic face of the flagellar pocket in African trypanosomes. *J Cell Sci.* 112 (18/1999): 3091-101.

- [81] Hörr V. Methoden zur Evaluation von Zytotoxizität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen an *Trypanosoma brucei brucei* Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2008.
- [82] Invitrogen®: Produktinformation FM-4-64:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Structures.-03166.html>, Stand 27.10.2009
- [83] Invitrogen®: Produktinformation LysoTracker®:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Structures.-07526.html>; Stand 27.10.2009
- [84] Invitrogen®: Produktinformation Rhodamin B hexylester:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Structures.-00648.html> Stand 27.10.2009
- [85] Invitrogen®; Material Safety Data Sheet Rhodamin B hexylester, Stand 03. August 2004
- [86] Invitrogen® / Molecular Probes®; Produktinformation LysoTracker®; Stand 27. Februar 2006.
- [87] James Cook University, Townsville,
www.jcu.edu.au/office/aac/documents/Dyes.PDF über
<http://www.jcu.edu.au/aac/analytical/confocal/laser.shtml>;
 Stand 03.03.2010
- [88] Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102 (1/2007): 95-7.
- [89] Janssens PG, De Muynck. A Clinical trials with “nifurtimox” in African trypanosomiasis. Ann Soc Belg Med Trop. 57(1977): 475–480.
- [90] Jelinek T, Bisoffi Z, Bonazzi L, van Thiel P, Bronner U, de Frey A, Gundersen SG, McWhinney P, Ripamonti D. European Network on Imported Infectious Disease Surveillance. Cluster of African trypanosomiasis in travelers to Tanzanian national parks. Emerg Infect Dis. 8 (6/2002): 634-5.
- [91] Kaminsky R, Brun R. In vitro assays to determine drug sensitivities of African trypanosomes: a review. Acta Trop. 54 (3-4/1993): 279-89. Review.
- [92] Kleine FK, Fischer, W. Bericht über die Prüfung von "Bayer 205" in Afrika. Dtsch Med Wochenschr. 48 (1993): 1693-6.

- [93] Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84 (5/1994): 1415-20.
- [94] Lanteri CA, Tidwell RR, Meshnick SR. The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 52 (3/2008): 875-82.
- [95] Legros D, Ollivier G, Gastellu-Etchegorry M, Paquet C, Burri C, Jannin J, Buscher P. Treatment of human African trypanosomiasis—present situation and needs for research and development. *Lancet Infect. Dis*. 2 (2002): 437–440.
- [96] Lejon V, Legros D, Savignoni A, Etchegorry MG, Mbulamberi D, Büscher P. Neuro-inflammatory risk factors for treatment failure in “early second stage” sleeping sickness patients treated with Pentamidine. *J Neuroimmunol*. 144(1-2/2003):132-8
- [97] Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol*. 76 (1/1998): 1-19. Review.
- [98] Liverpool School of Tropical Medicine: Student Handbook 2006.
- [99] Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*, 16., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme 2006. pp. 418-32.
- [100] MacLeod A, Welburn S, Maudlin I, Turner CMR, Tait A. Evidence for multiple origins of human infectivity in *Trypanosoma brucei* revealed by minisatellite variant repeat mapping. *J. Mol. Evol*. 52 (2001): 290–301.
- [101] Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, Lejoly-Boisseau H, Daulouede S, Thiolat D, Coves S, Courtois P, Vincendeau P, Mossalayi MD. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 48 (3/2004): 924-9.
- [102] Marton LJ, Levin VA, Hervatin SJ, Koch-Weser J, McCann PP, Sjoerdsma A., Potentiation of the antitumor therapeutic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by alpha-difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor. *Cancer Res*. 41 (11 Pt 1/1981): 4426-31.
- [103] Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 50 (6/2006): 2185-91.

- [104] McCann PP, Bacchi CJ, Clarkson AB Jr, Seed JR, Nathan HC, Amole BO, Hutner SH, Sjoerdsma A. Further studies on difluoromethylornithine in African trypanosomes. *Med Biol.* 59 (5-6/1981): 434-40.
- [105] McCann PP, Pegg AE. Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol Ther.* 54 (2/1992): 195-215. Review.
- [106] MediLexicon International Ltd.: Phase III Pivotal Trial of DB289 To Treat Trypanosomiasis (African sleeping sickness) auf <http://www.medicalnewstoday.com/articles/29694.php>; Article Date: 26 Aug 2005 - 7:00 PDT.
- [107] Mendonca Melo M, Rasica M, van Thiel PP, Richter C, Kager PA, Wismans PJ. Drie patiënten met Oost-Afrikaanse slaapziekte na verblijf in Kenia. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 146 (52/2002): 2552-6.
- [108] Merck KgaA: Giemsa's Azure Eosin Methylene Blue Solution; Stand: Februar 2008
- [109] Merschjohann K. Entwicklung eines kolorimetrischen Testverfahrens zur Bestimmung der trypanoziden Wirkung von chemischen Verbindungen und Pflanzenstoffen in vitro. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1997.
- [110] Molecular Probes®: Produktinformation FM® Lipophilic Styryl Dyes; Stand: 17. Mai 2005
- [111] Molecular Probes®: LysoTracker® and LysoSensor™ Probes; Manual; Stand 15. Oktober 2007
- [112] Molecular Probes®: Produktinformation Vybrant® Apoptosis Assay Kit #3, Stand 27. Juni 2005
- [113] Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 6 (4/2003): 359-64. Review.
- [114] Müller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived hemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med.* 1 (2/1998): 491-4. Review.
- [115] Mullin KA, Foth BJ, Ilgoutz SC, Callaghan JM, Zawadzki JL, McFadden GI, McConville MJ. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell.* 12 (8/2001): 2364-77.
- [116] Murray M, Morrison WI, Whitelaw DD. Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Adv Parasitol.* 21 (1982): 1-68. Review.

- [117] Mutomba MC, To WY, Hyun WC, Wang CC. Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 90 (2/1997): 491-504.
- [118] Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods.* 42 (2000): 97-114. Review.
- [119] Van Nieuwenhove S, Schechter PJ, Declercq J, Boné G, Burke J, Sjoerdsma A. Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO (DL-alpha-difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 79 (5/1985): 692-8.
- [120] Nkemgu-Njinkeng J, Rosenkranz V, Wink M, Steverding D. Antitrypanosomal activities of proteasome inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 46 (6/2002): 2038-40. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 47 (9/2003): 3036.
- [121] Onah DN, Hopkins J, Luckins AG. Changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations and parasite-specific antibody responses in *Trypanosoma evansi* infection of sheep. *Parasitol Res.* 85 (4/1999): 263-9.
- [122] Opigo J, Woodrow C. NECT trial: more than a small victory over sleeping sickness. *Lancet.* 374 (9683/2009): 7-9.
- [123] Ormerod WE. Hypothesis: the significance of Winterbottom's sign. *J Trop Med Hyg.* 94 (5/1991): 338-40. Review.
- [124] Pays E, Vanhollebeke B, Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP, Pérez-Morga D. The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol.* 4 (6/2006): 477-86.
- [125] Pentreath VW, Kennedy PEG. Pathogenesis of Human African Trypanosomiasis. In Maudlin I, Holmes P.H and Miles M.A. (eds.) *The Trypanosomiasis.* London: CAB international 2004, pp. 283-301.
- [126] Pépin J, Khonde N, Maiso F, Doua F, Jaffar S, Ngampo S, Mpia B, Mbulamberi D, Kuzoe F. Short-course eflornithine in Gambian trypanosomiasis: a multicentre randomized controlled trial. *Bull World Health Organ.* 78 (11/2000): 1284-95.
- [127] Pépin J, Milord F. The treatment of human African trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 33 (1994): 1-47.

- [128] Pépin J, Milord F, Guern C, Schechter PJ. Difluoromethylornithine for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Lancet*. 2 (8573/1987): 1431-3.
- [129] Pepin J, Milord F, Meurice F, Ethier L, Loko L, Mpia B. High-dose nifurtimox for arsenoresistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: an open trial in central Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86(1992): 254-6.
- [130] Picard A. A legendary killer allowed to get away; *The globe and Mail*; Toronto, Canada; 23. September 2000 über: http://www.msf.org/msfinternational/invoke.cfm?component=article&objectid=71282D8A-EC70-11D4-B2010060084A6370&method=full_html; Stand: 06.05.2010
- [131] Plasman N, Guillet JG, Vray B. Impaired protein catabolism in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: possible involvement in antigen presentation. *Immunology*. 86 (4/1995): 636-45.
- [132] Ponte-Sucre A. Molecular Mechanisms of N,C-Naphthylisoquinoline Alkaloids in *Leishmania major* im Rahmen von N,C-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids – a Novel Type of Antiinfectious Agents. Mini-Symposium Würzburg. 10. Juli 2007.
- [133] Ponte-Sucre A, Faber JH, Gulder T, Kajahn I, Pedersen SE, Schultheis M, Bringmann G, Moll H. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother*. 51 (1/2007): 188-94.
- [134] Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Nguouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet*. 374 (9683/2009): 56-64.
- [135] Priotto G, Pinoges L, Fursa IB, Burke B, Nicolay N, Grillet G, Hewison C, Balasegaram M. Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in Sudan: cohort study. *BMJ*. 336 (7646/2008): 705-8.
- [136] de Raadt P., The history of sleeping sickness. Fourth International Cours on African Trypanosomoses, Tunis, 11-28 October 2005
- [137] Rosenkranz V, Wink M. Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules*. 13 (10/2008): 2462-73.

- [138] Rote Liste Service GmbH, Rote Liste 2008 – Arzneimittelverzeichnis für Deutschland.
- [139] Schafer-Somi S, Aurich C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci.* 2006 Sep 19 [Epub ahead of print].
- [140] Schnee H. (Hrsg.), Deutsches Kolonial-Lexikon. - Leipzig: Quelle & Meyer. 1920. Band II, p. 614.
- [141] Schnee H. (Hrsg.), Deutsches Kolonial-Lexikon. - Leipzig: Quelle & Meyer. 1920. Band III, p. 548f.
- [142] Seed JR. African trypanosomiasis research: 100 years of progress, but questions and problems still remain. *International Journal for Parasitology.* 31 (2001): 434-42.
- [143] Seidl A, Dávila AM, Silva RA. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian pantanal and Bolivian lowlands. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (2/1999): 269-72.
- [144] Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 279 (50/2004): 52366-75.
- [145] SFB 630: SOP M-Z1-007-01 Antitrypanosomale Aktivität.
- [146] Shaw APM, Economics of African trypanosomiasis. In Maudlin I, Holmes PH and Miles MA. (eds.) *The Trypanosomiasis*. London: CAB international. 2004, pp. 369-402.
- [147] Sigma-Aldrich®:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=A2942|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC;
 Stand 21.09.09
- [148] Small EJ, Halabi S, Kantoff P, D'Amico A, Stadler W, Kelley WK, Mohler J, Bajorin D, Vogelzang NJ. Activities and accomplishments of the cancer and leukemia group B genitourinary committee. *Clin Cancer Res.* 12 (11 Pt 2/2006): 3596-600. Review.
- [149] Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitology*, 15 (1999): 432–7.
- [150] Steverding D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors.* 1 (1/2008): 3.

- [151] Stich A, Abel PM, Krishna S. Human African trypanosomiasis. *BMJ*. 325 (7357/2002): 203-6. Review.
- [152] Stich A, Barrett MP, Krishna S. Waking up to sleeping sickness. *Trends Parasitol*. 19 (5/2003): 195-7. Review.
- [153] Stich A, Firmenich P. Afrikanische Schlafkrankheit: Die Karriere eines Medikaments; *Dtsch Arztebl*. 98 (26/2001): A-1735 / B-1489 / C-1381 THEMEN DER ZEIT
- [154] Terasaki M, Reese TS. Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J Cell Sci*. 101 (Pt 2/1992): 315-22.
- [155] Trail JC, d'Ieteren GD, Viviani P, Yangari G, Nantulya VM. Relationships between trypanosome infection measured by antigen detection enzyme immunoassays, anaemia and growth in trypanotolerant N'Dama cattle. *Vet Parasitol*. 42 (3-4/1992): 213-23.
- [156] Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*. 359 (9324/2002): 2188-94. Review.
- [157] Tu X, Wang CC. Coupling of posterior cytoskeletal morphogenesis to the G1/S transition in the *Trypanosoma brucei* cell cycle. *Mol Biol Cell*. 16 (1/2005): 97-105.
- [158] Turner CM. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* infections: an holistic view. *J Cell Sci*. 112 (Pt 19/1999): 3187-92. Review.
- [159] UNDP/World Bank/WHO (eds.) New lease of life for resurrection drug. in UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). *TDR news*. 64 (2001).
- [160] UNICEF/UNDP/World Bank/WHO: Human African trypanosomiasis. Seventeenth Program Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research & Training in Tropical Diseases: making health research for poor people, progress 2003–2004. WHO, Geneva. 2005.
- [161] Universidad Complutense: Abteilung für Biochemie und Molekular Biologie I:
http://www.bbm1.ucm.es/public_html/res/prot/1AVH_annexin_V_1.jpg;
 Stand 04.11.2009

- [162] The University of Edinburgh: School of biological sciences; Institute of Immunology & Infection Research - Gallery of Pictures:
<http://www.biology.ed.ac.uk/research/institutes/immunology/pictures.php>;
Stand 09.09.2009
- [163] University of Leicester: department of biology:
<http://www.le.ac.uk/biology/teach/modl03/mulecs/13.html>;
Stand 09.09.2009
- [164] Venegas B, González-Damián J, Celis H, Ortega-Blake I., Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature. *Biophys J.* 85 (4/2003): 2323-32.
- [165] Vreysen MJ. Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Med Trop (Mars).* 61 (4-5/2001): 397-411. Review.
- [166] Welburn SC, Macleod E, Figarella K, Duzensko M. Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology.* 132 (2006): Suppl: S7-S18. Review.
- [167] WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1: Chapter 8 – African trypanosomiasis. In WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases World Health Organization. 2000:95-106.
- [168] WHO: Fact sheet N°259, Revised August 2006
- [169] WHO: Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. *Weekly Epidemiol Rec.* 81 (8/2006): 71-80.
- [170] WHO: WHO Control and surveillance of African Trypanosomiasis. In WHO technical support series 881. World Health Organisation, Geneva. 1998, 114pp.
- [171] WHO: world health report 2004
- [172] WHO: Homepage, Emerging diseases:
http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/
- [173] WHO: Homepage, Human African Trypanosomiasis:
http://www.who.int/trypanosomiasis_african/disease/en/index.html;
Stand 17.09.2009
- [174] Wiederkehr A, Avaro S, Prescianotto-Baschong C, Haguenaer-Tsapis R, Riezman H. The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 149 (2/2000): 397-410.

- [175] Wikipedia: DAPI: <http://de.wikipedia.org/wiki/4%E2%80%B2,6-Diamidino-2-phenylindol>; Stand 17.10.2009
- [176] Wikipedia: Eflornithin: <http://de.wikipedia.org/wiki/Eflornithin> Stand 17.09.09
- [177] Wikipedia: Fluoreszein: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Fluorescein.png&filetimestamp=20070503003901>; Stand 04.11.09
- [178] Wikipedia: Melarsoprol: <http://de.wikipedia.org/wiki/Melarsoprol> Stand: 17.09.09
- [179] Wikipedia: Pentamidin: <http://de.wikipedia.org/wiki/Pentamidin> Stand 17.09.09
- [180] Wikipedia: Propidium-Jodid: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Propidium_iodide.png&filetimestamp=20070710020823 Stand 4.11.2009
- [181] Wikipedia: Suramin: <http://de.wikipedia.org/wiki/Suramin>; Stand 17.09.09
- [182] Williamson J. Chemotherapy and chemoprophylaxis of African trypanosomiasis. *Exp Parasitol.* 12 (1962): 323-67.
- [183] Wilson D. HIV epidemiology: a review of recent trends and lessons. Global HIV/AIDS Program The World Bank. 13.09.2006.
- [184] Wink M. Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids: from DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. *Alkaloids Chem Biol.* 64 (2007): 1-47.
- [185] Woodward R, Gull K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 95 (Pt 1/1990): 49-57.
- [186] Yun O, Priotto G, Tong J, Flevaud L, Chappuis F. NECT Is Next: Implementing the New Drug Combination Therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5/2010): e720.
- [187] Zhang JR, Norris SJ. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect Immun.* 66 (8/1998): 3698-704.

2. Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
bp	base pairs
CD	cluster of differentiation
CDC	Centre of Disease Control
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DALY	disease-adjusted life years (lost)
DAMP	(3-[2,4,-dinitroanilino]3'-amino-N-methyldipropylamine)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMFO	Eflornithin, α-Difluoromethyleflornithin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dUTP	desoxyuridine triphosphate
FACS [®]	Fluorescence activated cell sorting
FADH/FAD	Flavinadenin dinucleotide (oxidized/reduced form)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMNH/FMN	Flavin mononucleotide (oxidized/reduced form)
FSC	Forward Scatter
HAART	highly active anti-retroviral therapy - highly active anti-retroviral therapy against HIV
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonic acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
KCl	Potassium chloride
kDa	10 ³ Dalton
KG	Body weight
MSF	Médecins Sans Frontières
NADH/NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized/reduced form)
NADPH/NADP	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (oxidized/reduced form)
NaOH	Sodium hydroxide
NECT	Nifurtimox/Eflornithine combined treatment
NIQ	Naphthylisochinoline alkaloids
nM	10 ⁻⁹ Mol / Liter
PBS	phosphate buffered saline – Phosphate buffered saline solution
PI	Propidium iodide
SCC	Sidewards Scatter
SFB	Sonderforschungsbereich der deutschen Forschungsgemeinschaft
SOP	Standard operating procedure
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
<i>T.b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
US\$	United States Dollar
VSG	variant surface glycoprotein
WHO	World Health Organisation

Danksagung

Mein erster Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. August Stich für die Überlassung des Themas und einen guten Start in wissenschaftliches Arbeiten. Trotz Deiner knappen Zeit war es mir immer möglich Fragen und Probleme kurzfristig zu klären. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Barbara Klebrig und Eva-Maria Stephan und dem kompletten Tropenteam der Missionsärztlichen Klinik danken. Die meisten der Bedankten, die im Folgenden genannt sind, und die Einbettung der Arbeit in den SFB 630 habe ich Deinen Kontakten zu verdanken.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Heidrun Moll, die sich freundlicherweise bereiterklärt hat, das Koreferat zu übernehmen. Die meisten Versuche zu dieser Arbeit sind in den Räumen der AG Moll und vor allem mit Geräten (z.B.: Fluoreszenzmikroskop, FACS) und dem know-how der Mitarbeiter entstanden. Besonders möchte ich hierfür Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Katharina Remer danken, die mich selbstlos in die Geheimnisse des FACS und der Textilarchäologie eingeführt hat.

Ohne Prof. Dr. rer. nat. Alicia Ponte-Sucre hätte aus dieser Arbeit nicht das werden können, was es nun geworden ist. Dank der sehr freundschaftlichen Diskussion ergab sich der jeweils nächsten Versuchsschritt als logischer Folge. Insbesondere danken möchte ich Dir für die Aufmunterungen, wenn mal wieder ein Versuch aus unerklärlichen Gründen misslang, aber wie ich gelernt habe: „That's science“.

Hanne Fleischmann, Jenny Rath und Melanie Glaser vom Hanna-Decker-Haus oder wie es zu meinen Anfängen noch hieß Armauer-Hansen-Institut, die mir die Grundlagen über das Trypanosom im Allgemeinen sowie das Arbeiten mit diesen possierlichen Tierchen beigebracht haben. Dank ihnen gab es auch immer genug „Trypsen“ für meine Versuche.

Dr. rer. nat. Tanja Gulder und Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Bringmann, die mir die benötigten Wirkstoffe im Rahmen des SFB 630 zur Verfügung stellten.

Prof. Dr. rer. nat. Georg Krohne, Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heike Bruhn, Sieglinde Mauder, Christian Albert und vielen anderen für ihre Hilfe bei den vielen kleinen Problemen, die im Rahmen einer solchen Arbeit immer wieder auftreten.

Prof. Dr. med. Klaus Fleischer, der mich wie so viele mit dem Virus Tropenmedizin infiziert hat.

Danken will ich natürlich Margit und Dr. med. dent. Rolf Strasen, meinen Eltern, für all die Unterstützung, die ich in den letzten nun fast 30 Jahren in wirklich jedem Bereich erhalten habe.

Mein Dank gilt ebenso Tim Strasen, dem besten Bruder, den man sich wünschen kann.

„Die Welt ist nicht gerecht, das ist nicht schön, aber führt manchmal dazu, dass man unverschämtes Glück haben kann.“ So kam es, dass ich mit meinem Patenonkel Priv.-Doz. Dr. phil. Sven Strasen jemanden an meiner Seite hatte, der mich in die Geheimnisse der Literaturzitierung einführen konnte.

Ein lieber Dank geht an meine Freunde. Ihr habt mir zum Teil sehr konkret, zum Teil auch mit reinem Quatschen, Kochen und Bierchen trinken mehr geholfen, als Ihr wahrscheinlich ahnt.

Zum Schluss möchte ich Dir, Anne, von ganzem Herzen Danke sagen.

DANKE FÜR ALLES

Lebenslauf

Name: Strasen

Vorname: Jörn

Geburtstag: 02.05.1981

Geburtsort: Würzburg

Adresse: Königsbergerstr. 44
97072 Würzburg

Eltern: Dr. med. dent. Rolf-Dieter Strasen, Zahnarzt
Margit Strasen, geb. Engert, Auslandskorrespondentin

Wohnorte: 05/1981 – 12/1983 Veitshöchheim
12/1983 – 04/2004 Kist
04/2004 – bis heute Würzburg

Schulbildung: 1987 – 1991 Grundschule Kist
1991 – 2000 Siebold-Gymnasium Würzburg

Schulabschluss: Abitur

Hochschulausbildung: 04/2002 – 10/2008 Julius-Maximilians-Universität
Würzburg, Fachrichtung: Humanmedizin

04/2004 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2008 Approbation

Würzburg, April 2011