



DISSERTATIONSVORTRAG

Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection von *Trypanosoma brucei* und Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem

von

Stefan Mogk

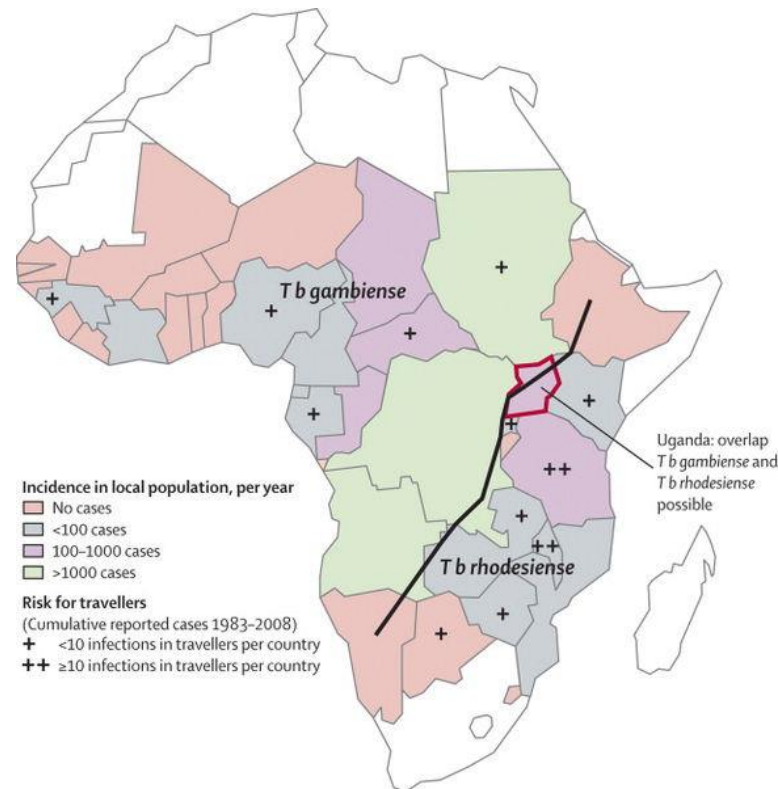
-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Duszenko
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hartwig Wolburg
 3. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Engstler

Westafrikanische Form

T.b.gambiense

Ostafrikanische Form

T.b.rhodesiense



Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. **The Lancet** 375: 148-159.

Afrikanische Schlafkrankheit

Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Epidemiologie und Krankheitsbild

Lebenszyklus

Vorarbeiten zur Gehirninfection

Westafrikanische Form

T.b.gambiense

4-6 Monate

Jahre

Hämolymphatisches Stadium

Lokaler Trypanosomenschanter,
allgemeine Krankheitssymptome,
Winterbottom's sign

Meningoenzephalitisches Stadium:

Deregulation des Schlaf- / Wachrhythmus,
Kachexie und Apathie

Exitus letalis

Ostafrikanische Form

T.b.rhodesiense

Wochen

3-7 Monate

Afrikanische Schlafkrankheit

Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem

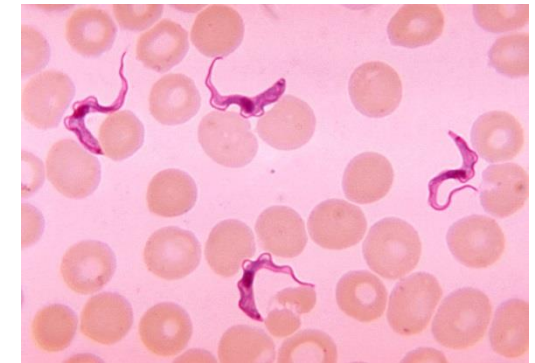
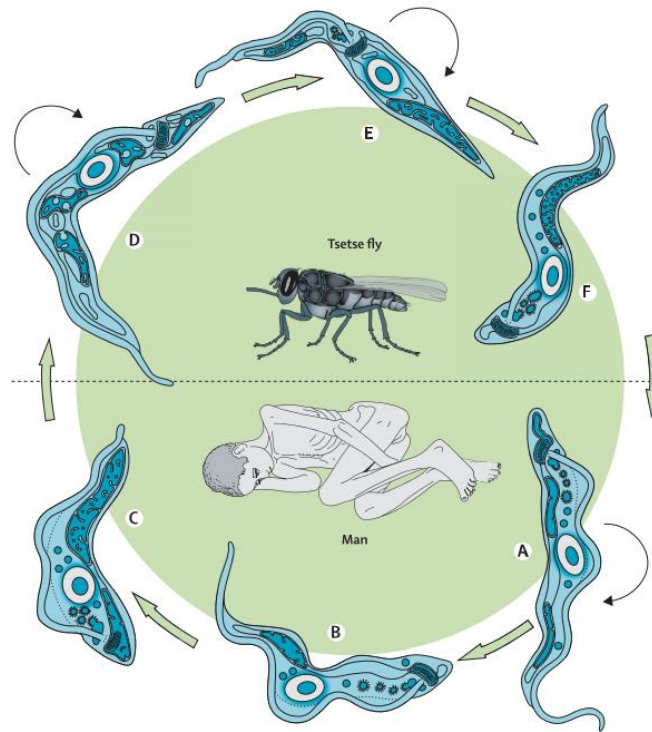
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Epidemiologie und Krankheitsbild

Lebenszyklus

Vorarbeiten zur Gehirninfection

Lebenszyklus von *T.brucei* (mit Wirtswechsel):



Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. **The Lancet** 375: 148-159.

Afrikanische Schlafkrankheit

Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

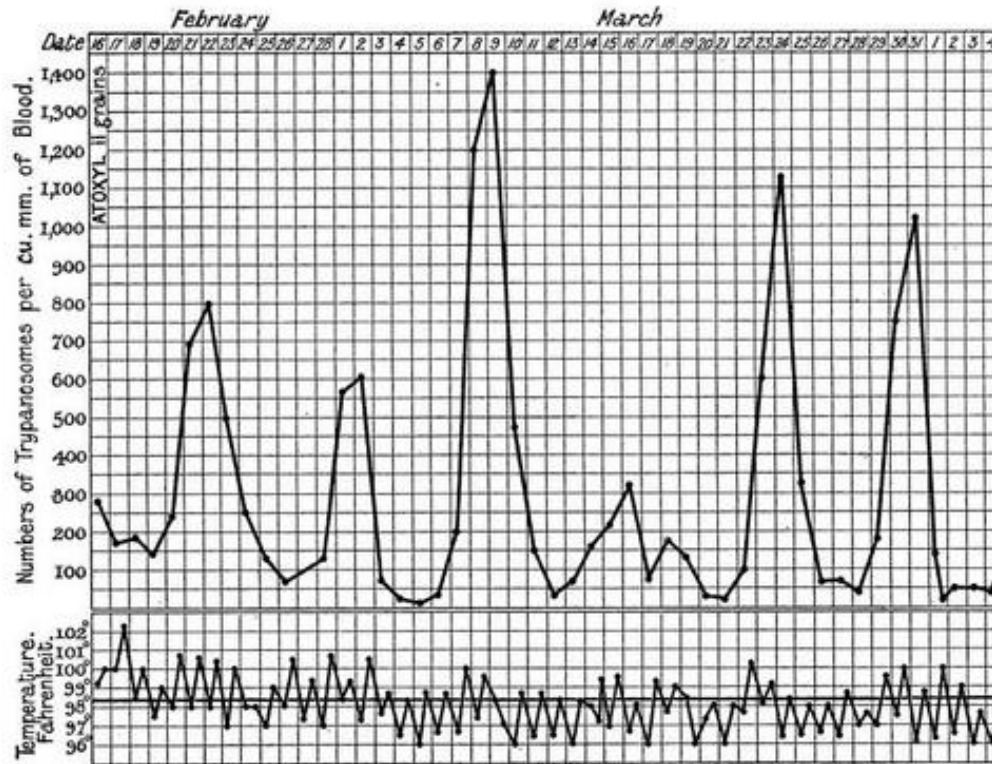
Epidemiologie und Krankheitsbild

Lebenszyklus

Vorarbeiten zur Gehirninfection

Zyklischer Parasitämieverlauf

durch trypanosomale Zelldichteregulation und Antigenvariation



Ross R, Thomson D (1910) A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: regular periodical increase of the parasites disclosed. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**,82: 11-415.

Afrikanische Schlafkrankheit

Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem

Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

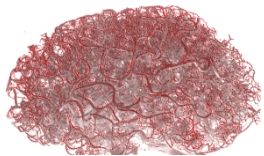
Epidemiologie und Krankheitsbild

Lebenszyklus

Vorarbeiten zur Gehirninfection

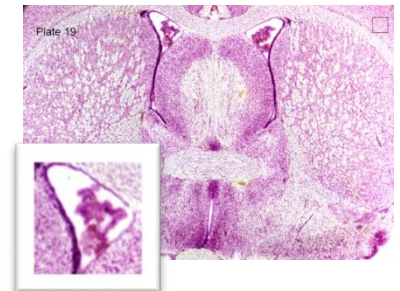
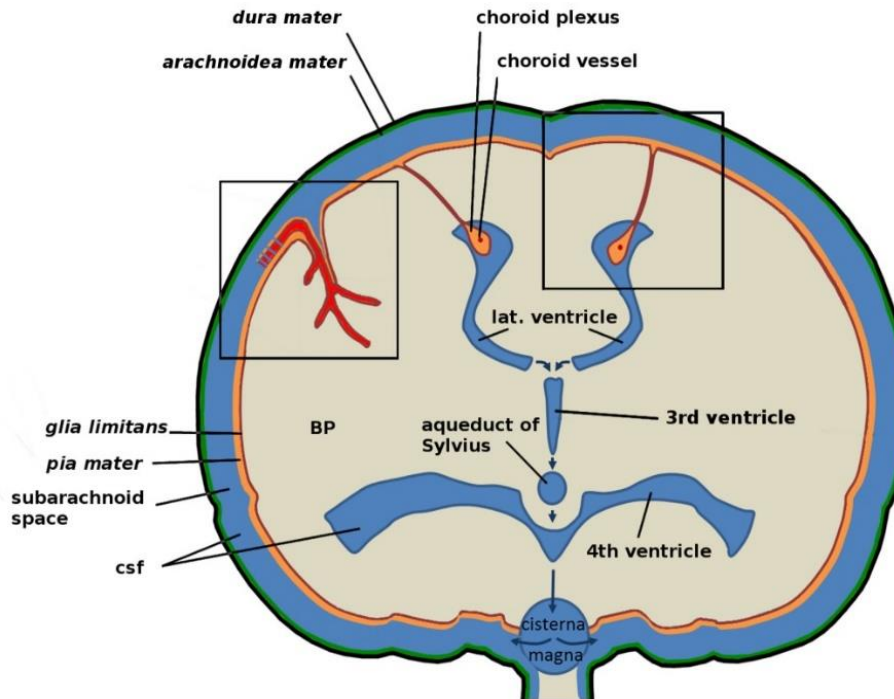
Blut-Hirn-Schranke

Mulenga et al (2001), Trypanosoma brucei brucei crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. **Neuropathol Appl Neurobiol** 27:77-85



Blut-csf-Schranke

Schmidt, H (1983), The pathogenesis of trypanosomiasis of the CNS. Studies on parasitological and neurohistological findings in trypanosoma rhodesiense infected monkeys. **Pathological anatomy and histopathology** 299: 333-343

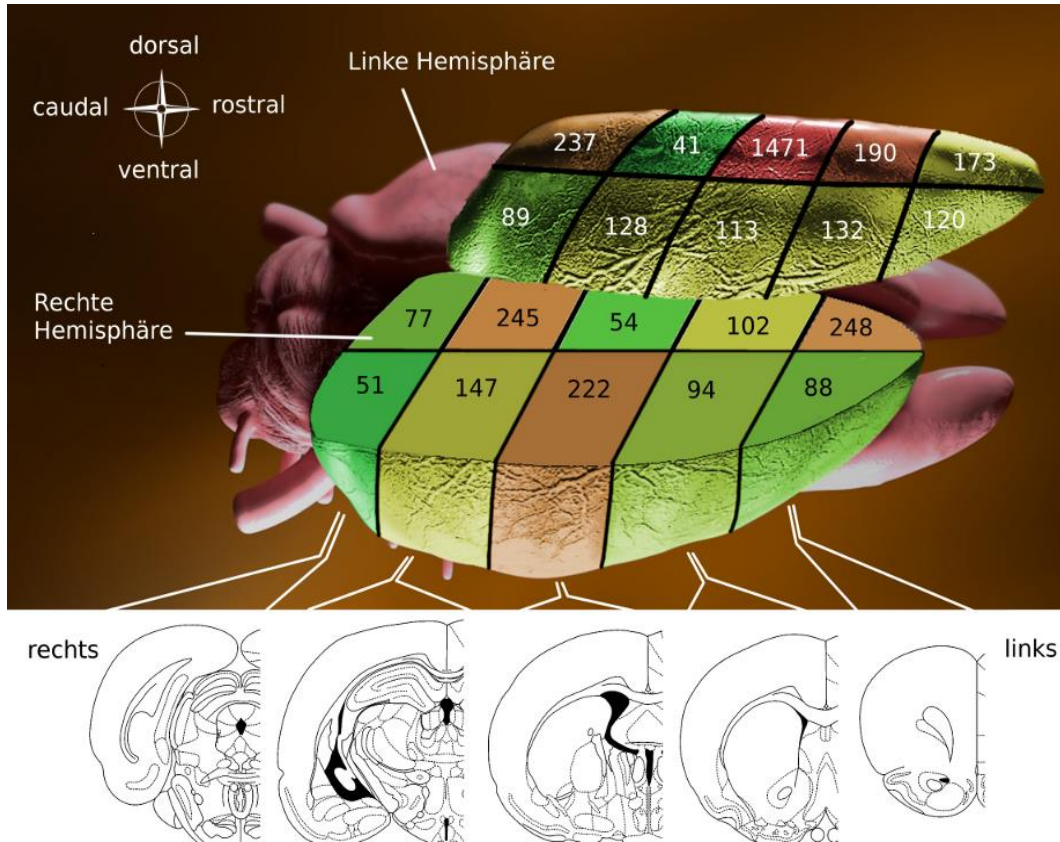


Afrikanische Schlafkrankheit

Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Epidemiologie und Krankheitsbild
Lebenszyklus
Vorarbeiten zur Gehirninfection

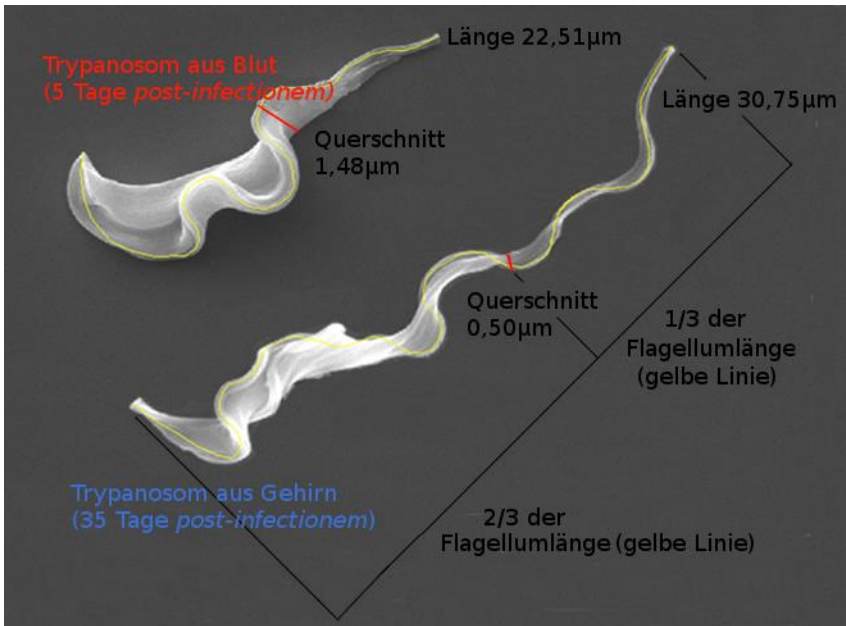
Kartierung der Trypanosomendichte im Gehirn einer 23d-infizierten Ratte



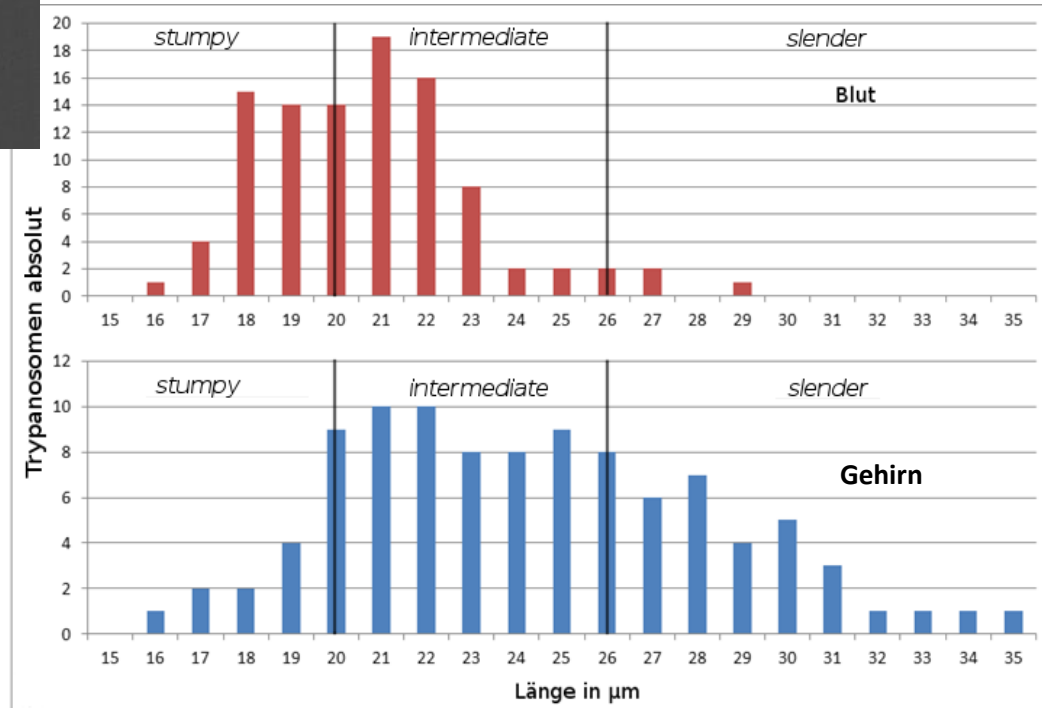
- Rechte Hemisphäre in 20 Gewebsblöcke geschnitten
- Isolierung von gDNA
- *Real time* PCR mit Primern gegen TbAOX und RnGAPDH

Afrikanische Schlafkrankheit
 Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
 Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Lokalisation
 Isolierung und Vermessung



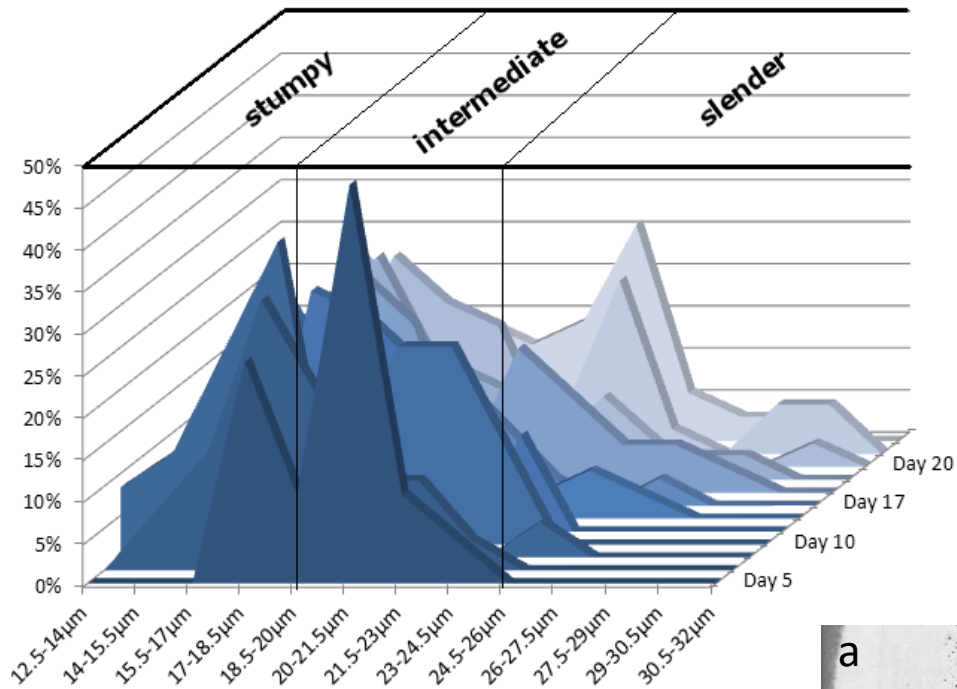
Vermessung von Trypanosomen entlang des undulierenden Flagellums



Längenvergleich von Trypanosomen aus Blut und Gehirn einer 13d-infizierten Ratte

Afrikanische Schlafkrankheit
 Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
 Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Lokalisation
 Isolierung und Vermessung

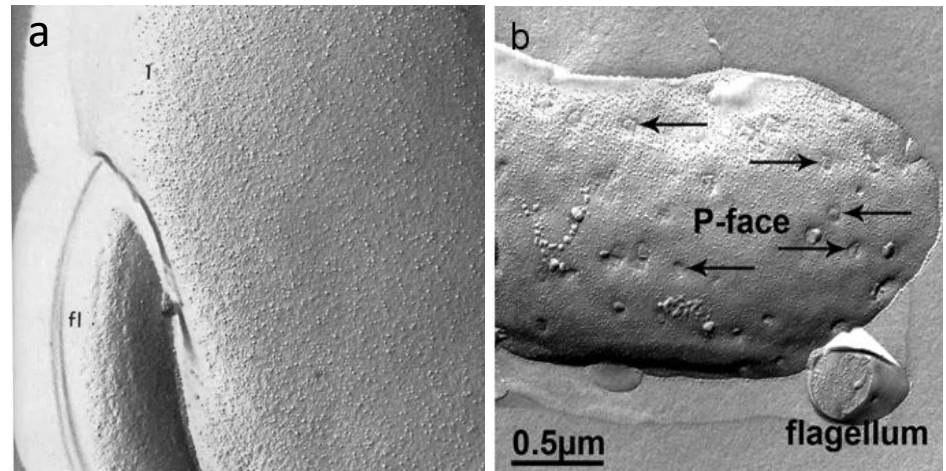


Vermessung von Trypanosomen aus dem Blut während des Infektionsverlaufs

Publiziert in *Neurology, Psychiatry and Brain Research* (2012)

Gefrierbruch

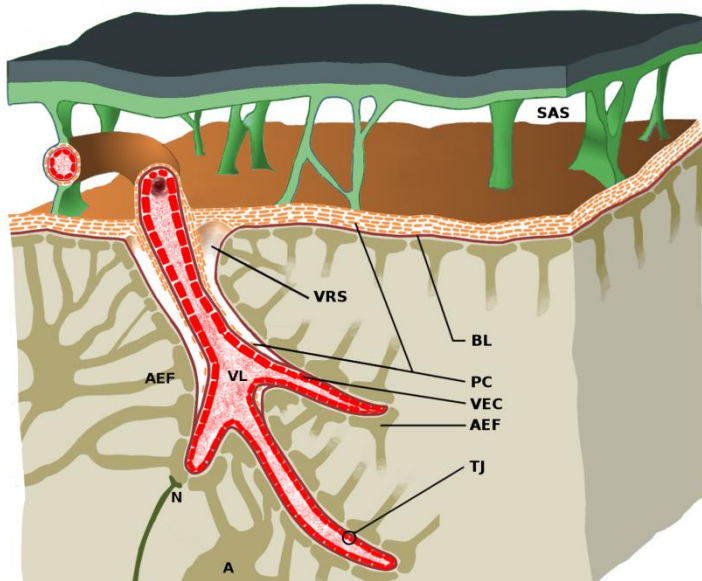
- a) Trypanosomen aus Blut
- b) Trypanosomen aus Gehirn



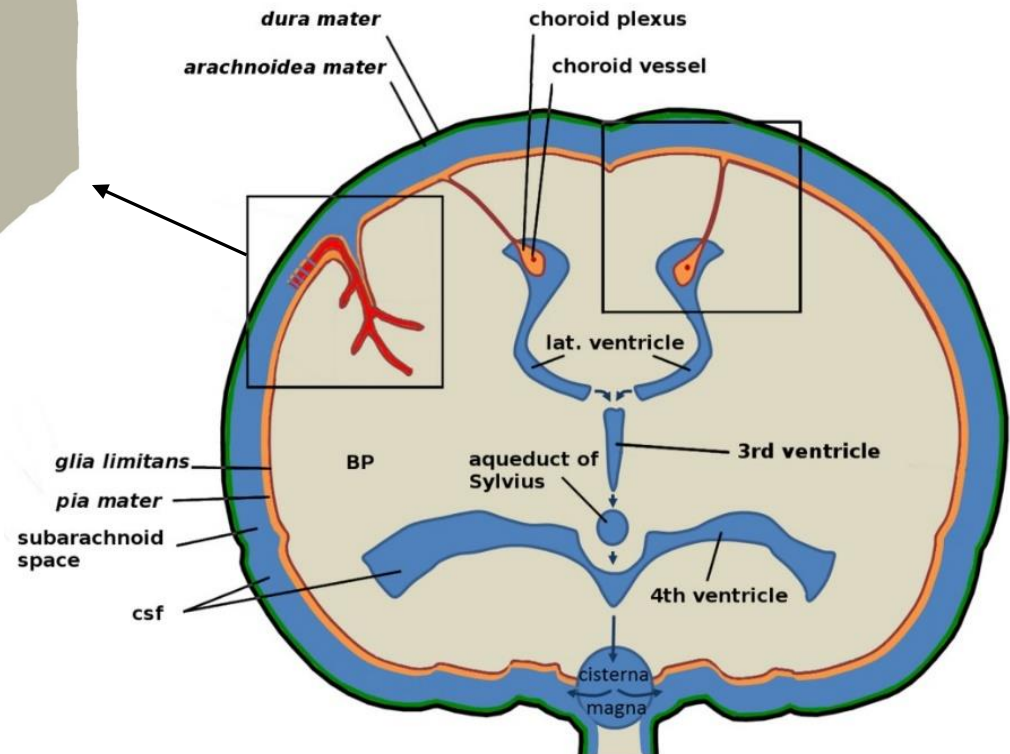
Afrikanische Schlafkrankheit
 Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
 Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

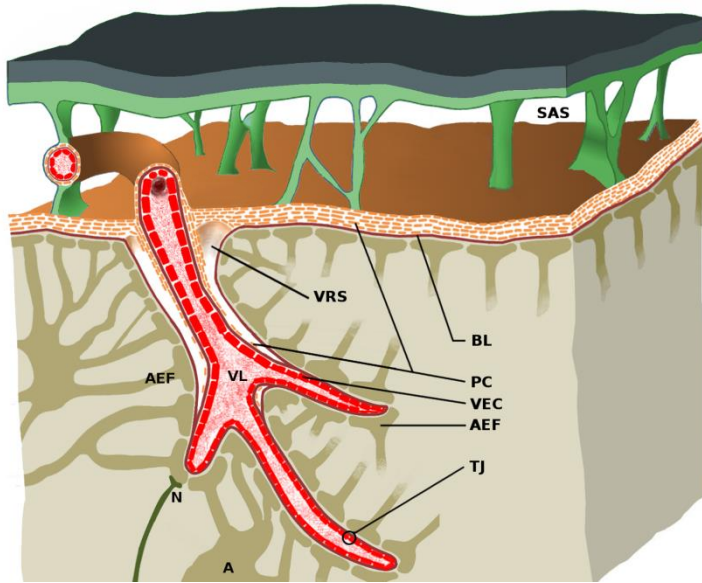
Lokalisation
 Isolierung und Vermessung

Aufklärung des Infektionsweges Blut-Hirn-Schranke ?



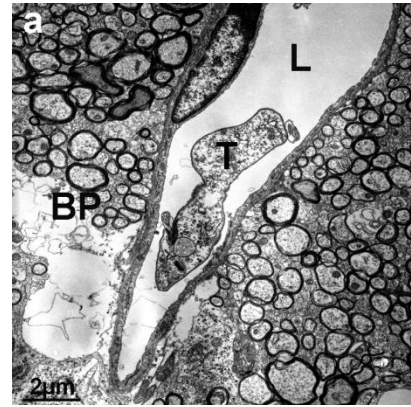
A=Astrozyt,
 AEF=Astrozytenendfuß,
 BL=Basallamina,
 N=Neuron,
 PC=Piazelle,
 SAS=Subarachnoidalraum,
 TJ=tight junction,
 VEC=Gefäßendothelzelle,
 VL=Gefäßlumen,
 VRS=Virchow-Robin-Raum.



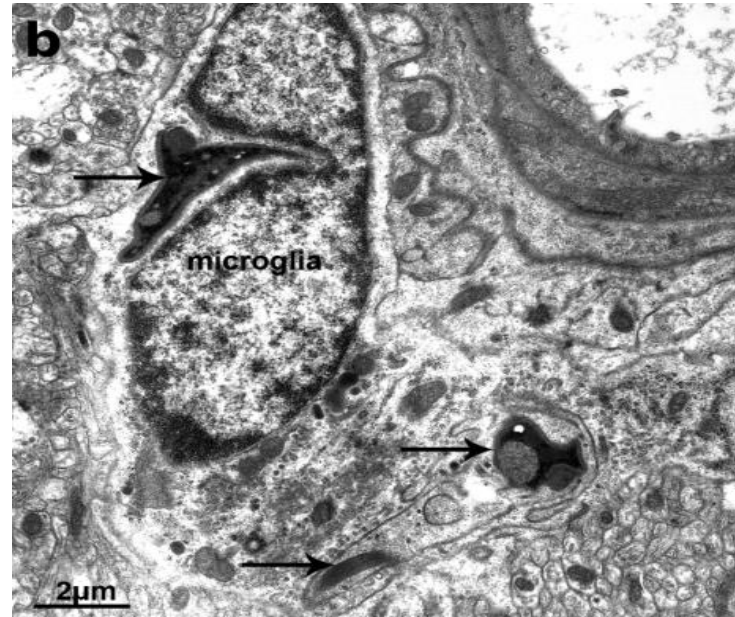


Publiziert in **PLoS ONE** (2012)

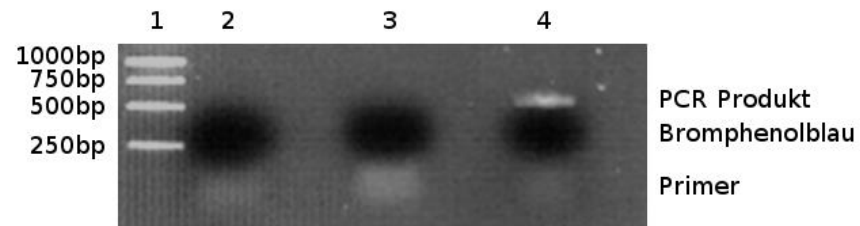
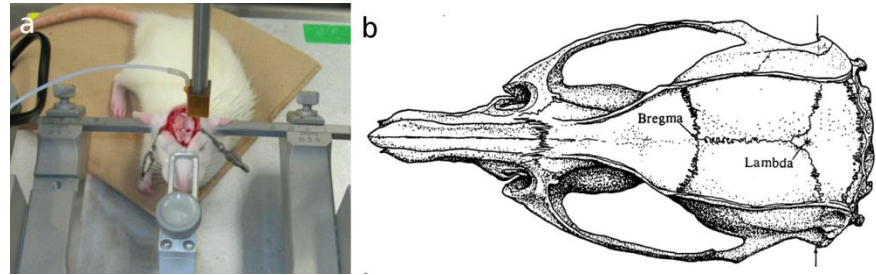
Pfeile= von Mikroglia
phagozytierte
Trypanosomen



BP=Gehirnparenchym,
L=Gefäßlumen,
T=Trypanosom



Stereotaktische intracerebrale Injektion



Nachweis von injizierten Trypanosomen mittels PCR (Primer gegen TbAOX).

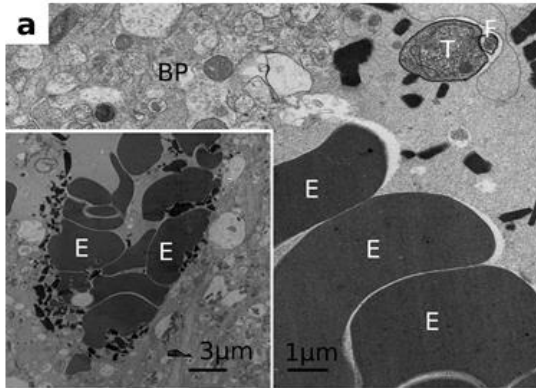
- 1) GeneRuler® 1kb,
- 2) Biopsiematerial aus naïvem Gehirn,
- 3) Biopsiematerial der nicht-infizierten Hemisphäre,
- 4) Biopsiematerial der infizierten Hemisphäre

Intracerebrale Injektion

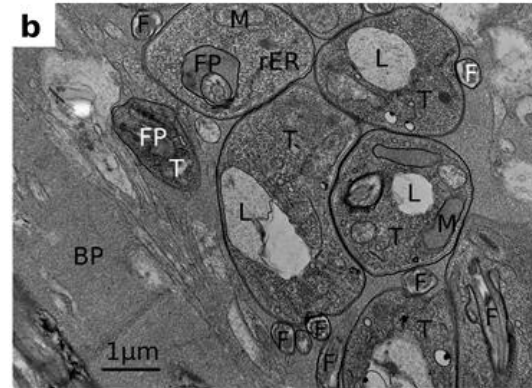
(10^4 Trypanosomen
in 5µl, 250nl/min)



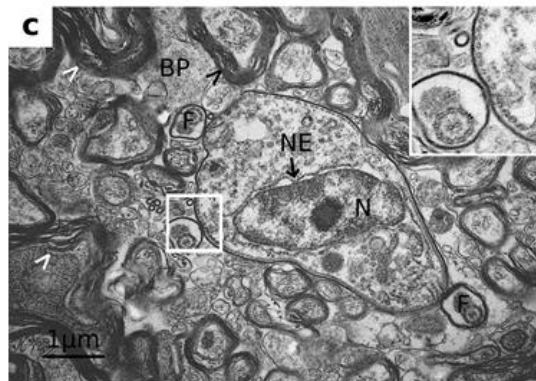
Stereotaktische intracerebrale Injektion



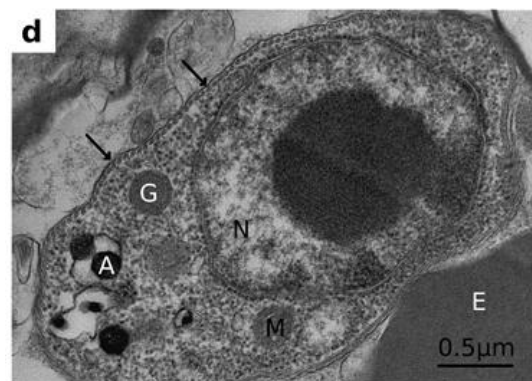
1h nach Injektion



1h nach Injektion



1d nach Injektion



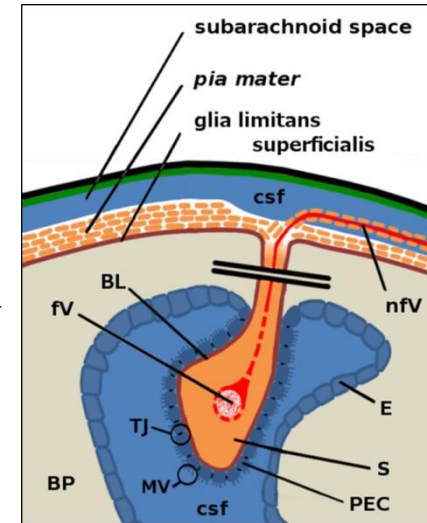
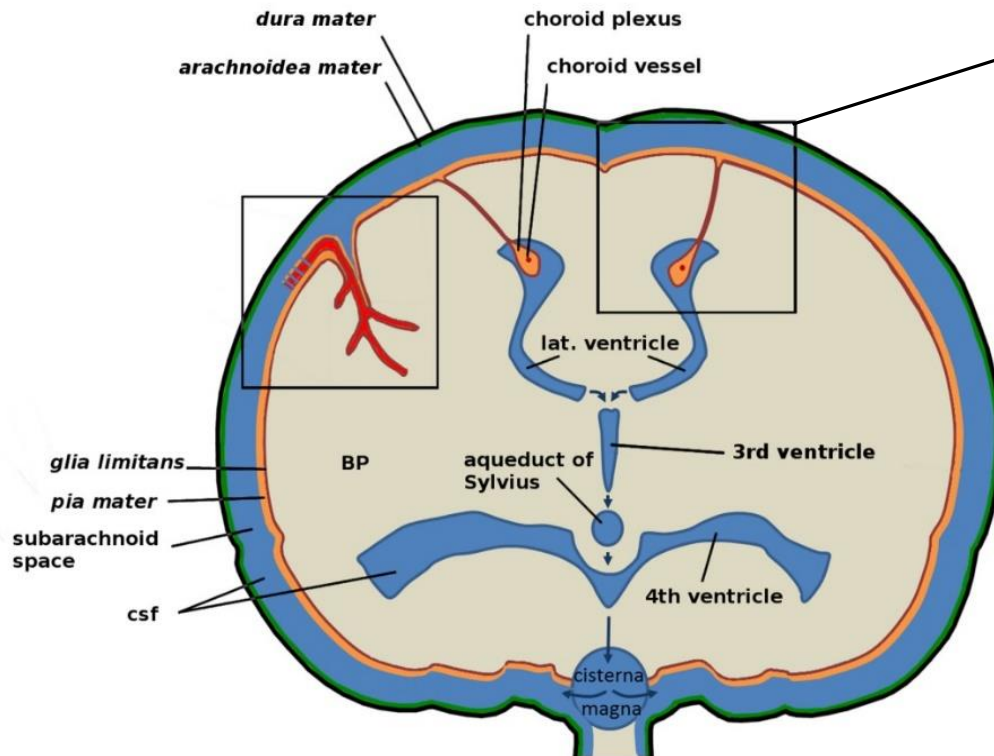
2d nach Injektion

Publiziert in **PLoS ONE** (2014)

A=Azidocalcisom,
 BP=Gehirnparenchym,
 E=Erythrozyt,
 F=Flagellum,
 FP=Flagellumtasche,
 G=Glycosom,
 L=Lysosom,
 M=Mitochondrium,
 N=Nucleus,
 rER=raues endoplasm. Retikulum,
 Pfeil=Myelinscheiden

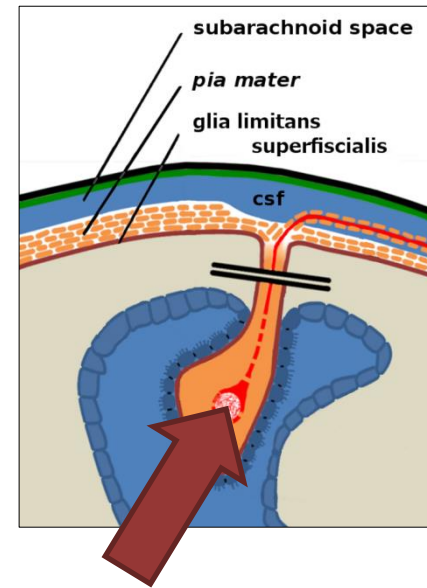
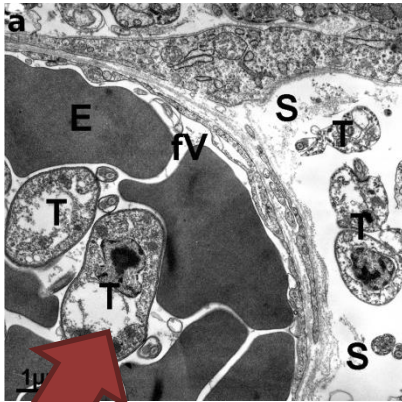
Aufklärung des Infektionsweges

Blut-csf-Schranke ?



BL=Basallamina,
 BP=Gehirnparenchym,
 E=Ependym,
 fV=fenestriertes Gefäß, MV=Mikrovilli,
 nfV=nicht-fenestriertes Gefäß,
 PEC=Plexusepithelzelle,
 S=Stroma,
 TJ=tight junction.

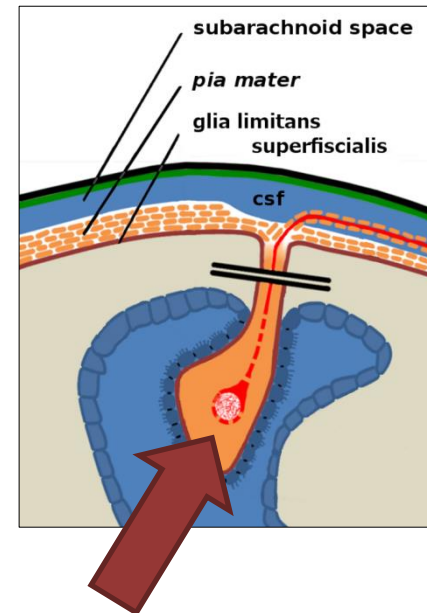
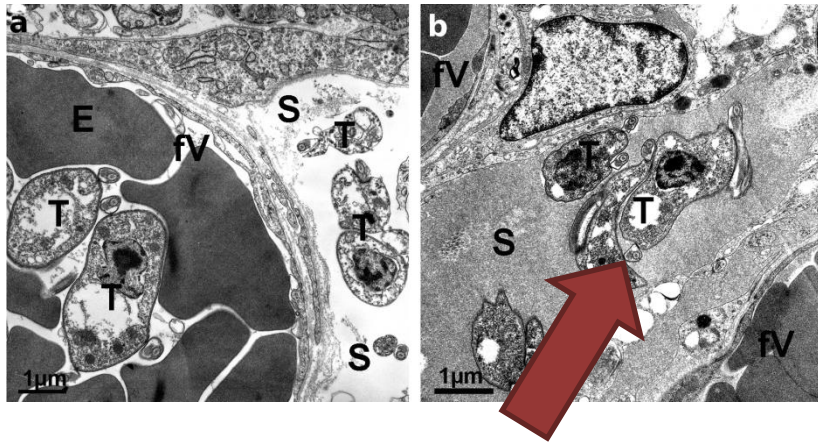
Aufklärung des Infektionsweges



Publiziert in **PLoS ONE** (2012)

E=Erythrozyt,
fV=fenestriertes Gefäßendothel,
S=Stroma,
T=Trypanosom,
fE=fenestriertes Gefäßendothel,
KC=Kolmer-Zelle,
PEC=Plexusepithelzelle,
T=Trypanosom,
V=Ventrikel.

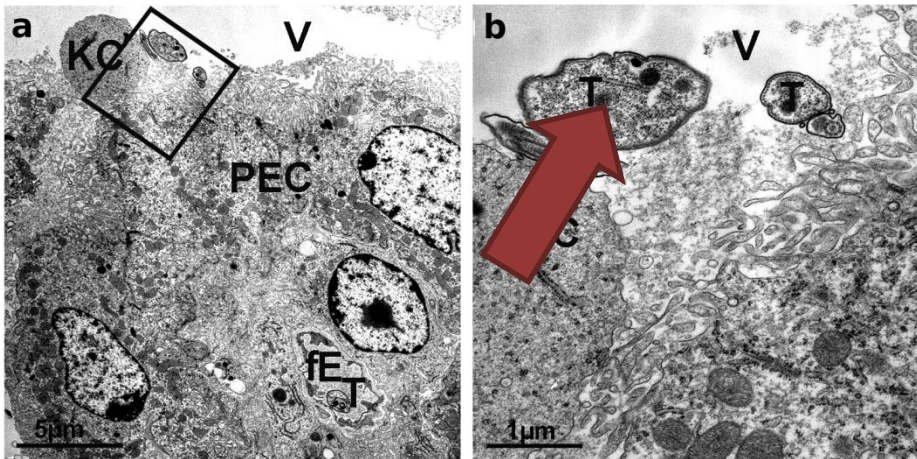
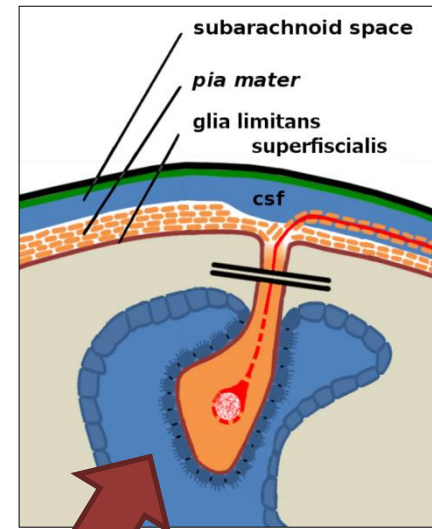
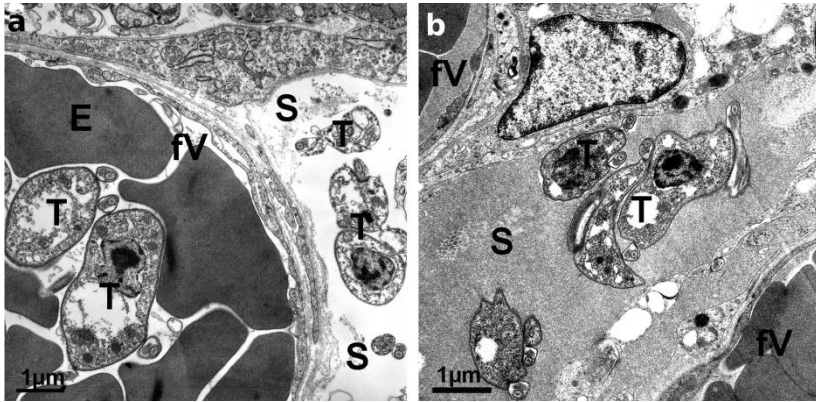
Aufklärung des Infektionsweges



Publiziert in **PLoS ONE** (2012)

E=Erythrozyt,
 fV=fenestriertes Gefäßendothel,
 S=Stroma,
 T=Trypanosom,
 fE=fenestriertes Gefäßendothel,
 KC=Kolmer-Zelle,
 PEC=Plexusepithelzelle,
 T=Trypanosom,
 V=Ventrikel.

Aufklärung des Infektionsweges



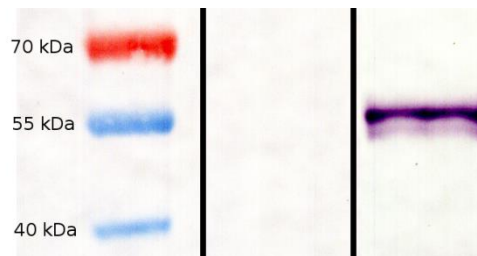
Publiziert in **PLoS ONE** (2012)

E=Erythrozyt,
 fV=fenestriertes Gefäßendothel,
 S=Stroma,
 T=Trypanosom,
 fE=fenestriertes Gefäßendothel,
 KC=Kolmer-Zelle,
 PEC=Plexusepithelzelle,
 T=Trypanosom,
 V=Ventrikel.

Welche Faktoren begünstigen eine Invasion in den *Plexus choroideus*?

a) Bildung von Immunkomplexen ?

- Lambert PH, Berney M, Kazyumba G (1981) Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis.
- Poltera AA, Hochmann A, Rudin W, Lambert PH (1980) *Trypanosoma brucei brucei*: a model for cerebral trypanosomiasis in mice.
- Patzold U, Haller P, Baruth B, Liman W, Deicher H (1980) Immune complexes in multiple sclerosis.

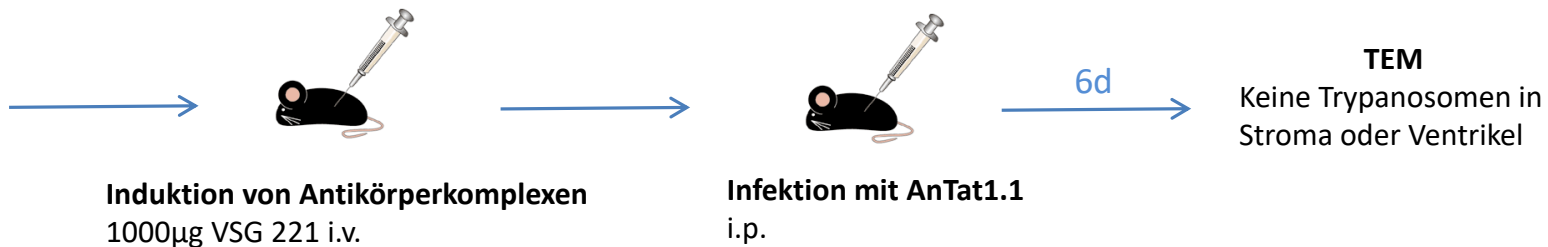


Western blot zum Nachweis von anti-VSG 221 in immunisiertem Rattenblut. Links: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific®). Mitte: Negativkontrolle mit naïvem Serum. Rechts: Probe mit immunisiertem Serum.

Welche Faktoren begünstigen eine Invasion in den *Plexus choroideus*?

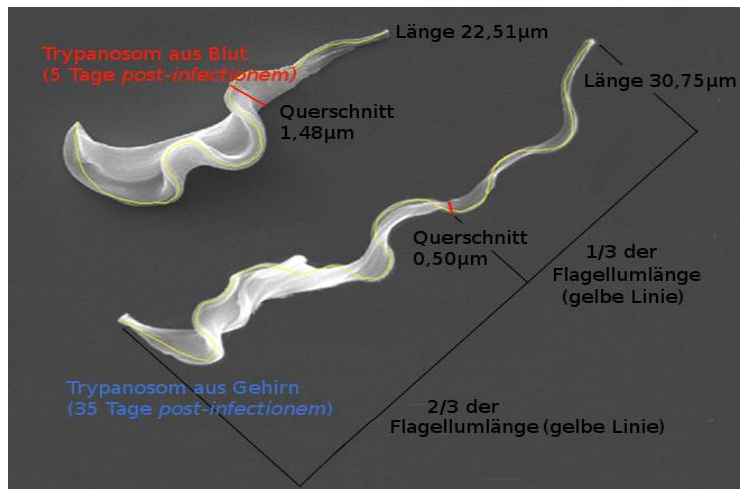
a) *Bildung von Immunkomplexen ?*

- Lambert PH, Berney M, Kazyumba G (1981) Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis.
- Poltera AA, Hochmann A, Rudin W, Lambert PH (1980) *Trypanosoma brucei brucei*: a model for cerebral trypanosomiasis in mice.
- Patzold U, Haller P, Baruth B, Liman W, Deicher H (1980) Immune complexes in multiple sclerosis.



Welche Faktoren begünstigen eine Invasion in den *Plexus choroideus*?

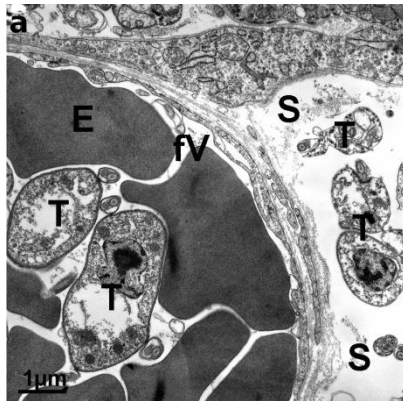
- a) **Bildung von Immunkomplexen ?**
- b) **Entstehung von Gehirnformen ?**



- Mogk S, Meiwes A, Boßelmann CM, Wolburg H, Duszenko M. *The lane to the brain: How African trypanosomes invade the CNS.*
- Mogk S, Meiwes A, Shtopel S, Schraermeyer U, Lazarus M, Kubata B, Wolburg H and Duszenko M. *Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS.*
- Wolburg H, Mogk S, Acker S, Frey C, Meinert M, Schönfeld C, Lazarus M, Urade Y, Kubata BK, Duszenko M. *Late Stage Infection in Sleeping Sickness.*
- Mogk S, Wolburg H, Frey C, Kubata BK, Duszenko M. *Brain infection by African trypanosomes during sleeping sickness.*

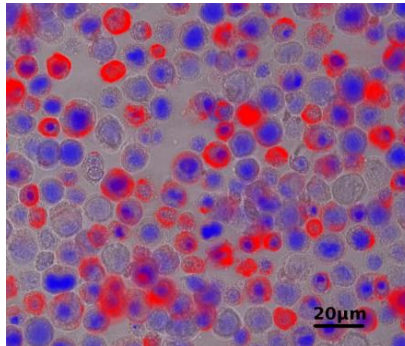
Welche Faktoren begünstigen eine Invasion in den *Plexus choroideus*?

- a) **Bildung von Immunkomplexen ?**
- b) **Entstehung von Gehirnformen ?**
- c) **Expression von Metalloproteasen ?**



Publiziert in **PLoS ONE** (2012)

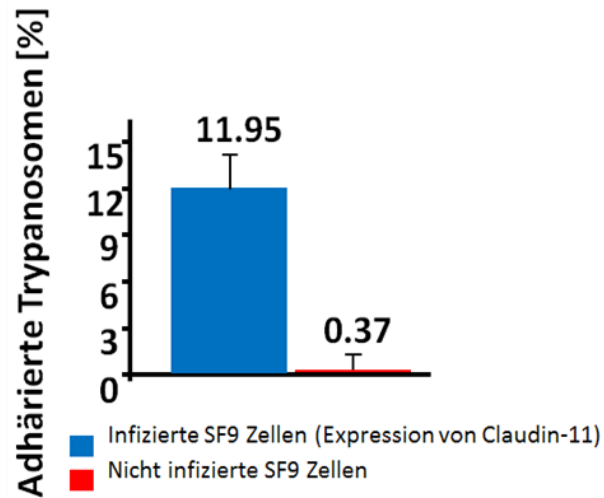
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis.
- Yang Y, Hill JW, Rosenberg GA (2011) Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders.
- De Sousa KP, Atouguia J, Silva MS (2010) Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites.
- Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME, Donelson JE (2007) A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes.



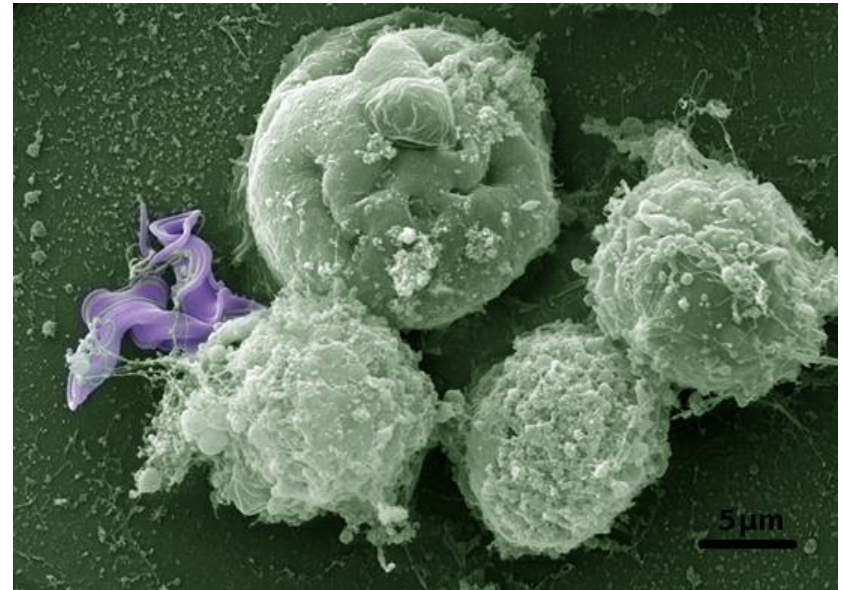
Untersuchung der Wechselwirkung von Trypanosomen und Claudin-11 (mit Claudin-11 exprimierenden SF9-Zellen)

Claudin-11
anti-Claudin-11 / Alexa Fluor 594

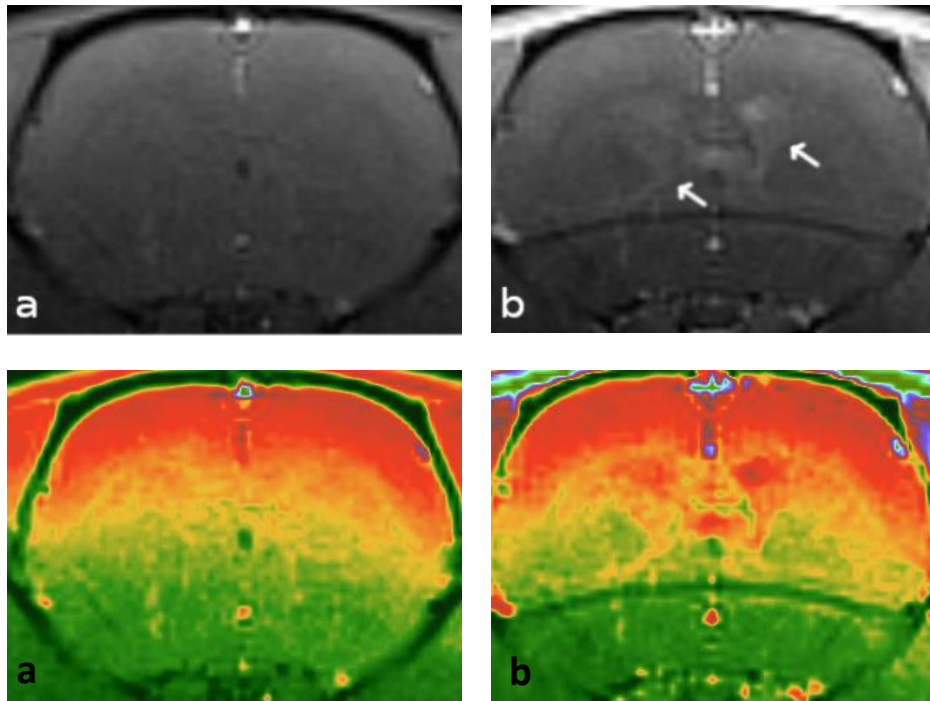
Zellkerne
Bisbenzimidid



Publiziert in **PLoS ONE** (2014)



Permeabilitätssteigerung der Blut-csf-Schranke im Rahmen einer Trypanosomiasis



Kontrastmittelsensitive Sequenz (T1w se *fatsat*)

25 Tage *post-infectionem*

a) nativ

b) Kontrastmittel (Gd-DTPA)



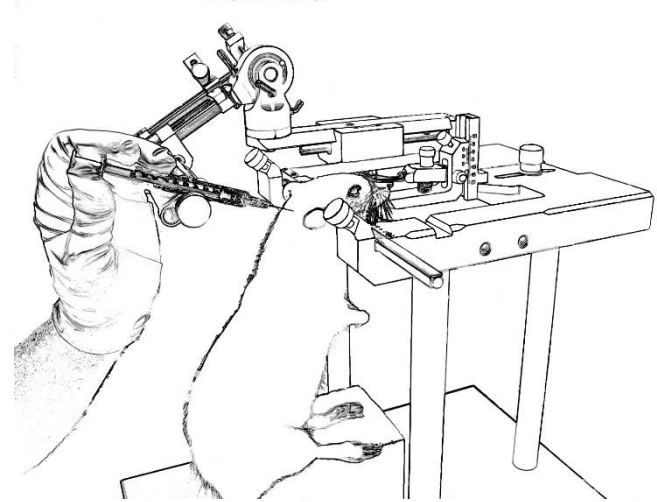
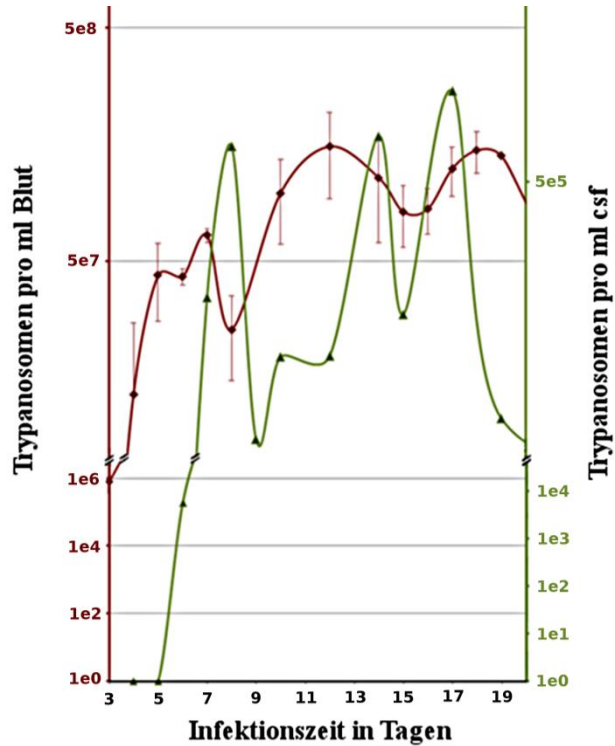
Rodgers J, McCabe C, Gettinby G, Bradley B, Condon B, et al. (2011) Magnetic resonance imaging to assess blood-brain barrier damage in murine trypanosomiasis.

Afrikanische Schlafkrankheit
Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Blut-Hirn-Schranke
Blut-csf-Schranke

Vergleich von Parasitämie und Trypanosomentiter im csf

(nach atlanto-occipitaler csf-Entnahme)



Publiziert in **PLoS ONE** (2014)

Afrikanische Schlafkrankheit
Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

Blut-Hirn-Schranke
Blut-csf-Schranke

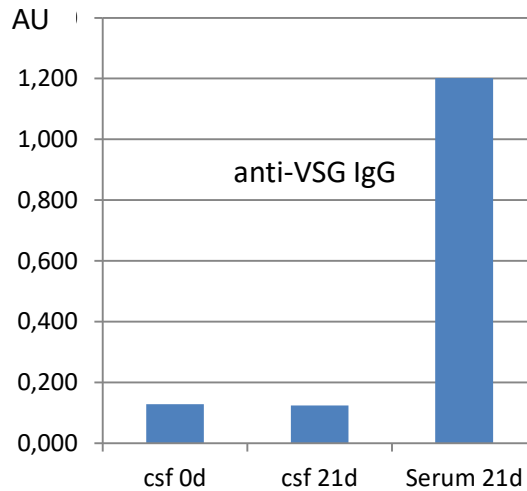
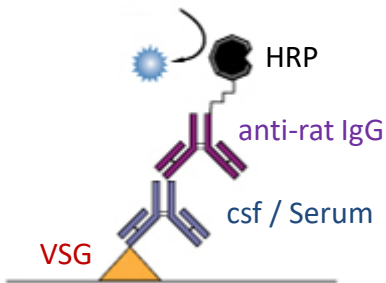
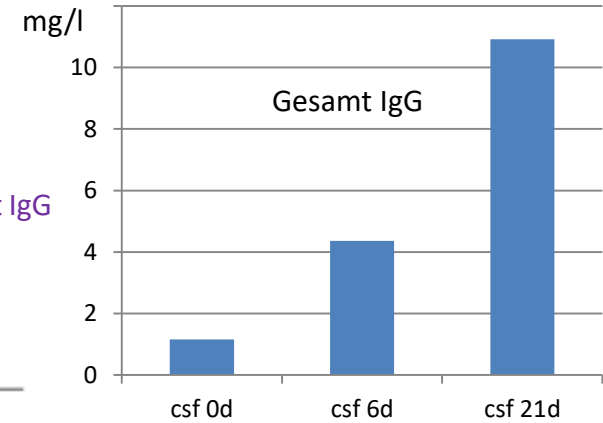
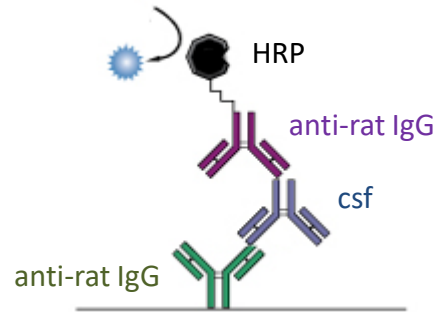
Weshalb verlaufen csf-Infektionen zyklisch?

a) *Trypanosomale Zelldichteregulation ?*

- Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC (2006) Death of a trypanosome: a selfish altruism. Trends Parasitol 22: 536-542.
- Figarella K, Rawer M, Uzcategui NL, Kubata BK, Lauber K, et al. (2005) Prostaglandin D2 induces programmed cell death in Trypanosoma brucei bloodstream form. Cell Death Differ 12: 335-346.
- Hamm B, Schindler A, Mecke D, Duszenko M (1990) Differentiation of Trypanosoma brucei bloodstream trypomastigotes from long slender to short stumpy-like forms in axenic culture. Molecular and biochemical parasitology 40: 13-22.

Weshalb verlaufen csf-Infektionen zyklisch?

- a) *Trypanosomale Zelldichteregulation ?*
- b) *Immunologische Eradikation ?*



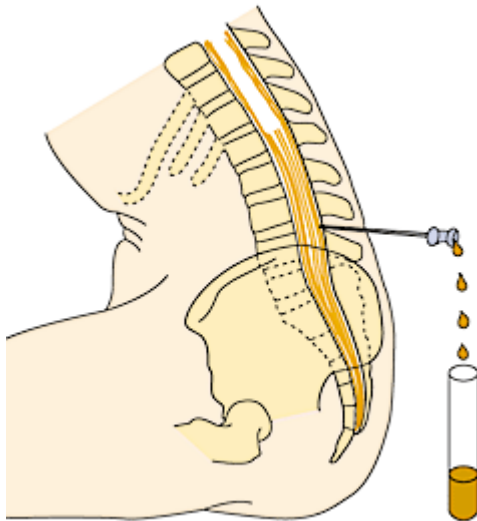
Publiziert in **PLoS ONE** (2014)

Afrikanische Schlafkrankheit
 Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
 Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

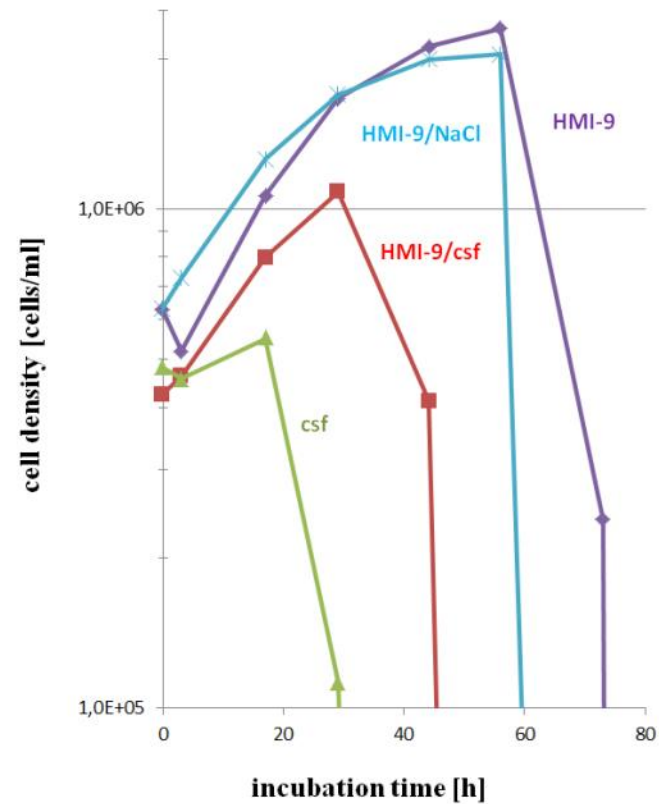
Blut-Hirn-Schranke
 Blut-csf-Schranke

Weshalb verlaufen csf-Infektionen zyklisch?

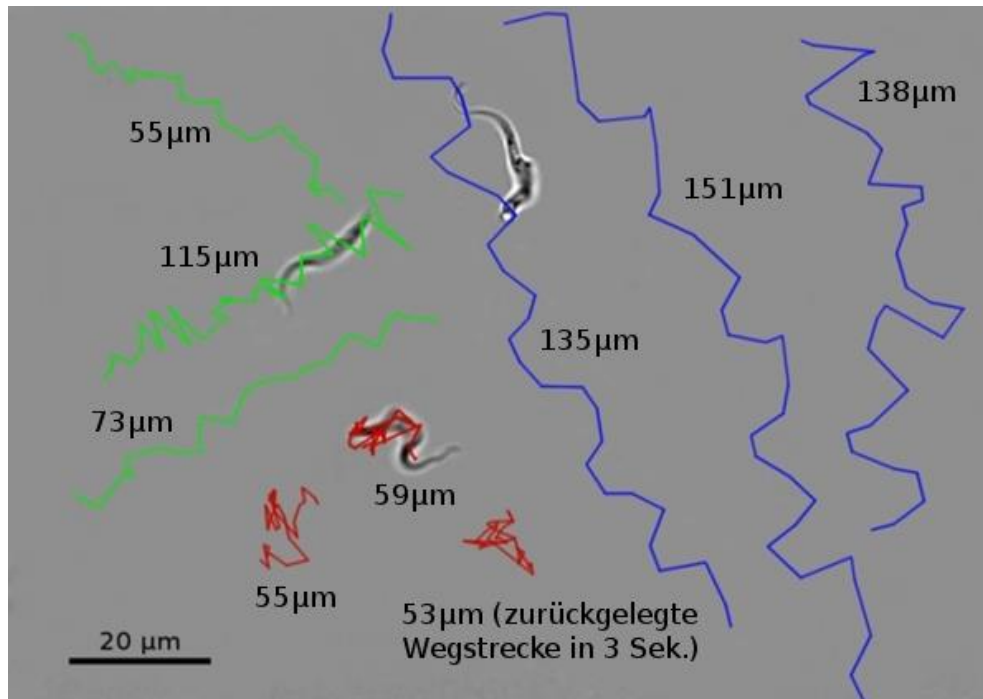
- a) *Trypanosomale Zelldichteregulation ?*
- b) *Immunologische Eradikation ?*
- c) *Nährstoffmangel oder toxische Faktoren im csf ?*



Publiziert in PLoS ONE (2012)



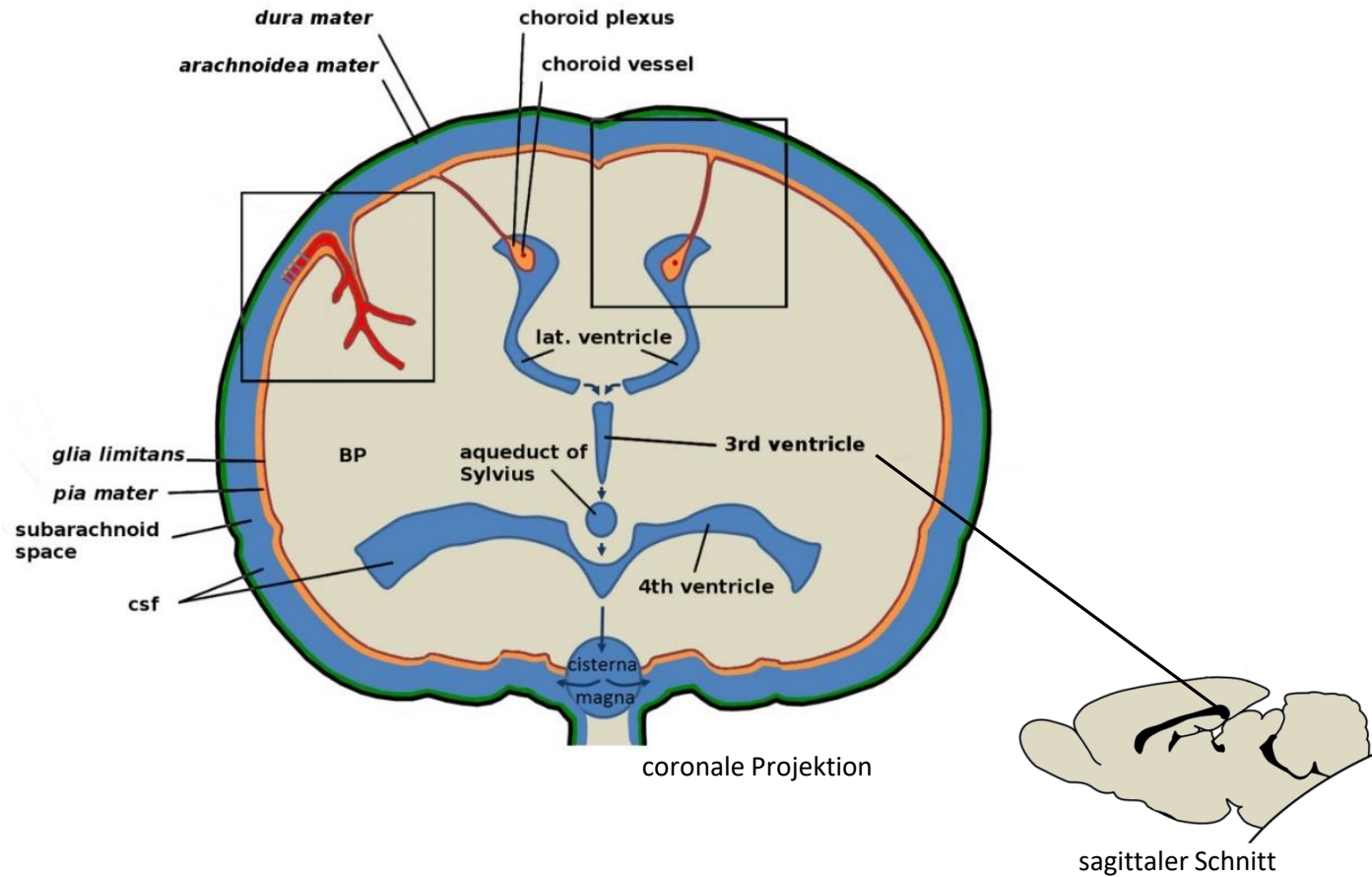
Schwimmverhalten der Trypanosomen im csf



Trypanosomen aus Kultur (Blut)
Trypanosomen aus csf
Procyclische Trypanosomen

Uppaluri S, Nagler J, Stellamanns E, Heddergott N, Herminghaus S, et al. (2011) Impact of microscopic motility on the swimming behavior of parasites: straighter trypanosomes are more directional.

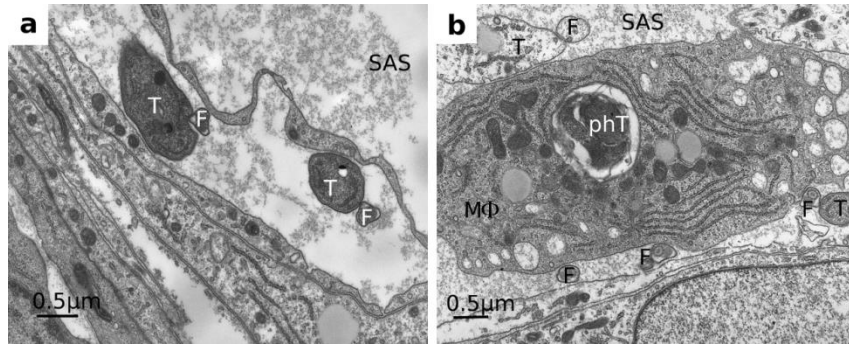
Aufklärung des Infektionsweges



Afrikanische Schlafkrankheit
Charakterisierung der Parasiten im zentralen Nervensystem
Aufklärung des Infektionsweges der Gehirninfection

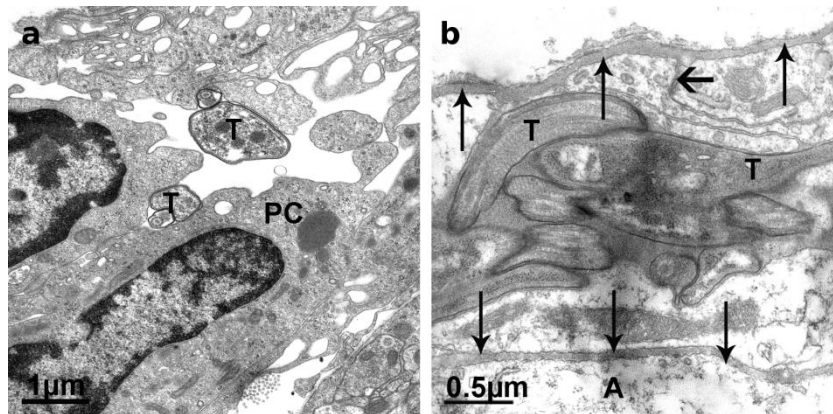
Blut-Hirn-Schranke
Blut-csf-Schranke

Aufklärung des Infektionsweges



Trypanosomen im Subarachnoidalraum

F=Flagellum,
MΦ=Makrophage,
phT=phagozytiertes Trypanosom,
SAS=Subarachnoidalraum,
T=Trypanosom.



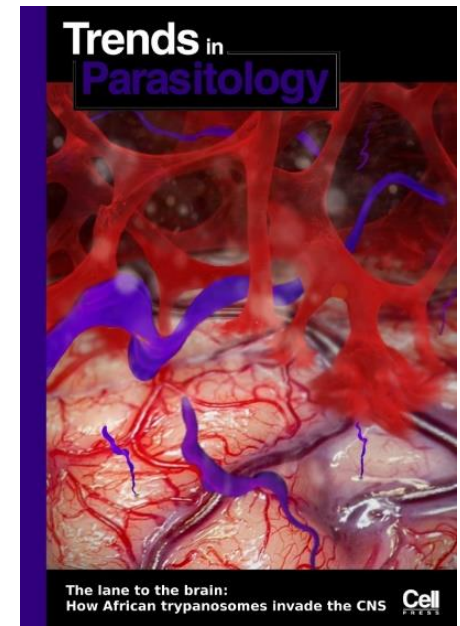
Trypanosomen in der *Pia mater*

A=Astrozyt,
PC=Piazelle,
T=Trypanosom,
obere vertikale Pfeile=Mesothel,
untere vertikale Pfeile=*Glia limitans*.

Publiziert in **PLoS ONE** (2014)

Zusammenfassung

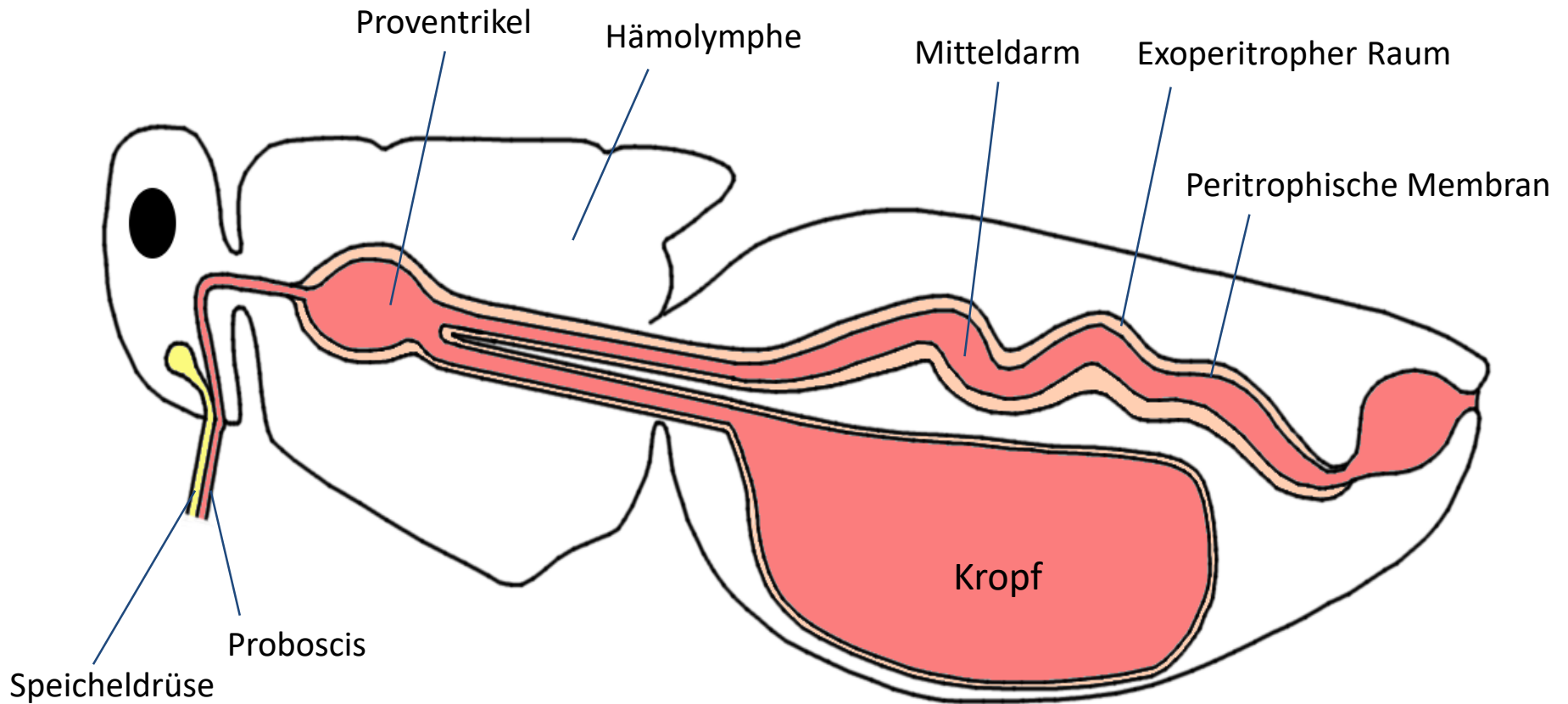
- Die Parasiten überqueren die Blut-csf-Schranke, nicht jedoch die Blut-Hirn-Schranke.
- Eine csf-Infektion tritt bereits rund sechs Tage *post infectionem* auf.
- Die csf-Infektion verläuft zyklisch.
- Trypanosomen besiedeln die *Pia mater*, ohne über die *Glia limitans superficialis* in das Gehirnparenchym überzutreten.



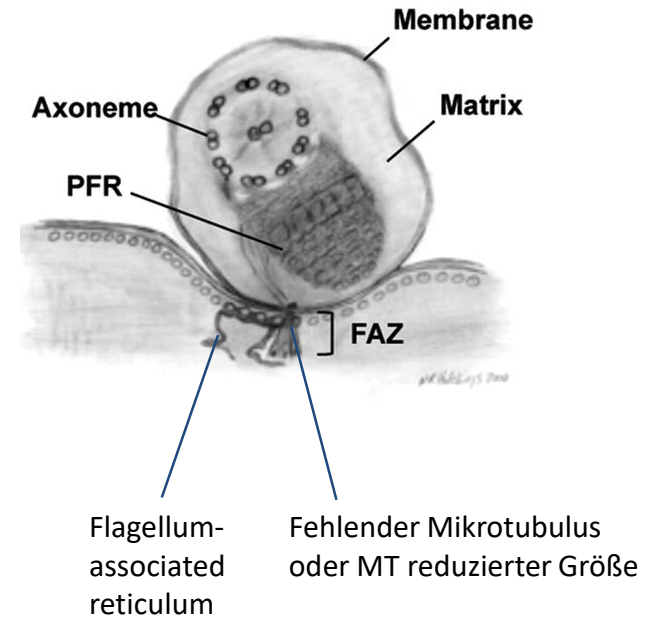
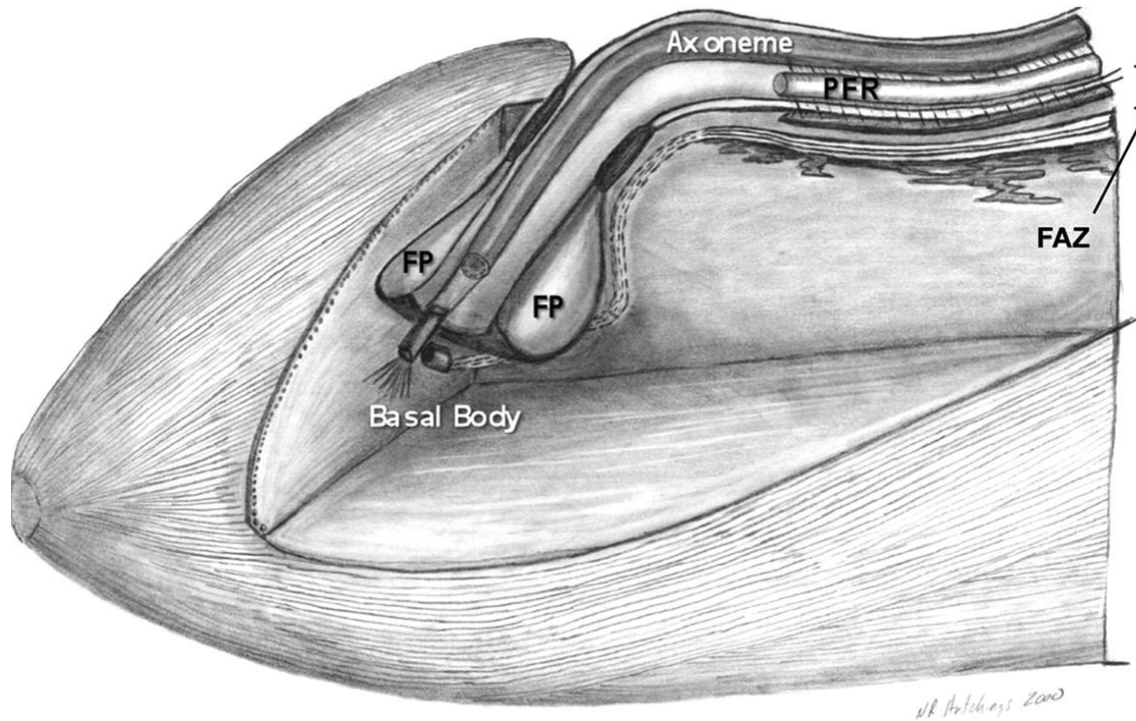
Opinion in **Trends in Parasitology** (2014)

T.brucei brucei invadiert in WISTAR-Ratten nicht in das Gehirnparenchym → Neue Möglichkeiten der Medikation ?

Verdauungstrakt von *Glossina spec.*

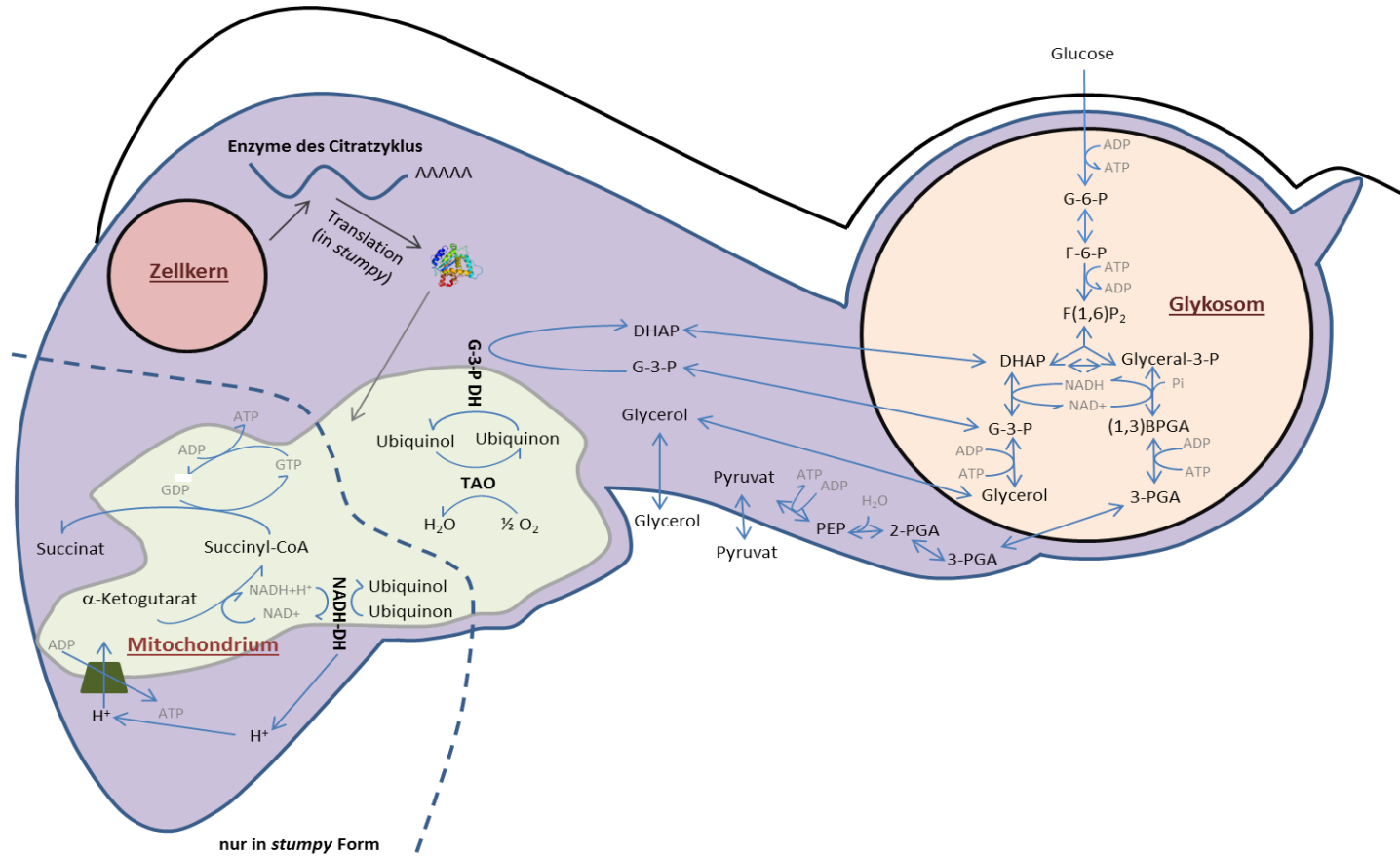


Aufbau der Geißel in *Trypanosoma brucei*

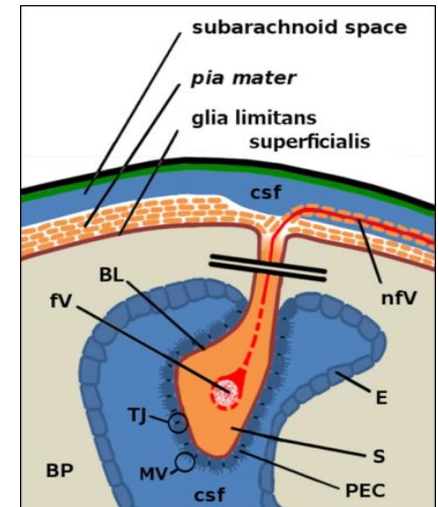
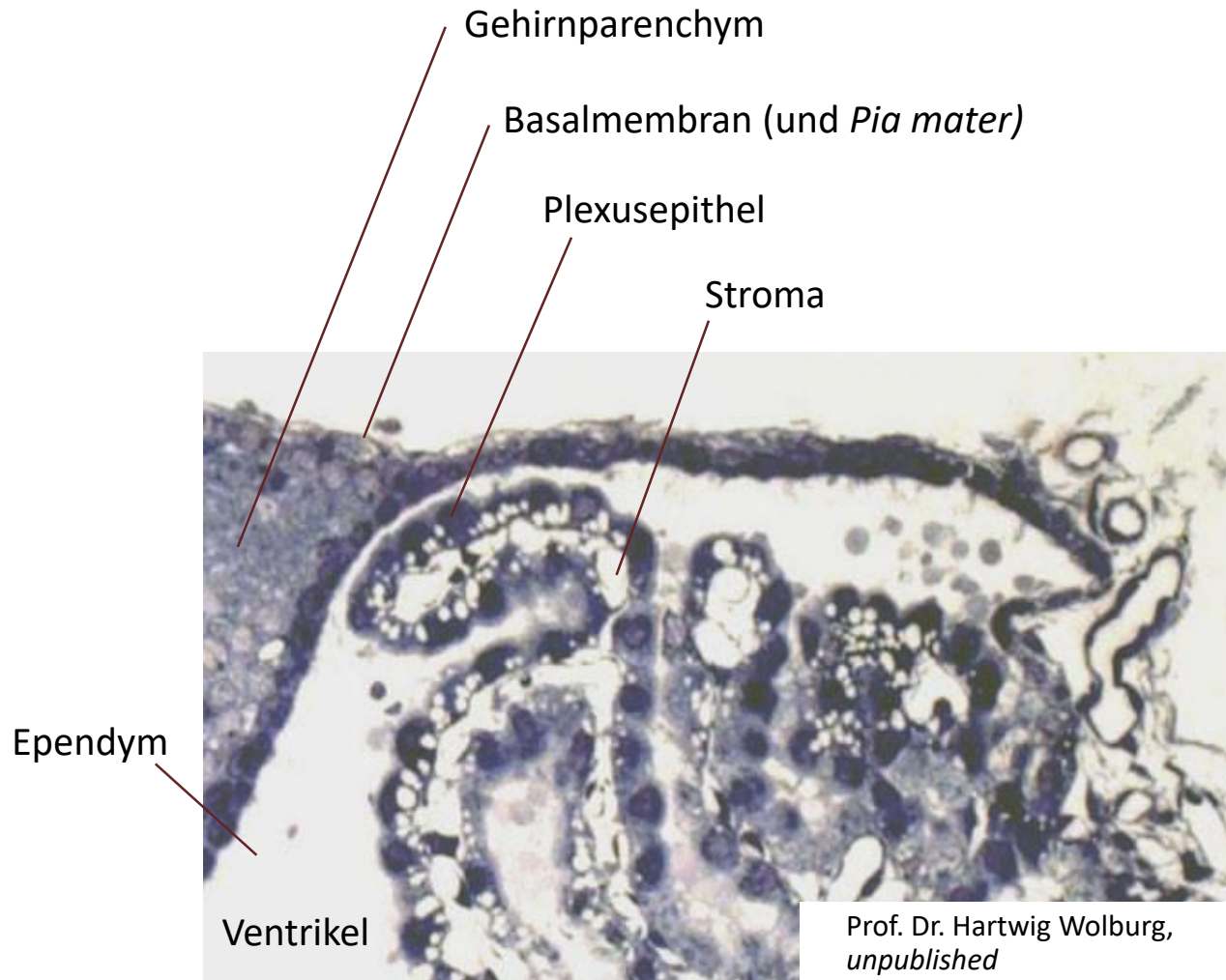


Independent Analysis of the Flagellum Surface and Matrix Proteomes Provides Insight into Flagellum Signaling in Mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*, **Molecular & Cellular Proteomics**, October 2011, vol. 10, no. 10

Energiestoffwechsel von *Trypanosoma brucei*

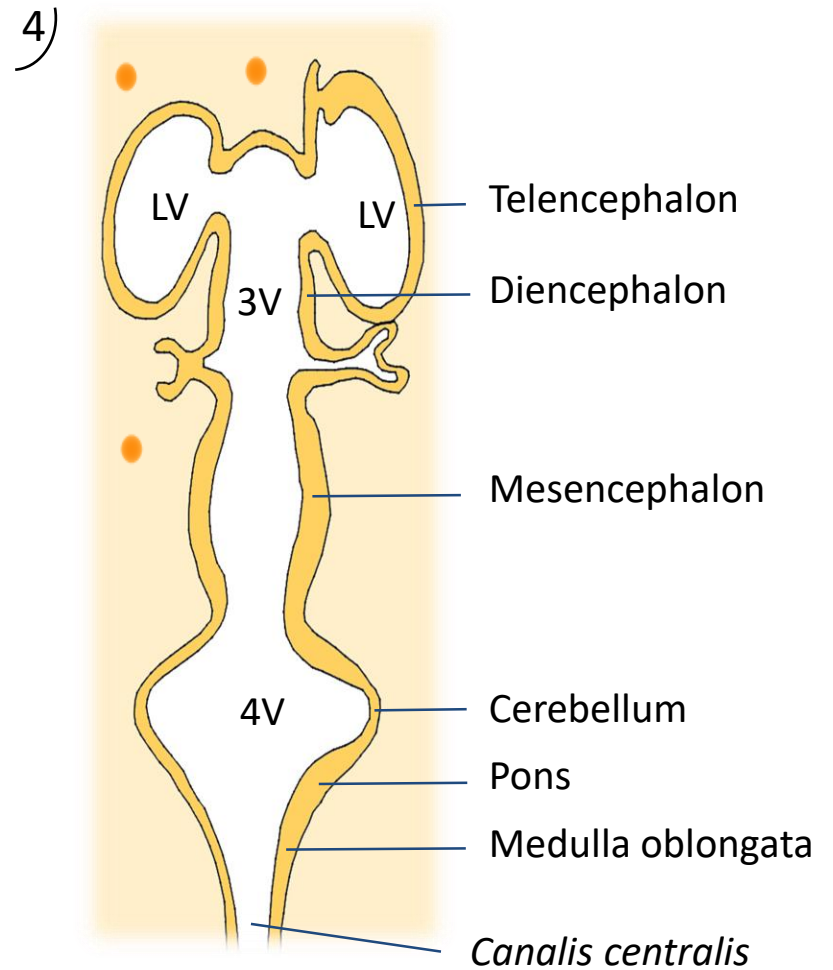
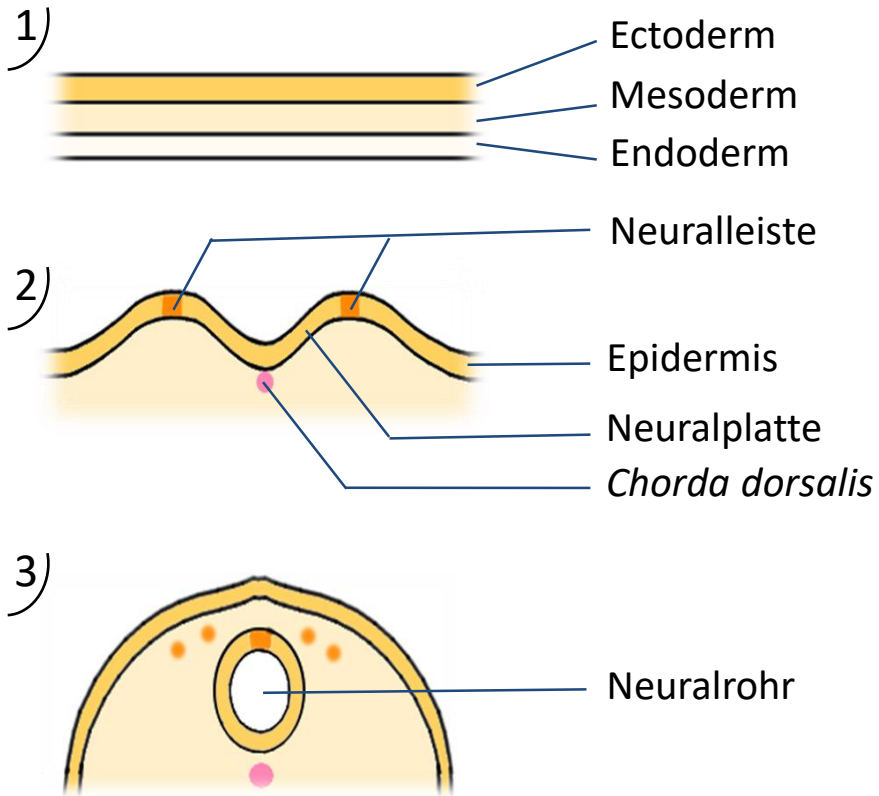


Kontinuität zwischen *Pia mater* und Stroma



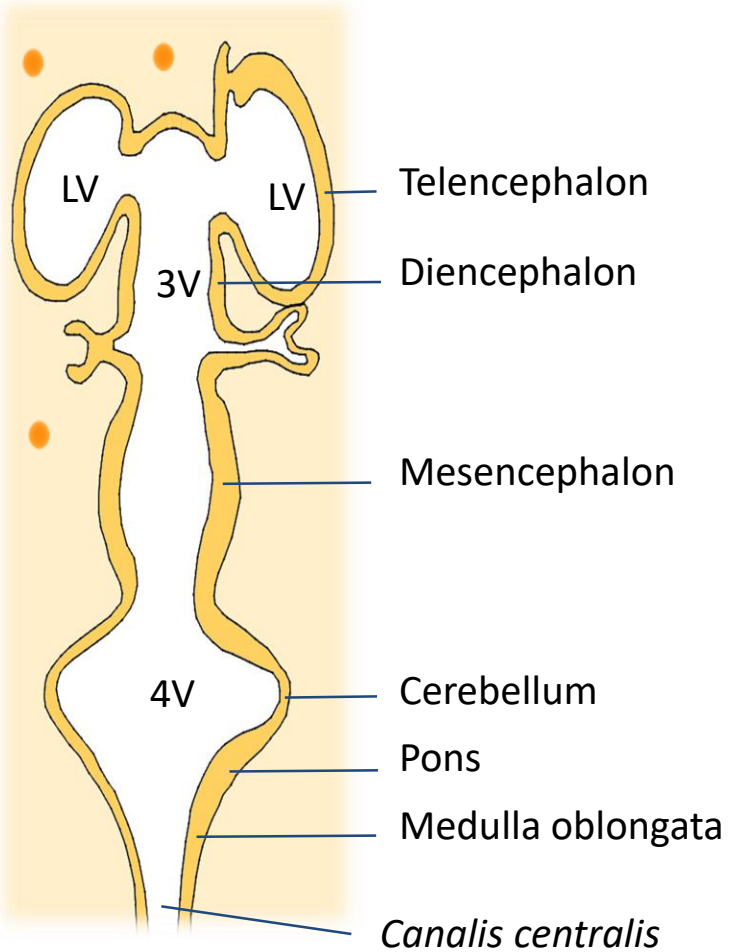
BL=Basallamina
 BP=Gehirnparenchym
 E=Ependym
 fv=fenestriertes Gefäß
 MV=Mikrovilli
 nfV=nicht-fenestriertes Gefäß
 PEC=Plexusepithelzelle
 S=Stroma
 TJ=tight junction.

Entstehung des *Plexus choroideus* während der Embryogenese

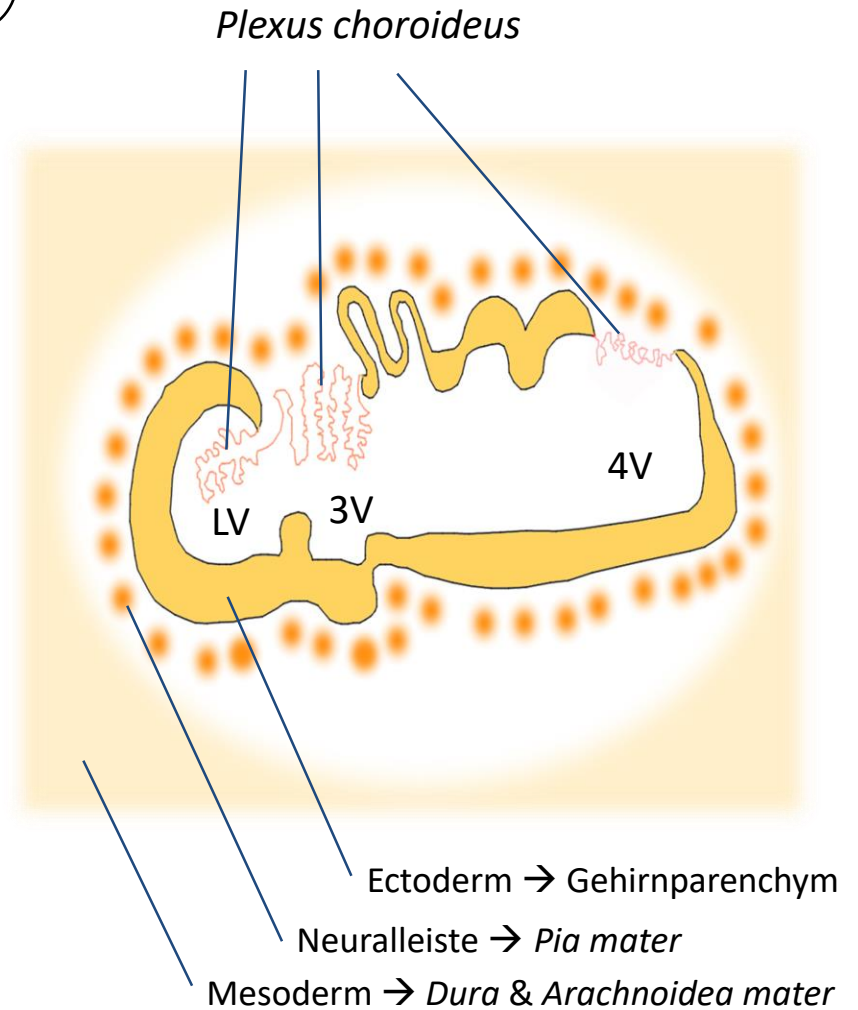


Entstehung des *Plexus choroideus* während der Embryogenese

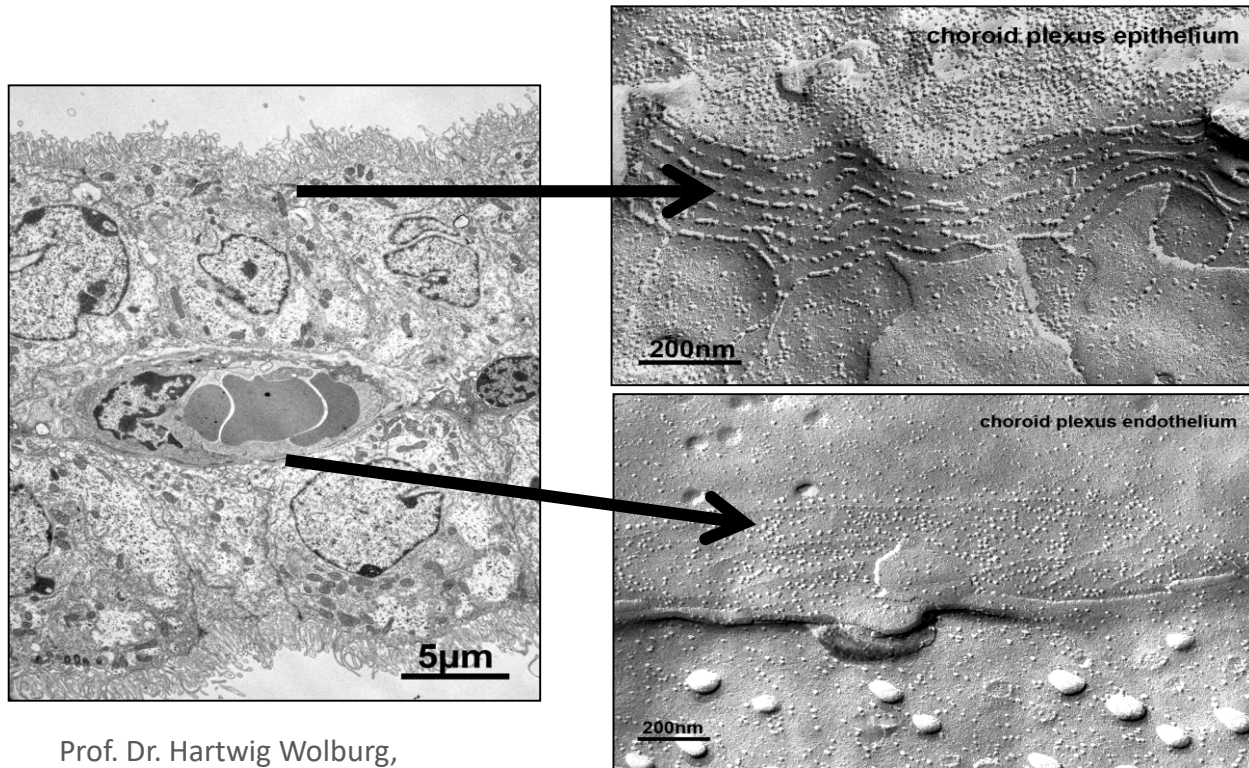
4)



5)

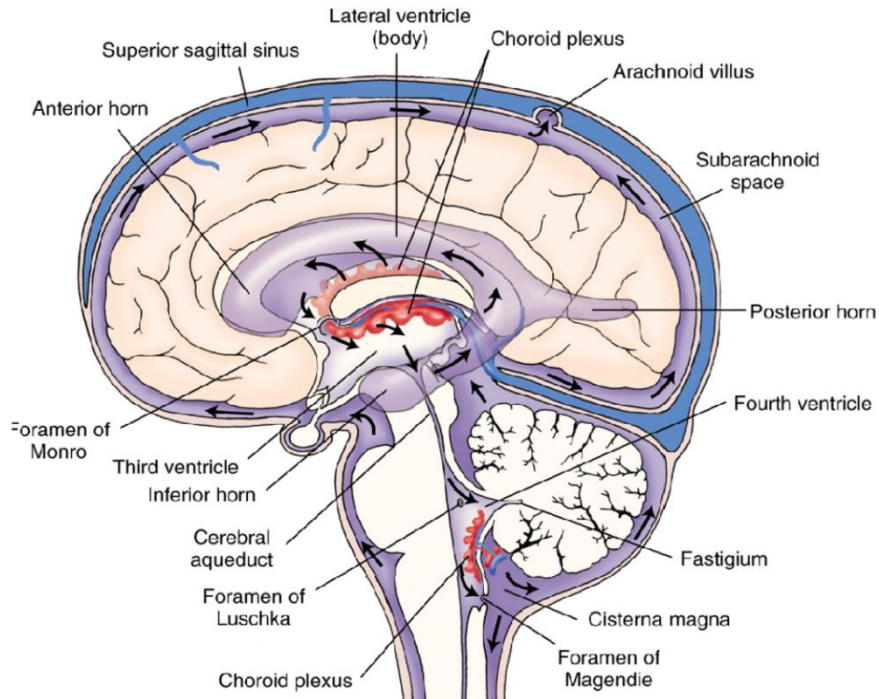


Tight junctions in Plexusendothel und -epithel



Prof. Dr. Hartwig Wolburg,
unpublished

Ventrikelräume und Liquorfluss



Lateralventrikel



Foramen von Monro



3. Ventrikel



Sylvius-Aquädukt



4. Ventrikel



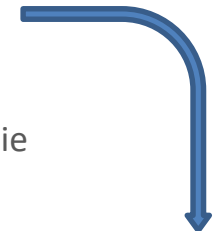
Foramen von Magendie



Cisterna magna



Subarachnoidalraum

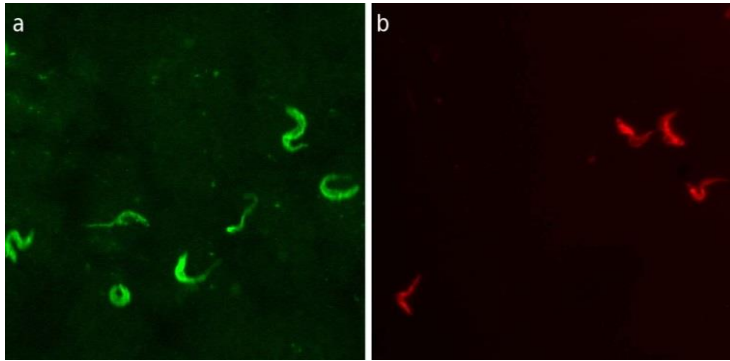


Foramen von Luschka

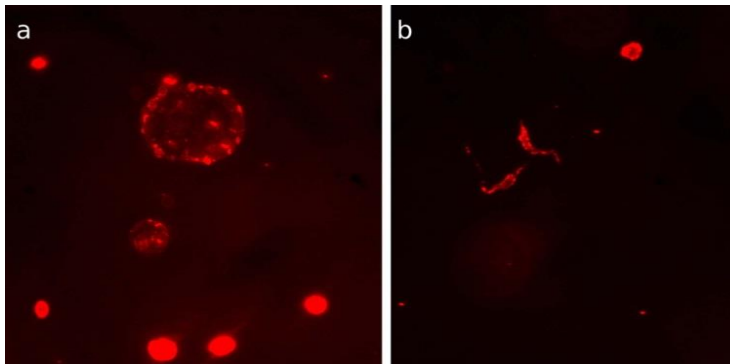


Siegel A, Sapru H. Essential Neuroscience. Lippincott Williams and Wilkins, 2011.

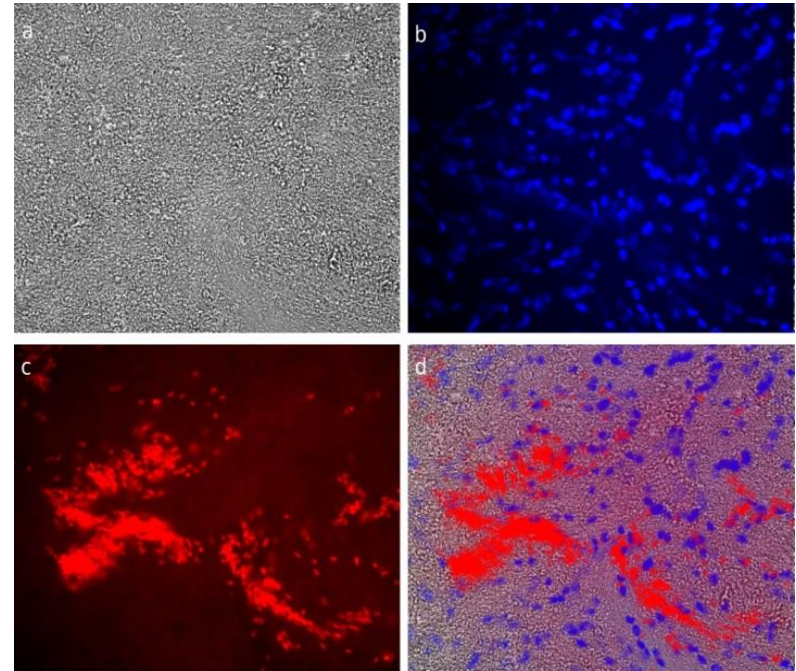
Fluoreszenzmikroskopische Nachweisverfahren



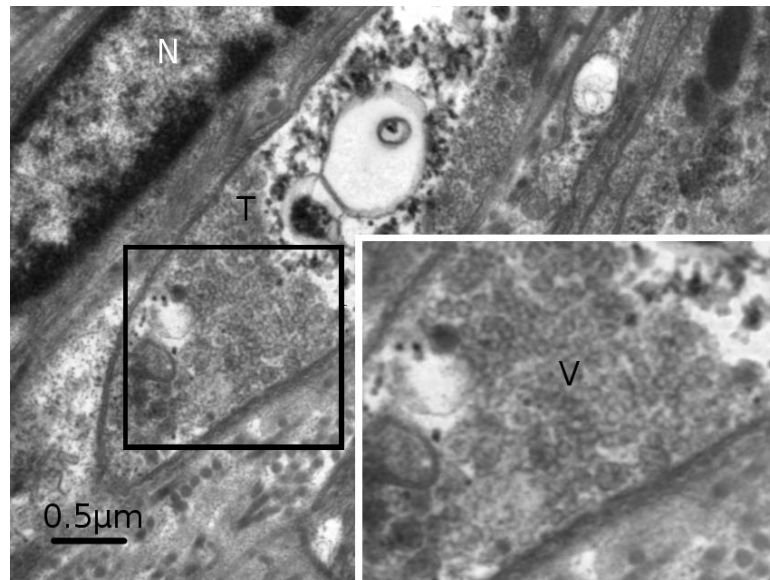
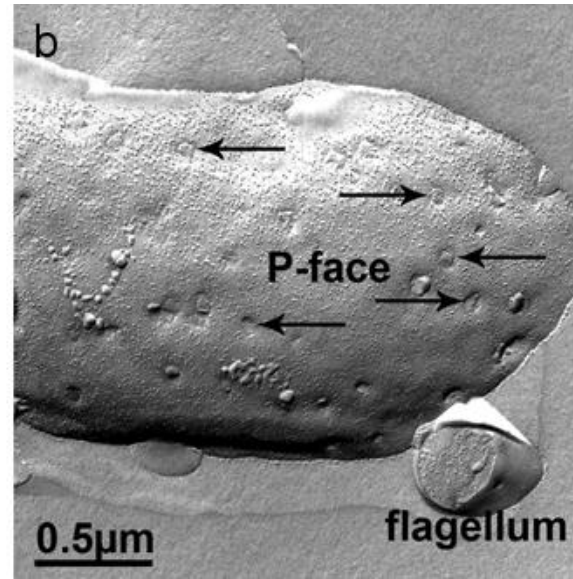
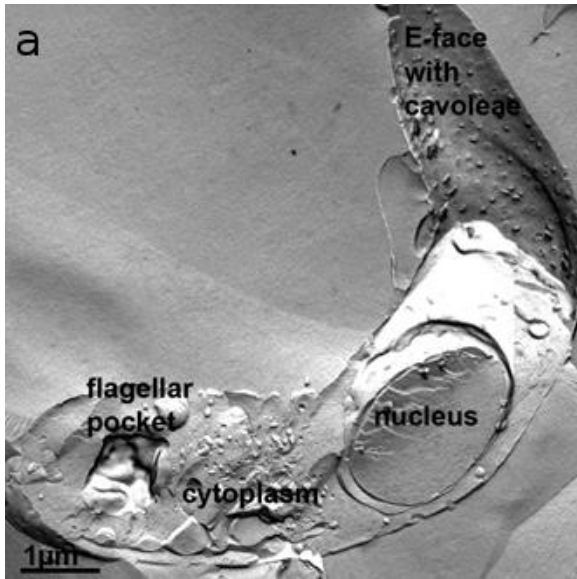
a) Monomorphe Trypanosomen (MiTat 1.1, Antigentyp 221) mit *rabbit anti-221* und *goat anti-rabbit-FITC*. b) *mCherry* exprimierende pleomorphe Trypanosomen (AnTat1.2)



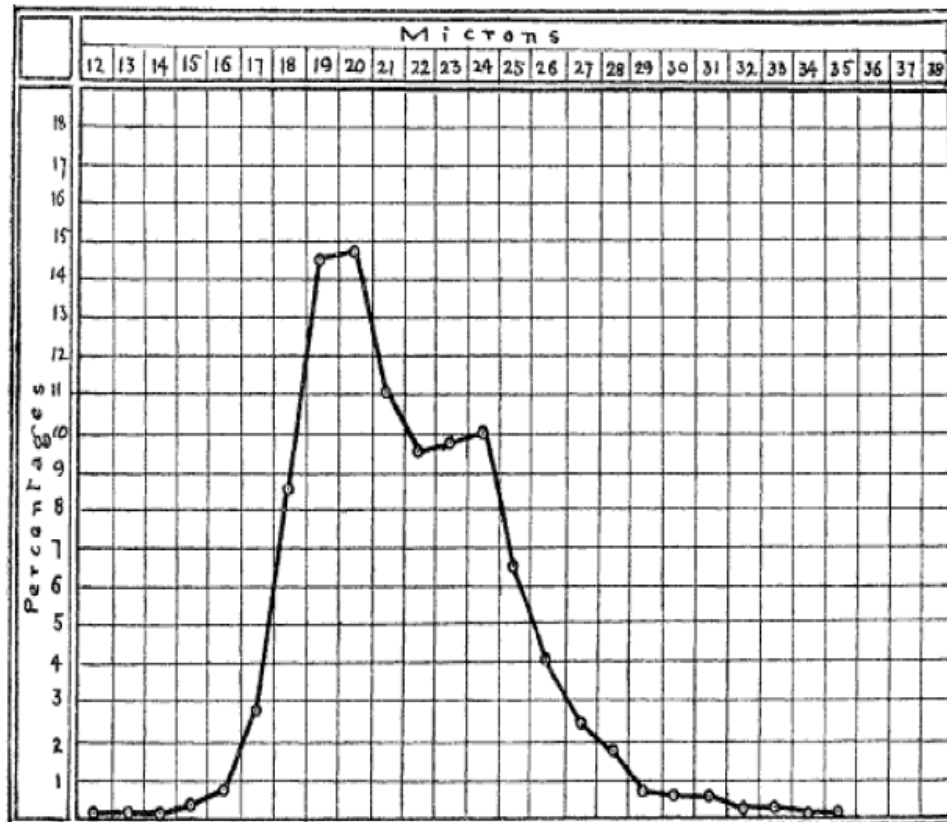
Fluoreszenzmikroskopie mit *quantum dots* (QDot® 605) beladener Zellen. a) Fibroblasten aus *Microtus montanus*. b) prozyklische Trypanosomen (MiTat 1.2)



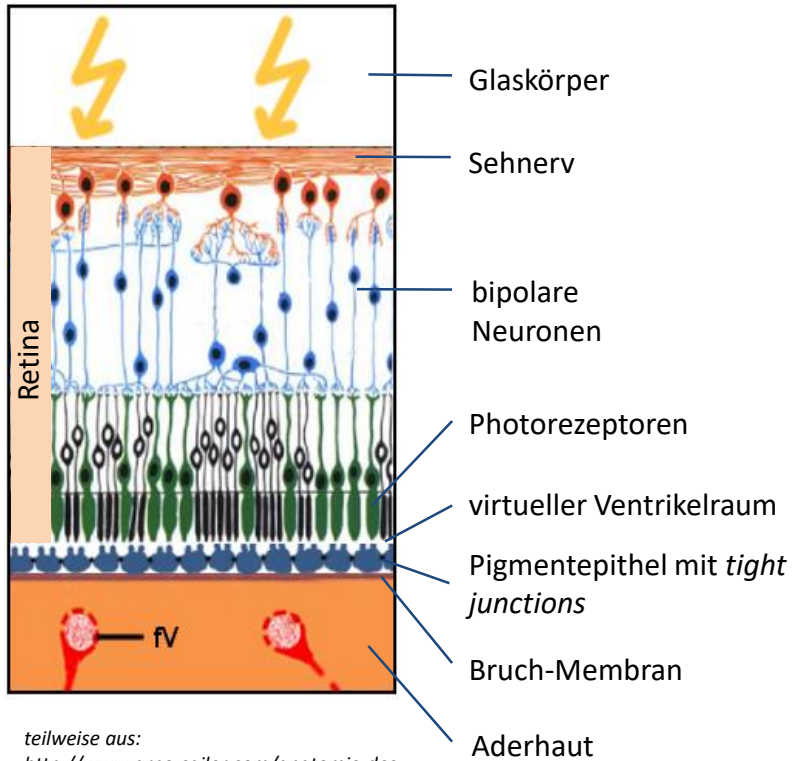
Nachweis ins Striatum injizierter Trypanosomen mittels Immunfluoreszenz. a) *brightfield*, b) Bisbenzimid-Färbung, c) *rabbit anti-trypanosomale Prostaglandin-F-Synthase* und *anti-rabbit Alexa Fluor 594*, d) *overlay*



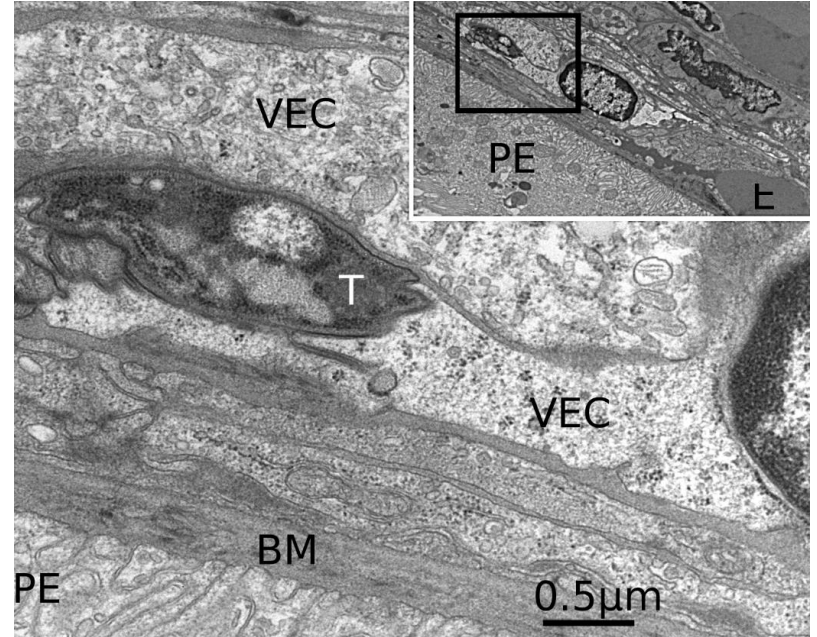
Bruce D, Harvey D, Hamerton AE, Davey JB, Bruce L (1912) The Morphology of the Trypanosome Causing Disease in Man in Nyasaland. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, Containing Papers of a Biological Character 85: 423-433.



Blut-Retina-Schranke

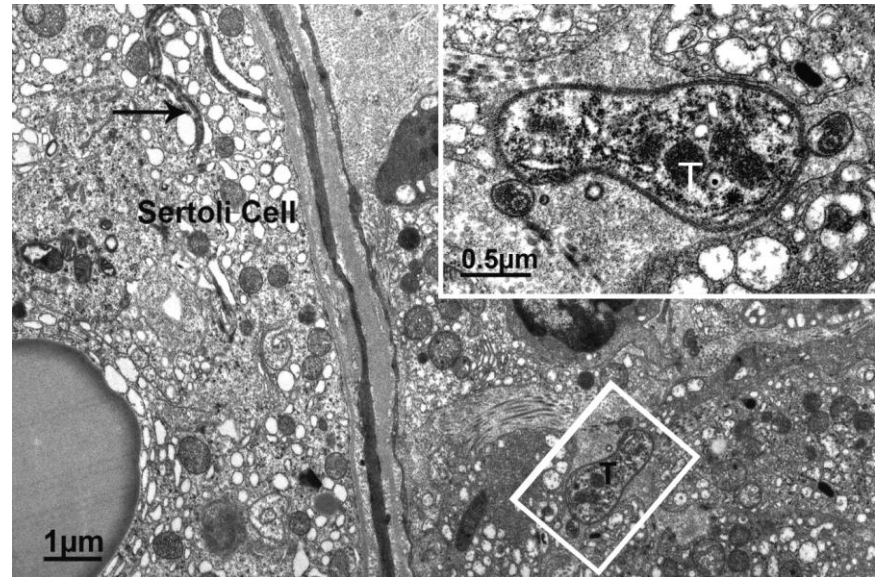
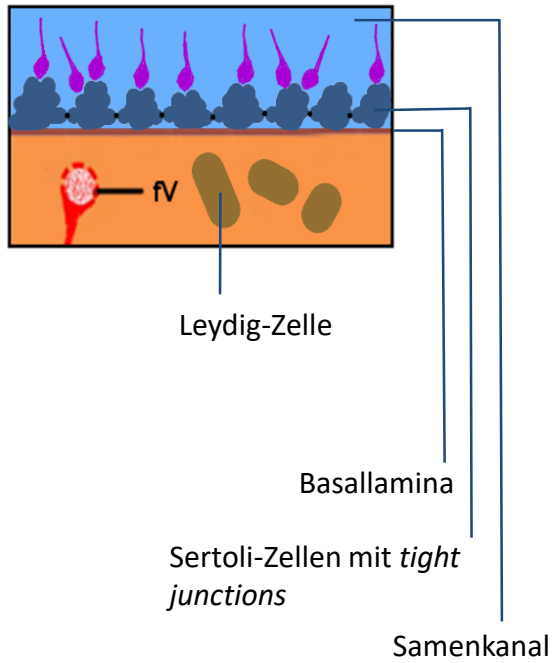


teilweise aus:
<http://www.arno-sailer.com/anatomie-des-auges/>



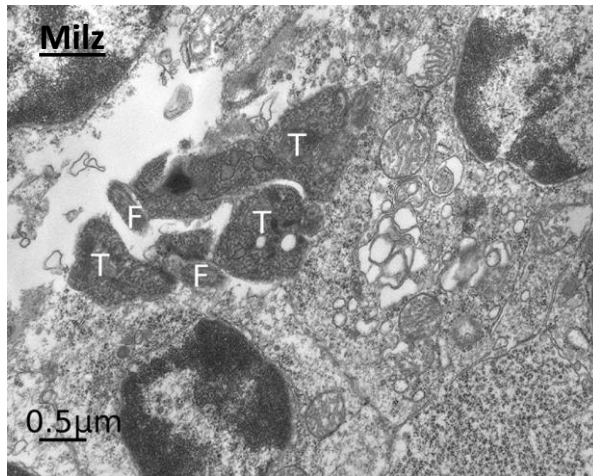
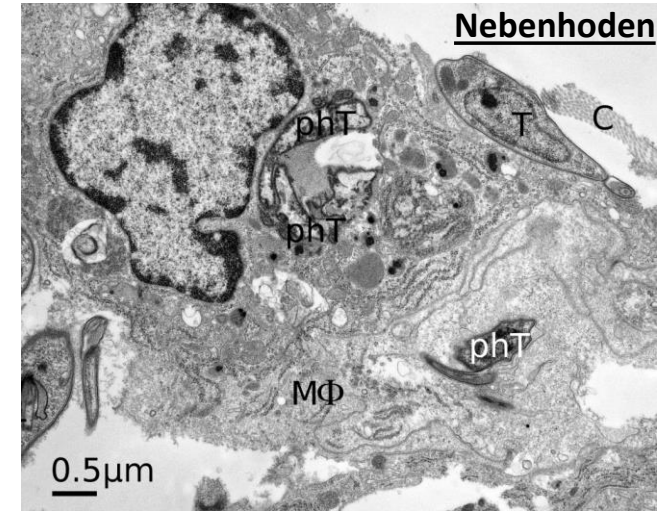
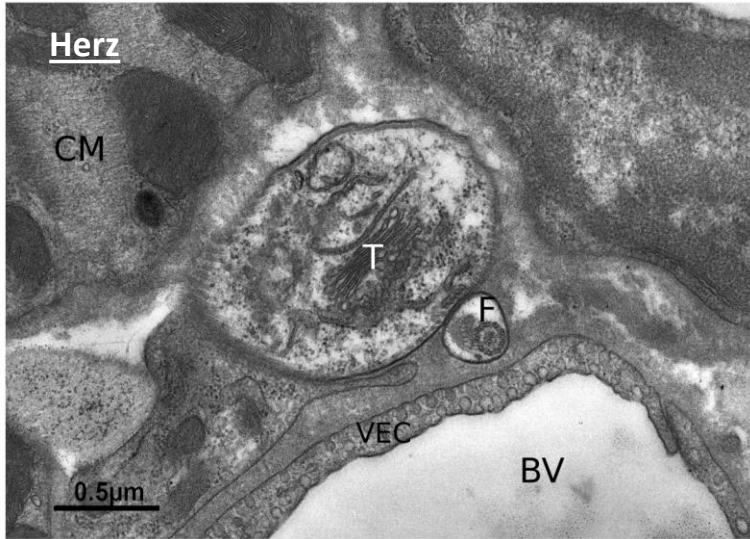
BM=Bruch-Membran,
 E=Erythrozyt,
 PE=Photorezeptorepithel,
 T=Trypanosom,
 VEC=Gefäßendothelzelle.

Blut-Hoden-Schranke



T=Trypanosom,
Pfeil=*tight junction*

Blut-Organ-Schranken

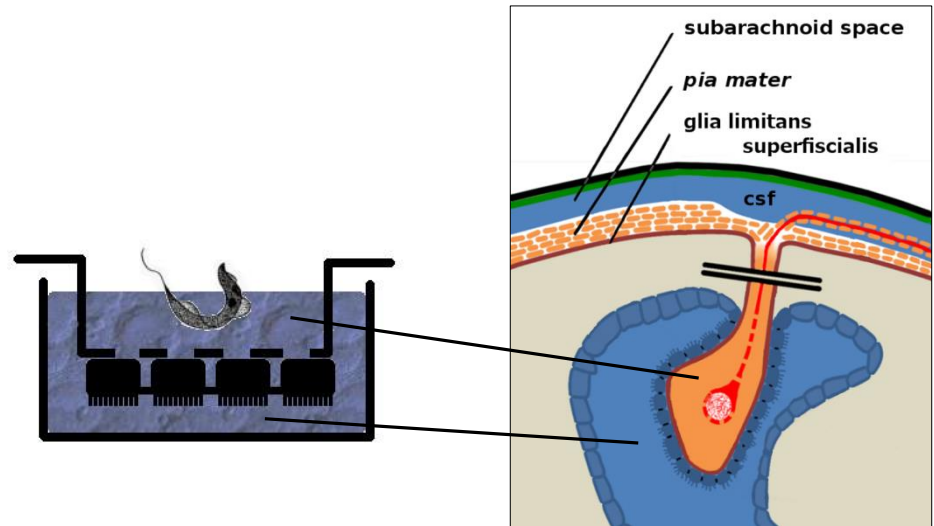


BV=Blutgefäß,
 C=Kollagen,
 CM=Kardiomyozyt,
 F=Flagellum,
 MΦ=Makrophage,
 (ph)T=(phagozyt.) Trypanosom,
 VEC=Gefäßendothelzelle

Artifizielle Blut-csf-Schranke

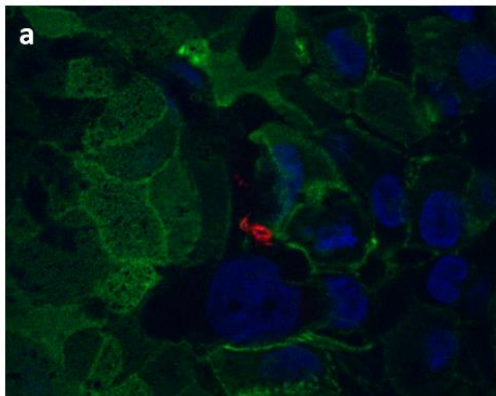
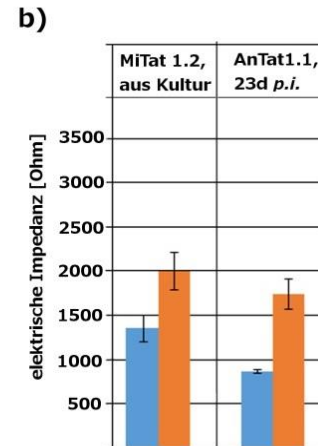
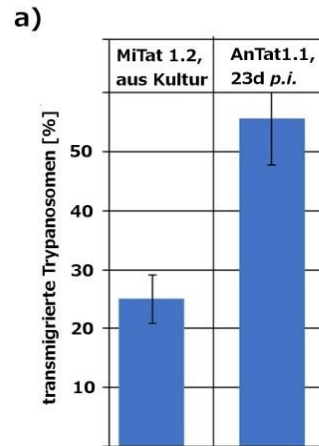
Humane Plexusepithel- (papilloma-) zellen

Primäre porcine Plexusepithelzellen



- Schwerk C, Papandreou T, Schuhmann D, Nickol L, Borkowski J, et al. (2012) Polar Invasion and Translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a Novel Human Model of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier.
- Wewer C, Seibt A, Wolburg H, Greune L, Schmidt MA, et al. (2011) Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*.

Artifizielle Blut-csf-Schranke



Trypanosomen
anti-VSG 221 / Alexa Fluor 594

Aktin
Phalloidin-Alexa Fluor 488

Zellkerne
Bisbenzimid

