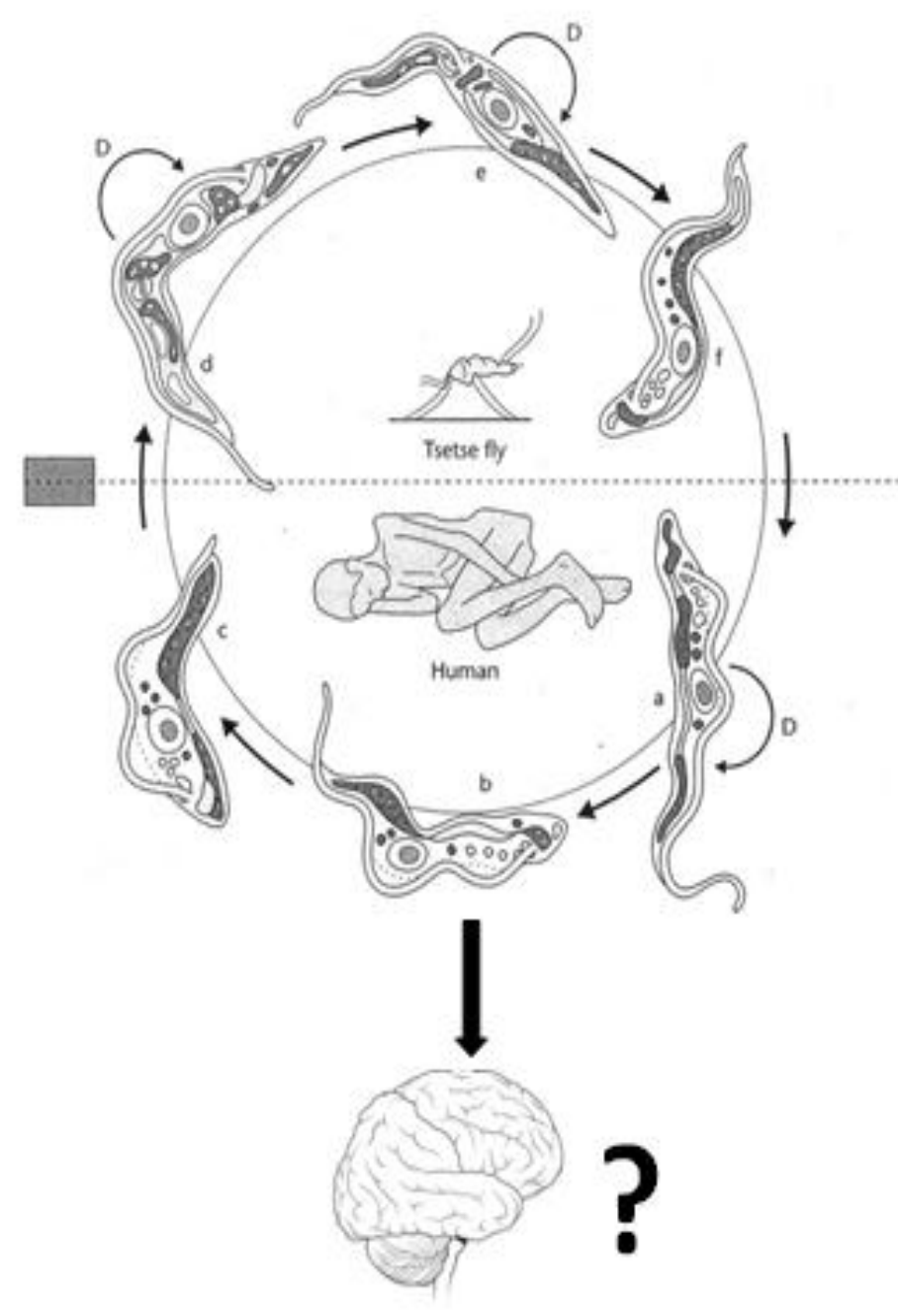


„Herstellung von rot fluoreszierenden, konstitutiv monomeres Cherry Protein exprimierenden Trypanosomen zur morphologischen Charakterisierung von Trypanosomen brucei im Gewebe des Zentralen Nervensystems“



Sven Acker, Stefan Mogk, Björn Bassarak, Hartwig Wolburg, Michael Duszenko
 Interfakultäres Institut für Biochemie
 Universität Tübingen

Einleitung:

- Trypanosoma brucei ist ein einzelliger eukaryotischer Parasit, der einen komplexen Lebenszyklus vollzieht und beim Menschen die Schlafkrankheit verursacht.
- Die Krankheit gliedert sich in ein primäres und sekundäres Stadium. Das zweite Krankheitsstadium ist weitgehend unerforscht, so dass bislang nicht geklärt ist, wie Trypanosomen in das ZNS eindringen, in welchem Stadium des Lebenszyklus sie sich befinden und ob sie morphologische oder biochemische Besonderheiten besitzen, die einen therapeutischen Zugang ermöglichen würden.
- Ziel der Arbeit war es, mCherry Protein exprimierende Trypanosomen (Stamm: Antat 1.1.) herzustellen, um diese im Gewebe des ZNS zu lokalisieren. Des Weiteren ist es Ziel, diese Trypanosomen durch Elektronenmikroskopie und Rekultivierungsexperimente morphologisch zu beschreiben.

Material und Methoden:

Klonierung und Expression von mCherry Protein

Das mCherry Gen wurde durch PCR amplifiziert und mittels *Topo TA cloning* in Top 10 Zellen subkloniert. Das rekombinante Plasmid wurde isoliert, amplifiziert und mittels BamHI und HindIII geschnitten. Anschließend wurde das mCherry Gen in den Expressionsvektor pHD309-HYG in Top 10 Zellen kloniert.

Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation und anschließender homologer Rekombination. Rekombinante Trypanosomen wurden auf semi-soliden Platten kultiviert und mittels Hygromycin B selektioniert. Die Expression des Proteins wurde durch Fluoreszenzmikroskopie und Western blotting kontrolliert. Zum Western blotting wurden 10^7 Trypanosomen und ein polyklonaler DsRed Antikörpers, Verdünnung 1:1000, verwendet.

Gehirnschnitte

Gehirne von Mäusen, 22-35 Tage p.l., wurden mit 30ml CGA perfundiert und mit 30ml 2% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden 10µm dicke Gefrierschnitte des Gehirns angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Gehirnbereichen, zwischen dem 22-35 Tag p.l., wurden in Kooperation mit Dr. Wolburg aus dem Institut der Allgemeinen Pathologie des Universitätsklinikum Tübingen angefertigt.

Rekultivierung aus Gehirngewebe

Gehirne von Mäusen, 34-35 Tage p.l., wurden mit 30ml CGA perfundiert und anschließend in vier Stücke geteilt. Jedes Stück Gehirn wurde in 25ml HMI9 Medium für 24h rekultiviert. Die Kulturen wurden zentrifugiert und anschließend mit Bisbenzimid gefärbt.

Ergebnisse:

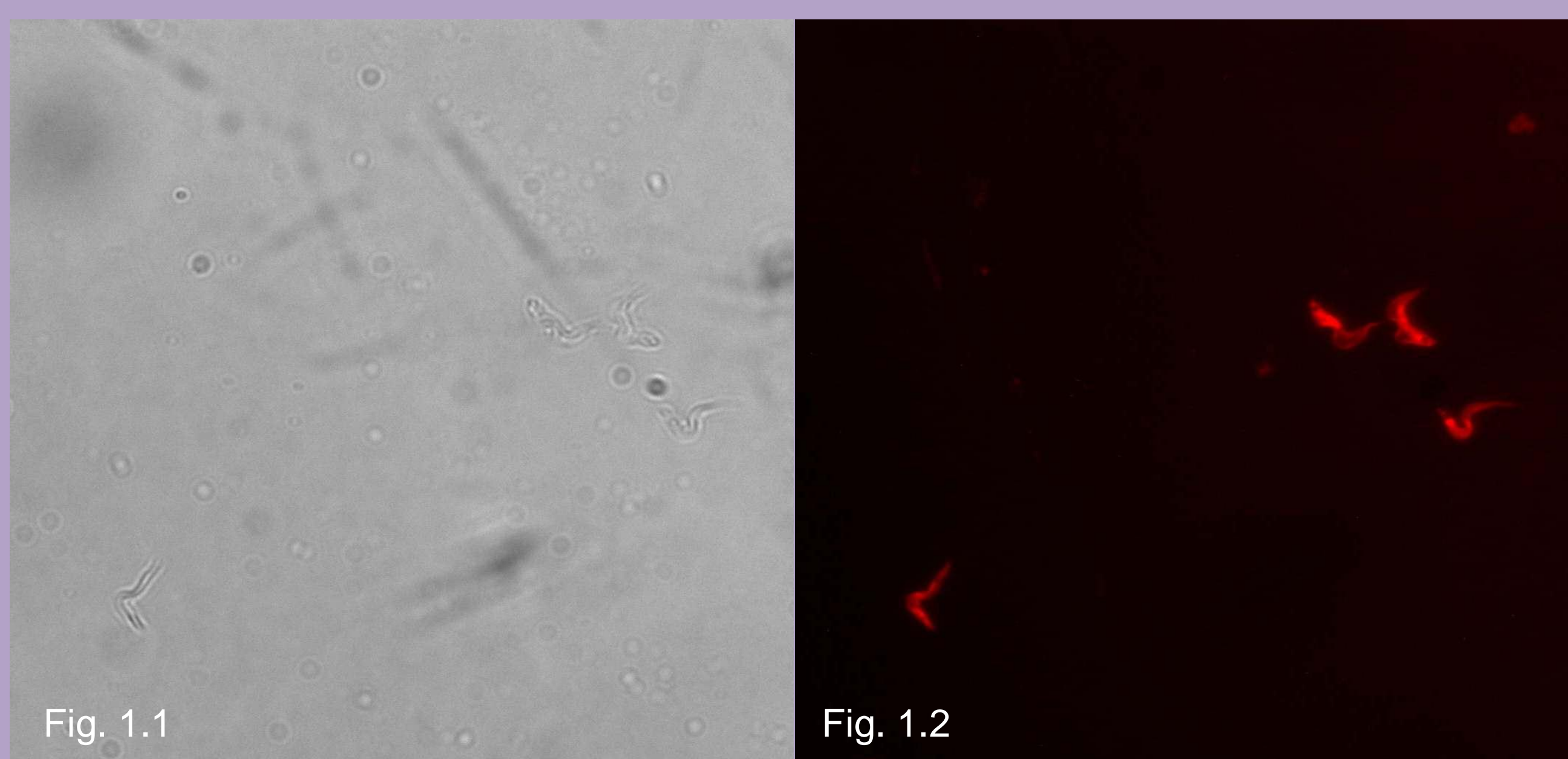


Fig.1: Lichtmikroskopische (Fig. 1.1) und fluoreszenzmikroskopische (Fig. 1.2) Aufnahme von Antat 1.1. mCherry Protein exprimierend.

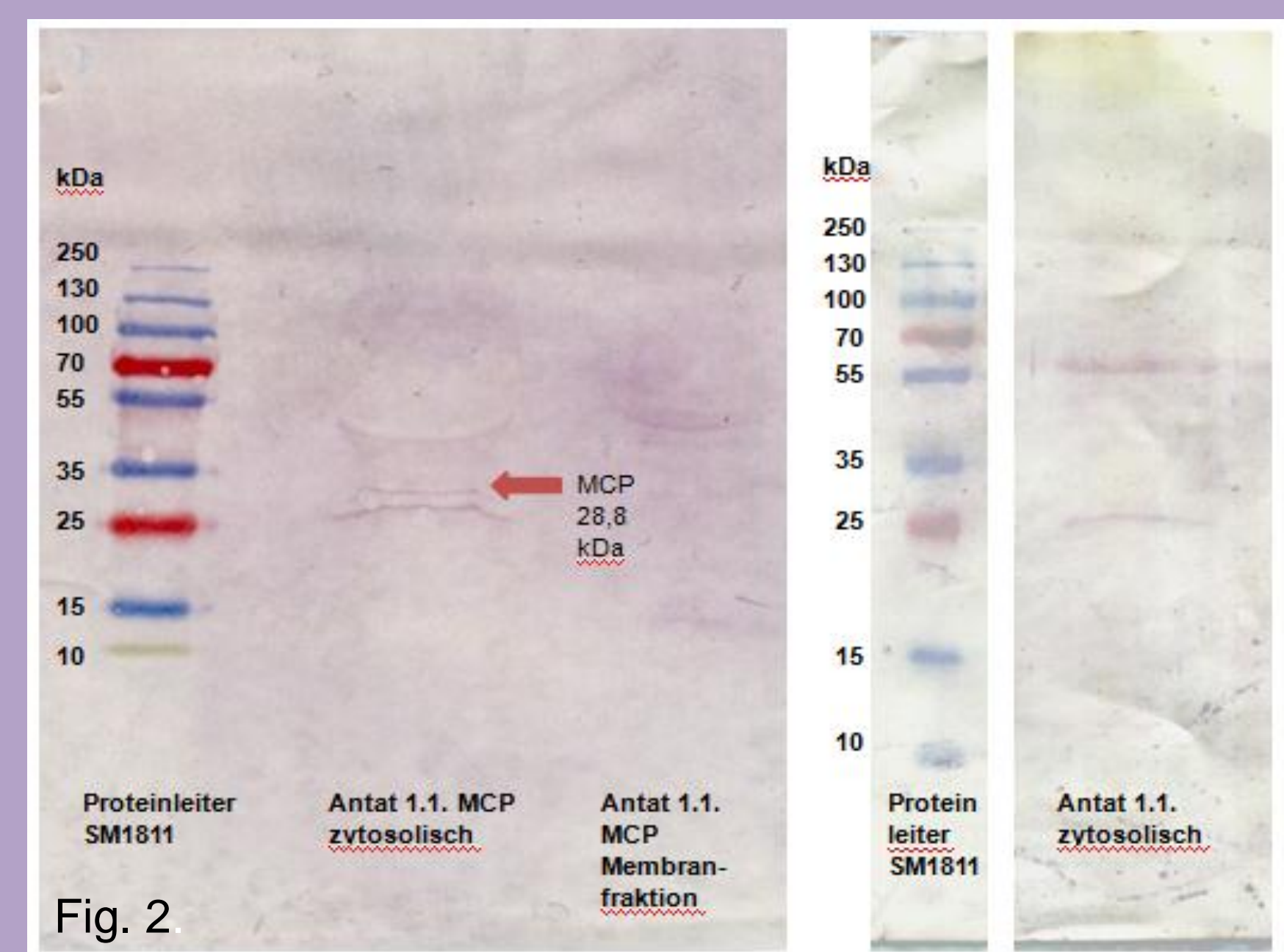


Fig. 2: Western Blot mCherry Protein

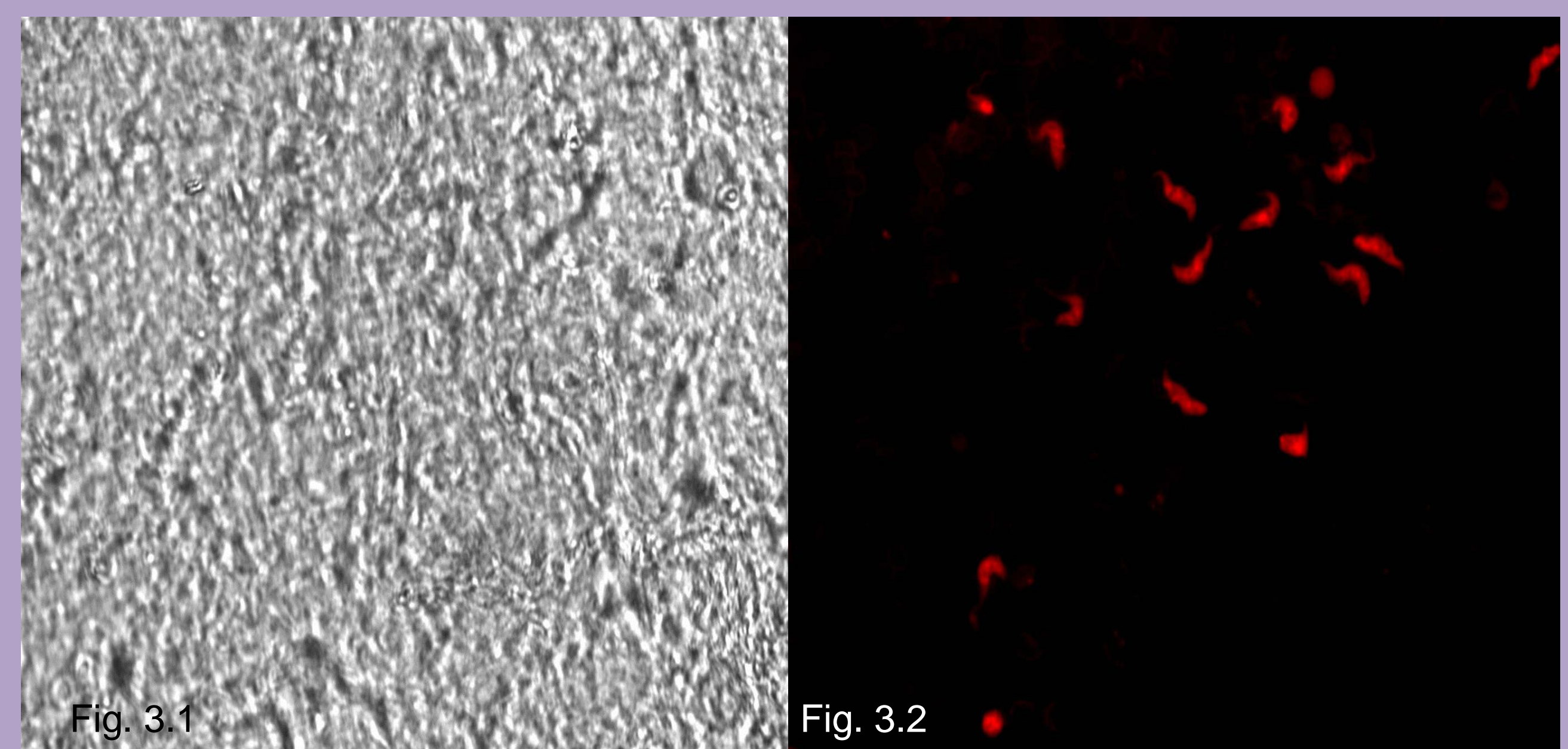


Fig. 3: Lichtmikroskopische (Fig. 3.1) und fluoreszenzmikroskopische (Fig. 3.2) Aufnahme von Trypanosomen brucei auf Gewebe des ZNS.

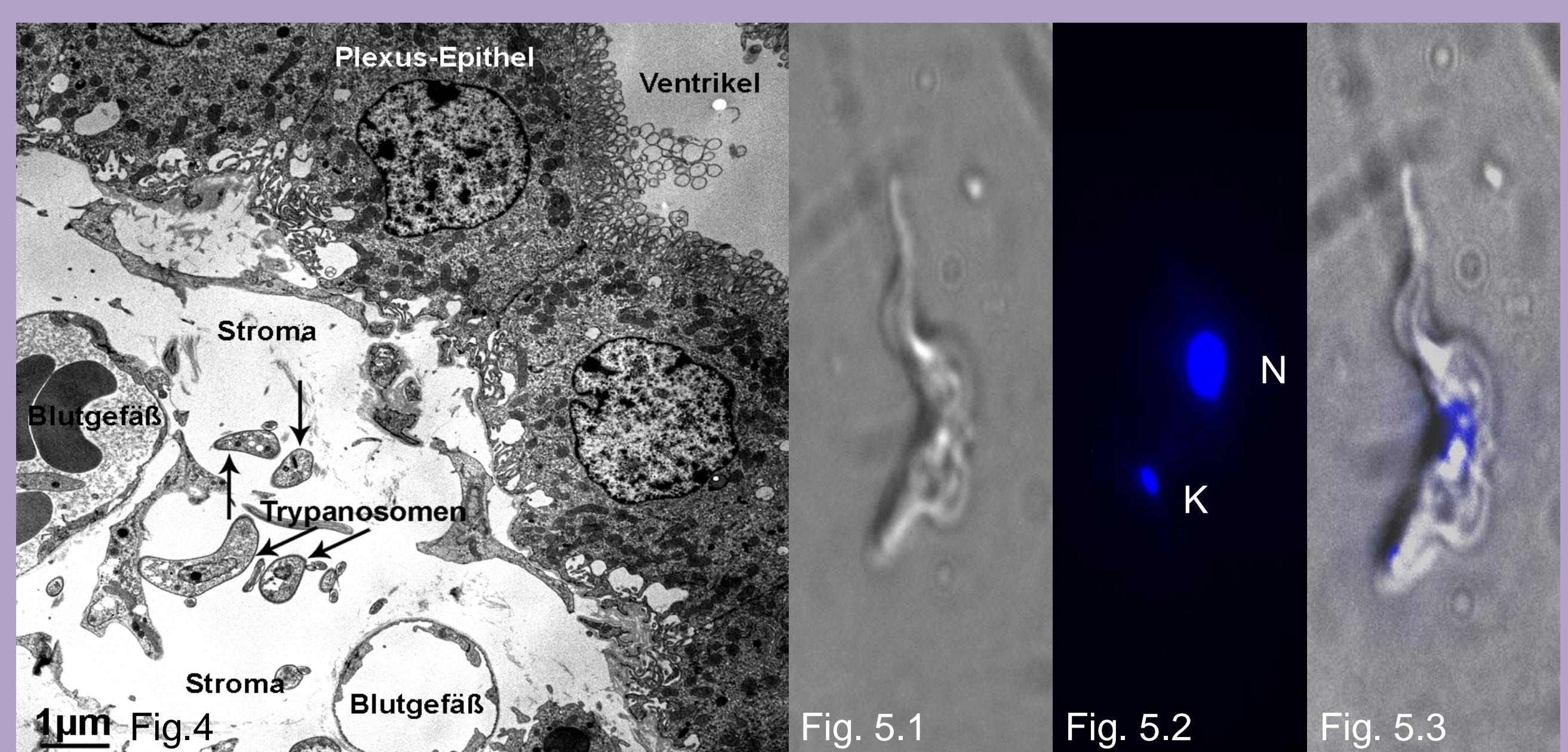


Fig. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Trypanosomen im Stroma des Plexus Chorioideus. Die Trypanosomen müssen aus den Blutgefäßen in das Stroma eingedrungen sein und gelangen durch das Plexusepithel in den Ventrikel mit dem Liquor cerebrospinalis (nicht gezeigt).
 Fig. 5: LM-Aufnahme (Fig. 5.1) und Bisbenzimidfärbung (Fig. 5.2) rekultivierter Trypanosomen. Zu sehen sind Lage von Kern (N) und Kinetoplast (K) zueinander. Es handelt sich um trypanomastigote Formen (Fig. 5.2).

Zusammenfassung

- mCherry Protein exprimierende Trypanosomen sind geeignet, um Trypanosomen im Gewebe des ZNS (20-35d p.l.) zu lokalisieren und morphologisch zu beschreiben.
- Trypanosomen konnten nicht im Bereich der Blut-Hirnschranke aber insbesondere im Stroma des Plexus Chorioideus lokalisiert werden. Vermutlich nutzen Trypanosomen diesen Weg zum Eintritt in das ZNS.
- Elektronenmikroskopisch dargestellte und rekultivierte Trypanosomen aus Gewebe des ZNS zeigen keine morphologischen Besonderheiten zu Blutformen der Trypanosomen; jedoch eine längere Lebenszeit in Flüssigkultur. Möglicherweise könnten biochemische Anpassungen bestehen.

Kontaktadresse sven.acker@student.uni-tuebingen.de