

# **Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Nanopartikeln in *Trypanosoma brucei brucei***

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
**Jasmin Longina Stein**  
aus Konstanz

Tübingen  
2016

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Duszenko

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Wieder

## **Für meine Eltern und meine Schwester**

*„Das Leben bedeutet das, was es immer war.  
Der Faden ist nicht durchschnitten.  
Weshalb soll ich nicht mehr in euren Gedanken sein,  
nur weil ich nicht mehr in eurem Blickfeld bin?  
Ich bin nicht weit weg,  
Ich bin nur auf der anderen Seite des Weges.“  
(Auszug aus: Auf der anderen Seite des Weges, Charles Peguy )*



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard Karls Universität in Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Michael Duszenko danke ich insbesondere für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft sowie für die intensive und kollegiale Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wieder danke ich für die Bereitstellung der Erythrozyten und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Bernd Reinhard und Céline Belot vom Leibniz-Institut für Neue Materialien in Saarbrücken danke ich für die Synthese der Nanopartikelpräparationen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Projekts.

Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Duszenko für das nette freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen wertvollen Diskussionen. Ich danke allen bereits ausgeschiedenen Kollegen, die mich während der alltäglichen Laborarbeiten tatkräftig unterstützten. Ein besonderer Dank gilt meinen Doktorandenkollegen Celestin Mudogo und Stefan Mogk für ihre stetige Hilfsbereitschaft in experimentellen Fragen und ihre tägliche Motivation. Vielen Dank!

All meinen Praktikanten und Bachelor-Studenten danke ich für die produktive Zusammenarbeit und ihre schwungvolle und motivierende Art den Laboralltag zu meistern. Vielen Dank an Patricia Blach, Sven Szialgyi, Marcel Beha und Alexandra Fux.

Ein besonderer Dank gilt meiner besten Freundin Sonja Weißhaupt. Ich danke dir dafür, dass du immer für mich da bist!

Markus, dir danke ich für deine ständige Unterstützung auch in schwierigen Situationen und für die vielen schönen Momente abseits der Arbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester bedanken. Ohne eure Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Geschichte der Entdeckung von Trypanosomen .....	1
1.2	Epidemiologie und Krankheitsbild .....	3
1.3	Diagnose .....	6
1.4	Bisherige Behandlungs- und Präventionsmöglichkeiten .....	8
1.5	Biologie der Kinetoplastiden .....	13
1.5.1	Systematische Einordnung von <i>Trypanosoma brucei</i> .....	13
1.5.2	Zellmorphologie .....	14
1.5.3	Lebenszyklus .....	16
1.6	Biochemische Besonderheiten von Trypanosomen .....	19
1.6.1	Glykosomen und Energiestoffwechsel .....	19
1.6.2	Antigenvariation .....	22
1.7	Endozytose in Trypanosomen .....	25
1.7.1	Die Architektur der Flagellumtasche .....	25
1.7.2	Endozytose in Trypanosomen .....	28
1.7.3	Funktion der Endozytose in Trypanosomen .....	32
1.7.4	Der Transferrin-Rezeptor (Tf-R) .....	35
1.8	Autophagie in Trypanosomen .....	36
1.9	Nanopartikel .....	38
1.10	Zielsetzung der Arbeit .....	41
2	Material und Methoden .....	44
2.1	Verwendete Organismen und Zellen .....	44
2.1.1	Verwendete Trypanosomen .....	44
2.1.2	Verwendete Erythrozyten .....	44
2.1.3	Verwendete Versuchstiere .....	45
2.2	Materialien .....	45

2.2.1	Verwendete Nanopartikel.....	45
2.2.2	Chemikalien.....	46
2.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	49
2.2.4	Geräte .....	50
2.2.5	Software und Datenbanken .....	51
2.3	Medien, Puffer, Lösungen .....	52
2.3.1	Medien für die Zellkultur .....	52
2.3.2	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	56
2.3.3	Elektronenmikroskopie .....	59
2.4	Methoden.....	60
2.4.1	Sterile Isolierung von <i>Trypanosoma brucei</i> aus Rattenblut und die Herstellung von Stabilaten.....	60
2.4.2	Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen, Stamm 221, aus Stabilaten .....	62
2.4.3	Zytotoxizitätsbestimmung durch Wachstumskurven .....	62
2.4.4	TC <sub>50</sub> -Bestimmung in Erythrozyten (Häm-Assay).....	63
2.4.5	Durchflusszytometrie .....	65
2.4.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	66
2.4.7	Elektronenmikroskopie .....	67
3	Ergebnisse .....	72
3.1	Zytotoxischer Effekt von Silizium- und Eisenoxidnanopartikeln auf <i>Trypanosoma brucei</i> unter serumhaltigen Bedingungen .....	72
3.1.1	SiO <sub>2</sub> -Partikel .....	73
3.1.2	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Partikel .....	74
3.1.3	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf .....	75
3.1.4	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC .....	77
3.1.5	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -AllylthioNeu5Ac, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -APS, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NANA .....	79
3.2	Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln unter serumfreien Bedingungen .....	81



3.2.1	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC .....	81
3.3	Zytotoxischer Effekt von Siliziumpartikeln und Eisenoxidnanopartikeln auf Erythrozyten .....	83
3.4	Untersuchung der Aufnahmekinetik von fluoreszenzmarkierten Eisenoxidpartikeln mittels Durchflusszytometrie .....	86
3.4.1	Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumhaltigen Bedingungen .....	87
3.4.2	Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen .....	92
3.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	96
3.5.1	Wirkung von Siliziumpartikeln auf Erythrozyten.....	96
3.5.2	Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln in <i>Trypanosoma brucei</i> .....	98
3.6	TEM .....	99
3.6.1	Negativ Kontrastierung von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA Partikeln .....	99
3.6.2	Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Siliziumpartikeln durch <i>Trypanosoma brucei</i> .....	100
3.6.3	Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikeln durch <i>Trypanosoma brucei</i> .....	102
3.6.4	Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumhaltigen Bedingungen .....	103
3.6.5	Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme der Sialinsäure-modifizierten Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Partikel unter serumhaltigen Bedingungen .....	107
3.6.6	Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen .....	109
3.7	Blockade der Endozytose .....	114
3.7.1	Inkubation von Trypanosomen mit Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen bei 4°C .....	114
4	Diskussion .....	119
4.1.1	Zytotoxischer Effekt von Siliziumpartikeln auf Erythrozyten und Trypanosomen .....	119

4.1.2	Zytotoxischer Effekt von Eisenoxidpartikeln auf Erythrozyten und Trypanosomen .....	123
4.1.3	Untersuchung der Endozytose von Eisenoxidpartikeln unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen mittels Durchflusszytometrie..	127
4.1.4	Untersuchung der Endozytose von Eisenoxidpartikeln unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie .....	131
4.1.5	Blockade der Endozytose .....	134
4.2	Ausblick .....	136
5	Zusammenfassung .....	138
6	Abstract.....	143
7	Literaturverzeichnis .....	147

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Photographische Darstellung von Sir David Bruce (1855-1931) [6].	2
Abbildung 2: Verbreitung der afrikanischen Schlafkrankheit mit der Angabe von Inzidenzen und der Gefährdung von Reisenden [19].	4
Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von <i>Trypanosoma brucei</i> [22, 69].	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellarchitektur von Trypanosomen [76].	15
Abbildung 5: Lebenszyklus von <i>Trypanosoma brucei</i> [88].	17
Abbildung 6: Energiestoffwechsel in Blutform-Trypanosomen [98].	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer VSG-Expressionsstelle in Blutform-Trypanosomen [103].	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Flagellums und der Flagellumtasche [122].	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Endo- und Exozytose in <i>Trypanosoma brucei</i> [80].	30
Abbildung 10: Nährstoffversorgung und Umgehung der Immunabwehr in <i>Trypanosoma brucei</i> [121].	34
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Autophagie [158].	37
Abbildung 12: Darstellung eines multifunktionalen Nanopartikels [168].	39
Abbildung 13: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der SiO <sub>2</sub> -Partikel (~ 8nm) auf <i>Trypanosoma brucei</i> .	73
Abbildung 14: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Partikel (~ 30nm) auf <i>Trypanosoma brucei</i> .	74
Abbildung 15: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf Partikel auf <i>Trypanosoma brucei</i> .	76
Abbildung 16: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikel auf <i>Trypanosoma brucei</i> .	78
Abbildung 17: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -AllylthioNeu5Ac, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -APS, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NANA Partikel auf <i>Trypanosoma brucei</i> .	80
Abbildung 18: Inkubation von <i>Trypanosoma brucei</i> mit den Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen.	82
Abbildung 19: TC <sub>50</sub> -Bestimmung. Zytotoxischer Effekt der fluoreszenzmarkierten SiO <sub>2</sub> -Partikel (~ 8nm) auf Erythrozyten.	84

Abbildung 20: Häm-Assay. Zytotoxischer Effekt der Eisenoxidnanopartikel auf Erythrozyten. ....	85
Abbildung 21: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	88
Abbildung 22: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	89
Abbildung 23: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem Medium. ....	90
Abbildung 24: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem HMI9-Medium. ....	93
Abbildung 25: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem HMI9-Medium. ....	94
Abbildung 26: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem HMI9-Medium. ....	95
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopie. Zytotoxische Wirkung der SiO <sub>2</sub> -APTES-FITC Partikel auf Erythrozyten. ....	97
Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem Medium. ....	98
Abbildung 29: Negativ Kontrastierung der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> und Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA Partikel. ....	100
Abbildung 30: TEM. Aufnahme der SiO <sub>2</sub> -Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem BF-Medium. ....	101
Abbildung 31: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem BF-Medium. ....	102
Abbildung 32: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	104
Abbildung 33: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	105
Abbildung 34: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	106
Abbildung 35: TEM. Aufnahme der Sialinsäurederivat-modifizierten Eisenoxidpartikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumhaltigem HMI9-Medium. ....	108
Abbildung 36: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem HMI9-Medium. ....	110
Abbildung 37: TEM. Aufnahme der Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC Partikel durch <i>Trypanosoma brucei</i> in serumfreiem HMI9-Medium. ....	111

Abbildung 38: TEM. Aufnahme der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem Medium. .... 113

Abbildung 39: TEM. Inkubation von Trypanosomen mit Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen bei 4°C. .... 115

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Medikamente zur Behandlung der Schlafkrankheit und die Angabe des Krankheitsstadiums, Wirkungsmechanismus und den Nebenwirkungen [19, 51].	9
Tabelle 2: Verwendete Nanopartikel	45
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	46
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	49
Tabelle 5: Verwendete Geräte	50
Tabelle 6: Verwendete Software und Datenbanken	51
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse	117

## Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptions-Spektrometrie
AllylthioNeu5Ac	Allylthio-N-Acetylneuraminsäure
APOL1	Apolipoprotein L1
APS	Aminophenylthioglykosid
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
ATG	<i>AuTophagy-related</i>
Au	Gold
BCS	Bathocuproindisulfonat
BDMA	Benzyl dimethylamin
BF-Medium	Blutform-Medium
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CATT	<i>card agglutination test for trypanosomiasis</i>
CCV	<i>clathrin-coated vesicle</i>
CGA	Citrat-Glucose-Antikoagulans
CMA	<i>chaperon-mediated autophagy</i>
CRAM	<i>cysteine-rich acidic integral membrane protein</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
Cvt	<i>cytoplasm-to-vacuole targeting</i>
DDSA	Dodecanyl-succinic-anhydride
DEAE	Diethylaminoethyl
DFMO	$\alpha$ -Difluormethylornithin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	<i>early endosome</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	<i>expression site</i>

ESAG	<i>expression site-associated gene</i>
EXC	<i>exocytotic carrier</i>
FAZ	<i>flagellum attachment zone</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPHb	Heptaglobin-Hämoglobin
Hpr	<i>heptaglobin-related protein</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's minimum essential medium</i>
ION	<i>iron oxide nanoparticle</i>
kDNA	Kinetoplasten DNA
L	Lysosom
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LE	<i>late endosome</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MNA	Methylnadicanhydrid
MRT	Magnetresonanztomographie
MVS	multivesikulare Struktur
NANA	N-Acetylneuraminsäure
ODC	Ornithin Decarboxylase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>



PEG	Polyethylenglykol
PGD2	Prostanglandin D2
PLGA	poly D,L-Laktid-Co- Glykolsäure
PMN	<i>piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
PVA	Polyvinylalkohol
QD	<i>quantum dot</i>
RE	<i>recycling endosome</i>
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SFCA	<i>surfactant-free cellulose acetate</i>
SHAM	Salicylhydroxamsäure
SIF	<i>stumpy induction factor</i>
SPION	<i>supermagnetic iron oxide nanoparticle</i>
SRA	Serum Resistenz-assoziiert
T.b.b.	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
T.b.g.	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
T.b.r.	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
TAO	trypanosomale alternative Oxidase
TC <sub>50</sub>	<i>median toxic concentration</i>
TDB	<i>trypanosome dilution buffer</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tf	Transferrin
Tf-R	Transferrin-Rezeptor
TLF	trypanosomaler lytischer Faktor
VSG	<i>variant surface glycoprotein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Geschichte der Entdeckung von Trypanosomen

Die ersten historischen Berichte über das Auftreten der Schlafkrankheit gehen auf den arabischen Historiker Ibn Khaldun im 14. Jahrhundert zurück [1]. Weitere symptomatische Beschreibungen traten erst wieder zu den Zeiten des Sklavenhandels im Jahr 1734 durch den Engländer John Atkins auf [2]. Thomas Winterbottom beschrieb 1803 erstmals die Lymphknotenschwellung im Halsbereich, genannt *Winterbottom sign*, die bis heute als charakteristisches Merkmal der frühen Krankheitsphase gilt [2]. Gruby entdeckte 1843 Parasiten der Unterart *Trypanosoma sanguinis* im Blut von infizierten Fröschen [3]. Der Gattungsname Trypanosoma setzt sich aus dem Griechischen Wort „trypanon“ (= Bohrer) und „soma (= Körper) zusammen. Der Schotte David Livingston beschrieb 1852 das erste Mal die Tsetse-Fliege als möglichen Überträger der Schlafkrankheit in Rindern (Nagana) [4] und 1895 identifizierte David Bruce *Trypanosoma brucei* als Erreger der Seuche [5] (Abbildung 1).

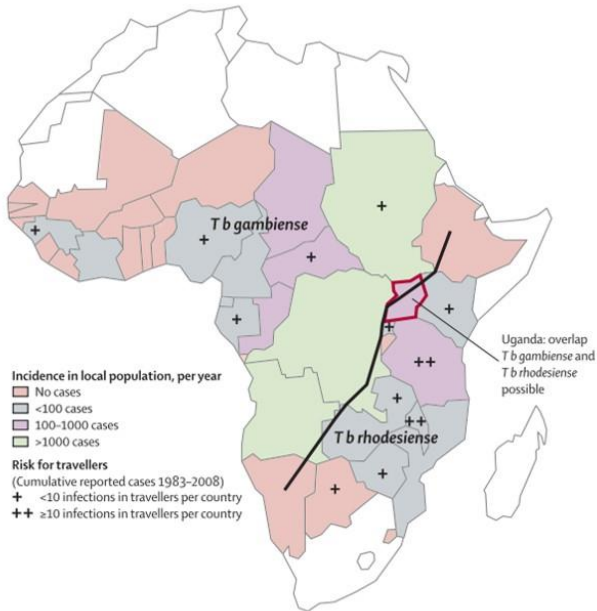


**Abbildung 1: Photographische Darstellung von Sir David Bruce (1855-1931) [6].**  
Entdecker von *T. brucei brucei* als Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit in Tieren (Nagana).

Die ersten Parasiten in menschlichem Blut wurden 1901 von Robert Michael Forde am Fluss Gambia entdeckt [7]. Im Jahr 1902 erkannte Joseph Everett Dutton, dass es sich dabei um Trypanosomen handelte und benannte sie, nach dem Ort der Entdeckung, als *Trypanosoma gambiense* [8]. Im selben Jahr fand Castellani die gleichen Parasiten in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) eines erkrankten Patienten [9]. 1903 bewies Bruce dann eindeutig, dass die Schlafkrankheit durch die Tsetse-Fliege übertragen wird [10]. Es war zunächst noch unklar, ob es sich um eine mechanische [2] oder aktive Übertragung handelte [11]. Letztere konnte bestätigt werden und Bruce beschrieb den komplexen Lebenszyklus mit Wirtswechsel [2]. John William Watson Stephens und Harold Benjamin Fantham entdeckten und isolierten 1910 den Erreger der ostafrikanischen Schlafkrankheit und klassifizierten ihn als *Trypanosoma rhodesiense* [12]. In der Folge kam es zur Entdeckung der drei Unterarten *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.b.*), *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.g.*) und *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b.r.*).

## 1.2 Epidemiologie und Krankheitsbild

Die afrikanische Schlafkrankheit (*Human African Trypanosomiasis*, HAT) zählt wie die Leishmaniose, Schistosomiasis und Chagas Krankheit zu den sogenannten „*neglected diseases*“ [13]. Sie kommt in 36 Ländern südlich der Sahara vor und betrifft meistens die arme Landbevölkerung in abgelegenen Gebieten [14]. Hervorgerufen wird die HAT durch einzellige eukaryontische Parasiten der Art *Trypanosoma brucei*, die durch Tsetsefliegen der Gattung *Glossina* übertragen werden [15]. Die Verbreitung beschränkt sich durch das ausschließliche Auftreten der Fliege in Afrika auf ein Gebiet südlich der Sahara bis zum Norden der Kalahari Wüste zwischen dem 14. nördlichen und 29. südlichen Breitengrad des Äquators [16, 17]. Das Auftreten einer Infektion ist dabei stark von der Wechselwirkung zwischen den Parasiten, dem Wirt und dem Vektor abhängig [18]. *Trypanosoma brucei gambiense* verursacht die chronische Form der Schlafkrankheit in West- und Zentralafrika und wird durch Glossinen der Palpalis-Gruppe übertragen, die eine wasserreiche Vegetation bevorzugen. Die akute ostafrikanische Form wird durch eine Infektion mit *Trypanosoma brucei rhodesiense* hervorgerufen und von Glossinen der Morsitans-Gruppe übertragen, die in der trockenen Savanne beheimatet sind [18] (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Verbreitung der afrikanischen Schlafkrankheit mit der Angabe von Inzidenzen und der Gefährdung von Reisenden [19].**

Die Prävalenz der Tsetsefliegen für *T. brucei spp.* ist mit nur 0,1% sehr gering [19] und die Inzidenz liegt bei etwa 1% [20]. Beide Unterarten sind humanpathogen und der afrikanische Grabenbruch führt zu der geographische Trennung und nur in Uganda könnte es in Zukunft zu einer Koexistenz beider Formen kommen [18, 19, 21]. Eine morphologische Unterscheidung dieser beiden Unterarten ist nicht möglich [22]. Die Klassifizierung erfolgt deshalb durch den Nachweis von artspezifischen molekularen Markern. Das Serum Resistenz-assoziierte (SRA) Gen ist charakteristisch für *T.b. rhodesiense* Stämme [23] und das TgsGP Gen, ein Rezeptor-ähnliches Glykoprotein in der Flagellumtasche, für *T.b. gambiense* Stämme [24]. *Trypanosoma brucei brucei* ist der

Erreger der Schlafkrankheit in Tieren, auch genannt Nagana, und befällt domestizierte Tiere (z.B. Hornträger, Schweine, Hunde) aber auch Wildtiere [25]. Er ist nicht humanpathogen, da er durch den im menschlichen Plasma vorkommenden trypanolytischen Faktor, bestehend aus Apolipoprotein L1 und dem Heptaglobin-related protein (Hpr), lysiert wird [26-28]. Kommt es während der Blutmahlzeit zu einer Übertragung von Parasiten auf den Wirt (Säugetier), so bildet sich in einigen Fällen zunächst ein sogenannter Trypanosomenschanter, eine Rötung oder Schwellung, an der Einstichstelle. In der ersten Phase der Krankheit verbleiben die Erreger im Blut und in der Lymphflüssigkeit (hämolymphatische Phase) und dringen erst in der späten Phase in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein (meningoenzephalitische Phase) [19]. Neuste Studien in Ratten zeigen, dass die Parasiten bereits kurz nach dem ersten Peak im Blut auch in der Cerebrospinalflüssigkeit detektierbar sind [29]. Des Weiteren konnte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden, dass Trypanosomen 20 Tage nach der Infektion nicht im Gehirn selbst, sondern im Plexus choroideus, CSF, Subarachnoidalraum und der Pia mater zu finden waren [30]. Bei der chronischen *T.b. gambiense* Infektion kommt es erst nach Jahren zum Eindringen der Erreger in das ZNS [31]. Hier zeigt eine neue Studie aus dem Jahr 2014, dass ein infizierter Patient Jahrzehnte lang asymptomatischer Träger einer Infektion war und erst dann Symptome der meningoenzephalitischen Phase entwickelte [32]. Bei der akuten *T.b. rhodesiense* Infektion tritt dieses Stadium schon nach einigen Wochen oder Monaten ein [33]. Unbehandelt ist die Krankheit immer tödlich [19]. Die hämolymphatische Phase äußert sich symptomatisch durch Lymphknotenschwellung, Fieber, Kopfschmerzen und Juckreiz [19]. Die

meningoenzephalitische Phase zeigt sich klinisch durch neurologische Symptome wie Koordinationsschwierigkeiten, Sinnesstörungen, Verwirrungszustände, Apathie, Abmagerung und Koma [19]. Es kommt zu einer Regulationsstörung im Schlaf-Wach-Rhythmus, was zur Namensgebung der Krankheit führte [19]. Zwischen 1896 und 1906 gab es in Uganda und im Kongobecken eine große Epidemie, weitere folgten ab 1920 in unterschiedlichen afrikanischen Ländern und ab 1970 bis in die späten 90er-Jahre [14]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzte die Anzahl der Erkrankten auf 300 000 zu dieser Zeit, wobei die Dunkelziffer recht hoch war [34]. Seitdem wurden fortlaufend Kontrollen durchgeführt und so sank im Jahr 2009 die Anzahl der Neuinfektionen zum ersten Mal seit 50 Jahren auf 10 000 und im Jahr 2013 wurden sogar nur rund 6300 Fälle gemeldet [14].

### 1.3 Diagnose

Das klinische Bild der afrikanischen Schlafkrankheit ist sowohl in der frühen als auch in der späten Phase relativ unspezifisch, deshalb sind weitere Laboruntersuchungen nötig, um eine eindeutige Diagnose zu geben und um das vorliegende Krankheitsstadium zu bestimmen [35, 36]. Für *T. b. gambiense* Infektionen eignet sich der *card agglutination test for trypanosomiasis* (CATT), der aus dem Serum oder Blut von Patienten bestimmt werden kann [37-39]. Er beruht auf dem Nachweis von Trypanosomen-spezifischen Antikörpern gegen das LiTat1.3 Antigen [40]. Die Sensitivität des Tests liegt nach Berichten bei 87-98% und seine Spezifität bei 93-95% [19, 35]. Er kommt vor allem in

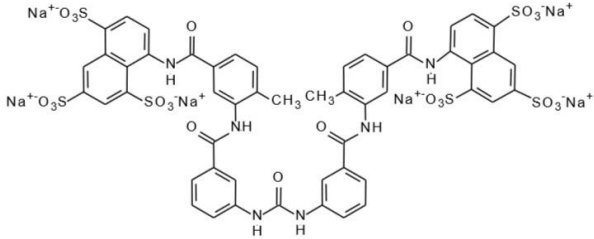



endemischen Gebieten zum Einsatz, da er einfach in der Handhabung ist und sich sehr gut zum *screening* großer Menschenmengen eignet [41, 42]. In nicht-endemischen Gebieten werden Trypanosomen normalerweise mit Hilfe von Immunfluoreszenz oder *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) nachgewiesen [43, 44]. Der mikroskopische Nachweis von Parasiten aus einer Lymphknotenbiopsie oder aus dem Blut muss unbedingt zur endgültigen Diagnose durchgeführt werden, jedoch sollte die Untersuchung wegen einer möglichen Lyse der Trypanosomen kurz nach der Probenentnahme erfolgen [19]. Die Sensitivität der Lymphknotenuntersuchung liegt zwischen 40% und 80% und variiert abhängig vom Parasitenstamm und Krankheitsstadium [45, 46]. Aufgrund der geringen Sensitivität von Blutausstrichen sollten weitere Methoden wie die Anreicherung durch Mikrohämatokrit-Zentrifugation [47], die Entnahme des *buffy coats* [48] und Anionenaustauscherchromatographie [49] herangezogen werden. Zur genauen Bestimmung, ob die meningoenzephalitische oder die hämolymphtische Phase vorliegt, ist eine CSF-Untersuchung unbedingt nötig, da sich die Therapie deutlich unterscheidet [50]. Es werden verschiedene Parameter herangezogen, um das Vorliegen des Gehirnstadiums zu bestätigen. Findet man mehr als 5 weiße Blutzellen pro  $\mu\text{l}$ , Trypanosomen oder einen gesteigerten Proteingehalt ( $>370 \text{ mg/ml}$ ) so liegt laut WHO das späte Stadium vor [19]. Die Diagnose für die ost- und westafrikanische Form der HAT unterscheidet sich zum einen darin, dass es für *T.b. rhodesiense* Infektionen keinen serologischen Nachweis gibt und zum anderen der mikroskopische Nachweis von Trypanosomen in Blutausstrichen aufgrund einer höheren Parasitendichte wesentlich einfacher ist [19].

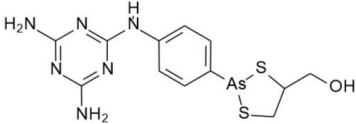
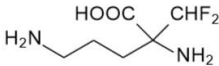
## 1.4 Bisherige Behandlungs- und Präventionsmöglichkeiten

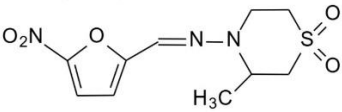
Zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit stehen bis heute nur wenige Medikamente zur Verfügung (Tabelle 1). Da das Interesse der Industrieländer und der pharmazeutischen Industrie an der Entwicklung neuer Medikamente gegen tropische Krankheiten im allgemeinen sehr gering ist, liegt die Entdeckung von drei der bis heute verwendeten Arzneimittel über 50 Jahre zurück [51]. Einen wichtigen Beitrag zur Medikamentenentwicklung leistete der deutsche Wissenschaftler Paul Ehrlich. Die Entdeckung von Suramin geht auf seine Arbeiten im Jahr 1901 zurück, als er über 100 verschiedene Farbstoffe zur Bekämpfung von Trypanosomen testete [52]. Von all den getesteten Farbstoffen zeigte nur ein symmetrischer polysulfonierter Naphtylamin-Azofarbstoff, genannt Nagana Rot, eine anti-trypanosomale Aktivität [53]. Um die Wirksamkeit und Löslichkeit zu erhöhen, entwickelte Ludwig Benda für die Cassella Farbwerke Trypan Rot, ein Derivat von Nagana Rot [54]. Ab 1906 arbeitete der Pharmakonzern Bayer an der Weiterentwicklung der Farbstoffe. Trypan Blau erwies sich als potentieller Kandidat, war jedoch aufgrund der Blaufärbung der Haut nicht einsetzbar und auch die Wirkung von Afridol Violett, einem Naphthalin-Harnstoff Derivat, war nicht zufriedenstellend [52, 54, 55]. Der Durchbruch gelang im Jahr 1917 mit der Entdeckung von Bayer 205, später auch Suramin genannt [55, 56]. Es wird zur Behandlung der frühen Phase der ostafrikanischen Schlafkrankheit verabreicht [51].

**Tabelle 1: Übersicht über die Medikamente zur Behandlung der Schlafkrankheit und die Angabe des Krankheitsstadiums, Wirkungsmechanismus und den Nebenwirkungen [19, 51].**

Substanz	Stadium	Wirkungsmechanismus	Nebenwirkungen
<p><b>Suramin</b></p>	<p>frühe Phase von <i>T.b. rhodesiense</i> Infektionen</p>	<p>Inhibitor zahlreicher Enzyme und Rezeptoren</p>	<p>Überempfindlichkeitsreaktionen, Albuminurie, Hämaturie, periphere Neuropathie</p>
			
<p><b>Pentamidin</b></p>	<p>frühe Phase von <i>T.b. gambiense</i> Infektionen</p>	<p>Bindung an negativ geladene zelluläre Komponenten z.B. Phospholipide, DNA, RNA, kDNA</p>	<p>Hypoglykämie, Schmerzen an der Einstichstelle, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen</p>
			

Einleitung

Substanz	Stadium	Wirkungsmechanismus	Nebenwirkungen
<b>Melarsoprol</b>	späte Phase von <i>T.b. rhodesiense</i> und <i>T.b. gambiense</i> Infektionen	Inhibitor der Trypanthion-reduktase	Enzephalopathie, Hautreaktionen, periphere motorische und sensorische Neuropathie, Thrombophlebitis
			
<b>Eflornithin (DFMO)</b>	späte Phase von <i>T.b. gambiense</i> Infektionen	irreversibler Inhibitor der Ornithin Decarboxylase	Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe, Anämie, Leuko- und Thrombozytopenie
			

Substanz	Stadium	Wirkungsmechanismus	Nebenwirkungen
Nifurtimox	späte Phase von <i>T.b. gambiense</i> Infektionen	Bildung von ROS	CNS Dysfunktion, periphere Neuropathie gastrointestinale Störungen [57]
			

Die Entwicklung von Pentamidin geht auf das Jahr 1937 zurück, als Lourie und Yorke herausfanden, dass Synthalin, ein synthetisches Insulinanalogon, eine trypanozide Wirkung besitzt [58]. Ein paar Jahre später synthetisierte A.J. Erwin das aromatische Diamidin Pentamidin für den Pharmakonzern May und Baker [59]. Pentamidin ist bis heute das einzige wirksame Medikament, das bei der frühen Phase von *Trypanosoma brucei gambiense* Infektionen eingesetzt wird [58]. Etwa zur selben Zeit, im Jahr 1938, synthetisierte der Schweizer Chemiker Ernst Friedheim ein Atoxyl-Derivat, genannt Melarsen [60]. Er wusste bereits, dass dreiwertige arsenhaltige Verbindungen effektiver sind als fünfwertige und entwickelte daraufhin das Melarsenoxid [55], was sich aber als sehr toxisch erwies [61]. Zur Verringerung der Toxizität entwickelte er das Melarsenoxid weiter und synthetisierte das wesentlich besser verträgliche Melarsoprol [62]. So kam im Jahr 1949 mit Melarsoprol das erste Medikament zur Behandlung der meningoenzephalitischen Phase der west- und ostafrikanischen Form

der Schlafkrankheit auf den Markt [51]. Ursprünglich als Krebstherapeutikum gedacht [63], wurde in den 1970er Jahren das Eflornithin (DFMO,  $\alpha$ -Difluormethylornithin) entwickelt [64]. Es wird gegen die späte Phase von *Trypanosoma brucei gambiense* Infektionen eingesetzt und ist ein irreversibler Inhibitor der Ornithin Decarboxylase (ODC). Nifurtimox wurde eigentlich zur Behandlung der Chagas Krankheit (verursacht durch *Trypanosoma cruzi*) zugelassen, es zeigte sich jedoch, dass es auch gegen die späte Phase der afrikanischen Schlafkrankheit wirksam ist, vermutlich durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [51]. In der Anwendung wird es als Kombinationstherapie mit Melarsoprol oder Eflornithin eingesetzt [65]. Die bis heute verwendeten Medikamente sind jedoch alle nicht zufriedenstellend, da sie unerwünschte Nebenwirkungen, eine hohe Toxizität, Verabreichungsschwierigkeiten, Resistenzen und zum Teil sehr hohe Herstellungskosten aufweisen [51]. Bei der Bekämpfung der afrikanischen Schlafkrankheit sollte der Fokus jedoch nicht nur auf der medikamentösen Beseitigung der Trypanosomen liegen, denn auch der Überträger selbst, die Tsetse-Fliege, sollte bei der Bekämpfung in Betracht gezogen werden. Bei der Ausrottung der Tsetse-Fliege kommen das Ausbringen von Insektiziden oder sterilisierten männlichen Fliegen sowie das Aufstellen spezieller Fallen mit Duftstoffen zum Einsatz [19].

## 1.5 Biologie der Kinetoplastiden

### 1.5.1 Systematische Einordnung von *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen gehören wie andere Protozoen zu den Kinetoplastiden. Diese Gruppe besitzt ein einziges langgestrecktes Mitochondrium mit einem charakteristischen Organell, Kinetoplast genannt [66], wobei es sich um die mitochondriale DNA (kDNA) handelt, die aus *mini- und maxicircles* aufgebaut ist [67]. Die taxonomische Einordnung der Trypanosomen erfolgt nach der Morphologie und dem Lebenszyklus [68]. Trypanosomen gehören zum Reich Animalia und zum Unterreich der Protozoa [69].

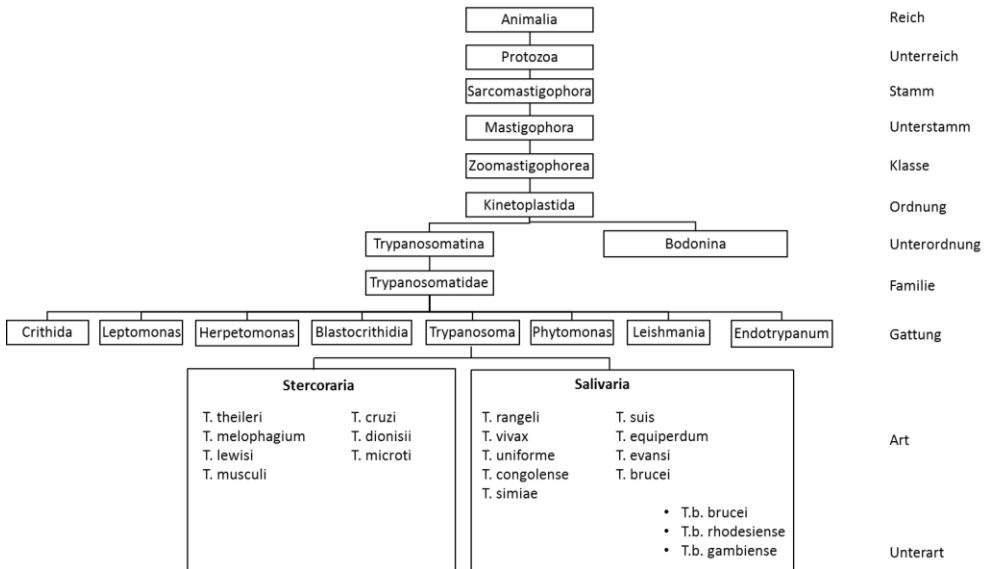


Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von *Trypanosoma brucei* [22, 69].

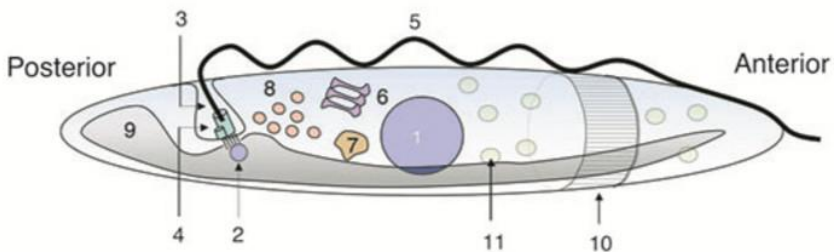
Die Ordnung der Kinetoplastida teilt sich in zwei Unterordnungen auf die Bodonina und die Trypanosomatina [66, 70]. Die Bodonina teilen sich in zwei Familien auf, die Bodonidae und die Cryptobiidae, bei denen alle Mitglieder einen relativ großen Kinetoplasten und zwei Flagellen besitzen. Die zweite Unterordnung, zu der auch die Trypanosomen gehören, bildet nur eine Familie, die Trypanosomatidae, bei der alle Mitglieder einen kleinen Kinetoplasten und ein einziges Flagellum haben [68]. Zur dieser Familie gehört auch die Gattung Trypanosoma. Sie zählen zu den Salivaria, die durch Bisse von Fliegen übertragen werden, und unterscheiden sich daher von den Stercoraria, zu denen z.B. *T. cruzi* der Erreger der Chagas-Krankheit gehört und die durch den Kot ihres Vektors übertragen werden (Abbildung 3) [22]. Die Art *Trypanosoma brucei* gliedert sich noch in die drei Unterarten *T.b. rhodesiense*, *T.b. gambiense* und *T.b. brucei*.

### 1.5.2 Zellmorphologie

Die Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit sind einzellige Hemoflagellaten mit einer spindelförmigen Körperform und einer durchschnittlichen Länge zwischen 14 - 40µm [71] und einer Dicke von 3µm [72]. Das Cytoskelett ist aus  $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$  Mikrotubuli aufgebaut [73, 74], die alle mit ihren positiven Enden zum posterioren Ende verlaufen und der Zelle somit eine Polarität verleihen [75]. Es sorgt für die Aufrechterhaltung der Zellform, auch während den unterschiedlichen Differenzierungsstadien des komplexen Lebenszyklus von Trypanosomen [76]. Die gesamte Oberfläche von Blutform-



Trypanosomen ist von einer dichten Schicht aus einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten *Variant Surface Glycoprotein* (VSG) umgeben, dieses wird bei den prozyklischen Formen durch das Prozyklin ersetzt [77]. Es gibt  $10^7$  identische VSG-Moleküle pro Zelle die den Oberflächenmantel bilden und dafür sorgen, dass der Parasit der Immunantwort entkommt [78, 79]. Die Flagellumtasche, eine Einstülpung der Zellmembran, befindet sich am posterioren Ende der Zelle und ist der einzige Ort der Endo- und Exozytose [80], was eine entscheidende Rolle bei der Antigenvariation in Blutform-Trypanosomen spielt. Das Flagellum entspringt aus dem Basalkörper in der Flagellumtasche und verläuft über die gesamte Fläche des Zellkörpers [76]. Es besitzt die typische  $9 \times 2 + 2$  Struktur aus der Geißeln aufgebaut sind [81].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zellarchitektur von Trypanosomen [76].**

1 = Nukleus, 2 = Kinetoplast, 3 = Flagellumtasche, 4 = Basalkörper, 5 = Flagellum, 6 = Golgi-Apparat, 7 = Lysosom, 8 = Endosomen, 9 = Mitochondrium, 10 = Cytoskelett, 11 = Glykosomen.

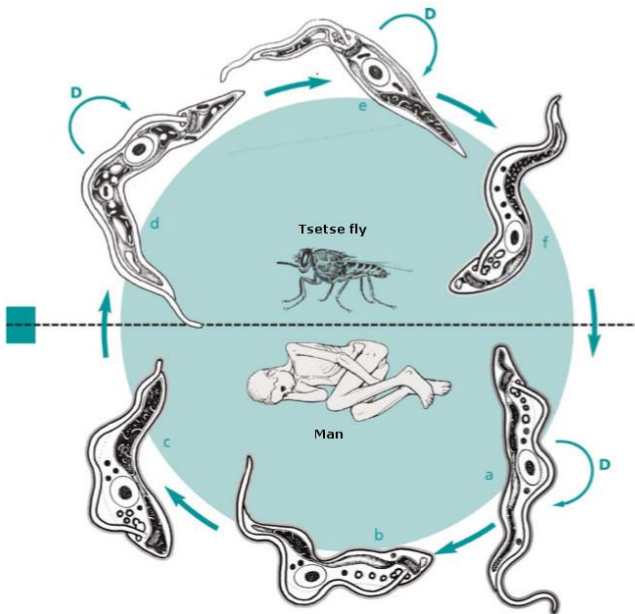
Ein einzelnes langgestreckte Mitochondrium verläuft vom posterioren zum anterioren Ende der Zelle und enthält den Kinetoplasten, die mitochondriale DNA (kDNA), die sich immer in unmittelbarer Nähe zum Flagellum befindet [76]. Der Zellkern hat eine durchschnittliche Größe von  $1,5\mu\text{m}$  und liegt typischerweise in der Mitte der Zelle [72]. Je nach

Differenzierungsstadium verändert sich die Lage von Kinetoplast und Nukleus und man unterscheidet zwischen trypomastigoten und epimastigoten Trypanosomen [76]. Neben den für eukaryontische Zellen charakteristischen Organellen wie Golgi-Apparat (G), endoplasmatisches Retikulum (ER), raues ER (rER), Lysosomen (L), Nukleus (N) und Mitochondrium (M) besitzen die Trypanosomen noch spezialisierte Organellen (Abbildung 4). Die Glykosomen sind abgewandelte Peroxisomen, in denen ein Großteil der Glykolyse abläuft [82]. Dies ist der Hauptstoffwechselweg zur Energiegewinnung in Blutform-Trypanosomen, deren Mitochondrien kaum Cristae und keine Cytochrome besitzen und somit keine Atmungskette betreiben können [83]. Bei den Acidocalcisomen handelt es sich um einen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und Phosphorspeicher. Ihre physiologische Funktion ist noch nicht vollständig geklärt. Sie könnten als  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher für intrazelluläre Signalprozesse, zur pH Homöostase oder Osmoregulation dienen [84].

### 1.5.3 Lebenszyklus

Trypanosomen durchlaufen einen sehr komplexen Lebenszyklus mit vielen unterschiedlichen Differenzierungsstadien, sowohl im Säugetierwirt als auch im Vektor (Abbildung 5). Mit einer Blutmahlzeit der Tsetse-Fliege gelangen die infektiösen metazyklischen Trypanosomen aus der Speicheldrüse in das Gewebe und führen häufig zu einer Entzündungsreaktion, auch Trypanosomenschanker genannt [85]. Im Wirt differenziert die metazyklische Form zu der proliferierenden *slender* Form. Sie vermehrt sich durch binäre Teilung

mit einer Verdopplungszeit von ungefähr 6h [86]. Es kommt zu einer zyklisch verlaufenden Parasitämie im Blut durch die Antigenvariation von VSG und der damit einhergehenden Umgehung der Immunantwort [87]. Die *slender* Form besitzt ein rückgebildetes Mitochondrium und bezieht ihre Energie allein über die Glykolyse durch den Verbrauch von Glukose aus dem Wirt [83, 87].



**Abbildung 5: Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei* [88].**

Im Wirt differenzieren die Blutform-Trypanosomen von a) der proliferierenden *slender* Form über b) die *intermediate* Form zu c) der nicht mehr teilungsfähigen *stumpy* Form. Im Vektor, der Tsetse-Fliege differenziert die *stumpy* Form im Mitteldarm der Fliege zu der d) prozyklischen Form und über e) die epimastigote Form in der Speicheldrüse zu f) der metazyklischen Form. Die letztere ist wieder infektiös für den Wirt.

Um eine persistierende Parasitämie und damit eine frühzeitige Tötung des Wirts zu verhindern, differenziert die *slender* Form über eine *intermediate* Form in die nicht mehr teilungsfähige *stumpy* Form, was

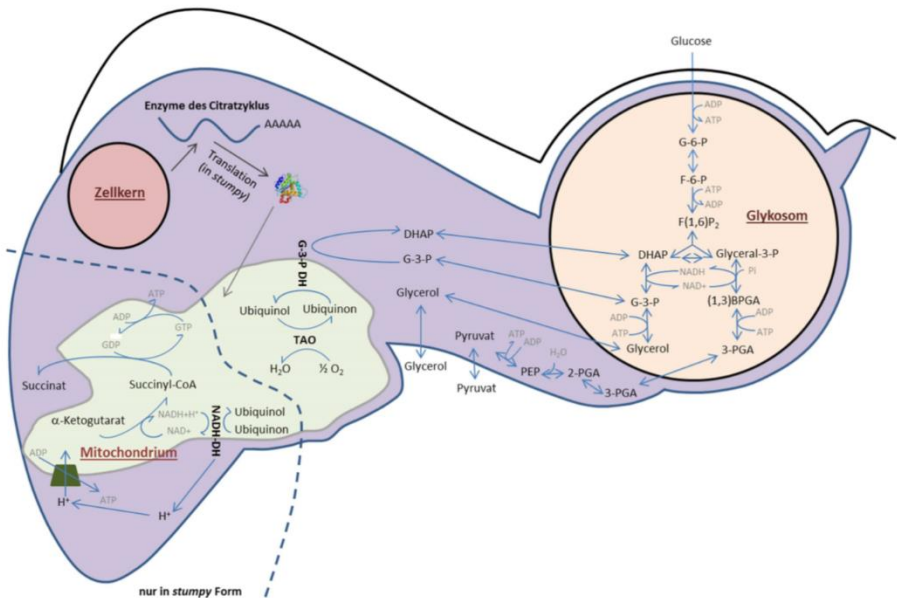
*quorum sensing* genannt wird [88, 89]. Hierfür wird von der *slender* Form der *stumpy induction factor* (SIF) sezerniert und die Differenzierung in die *stumpy* Form induziert [89]. Diese *stumpy* Form reguliert ihre Zelldichte wiederum über die Produktion von Prostaglandin D2 (PGD2) [90], was zum programmierten Zelltod (PCD) führt [91]. Die *stumpy* Form ist bereits an ein Leben in der Fliege präadaptiert. Während der nächsten 48-72h differenziert die *stumpy* Form im Mitteldarm der Fliege zu der prozyklischen Form [87]. Es kommt dabei zu einer Verlängerung der Zelle, der Ausbildung zahlreicher Cristae [87] und zum Austausch von VSG gegen das weniger dicht gepackte Prozyklin [77]. Ihre Energie bezieht die prozyklische Form durch den Verbrauch von Prolin. Im Mitteldarm der Fliege vermehren sich die prozyklischen Trypanosomen und wandern nach einigen Tagen in den ektoperitrophen Raum ein [87]. Dort entsteht die mesozyklische Form, die die Speicheldrüse der Fliege befällt und zu der proliferierenden epimastigoten Form differenziert. Diese ist über ihr Flagellum an die Mikrovilli der Epithelzellen angeheftet und differenziert in die nicht mehr teilungsfähige metazyklische Form [87]. Letztere ist an das Leben im Säugetier angepasst und besitzt bereits wieder ein begrenztes Repertoire von einem VSG-Mantel [87].

## 1.6 Biochemische Besonderheiten von Trypanosomen

### 1.6.1 Glykosomen und Energiestoffwechsel

Glykosomen wurden in *Trypanosoma brucei* entdeckt [92]. Man findet sie aber auch in anderen Unterarten der Trypanosomatina (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia*, *Phytomonas*) [93] und Bodonina (*Trypanoplasma*, *Cryptobia*) [94, 95]. Es handelt sich dabei um abgewandelte Peroxisomen höherer Eukaryonten oder Glyoxysomen von Pflanzen [96], die von einer Membran umgeben sind und keine eigene DNA besitzen [97]. Die Katalase, ein charakteristisches peroxisomales Enzym, fehlt in Trypanosomen und Leishmanien [93]. Ansonsten enthalten diese Organellen die enzymatische Ausstattung für den Pentosephosphatweg, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Purin-Wiederverwertung, sowie die Pyrimidin- und Etherlipid-Biosynthese [97]. Da Trypanosomen einen sehr komplexen Lebenszyklus durchlaufen und beim Wechsel zwischen Säugetier und Insektenvektor unterschiedliche Lebensräume vorfinden, müssen sie sich an die unterschiedlichen Lebensbedingungen anpassen. Blutform-Trypanosomen besitzen ein rückgebildetes Mitochondrium und können somit ihre Energie nicht über die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung gewinnen. Im Wirt herrscht aber ein ständiges Überangebot an Glukose, deshalb ist ihr Energiestoffwechsel zu diesem Zeitpunkt vollständig von der Glykolyse abhängig. Diese läuft im Gegensatz zu anderen Eukaryonten nicht im Cytosol sondern in den Glykosomen ab, deren Proteingehalt in diesem Stadium zu 90% aus glykolytischen Enzymen besteht [97]. Unter aeroben Bedingungen wird

Pyruvat gebildet und pro Molekül Glukose werden 2 Moleküle ATP generiert [93]. Die ersten Schritte der Glykolyse bis 3-Phosphoglycerat laufen in den Glykosomen ab, die letzten Schritte bis zur Pyruvatbildung im Cytosol [92]. Das gebildete Pyruvat wird in das Blut des Wirts ausgeschieden zur Leber transportiert und u.a. zur Glukoneogenese verwendet [98].



**Abbildung 6: Energiestoffwechsel in Blutform-Trypanosomen [98].**

(1,3) BPGA = 1,3-Bisphosphoglycerat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, F-6-P = Fructose-6-Phosphat, F(1,6)P<sub>2</sub>= Fructose-1,6-bisphosphat, G-6-P = Glukose-6-Phosphat, , G-3-P = Glycerin-3-Phosphat, G-3-P DH = Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase, PEP = Phosphoenolpyruvat, PGA = Phosphoglycerat, TAO = trypanosomale alternative Oxidase.

Im Glykosom bleibt das Verhältnis zwischen ATP/ADP und NADH/NAD<sup>+</sup> unverändert. Der Verbrauch von ATP durch die Hexokinase und die Phosphofruktokinase wird durch die ATP Bildung der

Phosphoglyceratkinase im Glykosom ausgeglichen [97], da mittels der Triosephosphat-Isomerase 2 Mol Glycerol-3-Phosphat und damit 2 Mol 3-Phosphoglycerat entstehen. Um das Gleichgewicht zwischen den Reduktionsäquivalenten ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) aufrechtzuerhalten, wird das durch die Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase generierte NADH im Glykosom reoxidiert. Hierzu wird das Dihydroxyaceton zu Glycerin-3-Phosphat reduziert und  $\text{NAD}^+$  gebildet. Das gebildete Glycerin-3-Phosphat wird an der inneren Mitochondriummembran durch die Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase unter Beteiligung von Ubiquinon und der trypanosomalen alternativen Oxidase (TAO) zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert und wieder zurück ins Glykosom transportiert [97]. Die Regeneration von Ubiquinon durch die TAO erklärt den Verbrauch von molekularem Sauerstoff bei den Blutform-Trypanosomen, obwohl sie keine Atmungskette besitzen, da die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Abbildung 6). Da die TAO nicht im Menschen vorkommt, wurde sie lange Zeit als potentiell *drug target* angesehen. Salicylhydroxamsäure (SHAM) [99] und Ascofuranon [100] führen zu einer Hemmung der TAO, jedoch werden dann wie unter anaeroben Bedingungen Glycerol und Pyruvat in äquimolaren Mengen gebildet [97]. Die *stumpy* Form ist an ein Leben in der Fliege präadaptiert, und es konnte eine höhere Stabilität von mRNA Transkripten für einige Enzyme der Atmungskette gezeigt werden [101]. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg im mitochondrialen Membranpotential und zur Succinatbildung [102]. Prozyklische Trypanosomen besitzen dagegen ein vollständig entwickeltes Mitochondrium und können ihre Energie daher über den Citratzyklus und die Atmungskette beziehen [83, 87]. Als

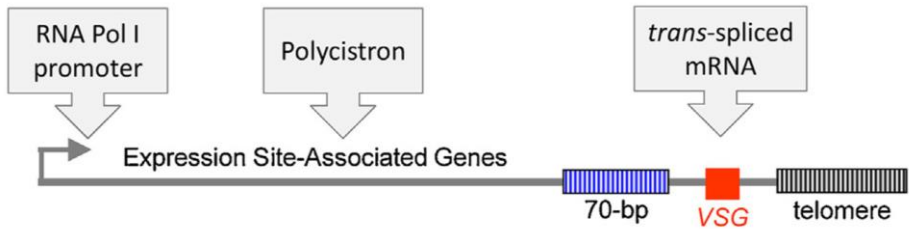
Hauptenergiequelle dient ihnen das Prolin, welches in der Fliege ausreichend vorhanden ist [87].

### 1.6.2 Antigenvariation

Schon relativ früh nach der Entdeckung der Trypanosomen als Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit beobachtete Sir David Bruce, dass die Parasitämie im Blut schwankte [103]. Im Jahr 1905 beschrieben Franke und Ehrlich zum ersten Mal, dass Trypanosomen über die Fähigkeit verfügen müssen, dem Immunsystem des Wirts zu entgehen [103]. Etwa fünf Jahre später zeigten Ross und Thomson den oszillierenden Verlauf der Parasitämie im Blut eines erkrankten Patienten [104]. 1969 konnte gezeigt werden, dass ein dichter Oberflächenmantel zu diesem oszillierenden Verlauf führt [105]. In den 1970er-Jahren erfolgte schließlich durch George Cross die Identifizierung und die Aufreinigung der Mantelproteine [78]. Daraufhin folgte die Klonierung und die anschließende Sequenzierung [103]. Es handelt sich dabei um *variant surface glycoproteins* (VSGs), deren N-terminale Bereiche kaum eine Sequenzhomologie in der Primärstruktur zeigen und die durch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind [79]. Etwa  $10^7$  identische VSG-Moleküle, mit jeweils einer Größe von ca. 60kDA, bedecken die gesamte Oberfläche des Parasiten und bilden so einen 15nm dicken VSG-Mantel aus [78]. Sie bilden Homodimere und zeichnen sich neben ihren Sequenzunterschieden durch eine außergewöhnliche Strukturhomologie aus [106]. Die VSG-Moleküle werden vom Immunsystem erkannt und es kommt zur Produktion von



IgM und IgG Antikörpern [19]. Trypanosomen die diesen VSG-Typ exprimieren werden dann abgetötet und die Parasitämie sinkt. Eine kleine Subpopulation von Trypanosomen exprimiert jedoch schon wieder einen anderen VSG-Typ und so kommt es zum typischen oszillierenden Verlauf der Parasitämie im Blut [103]. Dieser Wechsel des VSG-Typs tritt mit einer Rate von  $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  *switches* pro Verdopplungszeit (5-10 h) auf [107-109]. Da keine Vorhersage darüber möglich ist, welche VSG-Variante als nächstes exprimiert wird, ist eine Impfung gegen die afrikanische Schlafkrankheit nicht möglich [110]. Es gibt ungefähr 20 verschiedene VSG-Expressionsstellen, von denen jede ein VSG-Gen enthält, aber nach Schätzungen gibt es noch mindestens 1000 stumme VSG Gene im trypanosomalen Genom [111]. Die VSG-Expressionsstellen (ES) befinden sich in den Telomerregionen, aber nur eine ES wird zu einem bestimmten Zeitpunkt durch die RNA Polymerase I transkribiert [112]. Vor dem VSG-Gen liegt eine polycistronische Region, bestehend aus bis zu 12 *expression site-associated genes* (ESAGs), die am 5'-Ende durch eine 50-bp Wiederholung und am 3'-Ende durch eine 70-bp Wiederholung eingerahmt ist. Dem VSG-Gen folgt eine telomerische Wiederholung [103, 111] (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer VSG-Expressionsstelle in Blutform-Trypanosomen [103].**

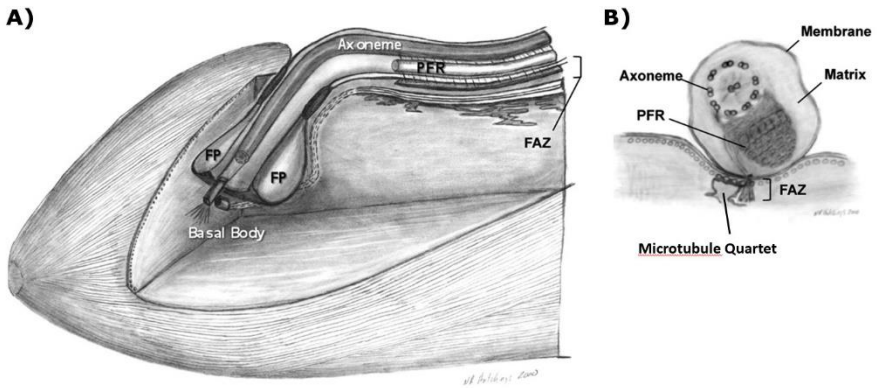
Die VSG-Expressionsstelle befindet sich in der Telomerregion und enthält am 5' Ende ein 50-bp Wiederholung. Sie besteht aus bis zu 12 polycistronischen Untereinheiten, genannt *Expression site-associated genes* (ESAGs). Das VSG-Gen ist immer durch eine 70b-bp Wiederholung von den ESAGs getrennt und endet mit den telomerischen Wiederholungen.

Die ESAGs spielen vermutlich eine Rolle in der Wirt-Parasit-Interaktion. ESAG6 und ESAG7 kodieren z.B. für einen Transferrinrezeptor (Tf-R) der ausschließlich in der Flagellumtasche lokalisiert ist [113, 114]. Seine Transferrin-Affinität ist wirtsspezifisch [115]. Für die VSG-Variation sind zwei unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. In der frühen Phase der Infektion spielt vor allem das *in situ switching* eine Rolle, bei dem eine gerade transkribierende VSG-ES zu Gunsten einer anderen ES abgestellt werden kann. Zum anderen kann das aktive VSG-Gen aber auch durch DNA-Rekombination ausgetauscht werden [111]. Letzteres geschieht in den meisten Fällen durch Genkonversion, wobei die Anzahl der VSG-Typen vor allem in der späten Phase der Infektion durch ein mosaikartiges Zusammenfügen von mehreren stillen VSG Genen erhöht wird [111]. Zusätzlich kann es an den Telomeren zu einem reziproken Austausch eines stillen VSG-Gens in die aktive ES kommen [111].

## 1.7 Endozytose in Trypanosomen

### 1.7.1 Die Architektur der Flagellumtasche

Die Flagellumtasche (FT) ist eine Einstülpung der Zellmembran, die sich am posterioren Ende des Parasiten befindet und aus der das Flagellum aus dem Zellkörper tritt (Abbildung 8). Sie ist der einzige Ort an dem die Endozytose, die Proteinsekretion und der Einbau von Proteinen in die Zelloberfläche stattfinden kann [116-118]. Das Flagellum entspringt am Basalkörper und dieser ist immer mit dem Kinetoplasten, der mitochondrialen DNA, durch einen dreiteiligen Komplex verbunden [119]. Es verläuft zum anterioren Zellende und wird durch die *flagellum attachment zone* (FAZ), die aus punktuell auftretenden Transmembranverbindungen besteht, an Ort und Stelle gehalten [120]. Ein Quartett aus 4 Mikrotubuli entspringt in der Nähe des Basalkörpers und verläuft um die Flagellumtasche herum sowie das gesamte Flagellum entlang der FAZ bis zum vorderen Zellende [121]. Das Axonem besteht aus der typischen 9x2+2 Mikrotubuli Struktur und ist durch einen Übergangsbereich vom Basalkörper getrennt. Der *paraflagellar rod* (PFR) verläuft parallel zum Axonem, ausgehend vom Austrittspunkt des Flagellums aus der Flagellumtasche bis zur Spitze [121].



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Flagellums und der Flagellumtasche [122].**

A) Gezeichneter Querschnitt vom posterioren Teil des Zellkörpers von *T. brucei*. Flagellum das aus dem Basalkörper in der Flagellumtasche entspringt. B) Querschnitt eines Zellkörpers mit Blick zum anterioren Zellende. Gezeigt ist die Verteilung der subpellikularen Mikrotubuli, das Mikrotubuli Quartett, die Mikrotubuli vom Axonem (9x2+2 Struktur), der PFR und die FAZ. FP = Flagellumtasche, FAZ = *flagellar attachment zone*, PFR = *parapflagellar rod*.

Das PFR ist charakteristisch für die beiden Ordnungen Euglenida und Trypanosoma und spielt eine wichtige Rolle für die vollständige Zellmotilität sowie vermutlich für den Flagellumschlag [123]. Der Flagellumkragen (Ort an dem das Flagellum die FT verlässt) bildet eine wichtige Abgrenzung der verschiedenen Bereiche der FT. Er ist eine elektronendichte ringförmige Öffnung von der bis zum jetzigen Zeitpunkt nur eine Komponente und zwar Bilbo1 identifiziert wurde [121]. Durch *RNA interference* (RNAi) konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die Ausbildung der Flagellumtasche unerlässlich ist, denn durch das Ausschalten kam es zu einem Verlust der Flagellumtasche und zu einer Zerstörung der Endo- und Exozytose [121, 124]. Das Lumen der FT besteht größtenteils aus einer kohlenhydratreichen Matrix, deren genaue Zusammensetzung und Funktion noch nicht vollständig bekannt

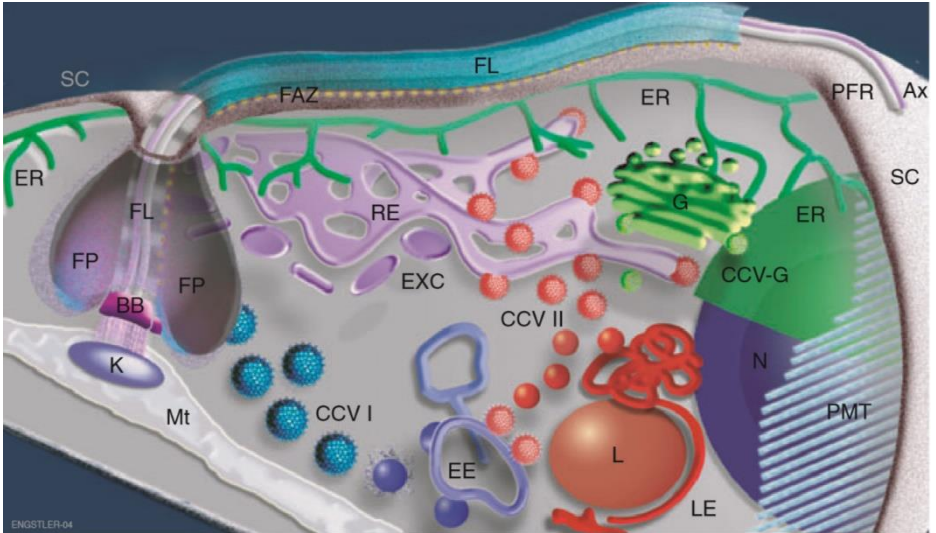
ist [121]. Morphologisch lässt sich die Zellmembran der Trypanosomen in drei unterschiedliche Bereiche einteilen: die Flagellummembran, die Membran der Flagellumtasche und die pellikulare Membran [125]. Obwohl sich all diese Bereiche durch hoch spezialisierte Membranen mit unterschiedlichen Funktionen, einzigartigen Proteinausstattungen und vermutlich unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen auszeichnen, erscheinen sie als eine einzige zusammenhängende Membran [126]. Die pellikulare Membran umgibt den gesamten Zellkörper und das darunter liegende Cytoskelett aus vernetzten Mikrotubuli stabilisiert die Zellform. In dieser Membran sind zahlreiche Transporter für die Aufnahme von Nährstoffen aus der Umgebung lokalisiert [126]. Die Flagellumtasche besitzt hingegen kein Cytoskelett, hier ist lediglich das Quartett aus den 4 spezialisierten Mikrotubuli zu finden [117]. Es wird vermutet, dass der Verlust des Netzwerks aus subpellikularen Mikrotubuli in der Flagellumtasche dazu führt, dass die Fusion von Vesikeln und die Rezeptor-vermittelte Endozytose ausschließlich in diesem Bereich stattfinden können [126]. Die gesamte Membranoberfläche der FT ist in den Blutform-Trypanosomen von einem dichten VSG-Mantel [127] oder in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Insektenzellen von Prozyklin bedeckt [120]. Dadurch, dass die Flagellumtasche der einzige Ort der Endo- und Exozytose in Trypanosomen ist, sind dort zahlreiche Rezeptoren lokalisiert, so wie z.B. der *Low-Density Lipoprotein* Rezeptor (LDL-R), der Heptaglobin-Hämoglobin Rezeptor (HPHb-R) und der Transferrinrezeptor (Tf-R) [116, 128]. Es wurden auch noch einige andere Flagellumtaschen-assoziierte Proteine gefunden, wie z.B. *das serum resistance-associated protein* (SRA), das eine wichtige Rolle in der Virulenz von humanpathogenen Erregern spielt [121]. Obwohl die Membran der Flagellumtasche nur 0,4-3% der gesamten Zelloberfläche

ausmacht [117, 125], besitzen Trypanosomen eine der höchsten bekannten Endozytoseraten [116]. So können Trypanosomen eine Membranoberfläche, die in etwa so groß wie die Flagellumtasche selbst ist, in etwa 2min endozytieren [129]. Die Mechanismen, die zum ausschließlichen Vorkommen spezifischer Proteine in der Membran der Flagellumtasche führen, sind noch nicht geklärt [121].

### 1.7.2 Endozytose in Trypanosomen

In höheren Eukaryonten werden große Partikel mittels Phagozytose durch spezialisierte Zellen, wie z.B. Makrophagen aufgenommen [80]. Die Aufnahme von Flüssigkeiten oder gelösten Substanzen läuft in allen Zellen durch vier unterschiedliche Mechanismen ab, genannt Makropinozytose, Clathrin-abhängige Endozytose, Caveolin-abhängige Endozytose und die Clathrin- und Caveolin unabhängige Internalisierung [80, 130]. In den Trypanosomen laufen hingegen alle endozytotischen Prozesse lediglich über die Clathrin-vermittelte Endozytose ab [131, 132], denn das trypanosomale Genom kodiert für kein Caveolin Homologen [133]. So werden die Meerrettich-Peroxidase, Ferritin und BSA-Gold über eine relativ langsame, nicht sättigungsfähige *fluid phase* Endozytose aufgenommen, wohingegen die Aufnahme von LDL und Transferrin über eine sehr schnelle sättigungsfähige Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt [126, 129]. Die Endozytoserate unterscheidet sich jedoch stark in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien und so besitzen Blutform-Trypanosomen eine in etwa 10-fach höhere Endozytoserate als die prozyklische Form in den

Insekten [134]. In beiden Stadien findet zwar ein Basallevel an Endozytose zur Nährstoffaufnahme statt, wobei es in den Blutform-Trypanosomen zusätzlich zu einer umfangreichen Umgestaltung der Plasmamembran kommt, die unter anderem der Entfernung von oberflächengebundenen Antikörpern dient [134]. Eine weitere Besonderheit in der Endo- und Exozytose bei Trypanosomen im Vergleich zu höheren Eukaryonten besteht darin, dass alle endo- und exozytotischen Prozesse nicht an der gesamten Membranoberfläche, sondern ausschließlich an der Flagellumtasche stattfinden [80]. So findet man in unmittelbarer Nähe zur Flagellumtasche ein komplexes Netzwerk aus Membransystemen und Vesikeln. Während der Endozytose in Trypanosomen ist die anfängliche Aufnahme in die Flagellumtasche noch unselektiv [121]. Danach kommt es zur Sortierung und zum eventuellen Recycling der aufgenommenen Moleküle und anderer Komponenten innerhalb verschiedener Vesikel und tubulärer Membransysteme, die als Endosomen bezeichnet werden [80, 135].



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Endo- und Exozytose in *Trypanosoma brucei* [80].**

Dargestellt ist der posteriore Teil der Zelle mit der Flagellumtasche (FP), dem Mitochondrium (Mt), der kDNA (K). Ax = Axonem, BB = Basalkörper, CCVI / CCV II= Clathrin-umhüllte Vesikel Typ I/ Typ II, EE = frühes Endosom, LE= spätes Endosom, L = Lysosom, RE = Recycling Endosom, EXC = exozytotische carrier, ER = endoplasmatisches Retikulum, G = Golgi-Apparat, PFR = *paraflagellar rod*, PMT = pelliculare Mikrotubuli, SC = Oberflächenmantel, VSG = *Variant surface glycoprotein*, N = Nukleus, FAZ = flagellum attachment zone.

Die Aufnahme in die Zelle erfolgt immer über *clathrin-coated vesicle* vom Typ I (CCVI), die sich von der Flagellumtasche abschnüren [80] (Abbildung 9). In höheren Eukaryonten kann die Bildung dieser CCVI in 5 unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: die Initiation, die Frachtauswahl, den Zusammenbau des Clathrin-Mantels, die Abspaltung der Vesikel von der Membran und die Abspaltung des Clathrins von den CCVI [136]. In den ersten drei Phasen spielen Adaptine und andere Adaptorproteine eine sehr wichtige Rolle, wobei das Adaptorprotein AP2 von besondere Bedeutung ist [136]. Es spielt u.a. eine wichtige Rolle während der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch die Bindung an zytosolische Rezeptordomänen, jedoch kodiert



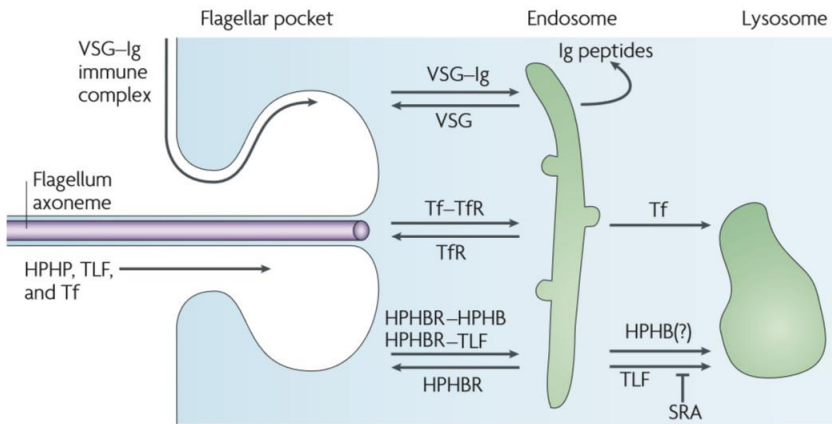
das trypanosomale Genom lediglich für AP1, AP3 und AP4, aber nicht für AP2, was für einen ungewöhnlichen Endozytosemechanismus in Trypanosomen spricht [137]. Die Abspaltung der CCVI von der Membran ist in höheren Eukaryonten von Dynamin abhängig [138], jedoch scheint die Vesikelabspaltung in *T. brucei* von Dynamin unabhängig zu sein [133]. Es konnten zwar zwei nahezu identische Dynamin Homologe identifiziert werden. Diese spielen aber keine Rolle in der Endozytose, sondern bei der Teilung des Mitochondriums [139]. Somit ist die Endozytose in Trypanosomen Clathrin-vermittelt aber Dynamin- und AP2 unabhängig [133]. Die meisten Proteinfamilien, die für den spezifischen Transport von Vesikeln nötig sind, wurden auch in Trypanosomen gefunden. So kodiert das trypanosomale Genom für 16 Rab und Rab-verwandte Proteine, sowie für 6 Arf und Arf-ähnliche Proteine, die alle an spezifischen Vesikelfusionen und an der Cytoskelett- und Proteininteraktionen beteiligt sind [140, 141]. In *T. brucei* konnten bisher fünf TbRab Proteine identifiziert und in endozytotischen Strukturen nachgewiesen werden: vier davon sind Bestandteile von frühen Endosomen (EE) oder dem Recycling (TbRab4, TbRab5A und TbRab5B und TbRab11), wohingegen TbRab7 in späten Endosomen (LE) und Lysosomen (L) gefunden wurde [137]. Das frühe Endosom ist das erste Kompartiment, das das mittels CCVI endozytierte Material aufnimmt [142]. Rab5 ist dabei ein wichtiger molekularer Marker, der an die zytosolische Oberfläche von EE Membranen bindet und für ihre Funktion unerlässlich ist [143]. In Trypanosomen wurden zwei Isoformen von Rab5 gefunden, TbRab5A und TbRab5B, die beide in frühen Endosomen lokalisiert sind [121, 137]. TbRab4 lokalisiert ebenfalls an die EE [144]. Zudem führt der leicht saure pH-Wert von 6,1 bis 6,8 in den EE [145] zu einer Dissoziation von Rezeptor und Ligand

[143]. Ab dem EE können zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen werden. So gelangen wiederzuwertende Substanzen (z.B. Rezeptoren) über TbRab11-positive Recycling Endosomen (RE) und TbRab11-positive exozytotische carrier (EXC) wieder zurück zur Flagellumtasche [80, 135], wohingegen abzubauenendes Material über TbRab7-positive späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert wird [80]. Eine zweite Klasse von CCVs (CCVII), können sowohl von den frühen Endosomen als auch von den Recycling Endosomen gebildet werden und zum späten Endosom transportiert werden [80].

### 1.7.3 Funktion der Endozytose in Trypanosomen

Die Endozytose spielt in Trypanosomen sowohl bei der Umgehung der Immunabwehr und der Virulenz der verschiedenen *T.brucei* Stämme, als auch bei der Versorgung mit Nährstoffen eine wichtige Rolle [121]. Da eine Infektion über Jahre andauern kann, müssen Mechanismen existieren, die das langfristige Überleben der Parasiten im Wirt sichern [146]. Im Blut des Säugetierwirtes sind die Trypanosomen von einem dicken Mantel aus ca.  $10^7$  VSG-Molekülen bedeckt [78]. Diese VSGs schützen konservierte Proteine auf der Plasmamembran gegen die Erkennung durch das Immunsystem [121]. Gegen die unterschiedlichen VSG-Varianten werden jedoch Immunglobuline gebildet, was zum schnellen Absterben der Parasiten führt, die diesen VSG-Typ exprimieren [103]. Deshalb existiert zur Beseitigung dieser VSG-spezifischen Antikörper von der Zelloberfläche ein einzigartiger Mechanismus (Abbildung 10). Hierbei werden VSG-Immunglobulin

Komplexe über die Flagellumtasche endozytiert, im sauren Milieu der Endosomen von VSG getrennt und letzteres zur Zelloberfläche zurücktransportiert und wiederverwertet [121]. Auch bei der Virulenz spielt die Endozytose eine entscheidende Rolle. So ist *T.b. brucei* nicht humanpathogen, da der Parasit durch den trypanosomalen lytischen Faktor (TLF) lysiert wird, wohingegen *T.b. rhodesiense* eine Resistenz gegen TLF besitzt [134]. TLF-1 und TLF-2 befinden sich beide in der HDL-Fraktion [26]. TLF-1 setzt sich aus dem Apolipoprotein A1, Apolipoprotein A2, der Paraoxonase und dem *Heptaglobin-related protein* (HPR) zusammen, wobei TLF-2 aus Apolipoprotein A1, IgM und HPR besteht [134]. HPR bindet an freies Hämoglobin (Hb) und wird durch den HPHbR (Heptaglobin-Hämoglobin Rezeptor) aufgenommen [128]. Apolipoprotein A1 zerstört nach der Aufnahme durch den Einbau von Poren die lysosomale Membranintegrität und führt damit zur Lyse der Parasiten [147]. Die TLF Resistenz von *T.b. rhodesiense* Stämmen wird durch das *serum resistance-associated* Protein (SRAP) hervorgerufen [134, 148].



**Abbildung 10: Nährstoffversorgung und Umgehung der Immunabwehr in *Trypanosoma brucei* [121].** Schematische Darstellung der Funktion der Endozytose und der Ablauf der Aufnahme von Transferrin (Tf), dem VSG-IgG Abbau und die Wirkung vom trypanosomalen lytischen Faktor (TLF) und dem *serum resistance-associated* (SRA) Protein.

Das in der Flagellumtasche und in den Endosomen lokalisierte SRAP bindet an die Carboxy-terminale Region von Apolipoprotein A1 und verhindert seine Wirkung auf die lysosomalen Membranen [121]. Trypanosomen beziehen auch einen Teil ihrer Nährstoffe über die Endozytose. Für das Wachstum benötigten sie geringe Mengen an Eisen, das sie über die Endozytose von Transferrin (Tf) aus dem Blut des Wirts über spezifische Transferrin-Rezeptoren (Tf-R) beziehen [121, 134]. Im Endosom dissoziiert das Tf vom Tf-R. Das Transferrin wird anschließend im Lysosom abgebaut und der Tf-R wird wieder zur Flagellumtasche recycelt [121]. Da die Blutform-Trypanosomen selbst keine eigene Fettsäure- und Sterolsynthese betreiben können, beziehen sie das für ihre Membranen benötigte Cholesterin über die Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL vom Wirt [149, 150]. Das *cysteine-rich acidic integral membrane protein* (CRAM) findet man ausschließlich in der

Flagellumtasche lokalisiert und es handelt sich dabei vermutlich um den LDL-Rezeptor [137].

#### 1.7.4 Der Transferrin-Rezeptor (Tf-R)

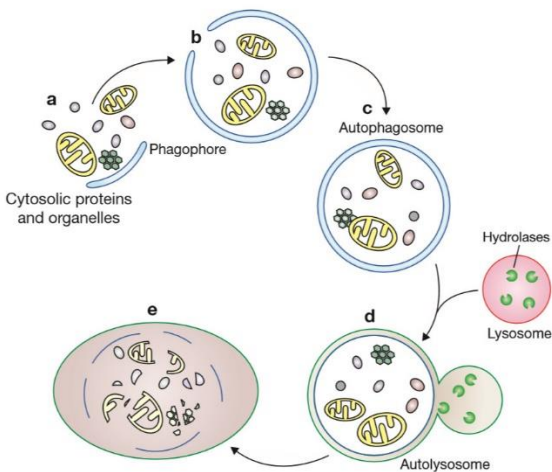
Obwohl Blutform-Trypanosomen keine Cytochrome besitzen [151], benötigen sie auch in diesem Differenzierungsstadium geringe Mengen an Eisen für ihr Wachstum [152] (nicht-Häm Eisenproteine). Dieses beziehen sie über die Rezeptor-vermittelte Endozytose von wirtsspezifischem Transferrin [129, 151]. Beim *T. b.* Tf-R handelt es sich um ein heterodimeres Protein, das durch ESAG 6 und ESAG 7 kodiert wird [113]. Beide Untereinheiten sind heterogen glykosylierte Proteine mit einer Größe von 50 - 60kDa für ESAG 6 und 40 - 42kDa für ESAG 7 [113, 151]. Die N-terminalen Bereiche beider Proteine sind nahezu identisch, wohingegen die C-terminalen Regionen deutliche Sequenzunterschiede aufweisen [151, 153]. Nur die hydrophobe C-terminale Domäne von ESAG 6 wird nachträglich durch GPI modifiziert, wodurch der Tf-R in der Plasmamembran verankert wird [113]. Beide Gene liegen in der polycistronischen Region der VSG- Expressionsstelle (VSG-ES) und sind dem VSG-Gen vorgeschaltet [154]. Es gibt in etwa 20 verschiedene VSG-Expressionsstellen, entsprechend der 11 Megabasen-Chromosomen, von denen immer nur eine zu einer bestimmten Zeit aktiv ist [112]. Jede dieser Expressionsstellen kodiert zwar für einen ähnlichen aber nicht für einen identischen Tf-Rezeptor [155], da sich ESAG6 und ESAG7 unterschiedlicher VSG-ES durch einen hypervariablen Bereich und damit

in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden [115, 153, 156]. Dadurch besitzen Tf-Rezeptoren verschiedener Expressionsstellen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Transferrin von unterschiedlichen Säugern, wodurch sich der Parasit dem wirtsspezifischen Transferrin anpassen kann [115]. Ansonsten weist der trypanosomale Tf-R eine VSG ähnliche Struktur auf und kann sich daher sehr gut in den dicht gepackten VSG-Mantel von Blutform-Trypanosomen eingliedern [151]. Alles in allem unterscheidet sich der trypanosomale Tf-R in der Sequenz, dem Aufbau der Untereinheiten, der Kopienanzahl pro Zelle und der Membranverankerung deutlich vom humanen Tf-R [151].

## 1.8 Autophagie in Trypanosomen

Das Wort Autophagie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den beiden Worten „auto“ (= selbst) und „phagein“ (= fressen) zusammen. Man kann zwischen verschiedenen Arten der Autophagie unterscheiden: Mitophagie, Pexophagie, *cytoplasm-to-vacuole targeting* (Cvt), *piecemeal microautophagy of the nucleus* (PMN), *chaperon-mediated autophagy* (CMA), Mikroautophagie und Makroautophagie [157]. Letztere ist die am besten untersuchte Form der Autophagie. Hierbei kommt es an einer beliebigen Stelle im Cytosol zur Neubildung einer Doppelmembran, der sogenannten Phagophore (Abbildung 11). Diese umschließt das abzubauen Material z.B. zytosolische Proteine oder ganze Organellen. Durch eine vollständige Schließung des Vesikels entsteht das Autophagosom. Dessen äußere

Membran verschmilzt mit einem Lysosom und bildet somit das Autolysosom. Die sauren Hydrolasen führen dann zum Abbau der inneren Membran, womit der Weg frei ist, so dass auch der abzubauenen Inhalt verdaut werden kann [158]. Aminosäuren, Basen, Fettsäuren etc. werden wieder an die Zelle abgegeben und können zur Energiegewinnung oder für Synthesen wiederverwertet werden.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Autophagie [158].**

Im Cytosol wird das abzubauenen Material durch die Phagophore eingeschlossen (a und b) und es kommt zur Bildung des Autophagosoms (c), die äußere Membran des Autophagosoms verschmilzt mit dem Lysosom zum Autolysosom (d) und der Inhalt wird durch die sauren Hydrolasen abgebaut (e).

In höheren Eukaryoten wird die Autophagie aufgrund unterschiedlicher extra- oder intrazellulärer Signale wie Nährstoffmangel, dem Fehlen von Wachstumsfaktoren, ER-Stress oder bei Infektionen induziert, um das Überleben der Zelle zu sichern [159]. Wird der Stress für die Zelle jedoch zu hoch, kann die Autophagie in den autophagischen Zelltod übergehen, der wiederum zur Apoptose oder Nekrose führen kann [160]. In Trypanosomen konnte gezeigt werden,

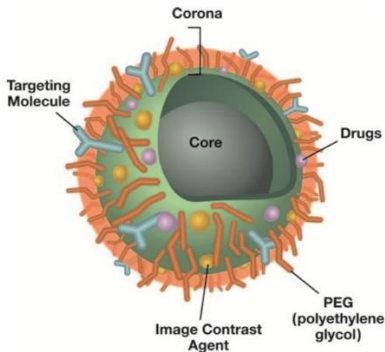
dass die Autophagie sowohl eine Rolle bei der Differenzierung [161] als auch bei Nährstoffmangel spielt [162]. Die molekulare Maschinerie wurde ausgiebig an *Saccharomyces cerevisiae* untersucht und wird hauptsächlich durch die *autophagy-related* (Atg) Proteine reguliert [163], von denen ca. 30 identifiziert wurden [164]. Bioinformatische Analysen zeigten, dass auch Trypanosomen einige dieser Atgs exprimieren, jedoch deutlich weniger als bei höheren Eukaryonten, was für eine vereinfachte Form der Autophagie sprechen könnte [165]. Bislang konnte dies aber nicht bestätigt werden [157].

## 1.9 Nanopartikel

In den späten 1970er-Jahren entdeckten Granqvist und Buhrman Nanopartikel und ihre besonderen Eigenschaften, wobei es sich um natürlich vorkommende Partikel handelte und ihr Beitrag an der Luftverschmutzung und ihr Einfluss auf die Gesundheit von Interesse war [166]. Die erste Publikation über den Gebrauch von Nanopartikeln als neues „*drug delivery system*“ erschien im Jahr 1978 durch Oppenheim und Speiser [167]. Daraufhin stieg das Interesse an Nanopartikeln stetig an und die Nanotechnologie entwickelte sich zu einem bedeutenden Forschungsgebiet des 21. Jahrhunderts. Nach der Definition der US *National Nanotechnology Initiative* (NNI) handelt es sich dabei um Objekte mit einer Größe von 1-100nm. Aufgrund ihrer geringen Größe sowie durch die Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung können sie in vielen medizinischen Bereichen angewendet werden, wie z.B. zum *targeting* einzelner Zellen, als



Medikamenten-*Carrier*, zur Diagnose oder als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie (MRT) (Abbildung 12) [168].



**Abbildung 12: Darstellung eines multifunktionalen Nanopartikels [168].**

Die „corona“ der Nanopartikel kann durch hydrophile Polymere (z.B. Polyethylenglykol, PEG), Medikamente, Kontrastmittel oder bestimmte Proteine verändert werden. Der Kern des Partikels kann fest (z.B. *quantum dots*) oder flüssig (z.B. Liposomen) sein.

Es kann zwischen verschiedenen Arten von Nanopartikeln unterschieden werden: Liposomen, Emulsionen, Polymere, keramische Partikel, metallische Partikel, Goldpartikel, Kohlenstoffpartikel und *quantum dots* (QDs) [169]. Liposomen besitzen einen Kern in welchen die Medikamente eingelagert werden können [170]. Dies erwies sich als Vorteil bei der Behandlung von Pilzkrankungen bei immunsupprimierten Patienten. Hier wurde Amphotericin B in Liposomen eingelagert, so dass die Nebenwirkungen, die bei systemischen Applikationen auftreten, deutlich reduziert werden [171]. Keramische Nanopartikel besitzen poröse Eigenschaften und können daher sehr gut zum Transport von Medikamenten verwendet werden [169, 172]. Ein Nachteil dieser Partikel besteht jedoch darin, dass sie aus anorganischen Materialien wie Silizium, Titan oder Aluminium

aufgebaut und dadurch biologisch nicht abbaubar sind [169]. Dadurch reichern sie sich im Körper an und führen zu unerwünschten Nebenwirkungen [169]. Im medizinischen Bereich sind metallische Nanopartikel aus Eisen, Kobalt oder Nickeloxid von besonderer Bedeutung, da sie aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften durch ein externes magnetisches Feld beeinflusst werden können [173]. Dadurch können die Nanopartikel gezielt in eine bestimmte Region im Körper dirigiert werden, um z.B. Medikamente oder Gene freizusetzen, oder sie können durch Energieübertragung zur hyperthermischen Behandlung von Krebs eingesetzt werden [174]. Magnetische Nanopartikel können auch als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) [175] oder zur magnetischen Trennung von Zellen verwendet werden [174]. Eisenoxidnanopartikel bieten im Gegensatz zu z.B. Kobaltpartikeln einige Vorteile, da sie nicht toxisch, biologisch verträglich und nach der Verabreichung biologisch abbaubar sind [176, 177]. Es kann zwischen drei verschiedenen Arten von Eisenoxidnanopartikeln unterschieden werden: Hämatit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) und Magnetit ( $\text{Fe}_2\text{O}_4$ ) [173]. Damit Eisenoxidnanopartikel zum zielgerichteten Medikamententransport verwendet werden können, müssen sie eine bestimmte Ausstattung besitzen, die sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt: einem magnetischen Kern, einer Polymerhülle und einer funktionalisierten Oberfläche [177]. Nanopartikel mit einem Kern aus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  eignen sich sehr gut für medizinische Anwendungen, da alle Eisenatome als 3-wertiges Eisen vorliegen [177]. Körpereigene Eisenatome liegen größtenteils ebenfalls in dieser Oxidationsstufe vor, weshalb diese Nanopartikel sehr gut verträglich sind [177]. Da Nanopartikel eine sehr reaktive Oberfläche besitzen, müssen die Kerne aus Eisenoxid für die

medizinische Anwendung durch Polymere wie z.B. Dextran [178], Polyethylenglykol [179] oder Polyvinylalkohol (PVA) [180] stabilisiert werden. Um die biologische Verträglichkeit zu steigern und um eine Aufnahme in die Zellen durch Pinozytose oder durch die Rezeptorvermittelte Endozytose zu sichern [129], können die Oberflächen noch mit Proteinen wie z.B. BSA [181] oder Transferrin (Tf) [182] modifiziert werden. Da die meisten Medikamente gar nicht oder nur schwach mit der Nanopartikeloberfläche wechselwirken, und es dann zu einer frühzeitigen unkontrollierten Freisetzung des Medikaments kommen kann, können die Partikel noch zusätzlich mit positiv geladenen Aminogruppen oder negativ geladenen Carboxygruppen modifiziert werden [177]. Dies ermöglicht die Anheftung positiv und negativ geladener Wirkstoffe an die Nanopartikeloberfläche. Durch die zusätzliche Kopplung eines Fluorophors wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kann sowohl die Route der Nanopartikel als auch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle verfolgt werden [183].

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Nanotechnologie bietet aufgrund der geringen Partikelgröße im Bereich von 1-100nm und der vielfältigen Möglichkeiten der Oberflächenmodifizierung ganz neue Möglichkeiten in der Behandlung von Krankheiten wie z.B. Krebs [184], Pilzinfektionen [171] oder auch parasitären Krankheiten [185]. Dadurch dass Medikamente in die Nanopartikel eingelagert oder angeheftet werden können [168, 186],

können zum einen die Löslichkeit der Medikamente erhöht und zum anderen deren Toxizität während der Verabreichung reduziert werden. Durch eine Modifizierung der Nanopartikel mit spezifischen Proteinen [181, 182] oder *Nanobodies* [187] ist sogar ein gezieltes *targeting* von einzelnen Organen wie z.B. dem Gehirn [188] oder einzelner Zellen möglich. Alle Medikamente, die man zu diesem Zeitpunkt auf dem Markt zur Behandlung der HAT findet, sind aus unterschiedlichen Gründen, wie z.B. starken Nebenwirkungen und Schwierigkeiten bei der Verabreichung durch eine schlechte Löslichkeit der Medikamente, nicht zufriedenstellend [51]. Nanopartikel könnten somit durch Ein- oder Anlagerung von Medikamenten einen neuen Ansatz bei der Behandlung der HAT bieten. Das Ziel dieser Arbeit besteht deshalb darin zu untersuchen, inwiefern keramische Siliziumpartikel und magnetische Eisenoxidnanopartikel zur Behandlung der HAT eingesetzt werden könnten. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Reinhard vom Leibniz-Institut für Neue Materialien in Saarbrücken und Prof. Dr. Wieder vom Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt. Hierfür sollte zunächst die Toxizität der Silizium- und Eisenoxidnanopartikel an *Trypanosoma brucei brucei* und an Erythrozyten getestet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein spezifischer Protein-*coat* nötig ist, um eine Endozytose der Partikel in die Parasiten zu erreichen oder ob auch unbeschichtete Partikel von den Trypanosomen aufgenommen werden können. Da aus unterschiedlichen Publikationen bekannt ist, dass Serumproteine die Aufnahme von Nanopartikeln beeinflussen können [189-193], wurden alle Versuche sowohl unter serumfreien als auch unter serumhaltigen Bedingungen durchgeführt. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln sollte die Aufnahmekinetik der

unbeschichteten und proteinbeschichteten Eisenoxidnanopartikel in serumhaltigen und serumfreien Medien mittels Durchflusszytometrie analysiert und miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollte die Aufnahme der Partikel und ihre genaue Lokalisation innerhalb der Zelle noch zusätzlich mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) näher untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen und Zellen

#### 2.1.1 Verwendete Trypanosomen

In dieser Arbeit wurde der monomorphe *Trypanosoma brucei brucei* Stamm MITat 1.2 (*Molteno Institut Trypanozoon antigenic type*, Cambridge) verwendet, der aus dem Stamm Lister 427 kloniert wurde [78] und die Antigenvariante 221 exprimiert.

#### 2.1.2 Verwendete Erythrozyten

Die verwendeten Erythrozyten wurden aus dem Blut von gesunden Freiwilligen ohne bekannte Vorerkrankungen isoliert und in EDTA gesammelt (Transfusionsmedizin Tübingen). Sie wurden *in vitro* mit einem Hämatokrit von 0,4% in Ringerlösung inkubiert. Dafür lag die Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor (Nr.343/2008B02).

### 2.1.3 Verwendete Versuchstiere

Für die Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten, dienten Ratten der Rasse „Wistar Han“ (Harlan Laboratories, Horst (NL)). Die Tiere erhielten R7M-H Alleinfutter (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Verwendete Nanopartikel

Die verwendeten Nanopartikel wurden am Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken synthetisiert. Der Feststoffgehalt und die Größe sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. Alle Nanopartikel waren in destilliertem Wasser suspendiert.

**Tabelle 2: Verwendete Nanopartikel**

<b>Partikelsuspension in Wasser</b>	<b>Feststoff- gehalt [Gew. %]</b>	<b>Größe [nm]</b>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9,50	28
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -AllylthioNeu5Ac	2,87	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -APS	0,98	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NANA	1,73	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA	0,29	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA	0,43	10

<b>Partikelsuspension in Wasser</b>	<b>Feststoff- gehalt [Gew. %]</b>	<b>Größe [nm]</b>
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-BSA-FITC	0,61	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-DTAF	0,31	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf	0,22	10
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf-FITC	0,43	10
SiO <sub>2</sub>	0,50	8
SiO <sub>2</sub> -APTES-FITC	0,52	8

### 2.2.2 Chemikalien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma, Standort</b>
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar100	Plano, Wetzlar
2'Desoxythymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bathocuproindisulfonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzyldimethylamin	Plano, Wetzlar
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
cis-Aconitat	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+) Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEAE-Sephacel	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dodeceny succinicanhydrid	Plano, Wetzlar
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Entwicklerkonzentrat Adefodur	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Fixierkonzentrat Adefodur	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Fötales Rinderserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe



<b>Chemikalie</b>	<b>Firma, Standort</b>
Glutaraldehyd für EM, 25%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin, 87% und 100%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
MEM essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma, Standort</b>
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEM Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methylnadicanhydrid	Plano, Wetzlar
Mercaptoethanol	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Myristinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumbicarbonat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 100fach	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propylenoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt
Serum Plus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uranylacetat	Plano, Wetzlar
Wasser reinst (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Firma, Standort</b>
6-, 12-, 24-, 48- und 96- <i>well</i> -Platten	Greiner, Frickenhausen
Beem®-Cups	Plano, Wetzlar
Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Cups	Greiner, Frickenhausen
Falcon-Tubes (15ml und 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Carestream® Kodak® electron microscopy film 4489, sheet size 3 1/4 in. × 4 in.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kunststoff-Pasteurpipetten, steril	Greiner, Frickenhausen
Kunststoff-Pasteurpipetten, unsteril	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfernetzchen (200- und 400 square mesh)	Plano, Wetzlar
Millex-PES-Filtereinheiten (0,22µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Papier-Rundfilter, versch. Größen	Macherey-Nagel, Düren
Pipettenspitzen, versch. Größen	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen-Sterilfilter (0,22µm)	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.2.4 Geräte

**Tabelle 5: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
AxioCamMRm	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank <i>Hera Cell</i> (37°C, 5% CO <sub>2</sub> -Begasung)	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer <i>FACSCantoll</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader <i>MRX-II Revelation</i>	Dynex, Chantilli (USA)
Fluoreszenzmikroskop BH2 RFCA	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver.Z1	Zeiss, Oberkochen
Hämozytometer nach Neubauer (Tiefe 0,02mm)	Brand, Wertheim
Invertmikroskop ID 02	Zeiss, Oberkochen
Kamera U-PMTVC	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop <i>Axiostar Plus</i>	Zeiss, Oberkochen
LKB 11800 Pyramitone	LKB, Stockholm (S)
Mikrofuge E	Beckmann, München
Mikropipetten	Gilson, Middleton (USA)
Mikrozentrifuge <i>MC-13</i>	Heraeus, Osterode
Ofen	WTB Binder GmbH Labortechnik, Tuttlingen
pH-Meter pH539	WTW, Weilheim
Röntgenfilm-Prozessor Konica SRX-101A	Konica, Taiwan
Schnellkochtopf	CS Solingen, Solingen
Sterilbank <i>LaminAir</i> HLB 2248 GS	Heraeus, Osterode
Sterilpumpe	Microgon, Laguna Hills (UK)

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller, Standort</b>
Transmissionselektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom OM U3	C. Reichert, Wien (A)

## 2.2.5 Software und Datenbanken

**Tabelle 6: Verwendete Software und Datenbanken**

<b>Software</b>	<b>Firma und <i>home page</i></b>
AxioVision 4.8.2	Zeiss, Oberkochen
Cyflogic 1.1	CyFlo Ltd, Turku, Finnland
EndNote X4.0.2	Thomson Reuters, New York, USA
FACSDiva	Becton Dickinson & Co, New Jersey, USA
GIMP 2.8.14	<a href="http://www.gimp.org">www.gimp.org</a>
Microsoft Office 2013	Microsoft, Unterschleißheim
OriginPro 8 SR1	OriginLab, Northhampton, MA, USA
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>

## 2.3 Medien, Puffer, Lösungen

### 2.3.1 Medien für die Zellkultur

#### 2.3.1.1 GRUNDMEDIUM

Das MEM-Medium wurde nach einem Standardprotokoll [194] hergestellt und nach Duszenko et al. modifiziert [195, 196].

<b>Substanz</b>	<b>[mg/l]</b>
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	265
KCl	400
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	200
NaCl	6800
HEPES	7140

Nach dem Einwiegen der Salze und des HEPES, wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und folgende Aminosäuren und Adenosin darin gelöst.

<b>Substanz</b>	<b>[mg/l]</b>
L-Arginin x HCl	126
L-Histidin x HCl x H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucin	52
L-Lysin	73
L-Methionin	60
L-Phenylalanin	100
L-Threonin	48
L-Tryptophan	100

<b>Substanz</b>	<b>[mg/l]</b>
L-Tyrosin	100
L-Valin	46
L-Ornithin x HCl	50
Adenosin	12

Anschließend wurden die folgenden kommerziellen Lösungen hinzugegeben.

<b>Substanz</b>	<b>[ml/l]</b>
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	10
MEM-Vitaminlösung	10

Das Grundmedium wurde mit einer Pumpe und einem Filter mit einer *surfactant-free cellulose acetate* (SFCA)-Membran steril filtriert und konnte bei 4°C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

2.3.1.2 BLUTFORM-MEDIUM (BF-MEDIUM)

Dem Grundmedium (2.3.1.1) wurden folgende Substanzen zugegeben:

<b>Substanz**</b>	<b>[mg/l]</b>
NaHCO <sub>3</sub> (75,0 mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	30
L-Glutamin (29 mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	10
L-Cystein (3,03 mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	10
2'-Desoxythymidin (0,39 mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	10
Hypoxanthin (1,36 mg/ml in 0,1M NaOH)	10
BCS (0,56 mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	1
BSA/Myristinsäure *	20
Penicillin/ Streptomycin	5
Glucose x H <sub>2</sub> O	5940
FCS (30min bei 56°C inaktiviert)	150

\* Für diese Lösung wurde 1g entfettetes BSA in 20ml *Aqua dest.* gelöst und in 10µl Schritten unter Rühren nach und nach mit Myristinsäure (24mg in 100µl Ethanol) versetzt. Es wurden 20ml-Aliquots angefertigt und bei -20°C gelagert.

\*\* Für das serumfreie BF-Medium wurde das Serum durch die Zugabe von Grundmedium (2.3.1.1) ersetzt.

Der pH-Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls mit NaOH auf 7,4 nachtitriert. Nach dem Sterilfiltrieren war das BF-Medium für 4 Wochen bei 4°C haltbar.



2.3.1.3 HMI9-MEDIUM

Für das 1-fach konzentrierte HMI9-Medium wurde zunächst das *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM)-Grundmedium aus folgenden Substanzen hergestellt.

Substanz *	[g/l]
IMDM	35,4
NaHCO <sub>3</sub>	3,02

\* Für das 2-fache HMI9-Medium wurden beide Substanzen in 355ml *Aqua dest.* gelöst.

Der pH wurde auf 7,2 eingestellt und mit *Aqua dest.* auf 1000ml aufgefüllt (bei dem 2-fachen HMI9-Medium wurde auf 355ml aufgefüllt). Daraufhin wurden folgende Substanzen hinzugegeben:

Substanz**	[ml/l]
IMDM-Grundmedium	890
L-Cystein (18,2mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	11
Pyruvat (110mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	1,11
2'-Desoxythymidin (39mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	1,11
Hypoxanthin (1,36g in 100ml 4%-iger NaOH)	11
BCS (28,2mg/ml in <i>Aqua dest.</i> )	1,11
2-Mercaptoethanol	0,0155
Penicillin/ Streptomycin	11
FCS (30min bei 56°C inaktiviert)	110
Serum Plus	110

Vor der Zugabe von Serum und Serum Plus wurde der pH nochmals kontrolliert und wenn nötig auf pH 7,4 nachtitriert. Die beiden Seren wurden vor dem Filtrieren steril hinzugegeben und das Medium bei 4°C gelagert.

\*\* Für das 2-fache HMI9 Medium wurden 316ml IMDM-Medium\* abgefüllt und mit den oben genannten Substanzen versetzt. Die beiden Seren wurden beim serumfreien Medium durch die Zugabe von 1-fach konzentriertem IMDM-Grundmedium ersetzt.

### 2.3.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### Separationspuffer, pH 8

<b>Substanz</b>	<b>[g/l]</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	20,41	57
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,41	3
NaCl	2,57	44
Glucose x H <sub>2</sub> O	10,91	55

#### Regenerationspuffer, pH 3

<b>Substanz</b>	<b>[g/l]</b>	<b>Konzentration [M]</b>
NaCl	54,44	1

Der Regenerationspuffer wurde nach der pH-Wert Einstellung mit einer Spatelspitze Natriumazid versetzt.

Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4

Substanz	[g/l]	Konzentration [mM]
NaHPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,76	7,7
KCl	0,65	8,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,32	2,3
NaCl	7,01	120

Trypanosome dilution buffer (TDB), pH 7,7

Substanz	[g/l]	Konzentration [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	6,45	18
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,28	2
KCl	0,37	5
NaCl	4,67	80
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,25	1
Glucose x H <sub>2</sub> O	3,96	20

Citrat-Glucose Antikoagulans (CGA), pH 7,7

Substanz	[g/l]	Konzentration [mM]
Na <sub>3</sub> -Citrat x 2H <sub>2</sub> O	29,91	102
Glucose x H <sub>2</sub> O	7,93	40

Einfriermedium für die Herstellung von Trypanosomen-Stabilaten

Substanz	[ml/100ml]	Endkonzentration
TDB	77,00	
Glycerin, 87%	23,00	20%

Ringerlösung, pH 7,4

<b>Substanz</b>	<b>[g/l]</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
NaCl	7,31	125
KCl	0,37	5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,29	1,2
HEPES	7,67	32,2
Glucose x H <sub>2</sub> O	0,90	5
CaCl <sub>2</sub>	0,11	1

FACS-Puffer, pH 7,4

<b>Substanz</b>	<b>g/l</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3,5	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,7	5,6
KCl	0,37	5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2	0,8
NaCl	5,84	100
Glucose x H <sub>2</sub> O	4,0	20

### 2.3.3 Elektronenmikroskopie

#### Cacodylatpuffer (200mM), pH 7,4

<b>Substanz</b>	<b>[g/l]</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
Na-Cacodylat x 3H <sub>2</sub> O	42,8	200
Saccharose	80,0	234

#### Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (v/v)

2% Glutaraldehyd (25%ige Lösung) in 100mM Cacodylatpuffer

#### Osmiumtetroxid-Stammlösung (3%ige) (w/v)

0,5g Osmiumtetroxid gelöst in 16,36ml *Aqua bidest.*

#### Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer (w/v)

1,5% OsO<sub>4</sub>-Lösung (3%ige Stammlösung) in 100mM Cacodylatpuffer

#### Uranylacetat-Stammlösung (5%ige) (w/v)

50mg/ml Uranylacetat wurden in *Aqua bidest.* gelöst. Die Lösung wurde mindestens einen Tag vor Gebrauch angesetzt und vor Benutzung 1min bei 17.000g zentrifugiert. Nur der klare Überstand wurde verwendet.

### Einbettungsharz: Zusammensetzung für eine Einbettung

<b>Substanz</b>	<b>Menge [g]</b>
Agar 100	2,00
DDSA	1,00
MNA	1,08
BDMA	0,04

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Sterile Isolierung von *Trypanosoma brucei* aus Rattenblut und die Herstellung von Stabilaten

Zur Vermehrung von Blutform-Trypanosomen des monomorphen Stammes 221 wurde eine Ratte mit  $5 \times 10^7$  Zellen intraperitoneal infiziert. Nach ungefähr 3 Tagen erreichte die Parasitämie eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen pro ml im Blut. Zur Blutentnahme wurden der Ratte 400 $\mu$ l 50% (w/v) Chlorhydrat intraperitoneal injiziert und das Tier damit narkotisiert. Anschließend wurde die Ratte ventral mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und die Haut im Bereich des Brustkorbes mit einer chirurgischen Schere entfernt. Der Thorax wurde unterhalb des *Sternums* zu den Vorderbeinen hin V-förmig geöffnet, wobei Rippen und Zwerchfell durchtrennt wurden. 1ml eiskaltes CGA wurde in die Brusthöhle vorgelegt und die *Vena cava* durchtrennt. Das Blut wurde mit einer sterilen Pipette am *Recessus pleuralis* abgenommen und mit 2ml CGA verdünnt. Dann wurde das Herz mit einer Organhaltepinzette fixiert und der linke Ventrikel mit einer 17

*gauge* Kanüle punktiert. Das Gefäßsystem wurde mit CGA perfundiert, bis sich die Leber entfärbt hatte. Das austretende Blut wurde durchgehend steril abpipettiert. Das entnommene Rattenblut wurde für 10min bei 2000g zentrifugiert, der *buffy coat* abgenommen und in ca. 3ml Separationspuffer resuspendiert. Zur Abtrennung der Trypanosomen aus dem gewonnenen Blut wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt [197]. Hierzu wurden in etwa 70ml Diethylaminoethyl-Sepharose in einer Säule mit ca. 200ml eiskaltem Separationspuffer äquilibriert und der *buffy coat* aufgetragen. Durch Anlegen eines Vakuums und gleichzeitigem Spülen mit eiskaltem Separationspuffer wurden die Trypanosomen eluiert. Der Durchlauf wurde erneut zentrifugiert (1500g, 4°C, 5min) und der Überstand verworfen. Die Trypanosomen wurden in TDB resuspendiert, ausgezählt und auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^8$  Zellen/ml angesetzt und 1:1 mit Einfriermedium gemischt. Es wurden 1ml- Aliquote angefertigt, mit -1K/min auf -80°C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Herstellung von Trypanosomenstabilaten, die zu der Infektion von Ratten dienen, wurde das Blut nicht zentrifugiert, sondern gleich in CGA auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt und mit Einfriermedium verdünnt. Das Einfrieren erfolgte analog zu den Kulturstabilaten.

#### 2.4.2 Axenische Kultivierung von Blutform-Trypanosomen, Stamm 221, aus Stabilaten

Die axenische Kultivierung erfolgte aus Stabilaten. Hierzu wurden diese sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter unter lauwarmem fließendem Wasser aufgetaut. Zum Waschen wurden die Zellen in ein Falcon Tube mit 9ml eiskaltem Blutform-Medium (2.3.1.2) überführt und bei 1500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1-2ml verworfen, die Zellen resuspendiert und die Zellzahl in einer 1:100 Verdünnung mit einem Hämozytometer ermittelt. Die Vorkultur wurde auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml mit vorgewärmtem Blutform-Medium angesetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Begasung kultiviert. Nach ca. 22-24h erreichte die Vorkultur eine Zelldichte von  $8 \times 10^5$  bis  $1,2 \times 10^6$  Zellen/ml, diese wurde dann, sofern nicht anders angegeben, als Hauptkultur für die jeweiligen Experimente wieder auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Für die Durchführung der Experimente in HMI9-Medium (2.3.1.3) wurden die Zellen analog vorbereitet, es wurde lediglich das BF-Medium bei allen Schritten durch HMI9-Medium ersetzt.

#### 2.4.3 Zytotoxizitätsbestimmung durch Wachstumskurven

Wachstumskurven stellen eine einfache und schnelle Methode dar, um die toxische Wirkung von Nanopartikeln auf Trypanosomen zu untersuchen [198]. Hierfür wurden die Parasiten wie unter 2.4.2 auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit



unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen im Bereich von 0,1µg/ml - 100µg/ml für SiO<sub>2</sub>-Partikel, 0,1µg/ml - 1000µg/ml für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA/-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf/-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA Partikel bzw. 0,1µg/ml - 2000µg/ml für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA/-FITC Partikel behandelt. Als Kontrolle diente immer die Zellsuspension unter Zugabe des größten Volumens an Lösungsmittel (Wasser), dass den Zellen in der höchsten Verdünnung zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte unter normalen Kultivierungsbedingungen bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>-Begasung) und die Zelldichte wurde zweimal täglich mittels eines Hämozytometers bestimmt, bis nahezu alle Zellen tot waren. Für die Inkubation unter serumfreien Bedingungen, wurden die Zellen vor dem Versuchsstart lediglich dreimal mit eiskaltem serumfreiem Kulturmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml angesetzt, die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mittels dem Computerprogramm OriginPro 8 SR1.

#### 2.4.4 TC<sub>50</sub>-Bestimmung in Erythrozyten (Häm-Assay)

Häm-Assays eignen sich, um die Toxizität von Siliziumpartikeln (SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC) und Eisenoxidnanopartikeln (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf) auf Erythrozyten zu untersuchen [199, 200] . Hierfür wurde 1ml Ringerlösung (2.3.2) mit der entsprechenden Nanopartikelkonzentration im Bereich von 0,1µg/ml - 100µg/ml für SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC und 0,1µg/ml - 500µg/ml für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf mit jeweils 0,4% Hämatokrit versetzt. Nach einer

3- stündigen Inkubation bei 37°C wurden jeweils 700µl der entsprechenden Suspension in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und für 5min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Als Kontrolle und zur Ermittlung einer Kalibrierungsgeraden, wurde einmal die höchste eingesetzte Menge an Lösungsmittel (Wasser) und einmal die entsprechende Menge an Ringerlösung verwendet. Es wurden ebenfalls 700µl entnommen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Kontrollen wurden durch Zugabe von 700µl Ampuwa Wasser lysiert und eine Kalibrierungsgerade durch eine kontinuierliche Verdünnung (100%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 1%) erstellt. 150µl des Überstandes der jeweiligen Kontrolle oder Verdünnung wurden in eine 96-well Platte überführt und die Lyse durch eine Absorptionmessung bei 405nm ermittelt (ELISA Reader MRXII, DYNEX). Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung.

### 2.4.5 Durchflusszytometrie

Die Aufnahmekinetik von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln wurde mittels Durchflusszytometrie [201] untersucht. Dafür wurden die Parasiten wie unter 2.4.2 angesetzt. Für die 1-stündigen Experimente wurden die Trypanosomen auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und für alle längeren Zeitpunkte (3h, 6h, 12h und 24h) auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen im Bereich von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  -  $1000 \mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC bzw.  $0,1 \mu\text{g/ml}$  -  $2000 \mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kontrollzellen, die unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden. Um die Reaktion zu stoppen und um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen, wurden die Zellen nach der Nanopartikelbehandlung dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer (2.3.2) gewaschen ( $17.000\text{g}$ ,  $30\text{s}$ , Raumtemperatur) und in FACS-Puffer resuspendiert ( $\sim 1 \times 10^6$  Zellen/ml). Für die Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden die Zellen vor der Nanopartikelbehandlung dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt, jeweils  $10.000$  Zellen gemessen (FACSCantoll, Becton) und mit der Cyflogic Software ausgewertet.

## 2.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.4.6.1 FLUORESZENZMIKROSKOPIE MIT ERYTHROZYTEN

0,4% Hämatokrit wurden in Ringerlösung (2.3.2) mit 15µg/ml der SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC Partikelsuspension bei 37°C für 45min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 400g für 5min zentrifugiert, dreimal mit 1ml Ringerlösung gewaschen (400g, 5min) und in Ringerlösung resuspendiert. 20µl der Probe wurden auf einem Objektträger ausgestrichen, 1-2min an der Luft getrocknet und mit einem Deckglas bedeckt. Die lebenden Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH2 RFCA) betrachtet. Fotos wurden mit der Kamera Olympus U-PMTVC gemacht.

### 2.4.6.2 FLUORESZENZMIKROSKOPIE MIT TRYPANOSOMEN

Trypanosomen wurden wie unter 2.4.2 beschrieben kultiviert, auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 1000µg/ml der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Nanopartikelsuspension bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kontrollzellen, die unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen bei 1500g für 5min bei 4°C abzentrifugiert, dreimal in jeweils 1ml eiskaltem TDB (2.3.2) gewaschen (1500g, 5min, 4°C) und in TDB resuspendiert ( $\sim 1 \times 10^6$  Zellen/ml). 10-20µl Probe wurden auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt, und die lebenden Zellen unter dem

Fluoreszenzmikroskop (AxioObserverZ.1, Zeiss) betrachtet. Fotos wurden mit der Kamera AxioCamMRm (Zeiss) gemacht.

## 2.4.7 Elektronenmikroskopie

### 2.4.7.1 NEGATIV KONTRASTIERUNG

Für die Negativkontrastierung wurden die Stammlösungen der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikelsuspensionen (siehe Tabelle 2.2.1) ca. 1:20 verdünnt. Anschließend wurden die Kupfergrids (400 *square mesh*) in die Nanopartikelsuspensionen eingetaucht und an der Luft eingetrocknet. Dann erfolgte die Analyse der Proben in Saarbrücken unter dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-2010 (JEOL, Tokyo, Japan).

## 2.4.7.2 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)

### 2.4.7.2.1 INKUBATION VON TRYPANOSOMEN MIT NANOPARTIKELN UNTER SERUMHALTIGEN BEDINGUNGEN

BF-221 wurden wie unter 2.4.2 beschrieben angesetzt, die Hauptkultur auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und die Trypanosomen mit einer Konzentration von jeweils  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC oder  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel für die unterschiedlichen Zeitpunkte (1,5h, 12h, 24h) oder mit  $50\mu\text{g/ml}$  der  $\text{SiO}_2$ -Partikel für 24h inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kontrollzellen, die unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden. Daraufhin folgte die Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie [91].

### 2.4.7.2.2 INKUBATION VON TRYPANOSOMEN MIT EISENOXID- NANOPARTIKELN UNTER SERUMFREIEN BEDINGUNGEN

Die Vorkultur wurde wie unter 2.4.2 angesetzt. Anschließend wurden die Trypanosomen vor dem Versuchsstart dreimal mit serumfreiem Kulturmedium bei  $1500g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5min gewaschen und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC oder  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel für 1h unter normalen Kultivierungsbedingungen inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) und dann für das

TEM vorbereitet. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kontrollzellen, die unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert und eingebettet wurden.

#### 2.4.7.2.3 INKUBATION VON TRYPANOSOMEN MIT EISENOXIDNANOPARTIKELN BEI 4°C

Die Trypanosomen wurden wie unter 2.4.7.2.2 auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit jeweils 1000µg/ml der entsprechenden Partikel-Charge (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC) für 1h bei 4°C inkubiert. Bei diesem Experiment war darauf zu achten, dass alle verwendeten Materialien (Medien, Falcons, Zellkulturflaschen, Pipettenspitzen etc.) vor dem Versuchsstart auf 4°C gekühlt waren und alle Schritte bis zur Fixierung der Zellen bei 4°C durchgeführt wurden, um eine Aufnahme der Nanopartikel in die Parasiten zu verhindern. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Kontrollzellen, die unter den gleichen Kultivierungsbedingungen inkubiert wurden. Anschließend folgte die Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie.

#### 2.4.7.2.4 EINBETTUNG DER PROBEN IN EPOCHARZ

Nach der Inkubation der Trypanosomen mit Nanopartikeln unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (2.4.7.2.1, 2.4.7.2.2, 2.4.7.2.3) erfolgte die Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie. Für eine Einbettung wurden mindestens  $5 \times 10^7$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach der Nanopartikelbehandlung dreimal mit eiskaltem TDB (2.3.2), in einem Volumen entsprechend der Hälfte des Volumens der Kultur, gewaschen. Anschließend mit 500µl 2% (v/v) Glutaraldehyd in 1-fach Cacodylatpuffer für 1h bei 4°C fixiert, viermal für 10min in 1ml 1-fach Cacodylatpuffer gewaschen und dann nochmal 1h bei 4°C in 500µl 1,5% (w/v) Osmiumtetroxid in 1-fach Cacodylatpuffer fixiert und kontrastiert. Dann wurde, jeweils für 10min, nochmals zweimal mit 1ml 1-fach Cacodylatpuffer und einmal mit 1ml *aqua bidest.* gewaschen. Die Proben wurden für 1h bei Raumtemperatur in 500µl 0,5% (w/v) Uranylacetat inkubiert, einmal mit 1ml *aqua bidest.* gewaschen und in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 1ml Ethanol (50%, 70% 95% und dreimal in 100% (v/v) Ethanol) für jeweils 10min entwässert. Danach wurden die Proben dreimal für 10min mit 1ml Propylenoxid gewaschen und dann für 1h bei Raumtemperatur in 1ml 50% Eponharz in Propylenoxid inkubiert. Die Einbettung erfolgte durch Überführung der Proben in 100% Eponharz in Beem-Cups (Plano, Wetzlar) und eine nochmalige Inkubation für 1h bei Raumtemperatur. Für die Polymerisation wurden die Proben für 12h bei 45°C und 24h bei 60°C in einem Ofen (WTB Binder GmbH Labortechnik, Tuttlingen) inkubiert. Nach der Aushärtung des Harzes wurden sie aus den Beem-Cups entfernt und die Spitze mit dem LKB 11800 Pyramitone zu einem Trapez



getrimmt. Es wurden Ultradünnschnitte mit dem Ultramikrotom OM U3 (Reichert, Wien) mit einer Dicke von 60-90nm angefertigt und die Schnittreihen auf Kupfergrids (200 *square mesh*) gefischt. Eine Nachkontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat wurde nicht durchgeführt, da die Nanopartikel sonst nur schwer unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Die Mikroskopie erfolgte an einem EM 10 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) und Bilder wurden mit der ColorView12 Kamera gemacht. Für die Aufnahmen wurden Schwarzweiß-Negativfilme Carestream®Kodak® Elektronenmikroskopie Filme 4489 (3,25 x 4 Inch) verwendet und mit dem Fixier- und Entwicklerkonzentrat Adefodur (Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach) im Röntgenfilm- Prozessor Konica SRX-101A entwickelt.

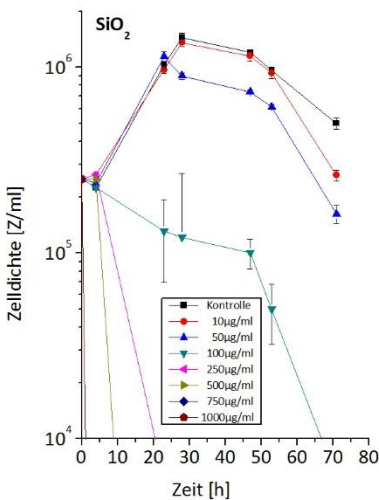
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zytotoxischer Effekt von Silizium- und Eisenoxidnanopartikeln auf *Trypanosoma brucei* unter serumhaltigen Bedingungen

Um den zytotoxischen Effekt von Silizium- und Eisenoxidnanopartikeln auf *Trypanosoma brucei brucei* zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumskurven angefertigt. Hierzu wurden die Parasiten wie unter 2.4.3 beschrieben auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt. Anschließend wurden sie mit den verschiedenen Nanopartikel-Chargen ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA/-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA/-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf/-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -AllylthioNeu5Ac,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NANA) und den unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  für die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA/-FITC Partikel) bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Die Zelldichte wurde mittels einer Neubauer Zählkammer zweimal täglich ermittelt, bis nahezu alle Zellen tot waren.

### 3.1.1 SiO<sub>2</sub>-Partikel

Die SiO<sub>2</sub>-Partikel hatten eine Größe von ~ 8nm und zeigten einen deutlichen dosisabhängigen zytotoxischen Effekt auf die Trypanosomen. Dabei war bis zu einer Konzentration von 10µg/ml kein Einfluss auf die Proliferation festzustellen und das Wachstum verglichen mit dem der unbehandelten Kontrollzellen war praktisch identisch.



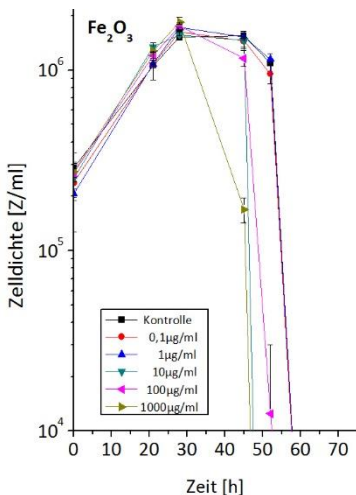
**Abbildung 13: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der SiO<sub>2</sub>-Partikel (~ 8nm) auf *Trypanosoma brucei*.** BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit unterschiedlichen SiO<sub>2</sub>-Partikel Konzentrationen (10µg/ml - 1000µg/ml) behandelt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in BF-Medium. Der Versuch wurde als Duplikat durchgeführt und die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.

Ab 50µg/ml war ein minimaler zytotoxischer Effekt zu erkennen, der mit aufsteigender Konzentration deutlich zunahm, wobei ab 100µg/ml die Proliferation vollständig inhibiert war. Die Behandlung mit 250µg/ml führte nach ca. 20h und die mit 500µg/ml nach ca. 10h zum Absterben

der Kultur. Die Inkubation mit noch höheren Konzentrationen (750µg/ml oder 1000µg/ml) führte bereits kurz nach der Zugabe der SiO<sub>2</sub>-Partikel zum Absterben der Parasiten (Abbildung 13).

### 3.1.2 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partikel

Die Eisenoxidpartikel ( ~ 30nm) zeigten nur einen minimalen zytotoxischen Effekt auf die Parasiten.



**Abbildung 14: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partikel ( ~ 30nm) auf *Trypanosoma brucei*.**

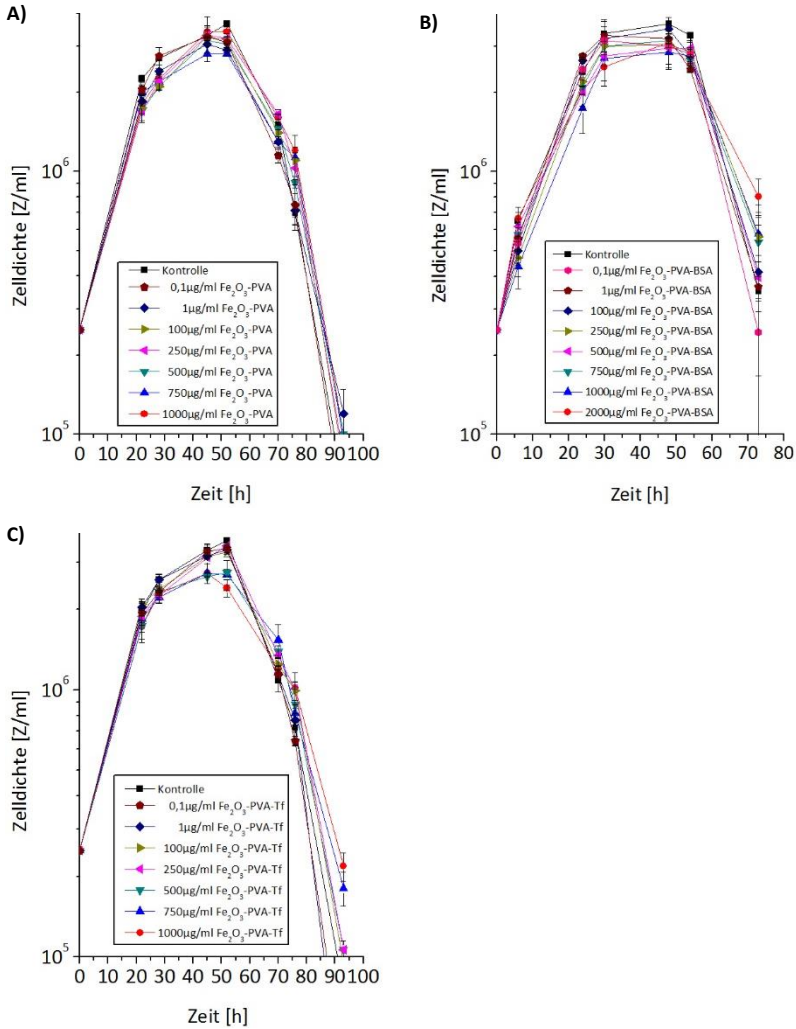
BF-221 wurden auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit unterschiedlichen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- Partikel Konzentrationen (0,1µg/ml - 1000µg/ml) behandelt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in BF-Medium. Die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.

In der exponentiellen Wachstumsphase war im gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml fast kein Unterschied

in der Proliferation, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, zu erkennen. Ab einer Konzentration von 10µg/ml zeigte sich eine verkürzte stationäre Phase und die Parasiten starben früher als die Kontrollzellen ab. Dieser Effekt verstärkte sich mit ansteigender Konzentration. Bei der Inkubation mit 1000µg/ml starben die Zellen direkt nach der exponentiellen Phase ab und die stationäre Phase blieb völlig aus (Abbildung 14).

### 3.1.3 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Eisenoxidnanopartikel mit dem Polymer Polyvinylalkohol (PVA) beschichtet, um sie im Medium zu stabilisieren. Es sollte zudem untersucht werden, ob eine spezifische Proteinbeschichtung der Eisenoxidnanopartikel nötig ist, um eine Aufnahme in Trypanosomen zu erreichen und ob diese unterschiedlichen Beschichtungen einen Einfluss auf die Zytotoxizität haben. Deshalb wurde zu Beginn die Wirkung von drei unterschiedlichen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partikeln untersucht: ein unbeschichteter (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA) und zwei proteinbeschichtete Partikeltypen. Ein Partikeltyp wurde mit BSA beladen (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA) und der zweite mit humanem Transferrin (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf), da aus der Literatur bekannt ist, dass Trypanosomen BSA über die Pinozytose und Tf über die Rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen [129].



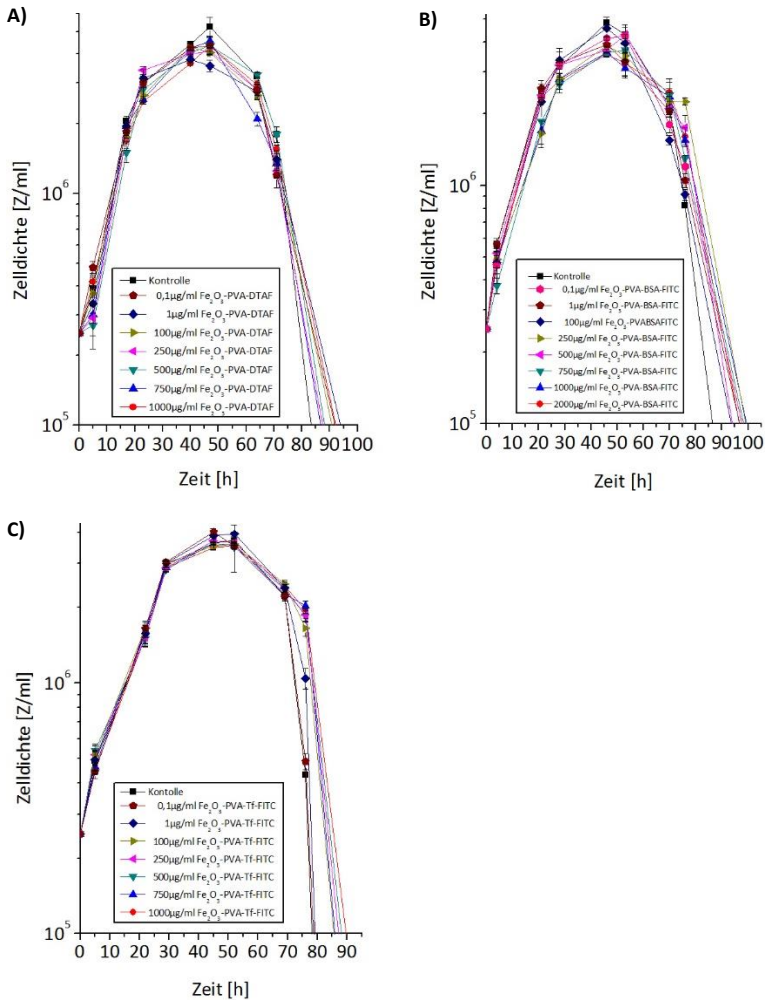
**Abbildung 15: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf Partikel auf *Trypanosoma brucei*.**

BF-221 wurden auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen (0,1µg/ml - 1000µg/ml für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf bzw. 0,1µg/ml - 2000µg/ml für Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA) behandelt. A) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, B) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA, C) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf. Alle Versuche wurden in HMI9-Medium und in Duplikaten durchgeführt. Die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.

Sowohl der unbeschichtete (Abbildung 15 A) als auch die beiden proteinbeschichteten Partikeltypen (Abbildung 15 B und C) zeigten im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml für die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf bzw. 0,1µg/ml - 2000µg/ml für die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA Partikel keinen deutlichen Einfluss in den unterschiedlichen Wachstumsphasen (exponentielle Phase, stationäre Phase und Absterbe Phase) der Trypanosomen. Ihr Wachstumsverhalten war mit dem der unbehandelten Kontrollzellen vergleichbar.

#### 3.1.4 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC

Um die Aufnahme in die Trypanosomen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie untersuchen zu können, wurden die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA und die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf Partikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) versehen. Auch hier wurde eine mögliche Toxizität der unterschiedlichen Nanopartikel-Chargen zuerst mit Hilfe von Wachstumskurven näher untersucht. Auch eine Fluoreszenzmarkierung aller drei Partikel zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml für die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel bzw. 0,1µg/ml - 2000µg/ml für den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikeltyp keine deutliche Änderung in der Proliferation der Parasiten im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 16 A-C).



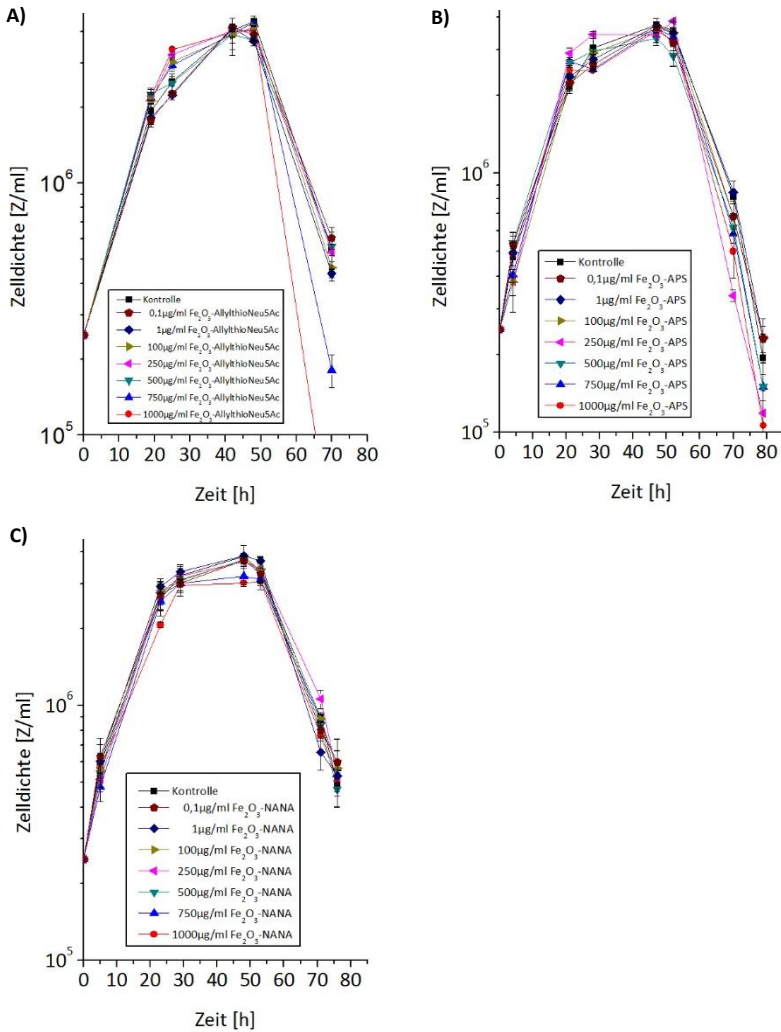
**Abbildung 16: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel auf *Trypanosoma brucei*.**

BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g/ml}$  - 1000  $\mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC bzw. 0,1  $\mu\text{g/ml}$  - 2000  $\mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC) behandelt. A)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF, B)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC, C)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC. Alle Versuche wurden in HMI9-Medium in Triplicaten durchgeführt. Die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.



### 3.1.5 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA

Sialinsäuren stellen eine weitere Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln dar, die zur Stabilisierung der Partikel im Medium oder während der medizinischen Anwendung beitragen können. Aus diesem Grund wurden Nanopartikel getestet, die mit unterschiedlichen Sialinsäurederivaten beschichtet waren. Zur Modifizierung der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partikel wurden Allylthio-N-Acetylneuraminsäure (AllylthioNeu5Ac), Aminophenylthioglykosid (APS) und N-Acetylneuraminsäure (NANA) verwendet. Bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac und den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS Partikeln war im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml kein deutlicher zytotoxischer Effekt auf das Wachstumsverhalten der Parasiten festzustellen (Abbildung 17 A-B). Der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-N-Acetylneuraminsäure) Partikeltyp zeigte nur in den beiden höchsten getesteten Konzentrationen (750µg/ml und 1000µg/ml) einen minimalen inhibitorischen Effekt. Bei den Parasiten, die mit Konzentration ≤ 500µg/ml behandelt wurden, war hingegen kein zytotoxischer Effekt zu erkennen, und das Wachstumsverhalten war mit dem der unbehandelten Kontrollzellen vergleichbar (Abbildung 17 C).



**Abbildung 17: Wachstumskurven. Zytotoxischer Effekt der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA Partikel auf Trypanosoma brucei.**

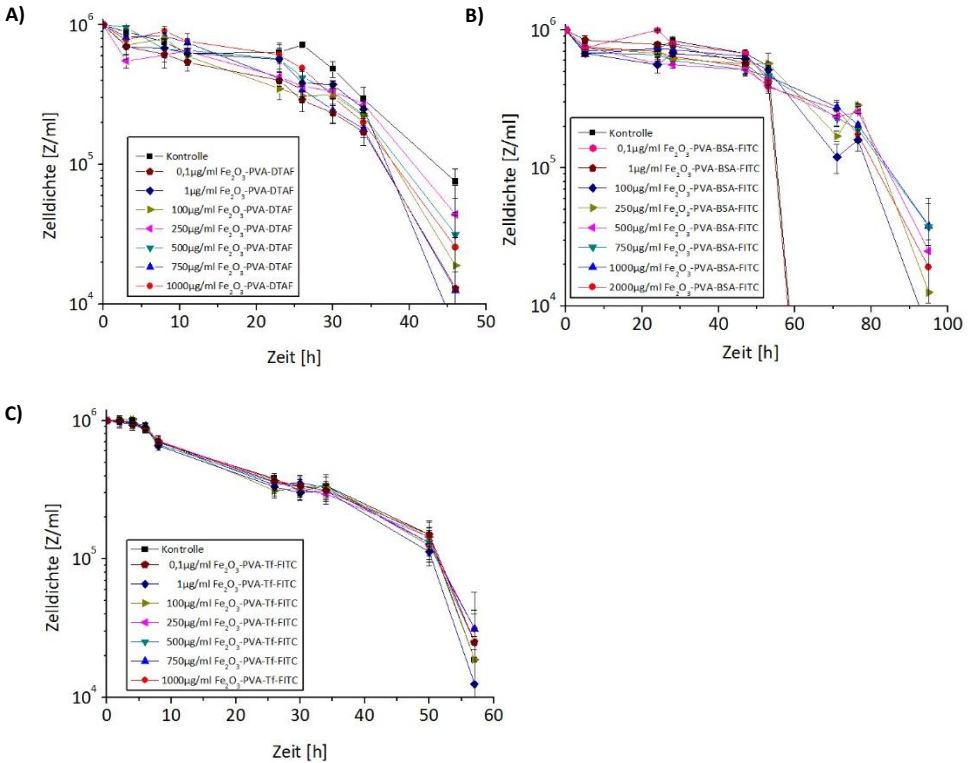
BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit unterschiedlichen Sialinsäurederivat-modifizierten Nanopartikeln im Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml behandelt. A) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, B) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, C) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA. Die Standardabweichung wurde aus zwei unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.

## 3.2 Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln unter serumfreien Bedingungen

### 3.2.1 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC

Aus zahlreichen Publikationen ist bekannt, dass Serumproteine einen Einfluss auf die Endozytoserate von Nanopartikeln bei unterschiedlichen Zelltypen haben können [189-193, 202]. Deshalb wurde die Zytotoxizität der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC und der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel auch unter serumfreien Bedingungen untersucht. Hierfür wurden die Trypanosomen wie unter 2.4.3 vor der Behandlung mit Nanopartikeln dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und anschließend mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen im Bereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml für die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC bzw. 0,1µg/ml - 2000µg/ml für den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikel behandelt. Die Zellzahl wurde zweimal täglich mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt bis nahezu alle Zellen tot waren. Bei allen drei getesteten Partikeln zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, auch unter serumfreien Bedingungen kein zusätzlicher zytotoxischer Effekt auf die Parasiten.

## Ergebnisse



**Abbildung 18:** Inkubation von *Trypanosoma brucei* mit den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen.

Trypanosomen wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, auf  $1 \times 10^6$  Z/ml angesetzt und mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC bzw. 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC) behandelt. A)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF, B)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC, C)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC. Alle Versuche wurden in HMI9-Medium und in Triplikaten durchgeführt. Die Standardabweichung wurde aus 2 unabhängigen Zählwerten pro Zeitpunkt ermittelt.

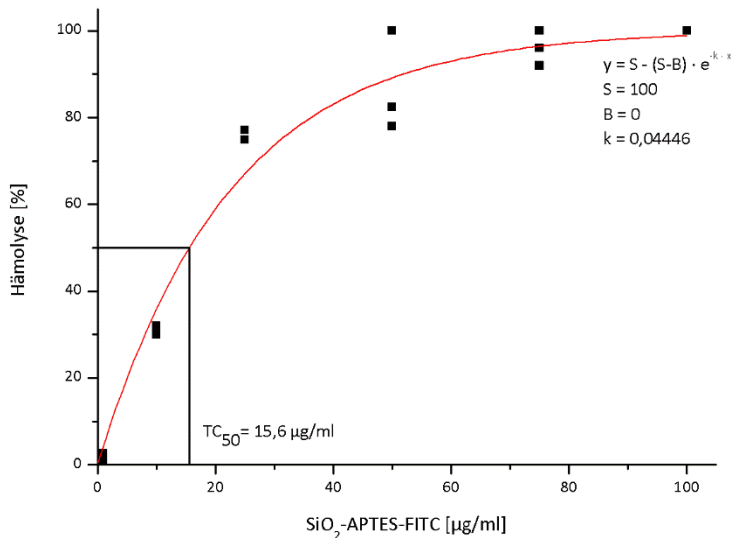
Bei dem  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel und dem  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC war bei keiner der getesteten Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ein deutlicher Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen (Abbildung 18 A, Abbildung 18 C). Im Vergleich dazu war nach der Inkubation der Trypanosomen mit dem proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -

PVA-BSA-FITC Partikeltyp zu sehen, dass Parasiten die mit einer Konzentration  $\geq 100\mu\text{g/ml}$  behandelt wurden über 30h länger überlebten, als Parasiten die mit Konzentrationen  $\leq 1\mu\text{g/ml}$  behandelt wurden und als die unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 18 B).

### 3.3 Zytotoxischer Effekt von Siliziumpartikeln und Eisenoxidnanopartikeln auf Erythrozyten

Die Toxizität von FITC markierten  $\text{SiO}_2$ -APTES-Partikeln ( $\sim 8\text{nm}$ ) und unbeschichteten und proteinbeschichteten Eisenoxidnanopartikeln ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf) wurde zusätzlich noch an menschlichen Erythrozyten getestet. Hierfür wurden wie unter 2.4.4 beschrieben die Erythrozyten mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen im Bereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $100\mu\text{g/ml}$  für die  $\text{SiO}_2$ -APTES-FITC Partikel bzw.  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $500\mu\text{g/ml}$  für die verschiedenen Eisenoxidnanopartikel behandelt und für 3h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und die Hämolyse durch eine Absorptionsmessung bei  $405\text{nm}$  ermittelt. Bei der Behandlung mit unterschiedlichen  $\text{SiO}_2$ -APTES-FITC Partikel Konzentrationen ergab sich ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt, wobei die *median toxic concentration* ( $\text{TC}_{50}$ ) nach einer 3-stündigen Inkubation bei ca.  $15,6\mu\text{g/ml}$  lag (Abbildung 19).

## Ergebnisse

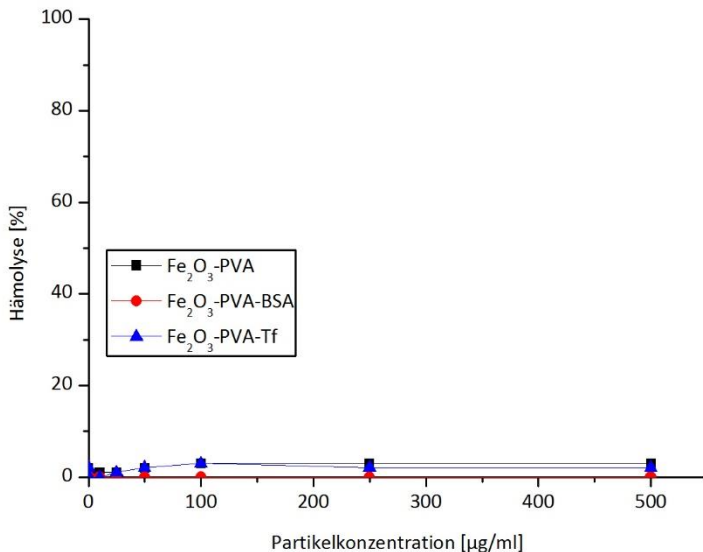


**Abbildung 19: TC<sub>50</sub>-Bestimmung. Zytotoxischer Effekt der fluoreszenzmarkierten SiO<sub>2</sub>-Partikel (~ 8nm) auf Erythrozyten.**

Die Erythrozyten wurden mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen (0,1µg/ml - 100µg/ml) der SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC Partikel behandelt und für 3h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und die Hämolyse bei 405nm ermittelt. Der 100% Wert der Lyse wurde durch die Zugabe von Wasser zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Zur Ermittlung der Hämolyse in % wurde eine Kalibrierungsgerade durch eine kontinuierliche Verdünnung der lysierten Kontrollzellen (100%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 1%) erstellt. Die TC<sub>50</sub> wurde aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die Kontrollen wurden durch Zugabe von 700µl Ampuwa Wasser lysiert und eine Kalibrierungsgerade durch eine kontinuierliche Verdünnung (100%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 1%) erstellt.

Im Gegensatz zu den Siliziumpartikeln war bei keinem der drei getesteten Eisenoxidnanopartikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf) über den gesamten Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $500\mu\text{g/ml}$  eine Zerstörung der Membran der Erythrozyten festzustellen. Die Hämolyse der Erythrozyten lag in allen Fällen bei  $\leq 3\%$  (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Häm-Assay. Zytotoxischer Effekt der Eisenoxidnanopartikel auf Erythrozyten.**

Die Erythrozyten wurden mit unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen ( $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $500\mu\text{g/ml}$ ) der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf Partikel behandelt und für 3h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und die Hämolyse bei  $405\text{nm}$  ermittelt. Der 100% Wert der Lyse wurde durch die Zugabe von Wasser zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Zur Ermittlung der Hämolyse in % wurde eine Kalibrierungsgerade durch eine kontinuierliche Verdünnung der lysierten Kontrollzellen (100%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 1%) erstellt.

### 3.4 Untersuchung der Aufnahmekinetik von fluoreszenzmarkierten Eisenoxidpartikeln mittels Durchflusszytometrie

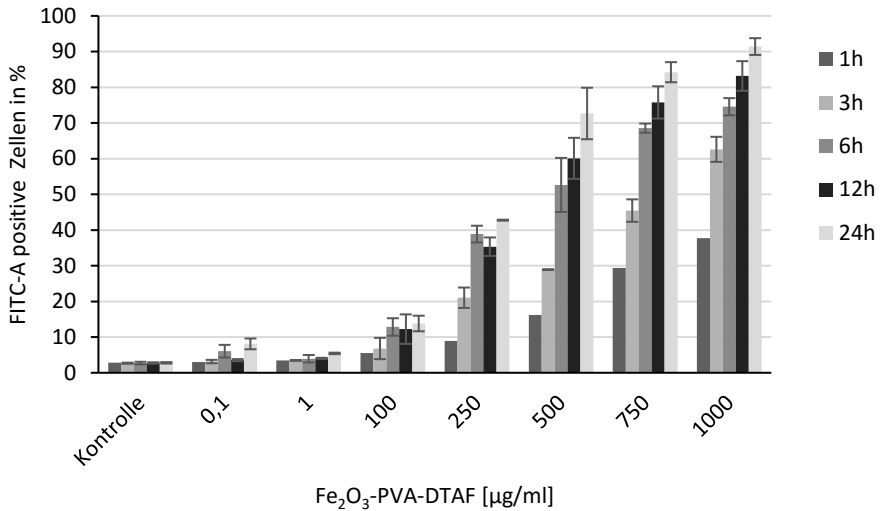
Trypanosomen nehmen BSA durch Pinozytose auf [129]. Für eine Verdopplung benötigen sie ca. 40.000 Eisenatome, welche sie über die Rezeptor-vermittelte Endozytose von wirtsspezifischem Transferrin beziehen [129, 152]. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikeln konnte die Aufnahmekinetik von unbeschichteten und proteinbeschichteten Partikeln miteinander verglichen werden und eventuelle Unterschiede zwischen der Pinozytose und der Rezeptor-vermittelten Endozytose näher untersucht werden. Dadurch dass Serumproteine ebenfalls einen Einfluss auf die Endozytoserate haben können, wurden zudem alle Experimente unter serumhaltigen- und serumfreien Bedingungen durchgeführt. Um die Aufnahmekinetik unter serumhaltigen Bedingungen zu analysieren, wurden Trypanosomen wie unter 2.4.5 für die 1-stündige Inkubation auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und für die längeren Inkubationszeiten von 3h, 6h, 12h und 24h auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt. Anschließend wurden die Parasiten mit den entsprechenden Nanopartikelkonzentrationen behandelt ( $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC bzw.  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $2000\mu\text{g/ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC) und bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  Begasung für die genannten Zeitpunkte inkubiert. Für die 1-stündige Inkubation unter serumfreien Bedingungen wurden die Trypanosomen ebenfalls auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt, jedoch vor der Nanopartikelbehandlung dreimal mit serumfreiem HMI9-Medium gewaschen. Nach der Nanopartikelbehandlung wurden die Zellen



abzentrifugiert und dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer (2.3.2) gewaschen, um die Endozytose zu stoppen und die nicht aufgenommenen Nanopartikel auszuwaschen. Daraufhin erfolgte die Analyse von 10.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie (BDFACS Canto II, BD Sciences).

#### 3.4.1 Aufnahme von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF, $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumhaltigen Bedingungen

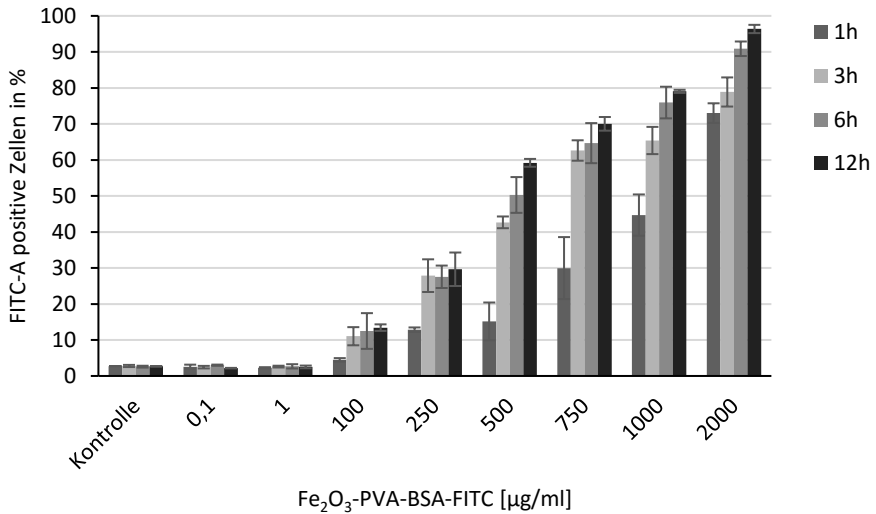
Im Vergleich zu anderen Zellen weisen Trypanosomen eine sehr hohe Endozytoserate auf, so können sie innerhalb weniger Minuten ihren gesamten VSG-Mantel endozytieren und gegen einen neuen austauschen [80]. Aus diesem Grund ist mit einer sehr schnellen Aufnahme der Nanopartikel zu rechnen. Im Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$  -  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  war bei allen drei Partikeln ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC), unabhängig von der getesteten Zeit (1h, 3h, 6h, 12h, 24h), kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen erkennbar (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23).



**Abbildung 21: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1µg/ml - 1000µg/ml) der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel behandelt und in serumhaltigem HMI9-Medium für 1h, 3h, 6h, 12h und 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert. Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt (3h, 6h, 12h, 24h).

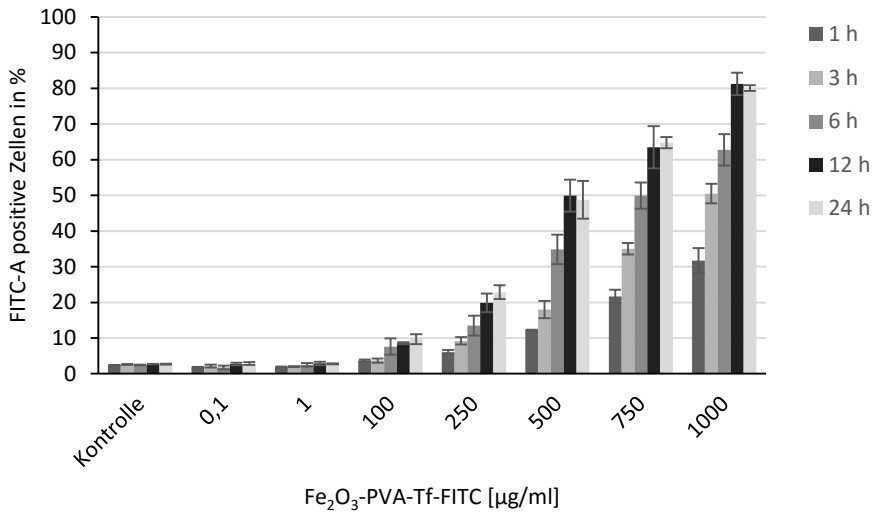
Bei allen drei Partikeln war aber ab einer Konzentration von 100µg/ml, ein langsamer kontinuierlicher Anstieg in der prozentualen Anzahl der fluoreszierenden Zellen, abhängig von der Konzentration und der Inkubationszeit, messbar. Dieser erreichte für alle Zeitpunkte bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF und den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikeln sein Maximum bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000µg/ml (Abbildung 21, Abbildung 23) und bei den BSA-FITC beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln bei einer Konzentration von 2000µg/ml (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1µg/ml - 2000µg/ml) der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikel behandelt und in serumhaltigem HMI9-Medium für 1h, 3h, 6h, und 12h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert. Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

Nach einer 1-stündigen Inkubation unter serumhaltigen Bedingungen mit 1000µg/ml der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel war bei ca. 38% der Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar (Abbildung 21). Bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikeln war bei einer Konzentration von 1000µg/ml bei 44,67±5,74% der Zellen ein FITC-Signal zu messen und bei einer Konzentration von 2000µg/ml bei 73,00±2,73% der Zellen (Abbildung 22). In den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel behandelten Trypanosomen war nach einer 1-stündigen Inkubation mit 1000µg/ml der Nanopartikelsuspension bei 31,7±3,49% der Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1µg/ml - 1000µg/ml) der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel behandelt und in serumhaltigem BF-Medium für 1h, 12h und 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert. Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

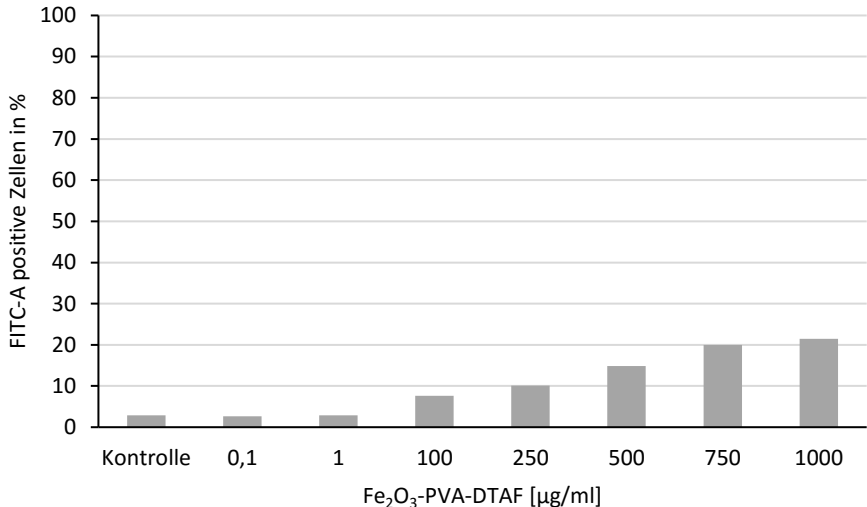
Durch eine stetige Verlängerung der Inkubationszeit von 1h auf 3h, 6h, 12h und 24h war es möglich, eine deutliche Steigerung im Anteil der FITC-positiven Zellen zu erreichen. Dieser war bei allen drei Partikeln sowohl von der Zeit als auch von der eingesetzten Konzentration anhängig und erreichte bei den unbeschichteten Partikeln nach 24h und bei den beiden proteinbeschichteten Partikeln jeweils nach 12h ein Maximum (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23). So war bei 91,41±2,35% der Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1000µg/ml der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel ein Fluoreszenzsignal messbar (Abbildung 21). Bei den BSA-FITC beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln war

nach einer 12-stündigen Inkubation bei einer Konzentration von 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei  $96,37\pm 1,15\%$  und bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei  $79,05\pm 0,43\%$  der Zellen ein FITC-Signal messbar (Abbildung 22). Die Aufnahme der Tf-FITC beschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel erreichte ebenfalls nach 12h ein Maximum mit einem prozentualen Anteil an FITC-positiven Zellen von  $81,2\pm 3,16\%$  bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , wobei hier kein deutlicher Unterschied zwischen einer 12- und 24-stündigen Inkubation messbar war (Abbildung 23). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aufnahme sowohl unbeschichteter  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel als auch proteinbeschichteter Eisenoxidnanopartikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) unter serumhaltigen Bedingungen möglich ist, jedoch sind bei allen drei Partikeln sehr lange Inkubationszeiten bis zu 12h bzw. 24h und sehr hohe Konzentrationen bis zu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  notwendig, um eine effiziente Aufnahme in Trypanosomen zu erreichen.

### 3.4.2 Aufnahme von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF, $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen

Um zu untersuchen, ob die im Serum enthaltenen Proteine einen möglichen Einfluss auf die Aufnahme von Eisenoxidpartikeln haben, wurde die Aufnahmekinetik von allen drei fluoreszierenden Partikeln ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) auch unter serumfreien Bedingungen analysiert. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.4.5 beschrieben vorbereitet und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  mit der jeweiligen Partikelsuspension in serumfreiem Medium für 1h inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Anschließend wurden jeweils 10.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACSCantoII, BD Sciences) analysiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation in serumfreiem Medium war bei allen drei Partikeln eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme in der Anzahl der FITC-A positiven Zellen zu erkennen (Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26). Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikeln und den beiden proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln. Bei den unbeschichteten Eisenoxidpartikeln war im Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1\mu\text{g/ml}$  kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen zu messen. Ab einer Konzentration von  $100\mu\text{g/ml}$  kam es zu einem sehr langsamen kontinuierlichen Anstieg in der prozentualen Anzahl der fluoreszierenden Zellen. Dieser erreichte sein Maximum bei der höchsten getesteten Konzentration von

1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  mit einem prozentualen Anteil an FITC-A positiven Zellen von ca. 20% (Abbildung 24).

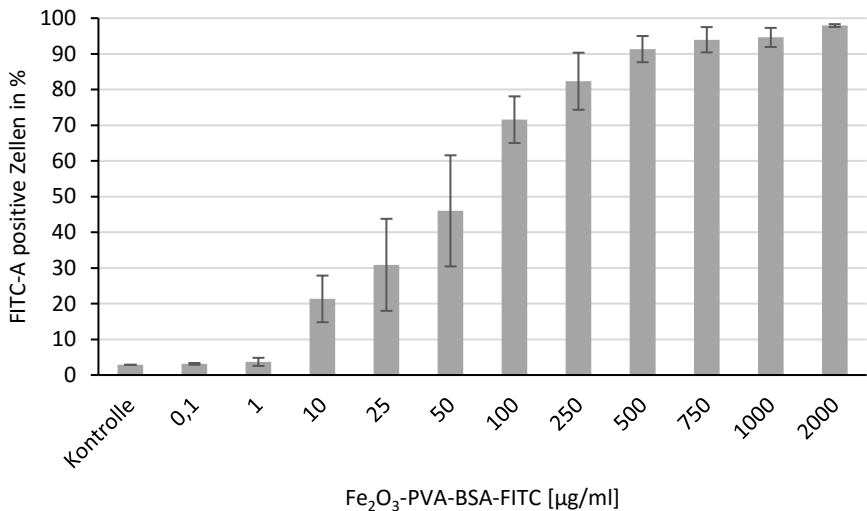


**Abbildung 24: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel behandelt und in serumfreiem HMI9-Medium für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert.

Bei den BSA-FITC und Tf-FITC beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln waren nach einer 1-stündigen Inkubation ebenfalls deutliche konzentrationsabhängige Zunahmen in der Anzahl der fluoreszierenden Zellen zu messen (Abbildung 25, Abbildung 26). Im Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  waren bei beiden Partikeln ebenfalls keine Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen zu messen. Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  kam es jeweils zu einem deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg im

prozentualen Anteil der FITC-A positiven Zellen. Dieser erreichte bei den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikeln ein Maximum bei der höchsten getesteten Konzentration von  $2000\mu\text{g/ml}$  (Abbildung 25) und bei den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln ab einer Konzentration von  $500\mu\text{g/ml}$  (Abbildung 26). Hier war jeweils bei nahezu allen Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar (ca. 98%).

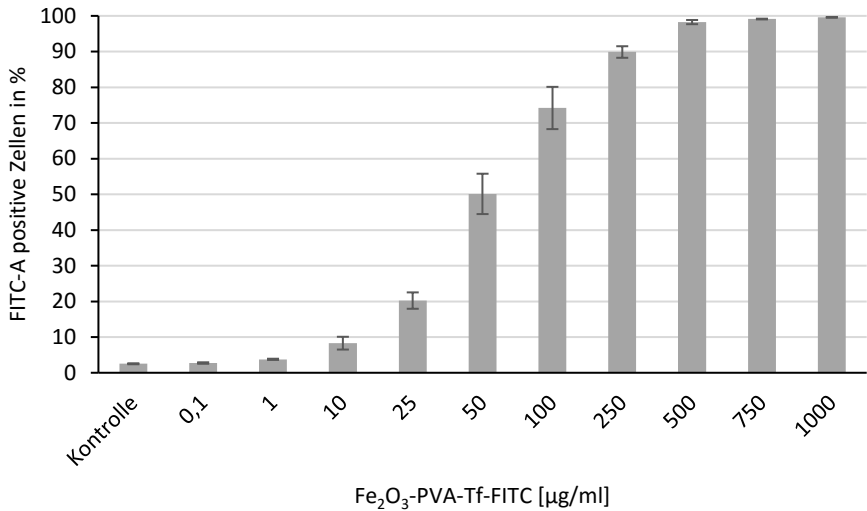


**Abbildung 25: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $2000\mu\text{g/ml}$ ) der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel behandelt und in serumfreiem HMI9-Medium für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert. Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.



## Ergebnisse



**Abbildung 26: Durchflusszytometrie. Aufnahmekinetik der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1µg/ml - 1000µg/ml) der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel behandelt und in serumfreiem HMI9-Medium für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem FACSCantoll analysiert. Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

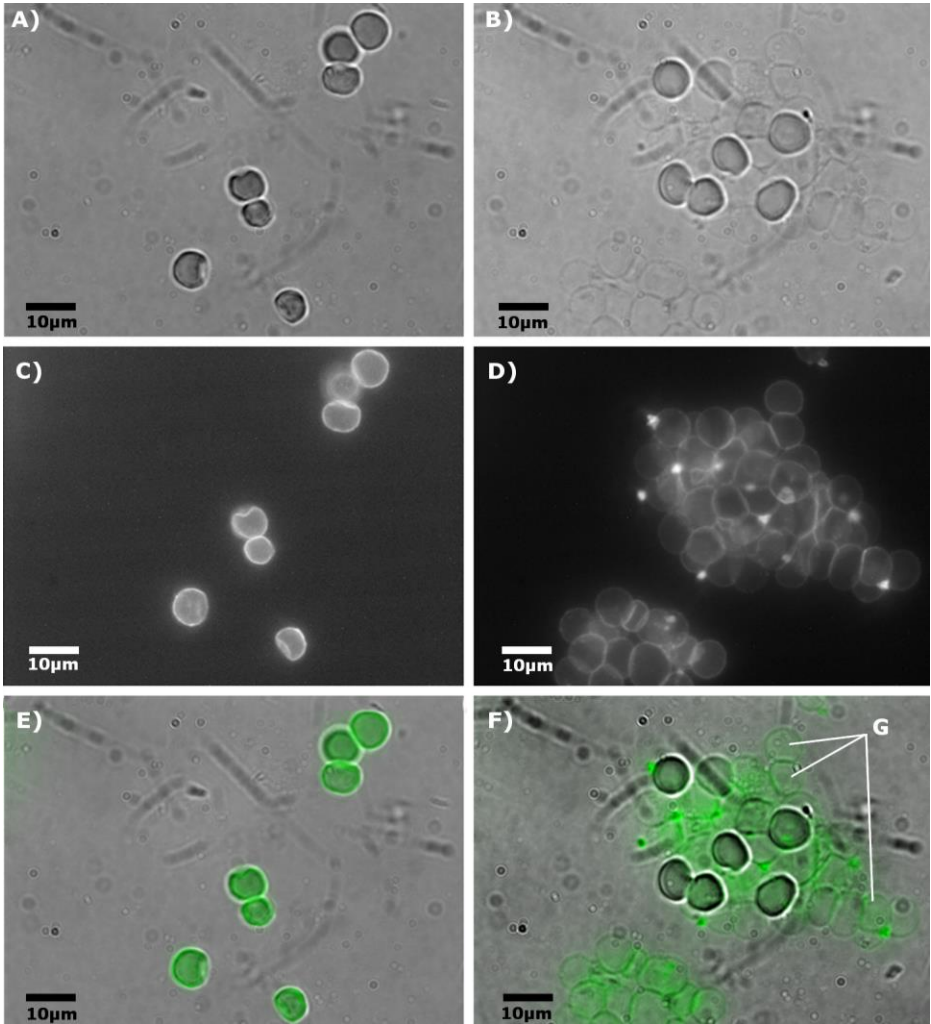
Es zeigte sich, dass eine Aufnahme von unbeschichteten Eisenoxidpartikeln trotz der bekannten hohen Endozytoserate von Trypanosomen auch unter serumfreien Bedingungen kaum möglich ist. Bei einer Konzentration von 1000µg/ml war nur bei ca. 20% der Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar (Abbildung 24). Im Vergleich dazu kam es bei den BSA-FITC und Tf-FITC beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln nach einer 1-stündigen Inkubation unter serumfreien Bedingungen zu einer gesteigerten Aufnahme. Bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC Partikeln war ab einer Konzentration von 500µg/ml bei über 90% der Zellen ein

Fluoreszenzsignal messbar und bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikeln ab einer Konzentration von 250µg/ml (Abbildung 25, Abbildung 26).

## 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 3.5.1 Wirkung von Siliziumpartikeln auf Erythrozyten

Die Ursache der zytotoxischen Wirkung von fluoreszenzmarkierten Siliziumoxidnanopartikeln (SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC) auf Erythrozyten wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie näher untersucht. Hierfür wurden die Erythrozyten wie unter 2.4.6.1 mit einer Konzentration von 15µg/ml der SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC Partikelsuspension behandelt und für 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die fluoreszierenden Siliziumoxidnanopartikel waren in den Membranen intakter Erythrozyten, aber größtenteils in bereits lysierten Erythrozyten, sogenannten „ghosts“ (G), zu finden (Abbildung 27). Es zeigte sich somit also deutlich, dass der zytotoxische Effekt nicht durch eine Aufnahme der Siliziumpartikel hervorgerufen wurde, sondern durch eine Insertion der Partikel in die Membranen der Erythrozyten, die daraufhin zur Lyse der Zellen führte.

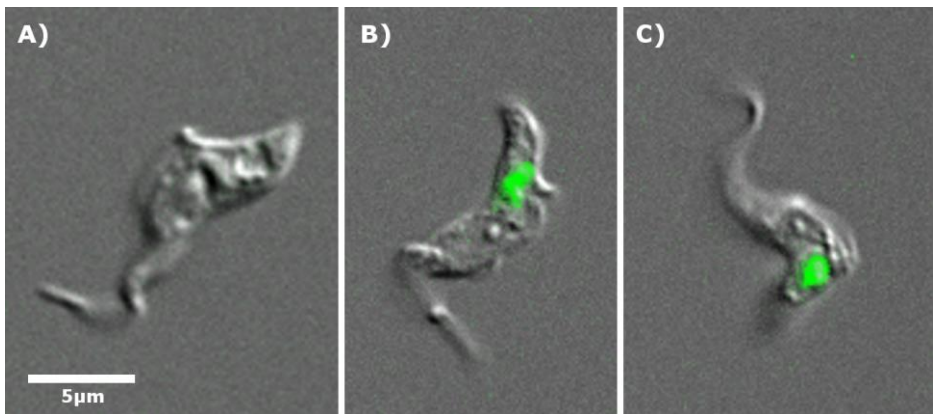


**Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopie. Zytotoxische Wirkung der  $\text{SiO}_2$ -APTES-FITC Partikel auf Erythrozyten.**

Erythrozyten wurden mit  $15\mu\text{g/ml}$  der  $\text{SiO}_2$ -APTES-FITC Partikel behandelt und für 45min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in Ringerlösung gewaschen, resuspendiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (OLYMPUS BH2, ZEISS). A) und B) Durchlichtaufnahme, C) und D) Fluoreszenzaufnahme, E) und F) *Overlay* von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme. G = *ghost*.

### 3.5.2 Aufnahme von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln in *Trypanosoma brucei*

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem gemessenen Fluoreszenzsignal in der Durchflusszytometrie (Abbildung 26) tatsächlich um eine Aufnahme der FITC markierten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf Partikel in Trypanosomen handelte, wurden die mit Nanopartikeln behandelten Parasiten unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.



**Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem Medium.**

BF-221 wurden für 1h bei 37°C mit 1000µg/ml der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikelsuspension in serumfreiem Medium inkubiert, zweimal mit TDB gewaschen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (AxioObserverZ.1, ZEISS). A) unbehandelte Kontrollzelle, B) und C) Trypanosomen, die für 1h mit 1000µg/ml der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikelsuspension behandelt wurden.

Hierzu wurden die Parasiten wie unter 2.4.6.2 auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit 100µg/ml der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikelsuspension für 1h in serumfreiem Medium inkubiert (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die lebenden Parasiten unter

dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (AxioObserverZ.1, Zeiss). In den mit Nanopartikeln inkubierten Trypanosomen war eine deutliche Akkumulation der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel in unmittelbarer Nähe der Flagellumtasche, dem einzigen Ort von Endo- und Exozytose, zu erkennen (Abbildung 28).

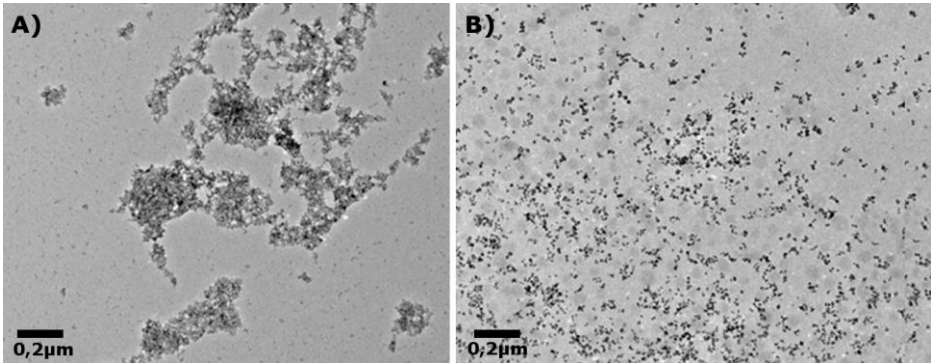
## 3.6 TEM

Aufgrund der geringen Größe der verwendeten  $\text{SiO}_2$ -Partikel und der verschiedenen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -AllylthioNeu5Ac,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NANA) von ca. 8-10nm eignete sich zur Bestätigung der Aufnahme und zur Untersuchung der genauen Lokalisation innerhalb der Zelle besonders gut die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

### 3.6.1 Negativ Kontrastierung von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ und $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln

Um die Größe der Nanopartikel und um ihre Tendenz zur Agglomeration zu untersuchen, wurden die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und die PVA beschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Nanopartikel wie unter 2.4.7.1 beschrieben negativ kontrastiert und unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Beide Partikel hatten eine durchschnittliche Größe von ca. 10nm und es zeigte sich deutlich, dass die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Partikel im Gegensatz zu den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA

Partikeln eine wesentlich größere Neigung zur Bildung von Agglomeraten in wässriger Suspension hatten (Abbildung 29).

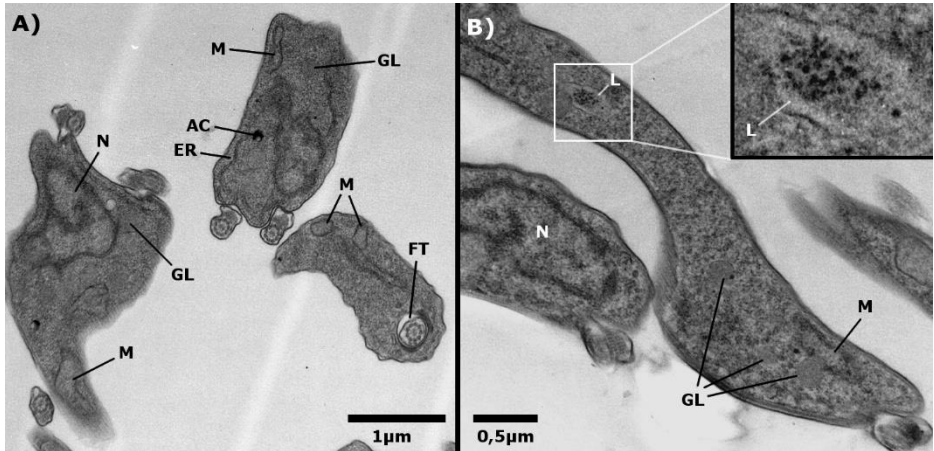


**Abbildung 29: Negativ Kontrastierung der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikel.**

Die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und die Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PVA Partikel wurden auf ein Kupfergrid aufgetragen und eingetrocknet. Anschließend wurden die Proben transmissionselektronenmikroskopisch in Saarbrücken unter dem JEM-2010 (JEOL, Tokyo, Japan) analysiert. A) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikel, B) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikel mit 2% PVA.

### 3.6.2 Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Siliziumpartikeln durch *Trypanosoma brucei*

Zur näheren Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Siliziumpartikeln auf Trypanosomen wurden diese, wie unter 2.4.7.2.1 beschrieben auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt, mit 50 µg/ml der SiO<sub>2</sub>-Suspension behandelt und für 24h inkubiert (37°C und 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.4.7.2.4 eingebettet und unter dem Elektronenmikroskop (EM10, ZEISS) untersucht.

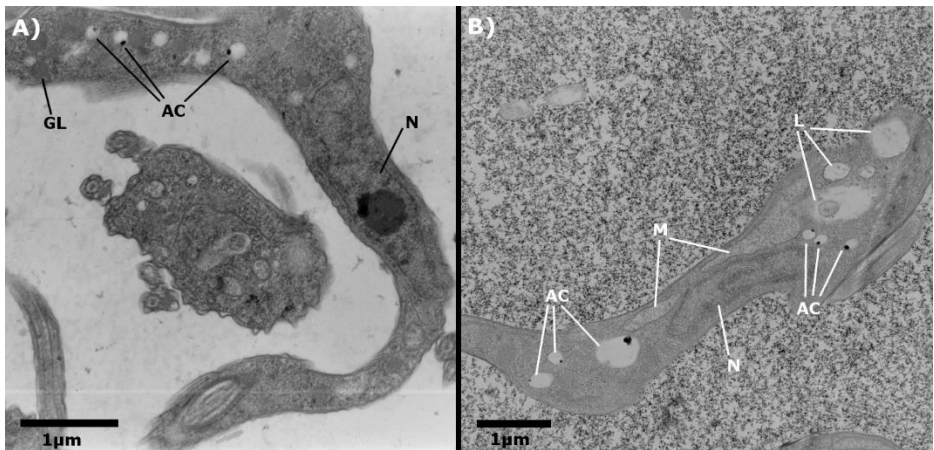


**Abbildung 30: TEM. Aufnahme der  $\text{SiO}_2$ -Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem BF-Medium.** BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und für 24h bei mit  $50\mu\text{g/ml}$  der  $\text{SiO}_2$ -Suspension inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). Daraufhin wurden die Zellen eingebettet und unter dem TEM (EM10, ZEISS) analysiert. A) unbehandelte Kontrollzellen, B)  $\text{SiO}_2$  Nanopartikel in einem Lysosom (L). AC = Acidocalcisom, ER = endoplasmatisches Retikulum, FT = Flagellumtasche, GL = Glykosom, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nukleus.

Nach einer 24-stündigen Inkubation war deutlich zu erkennen, dass die Siliziumpartikel von den Trypanosomen aufgenommen wurden. Die Nanopartikel akkumulierten hauptsächlich in Lysosomen (L), ansonsten sahen die Zellen wie die Kontrollzellen morphologisch unauffällig aus (Abbildung 30).

### 3.6.3 Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ Nanopartikeln durch *Trypanosoma brucei*

Die Aufnahme der nackten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel sollte ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie analysiert werden. Hierfür wurden die Parasiten wie unter 2.4.7.2.1 auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und für 90min mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Suspension inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wie unter 2.4.7.2.4 beschrieben für die Elektronenmikroskopie vorbereitet und analysiert. Nach einer 90- minütigen Inkubation waren keine Nanopartikel in den Parasiten zu finden. Es waren jedoch zahlreiche Nanopartikel, die im Medium ausgefallen sind um die Trypanosomen herum zu erkennen (Abbildung 31 B).



**Abbildung 31: TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem BF-Medium.**

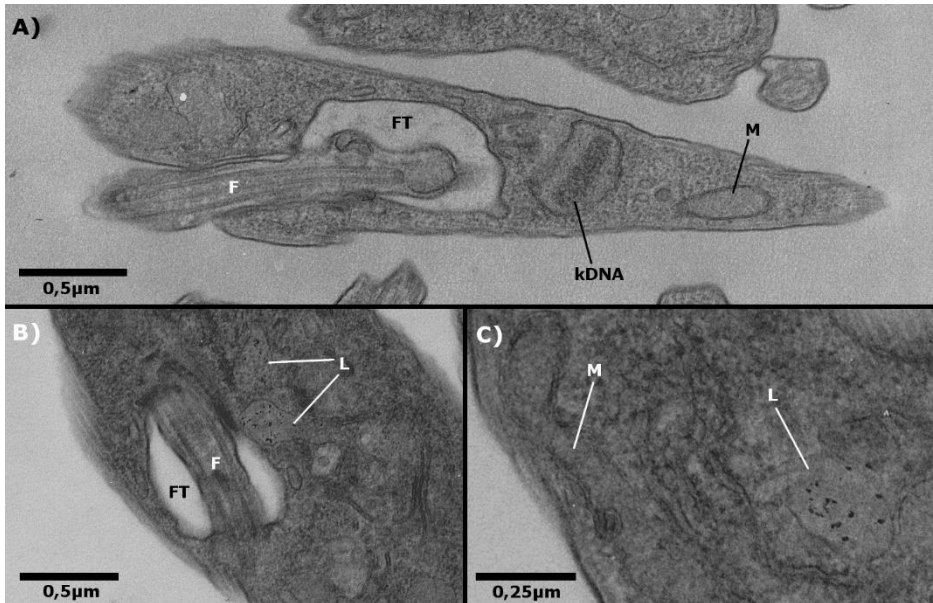
BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und für 90min mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Suspension unter normalen Kultivierungsbedingungen inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die Parasiten transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (EM10, ZEISS). A) unbehandelte Kontrollzelle, B) ausgefallene  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Nanopartikel um einen Trypanosomen herum. AC = Acidocalcisom, GL = Glykosom, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nukleus.



### 3.6.4 Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumhaltigen Bedingungen

Bei den fluoreszenzmarkierten unbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA und den beiden proteinbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf Partikeln zeigte die Analyse der Aufnahmekinetik mittels Durchflusszytometrie unter serumhaltigen Bedingungen, einen zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg im prozentualen Anteil der fluoreszierenden Zellen (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23). Dieser erreichte bei den unbeschichteten Partikeln nach einer 24- stündigen und bei den beiden proteinbeschichteten Partikeln nach einer 12-stündigen Inkubation sein Maximum, wobei bei den Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- PVA-Tf-FITC Partikeln kein Unterschied zwischen der 12- und 24- stündigen Inkubation zu erkennen war. Nun sollte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie die Aufnahme der unterschiedlichen Nanopartikel-Chargen bestätigt und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle genauer untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.4.7.2.1 auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit der jeweiligen Nanopartikelsuspension für 12h bzw. 24h unter normalen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für das TEM vorbereitet und analysiert (2.4.7.2.4). Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1000µg/ml der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikel in serumhaltigem Medium waren in den mit Nanopartikeln behandelten Trypanosomen zahlreiche Partikel innerhalb der Zellen zu finden. Vereinzelt waren die Nanopartikel in Vesikeln in unmittelbarer Nähe der Flagellumtasche (FT) lokalisiert

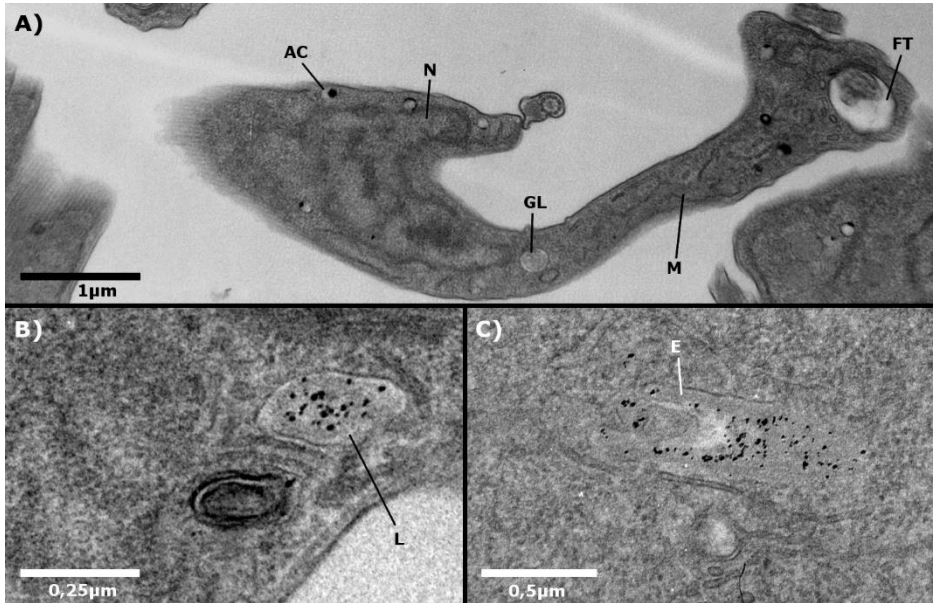
(Abbildung 32 B). Die meisten der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel akkumulierten jedoch nach einer 24-stündigen Inkubation in den Lysosomen (L) (Abbildung 32 C).



**Abbildung 32:** TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.

BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000\mu\text{g/ml}$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Nanopartikeln für 24h in serumhaltigem HMI9-Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die Zellen unter dem TEM (EM10, Zeiss) analysiert A) unbehandelte Kontrollzelle, B) und C) mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln behandelte Trypanosomen. B) Nanopartikel in einem Lysosom (L) in der Nähe der Flagellumtasche (FT) und C) Nanopartikel im Lysosom (L). F = Flagellum, FT = Flagellumtasche, kDNA = Kinetoplasten DNA, L = Lysosom, M = Mitochondrium.

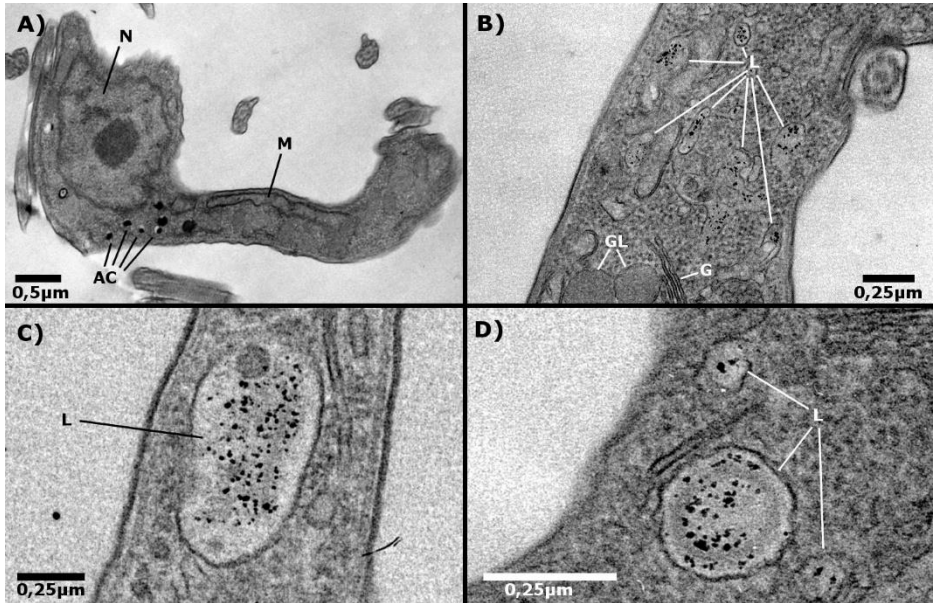
Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Trypanosomen, die mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel für 12h inkubiert wurden. Hier waren die Nanopartikel auch wieder größtenteils in den Lysosomen (Abbildung 33 B) oder in den Endosomen (Abbildung 33 C) lokalisiert.



**Abbildung 33: TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000\mu\text{g/ml}$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel für 12h in serumhaltigem HMI9-Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A) unbehandelte Kontrollzelle, B) und C) mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Nanopartikeln behandelte Trypanosomen. B) Nanopartikel in Lysosom (L), C) Nanopartikel in Endosom (E). AC = Acidocalcisom, FT = Flagellumtasche, E = Endosom, GL = Glykosom, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nucleus.

In den Parasiten, die mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel für 24h in serumhaltigem Medium inkubiert wurden, konnte die Aufnahme ebenfalls durch die elektronenmikroskopische Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 34). Die Nanopartikel waren auch hier wieder hauptsächlich in den Lysosomen (L) zu finden (Abbildung 34 B-D).



**Abbildung 34:** TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.

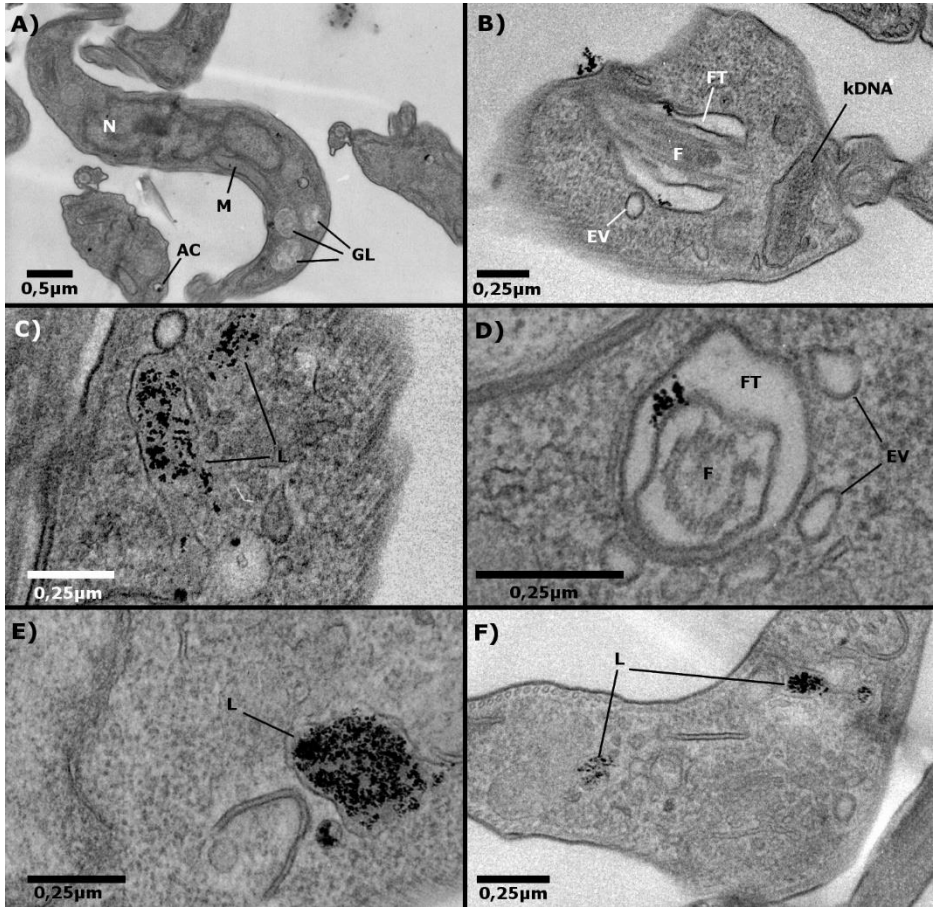
BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000 \mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel für 24h in serumhaltigem BF-Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). A) unbehandelte Kontrollzelle, B) – D) Nanopartikel in Lysosomen (L). AC = Acidocalcisom, G = Golgi, GL = Glykosom, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nukleus.

Bei allen drei getesteten Partikeltypen ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) waren nach der Behandlung mit Nanopartikeln keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen (Abbildung 32 A, Abbildung 33 A, Abbildung 34 A). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aufnahme von sowohl unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln als auch von proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumhaltigen Bedingungen möglich ist. Diese Aufnahme scheint keinen morphologischen Effekt auf die Parasiten zu haben, da keine Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen zu

erkennen waren. Jedoch sind bei allen drei getesteten Eisenoxidpartikeltypen, unabhängig von ihrer Beschichtung, sehr hohe Konzentrationen bis zu 1000 $\mu$ g/ml und sehr lange Inkubationszeiten von bis zu 12h oder 24h nötig, um eine effiziente Aufnahme der Nanopartikel in nahezu alle Zellen zu erreichen.

### 3.6.5 Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme der Sialinsäure-modifizierten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partikel unter serumhaltigen Bedingungen

Neben Polymeren, wie z.B. PVA oder Proteinen wie BSA und Transferrin können auch Sialinsäuren zur Oberflächenmodifizierung von Nanopartikeln verwendet werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Eisenoxidnanopartikel an Trypanosomen getestet, die mit unterschiedlichen Sialinsäurederivaten beschichtet wurden. Da keiner der getesteten Partikel einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die Parasiten hatte (Abbildung 17 A-C) sollte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht werden, ob es zu einer Aufnahme der Partikel kam. Hierfür wurden die Parasiten wie unter 2.4.7.2.1 auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit jeweils 1000 $\mu$ g/ml der entsprechenden Nanopartikelsuspension (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS und Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA) für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen eingebettet und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (2.4.7.2.4).



**Abbildung 35: TEM. Aufnahme der Sialinsäurederivat-modifizierten Eisenoxidpartikel durch *Trypanosoma brucei* in serumhaltigem HMI9-Medium.**

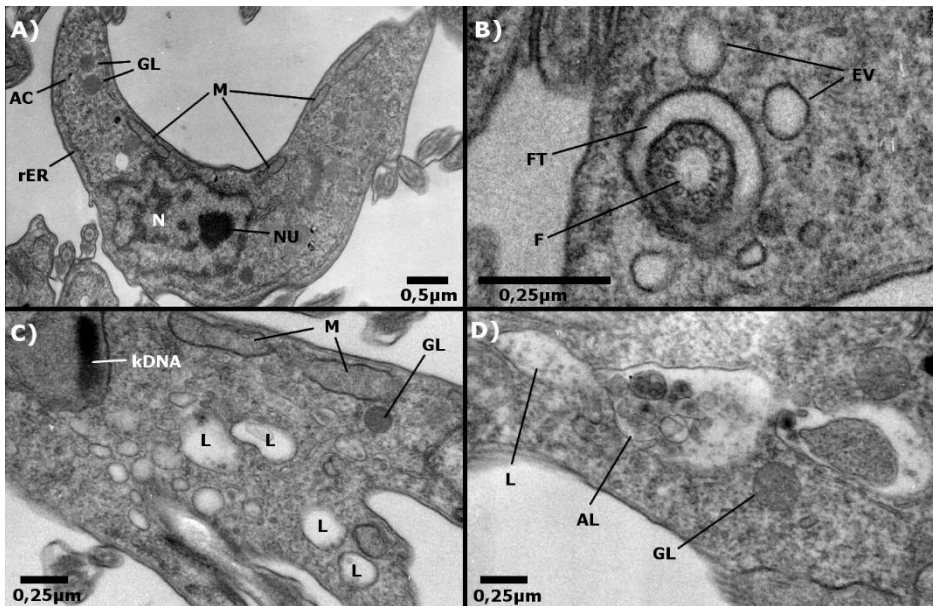
BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml angesetzt und mit jeweils  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -AllylthioNeu5Ac,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NANA in HMI9- Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die Zellen eingebettet und mit dem TEM untersucht (EM10, Zeiss). A) unbehandelte Kontrollzelle, B) und C) Trypanosomen behandelt mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -AllylthioNeu5Ac, D) und E) mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS, F) mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NANA, AC = Acidocalcisom, EV = endozytotisches Vesikel, F = Flagellum, FT = Flagellumtasche, GL = Glykosom, kDNA = Kinetoplasten DNA, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nukleus.

Bei keinem der mit Nanopartikel behandelten Trypanosomen waren morphologische Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen festzustellen (Abbildung 35). Bei allen der Sialinsäure-modifizierten Nanopartikel-Chargen war aber eine Aufnahme der Partikel zu erkennen, wobei die meisten Partikel nach einer 24h-stündigen Inkubation in der Flagellumtasche (FT) (Abbildung 35 B und D) lokalisiert waren oder in den Lysosomen (L) akkumulierten (Abbildung 35 C, E und F).

### 3.6.6 Ultrastrukturelle Analyse der Aufnahme von $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA, $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen

Während der 1-stündigen Inkubation der Trypanosomen unter serumfreien Bedingungen mit den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikeln und den beiden proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln war mit der Durchflusszytometrie ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg im prozentualen Anteil der fluoreszierenden Zellen messbar (Abbildung 24 , Abbildung 26). Nun musste die Aufnahme der Partikel in die Parasiten noch bestätigt und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle durch eine transmissionselektronenmikroskopische Analyse näher untersucht werden. Die Zellen wurden hierfür analog zu der Durchflusszytometrie wie unter 2.4.7.2.2 angesetzt, mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der entsprechenden Nanopartikelsuspension behandelt ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) und für 1h in serumfreiem Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Anschließend wurden die Parasiten eingebettet und für das

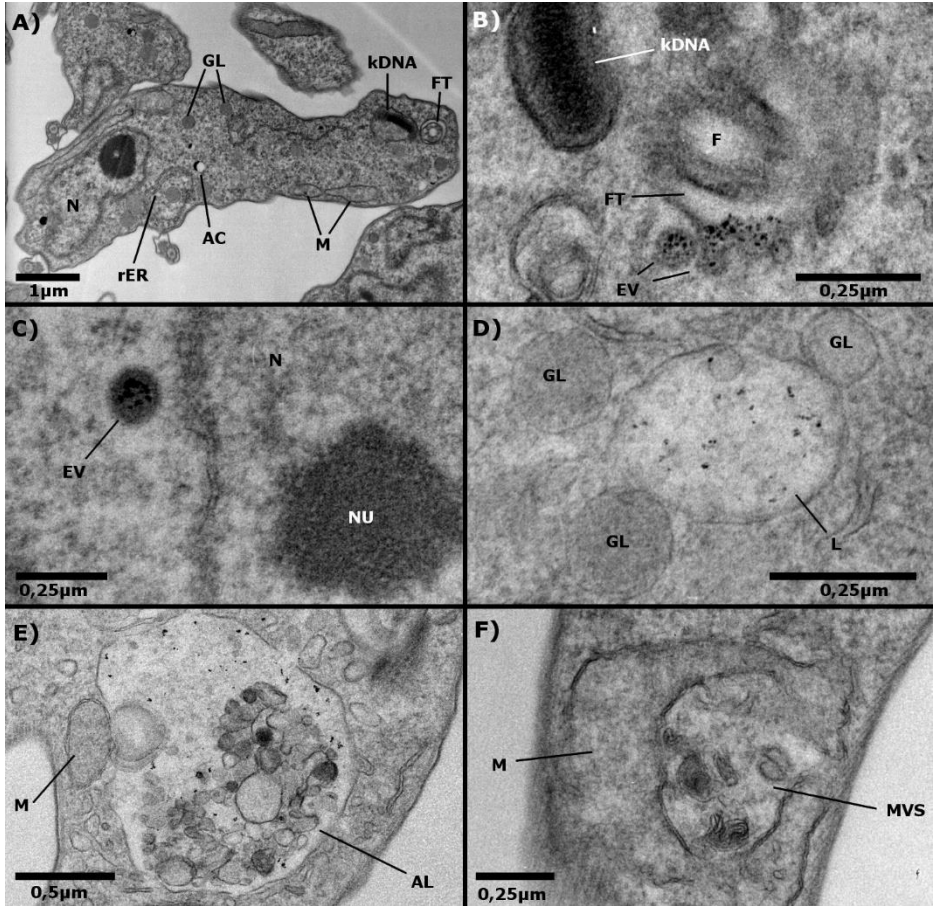
TEM vorbereitet (2.4.7.2.4). Nach einer 1-stündigen Inkubation waren bei den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln keine morphologischen Veränderungen der Parasiten selbst, aber auch keine endozytierten Nanopartikel zu erkennen. Sowohl in der Flagellumtasche (FT), den Lysosomen (L) als auch in den Autolysosomen (AL) der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA behandelten Parasiten waren keine Ansammlungen von Nanopartikeln zu erkennen (Abbildung 36 B-D).



**Abbildung 36: TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel für 1h in serumfreiem HMI9- Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). A) unbeschichtete Kontrollzellen, B) - D) mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - PVA Nanopartikel behandelte Trypanosomen. B) leere Flagellumtasche (FT), C) leere Lysosomen (L) und D) leeres Autolysosom. AC = Acidocalcisom, AL = Autolysosom, EV = endozytotisches Vesikel, F = Flagellum, FT = Flagellumtasche, GL = Glykosom, kDNA = Kinetoplasten DNA, L = Lysosom, M = Mitochondrium, N = Nukleus, Nu = Nukleolus, rER = endoplasmatisches Retikulum.

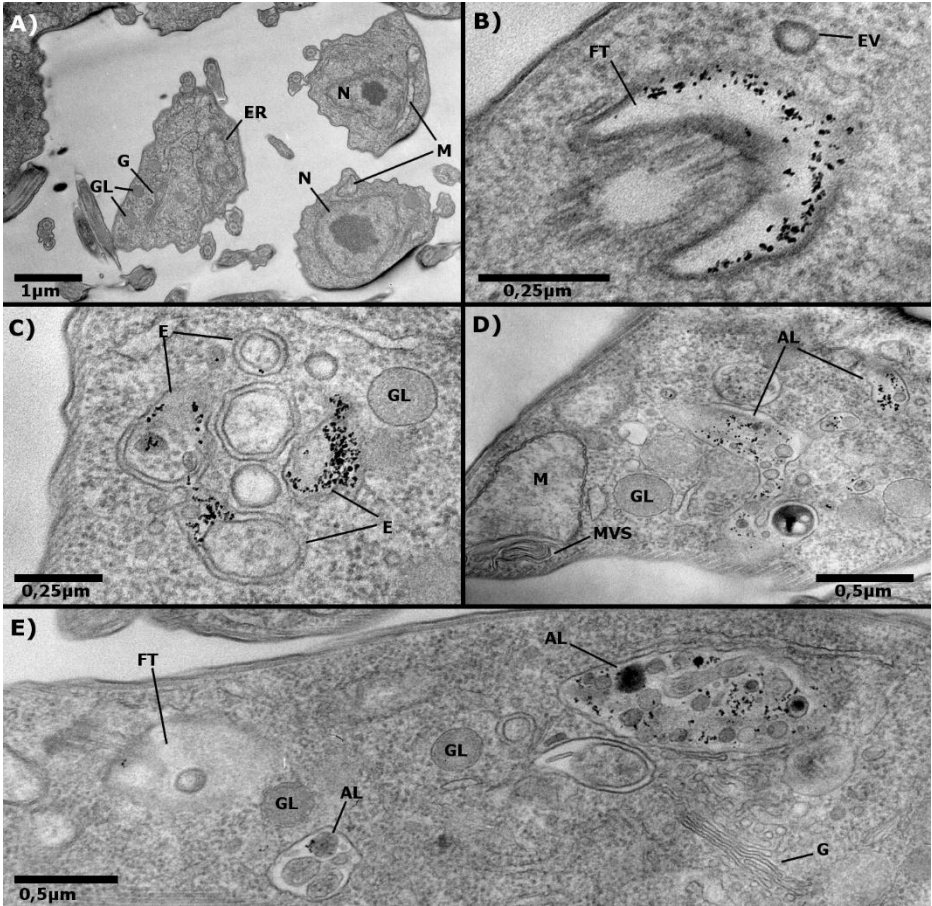




**Abbildung 37: TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem HMI9-Medium.**

BF-221 wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel für 1h in serumfreiem Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). A) Kontrollzellen, B) Nanopartikel in endozytotischen Vesikeln (EV) um die Flagellumtasche (FT), C) in EV im Cytosol, D) in einem Lysosom (L), E) in einem Autolysosom (AL) und F) eine multivesikuläre Struktur (MVS) im Mitochondrium. AC = Acidocalcisom, AL = Autolysosom, EV = endozytotisches Vesikel, F = Flagellum, FT = Flagellumtasche, GL = Glykosom, kDNA = Kinetoplasten DNA, L = Lysosom, M = Mitochondrium, MVS = multivesikuläre Struktur, N = Nukleus, Nu = Nukleolus, rER = raues endoplasmatisches Retikulum.

Im Gegensatz zu den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln war sowohl bei den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC als auch bei den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln eine deutliche Aufnahme der Nanopartikel in die Trypanosomen zu erkennen (Abbildung 37, Abbildung 38). Zahlreiche Nanopartikel waren in der Flagellumtasche (FT) (Abbildung 38 B) und in sich abschnürenden endozytotischen Vesikeln (EV) um die Flagellumtasche (Abbildung 37 B) oder im Cytosol zu finden (Abbildung 37 C). Einige Partikel befanden sich in Endosomen (Abbildung 38 C) und die meisten Partikel hatten sich nach einer 1-stündigen Inkubation in serumfreiem Medium bereits in den Lysosomen (L) (Abbildung 37 D) oder in den Autolysosomen (AL) angesammelt (Abbildung 37 E, Abbildung 38 D-E). Ebenfalls auffällig war das Auftreten von zahlreichen multivesikularen Strukturen (MVS) in den mit Nanopartikel behandelten Trypanosomen, die im Bereich der Mitochondrien auftraten (Abbildung 37 F, Abbildung 38 D). Obwohl Trypanosomen eine der höchsten bekannten Endozytoseraten besitzen [203], war eine Aufnahme von unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln auch unter serumfreien Bedingungen nicht möglich. Im Gegensatz hierzu, war eine schnelle Aufnahme der beiden proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel nachzuweisen. Zahlreiche Nanopartikel waren innerhalb der Zellen in der Flagellumtasche (FT), in endozytotischen Vesikeln (EV), in Endosomen, hauptsächlich aber in den Lysosomen (L) und Autolysosomen (AL) zu finden.



**Abbildung 38: TEM. Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel durch *Trypanosoma brucei* in serumfreiem Medium.**

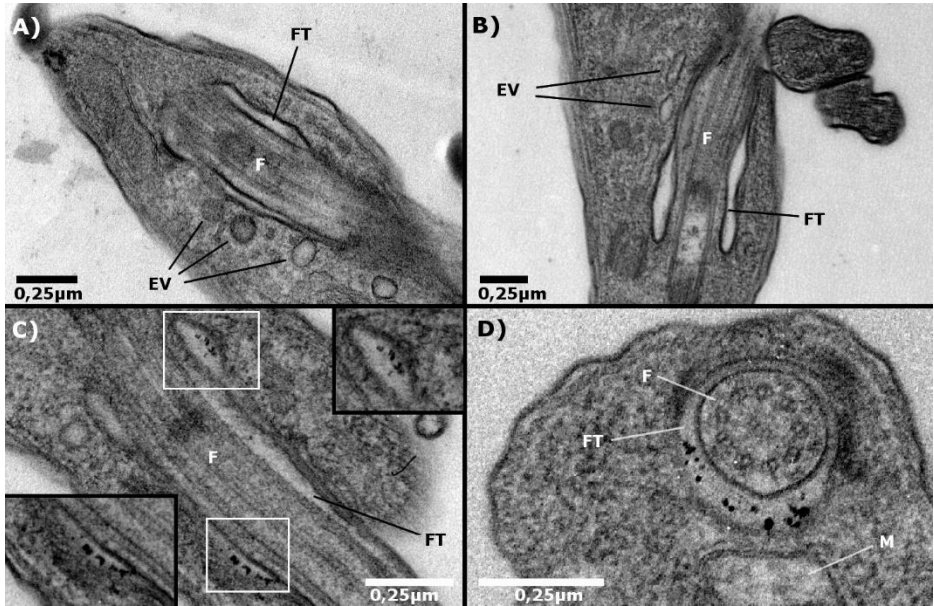
BF-221 wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen, dann auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit  $1000 \mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel für 1h in serumfreiem Medium inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ). A) unbehandelte Kontrollzellen, B) - E) Trypanosomen behandelt mit  $1000 \mu\text{g/ml}$   $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC. B) Nanopartikel in der Flagellumtasche (FT), C) Nanopartikel in Endosomen (E), D) und E) Nanopartikel in Autolysosomen (AL). AL = Autolysosom, E = Endosom, EV = endozytotisches Vesikel, ER = endoplasmatisches Retikulum, FT = Flagellumtasche, G = Golgi-Apparat, GL = Glykosom, M = Mitochondrium, MVS = multivesikuläre Struktur, N = Nukleus.

Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen der Pinozytose der BSA und der Rezeptor-vermittelten Endozytose der Transferrin beschichteten Partikel festgestellt werden.

## 3.7 Blockade der Endozytose

### 3.7.1 Inkubation von Trypanosomen mit $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF, $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen bei 4°C

Um zu demonstrieren, dass es sich bei der Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel tatsächlich um einen aktiven Prozess handelte, wurden die Parasiten während der Nanopartikelbehandlung bei 4°C inkubiert. Hierfür wurden die Trypanosomen wie unter 2.4.7.2.3 beschrieben auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und für 1h bei 4°C mit einer Konzentration von jeweils 1000µg/ml der entsprechenden Suspension in serumfreiem Medium inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für die TEM-Analyse vorbereitet (2.4.7.2.4). Während der 1-stündigen Inkubation bei 4°C kam es bei keinem der drei Partikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) zu einer Aufnahme in die Trypanosomen. In den Parasiten, die mit 1000µg/ml der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel behandelt wurden waren keine Partikel in der Flagellumtasche (FT) oder an irgendeiner anderen Stelle innerhalb der Zelle zu finden (Abbildung 39 B).



**Abbildung 39: TEM. Inkubation von Trypanosomen mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln unter serumfreien Bedingungen bei  $4^\circ\text{C}$ .**

BF-221 wurden auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und mit jeweils  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC oder  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikelsuspension behandelt. Anschließend wurden die Parasiten für 1h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert, dann eingebettet und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (EM10, ZEISS) A) unbehandelte Kontrollzellen, B) Flagellumtasche (FT) in  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF behandelte Trypanosomen, C)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel in der Flagellumtasche (FT), D)  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel in der Flagellumtasche (FT). EV = endozytotisches Vesikel, F = Flagellum, FT = Flagellumtasche, M = Mitochondrium.

Bei Trypanosomen, die mit jeweils  $1000\mu\text{g/ml}$  der proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC oder  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel inkubiert wurden, war hingegen eine deutliche Akkumulation von Nanopartikeln in der Flagellumtasche (FT) zu erkennen. Jedoch waren auch hier keine Partikel in endosomalen Strukturen innerhalb der Zelle zu finden (Abbildung 39 C und D). Es zeigte sich somit deutlich, dass es sich bei der Aufnahme der beiden proteinbeschichteten Partikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC) unter serumfreien Bedingungen um einen aktiven Prozess handelt. Die Ergebnisse zu allen untersuchten Nanopartikeln sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse**

Nanopartikel (NP)	Organismus/ Zellen	Zytotoxizität 0,1 - 1000µg/ml + Serum	Zytotoxizität 0,1- 1000µg/ml - Serum	Fluoreszenz- mikroskopie	FACS (37°C, 1h,3h, 6h,12h,24h) + Serum	FACS (37°C, 1h) - Serum	TEM, (37°C, 24h) 1000µg/ml + Serum	TEM, (37°C,1h) 1000µg/ml - Serum	TEM, (4°C,1h) 1000µg/ml - Serum
SiO <sub>2</sub> / SiO <sub>2</sub> -APTES- FITC	Erythro- zyten	toxisch TC <sub>50</sub> = 15,6µg/ml	-----	NP in Membran	-----	-----	-----	-----	-----
SiO <sub>2</sub>	<i>T.b.b.</i>	toxisch ≥ 50µg/ml	-----	-----	-----	-----	NP in L	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<i>T.b.b.</i>	toxisch ≥ 10µg/ml (stat. Phase)	-----	-----	-----	-----	keine NP in Zelle	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA	Erythro- zyten	nicht toxisch 0,1-500µg/ml	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA/ -DTAF	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	nicht toxisch	-----	langsame Aufnahme möglich	kaum Aufnahme	NP in L	keine NP in Zelle	keine NP in FT oder in Zelle
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA- BSA	Erythro- zyten	nicht toxisch 0,1-500µg/ml	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA- BSA/ -FITC	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	nicht toxisch	-----	langsame Aufnahme möglich	rasche Aufnahme ≥ 10µg/ml	NP in L, E	NP in EV,L, AL, viele MVS	NP nur in FT, nicht in der Zelle
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA-Tf	Erythro- zyten	nicht toxisch 0,1-500µg/ml	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PVA- Tf/-FITC	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	nicht toxisch	NP in der Nähe der FT	langsame Aufnahme möglich	rasche Aufnahme ≥ 10µg/ml	NP in L	NP in FT, E, AL, viele MVS	NP nur in FT, nicht in der Zelle

Nanopartikel (NP)	Organismus	Zytotoxizität 0,1 - 1000µg/ml + Serum	Zytotoxizität 0,1- 1000µg/ml - Serum	Fluoreszenz-mikroskopie	FACS (37°C, 1h,3h, 6h,12h,24h) + Serum	FACS (37°C, 1h) - Serum	TEM, (37°C, 24h) 1000µg/ml + Serum	TEM, (37°C,1h) 1000µg/ml - Serum	TEM, (4°C,1h) 1000µg/ml - Serum
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -AllythioNeu5 Ac	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	-----	-----	-----	-----	NP in FT, L	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -APS	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	-----	-----	-----	-----	NP in FT, L	-----	-----
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -NANA	<i>T.b.b.</i>	nicht toxisch	-----	-----	-----	-----	NP in L	-----	-----

**Abkürzungen:** AL = Autolysosom, E = Endosom, EV = endozytotisches Vesikel, FT = Flagellumtasche, L = Lysosom, MVS = multivesikuläre Struktur, NP = Nanopartikel.



## 4 Diskussion

### 4.1.1 Zytotoxischer Effekt von Siliziumpartikeln auf Erythrozyten und Trypanosomen

Die afrikanische Schlafkrankheit wird durch eukaryontische Parasiten der Art *Trypanosoma brucei* hervorgerufen und durch den Biss der Tsetse-Fliege auf den Säugetierwirt übertragen. Die beiden Unterarten *T.b. rhodesiense* und *T.b. gambiense* sind humanpathogen, wohingegen die dritte Unterart *T.b. brucei* nur Tiere befällt. Die Erreger verbleiben im 1. Stadium der Krankheit im Blut und in der Lymphflüssigkeit (hämolymphatische Phase) und sie dringen erst im 2. Stadium in das zentrale Nervensystem ein (meningoenzephalitische Phase) [19]. Bis heute gibt es aber nur wenige Medikamente zur Behandlung der HAT auf dem Markt, deren Entdeckung und Entwicklung überwiegend über 50 Jahre zurückliegt. Alle gängigen Medikamente sind jedoch aufgrund von hohen Produktionskosten, geringer Wirksamkeit, unerwünschten Nebeneffekten, hohen Toxizitäten, sowie Schwierigkeiten bei der Verabreichung und der Entwicklung von Resistenzen nicht zufriedenstellend [51]. Deshalb ist die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der HAT unbedingt notwendig. Hierbei könnten Nanopartikel eine entscheidende Rolle spielen, denn sie sind aus unterschiedlichen Gründen für die medizinische Anwendung sehr interessant: Zum einen sind sie in etwa so groß wie Makromoleküle und dadurch, dass ihre Oberfläche spezifisch modifiziert werden kann [168], ist ein gezieltes *targeting* von einzelnen Zellen [187, 204] oder auch der

gerichtete Transport in spezielle Organe (z.B. in das ZNS) möglich [188]. Zum anderen kann die Löslichkeit von Medikamenten durch die Anheftung, Adsorption oder die Inkorporation in Nanopartikel deutlich erhöht werden [168, 186]. In zahlreichen Studien wurden bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Liposomen und Polymernanopartikel als Medikamenten-Carrier zur Verwendung gegen Malaria, Leishmaniose, Chagas-Krankheit und die afrikanische Schlafkrankheit getestet [185]. Auch *Nanobody* (NbAn33) konjugierte Pentamidin-beladene PEG-PLGA (poly D, L-Laktid-Co- Glykolsäure) Nanopartikel und *Nanobody* (NbAn33) konjugierte Pentamidin-beladene Chitosan Nanopartikel, die ein für herkömmliche Antikörper nicht zugängliches Epitop im GPI-Anker von VSG erkennen, zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine stärkere anti-trypanosomale Wirkung als freies Pentamidin [187, 204]. Aber auch keramische Nanopartikel wie z.B. Siliziumoxidpartikel [169, 172] oder magnetische Eisenoxidnanopartikel [205, 206] könnten zum zielgerichteten Medikamententransport eingesetzt werden. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Zytotoxizität und die Aufnahme von Siliziumpartikeln und unterschiedlichen Eisenoxidpartikeln, sowohl an Trypanosomen, als auch an Erythrozyten getestet, um ihren möglichen Einsatz als Medikamenten-*Carrier* zur Behandlung der HAT näher zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Thomas Wieder vom Universitätsklinikum Tübingen und Dr. Bernd Reinhard vom Leibniz- Institut für Neue Materialien (INM) in Saarbrücken durchgeführt. Zuerst wurde der zytotoxische Effekt von SiO<sub>2</sub>- Partikeln ( ~ 8nm) wie unter 2.4.3 auf Trypanosomen mit Hilfe von Wachstumskurven im Bereich von 10µg/ml - 1000µg/ml untersucht. Diese zeigten ab einer Konzentration von 50µg/ml einen minimalen

inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Parasiten, der mit ansteigender Konzentration deutlich zunahm und zu deren Absterben führte (Abbildung 13). Obwohl SiO<sub>2</sub>-Partikel im Allgemeinen als biologisch verträglich angesehen werden, zeigten sie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zahlreiche zytotoxische Effekte. So führte die intraperitoneale Injektion amorpher SiO<sub>2</sub>-Partikel in Mäusen zu Entzündungsreaktionen [207] und nach einer intravenösen Injektion akkumulierten die Partikel hauptsächlich in Makrophagen der Leber und der Milz [208]. *In vitro* Experimente an verschiedenen humanen Zellen zeigten ebenfalls einen zytotoxischen Effekt von SiO<sub>2</sub>-Partikeln in der Endothel-Zelllinie EAHY96 [209], in A549 Alveolarepithelzellen der Lunge [210], in Fibroblasten [211] und in HaCaT Keratinozyten [212]. Typischerweise haben Siliziumpartikel ab einer Konzentration von > 10µg/ml einen Effekt auf die Vitalität von Säugetierzellen [213, 214], wobei die Toxizität sowohl von der Größe, der Dosis als auch vom Zelltyp abhängig ist [209, 214]. Als mögliche Wirkungsmechanismen der Siliziumpartikel wird die Endozytose-abhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zu einem DNA-Schaden führt [215], eine Membranzerstörung [216] sowie die Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest diskutiert [213, 217]. Auch andere keramische Nanopartikel zeigten einen zytotoxischen Effekt z.B. auf Leishmanien [218] oder auf Fibroblasten und Makrophagen [219]. Die weitere Untersuchung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (2.4.7.2.1, 2.4.7.2.4) zeigte, dass es zu einer Aufnahme der SiO<sub>2</sub>-Partikel in die Trypanosomen kam. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 50µg/ml der SiO<sub>2</sub>-Partikel in serumhaltigem Medium waren sie vor allem in den Lysosomen zu finden, ansonsten waren in den Parasiten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den

unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen (Abbildung 30). Eine Aufnahme von SiO<sub>2</sub>-Partikeln konnte auch in HeLa Zellen [220], in A549 Zellen [201, 214] und in HepG2 Leberkarzinom-Zellen nachgewiesen werden [221, 222]. In diesen Fällen konnten die Partikel sowohl im Cytosol, in Vesikeln, in endosomalen Strukturen, in Lysosomen [201, 214, 220, 221], den Mitochondrien [214, 221] und im Nukleus gefunden werden [222]. Um den zytotoxischen Effekt von fluoreszenzmarkierten Siliziumpartikeln (SiO<sub>2</sub>-APTES-FITC) auf Erythrozyten zu untersuchen, wurden die Zellen wie unter 2.4.4 vorbereitet und die Lyse der Zellen photometrisch bestimmt. Hier zeigte sich nach einer 3-stündigen Inkubation ein dosisabhängiger Anstieg der Hämolyse, wobei die TC<sub>50</sub> bei ca. 15,6µg/ml lag (Abbildung 19). Der hämolytische Effekt macht diese Nanopartikel für die Anwendung im Patienten wertlos. Die TC<sub>50</sub> von nicht porösen SiO<sub>2</sub>-Partikeln mit einer Größe von ~24nm lag nach 3h bei 8,8µg/ml [199]. Es zeigte sich zudem, dass die Hämolyse von Erythrozyten durch nicht-poröse SiO<sub>2</sub>-Partikel sowohl von der Dosis als auch der Größe abhängig ist, wobei kleinere Partikel eine deutlich stärkere Hämolyse hervorrufen als größere [199]. Hierfür ist vermutlich die größere Oberfläche pro Masse von kleineren Nanopartikeln verantwortlich und die damit einhergehende höhere Anzahl an reaktiven Silanol-Gruppen [199]. Die dosisabhängige Hämolyse konnte auch bei porösen SiO<sub>2</sub>-Partikeln bestätigt werden, wobei diese eine geringere Hämolyse Aktivität zeigten als nicht poröse [199, 223]. Hier lag die TC<sub>50</sub> von ~25nm großen Siliziumpartikeln bei 991µg/ml [199]. Bei einer genaueren Betrachtung des Wirkungsmechanismus durch Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass die toxische Wirkung auf Erythrozyten nicht durch eine Aufnahme der Partikel hervorgerufen wurde, sondern diese in die Membranen der

Zellen inserierten und zu deren Lyse führten (Abbildung 27). Diese Beobachtung der Membranzerstörung durch nicht-poröse SiO<sub>2</sub>-Partikel konnte auch durch die Messung von Propidiumiodid positiven Zellen bestätigt werden [224]. Andere Studien zeigten jedoch, dass poröse SiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer Größe von ~100nm nur an die Membran von Erythrozyten adsorbierten und sie nicht zerstörten. Größere SiO<sub>2</sub>-Partikel (~600nm) adsorbierten ebenfalls an die Membran, führten zu deren Deformation und zu einer Aufnahme der Partikel [225].

#### 4.1.2 Zytotoxischer Effekt von Eisenoxidpartikeln auf Erythrozyten und Trypanosomen

Eisenoxidpartikel ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) werden als biokompatibel, biologisch abbaubar und nicht toxisch angesehen und wurden bereits für zahlreiche biomedizinische Anwendungen genutzt [176], z.B. bei der Zellsortierung [226], beim zielgerichteten Medikamententransport [227], als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) [228] und bei der hyperthermischen Behandlung [229]. Aufgrund dieser Vorteile wurden sie im Rahmen dieser Arbeit auch an Trypanosomen und Erythrozyten getestet. Zunächst wurde wie unter 2.4.3 beschrieben die Zytotoxizität von unbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Partikeln auf *Trypanosoma brucei* untersucht, wobei im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml kein Einfluss in der exponentiellen Wachstumsphase festzustellen war. Es kam jedoch ab einer Konzentration von 100µg/ml zu einer verkürzten stationären Phase, die mit steigender Konzentration deutlich zunahm (Abbildung 14). Eine

mögliche Erklärung könnte eine Änderung in der Zusammensetzung des Mediums sein, die durch die Bindung von Serumproteinen, Vitaminen, Aminosäuren und Ionen an die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel hervorgerufen wird [179, 230]. Nach einer 90-minütigen Inkubation mit  $1000\mu\text{g/ml}$  der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel war zusätzlich noch eine Agglomeration der Partikel im Medium zu erkennen, was vermutlich die Aufnahme der Partikel in die Parasiten verhinderte (Abbildung 31). Da unbeschichtete Nanopartikel in der Regel sehr schnell in Medium und unter physiologischem pH-Wert agglomerieren und zwar durch eine Interaktion der Nanopartikel selbst, als auch mit den Molekülen im Medium, werden sie meistens mit Polymeren, sogenannten Dispersionsmitteln stabilisiert [231]. Hierbei kommen in der klinischen Anwendung vor allem Dextran [178], Alginat [232], Chitosan [229], Polyvinylalkohol (PVA) [180, 233] oder Polyethylenglykol (PEG) [179] zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eisenoxidnanopartikel mit PVA stabilisiert. Die PVA beschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel zeigten über die gesamte Kultivierungszeit eine geringere Toxizität als die nackten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel. Bei keiner der getesteten Konzentrationen ( $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$ ) war ein Einfluss auf die Proliferation der Parasiten zu erkennen, wohingegen die mit den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Partikel behandelten Trypanosomen ab  $100\mu\text{g/ml}$  eine verkürzte stationäre Phase zeigten (Abbildung 14, Abbildung 15 A). Eine geringere Toxizität von PVA-beschichteten Eisenoxidpartikeln im Vergleich zu unbeschichteten Partikeln konnte auch in Mausfibroblasten gezeigt werden [233].

Um eine Aufnahme der Partikel in die Zellen zu gewährleisten und ihre biologische Verträglichkeit zu steigern, können die Oberflächen der Nanopartikel zusätzlich mit Proteinen wie humanem Transferrin [182]

oder BSA [181] modifiziert werden. Da Trypanosomen Proteine über Pinozytose (BSA) und Rezeptor-vermittelte Endozytose (Tf) aufnehmen [129], wurden die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit BSA und humanem Tf modifiziert. Auch bei den beiden proteinbeschichteten Partikeln war im getesteten Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  für die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf bzw.  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $2000\mu\text{g/ml}$  für die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA Partikel kein deutlicher inhibitorischer Effekt auf das Wachstumsverhalten der Parasiten zu erkennen (Abbildung 15 B und C). Anschließend wurde die Toxizität der unbeschichteten und der beiden proteinbeschichteten Eisenoxidnanopartikeltypen ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf) im Bereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $500\mu\text{g/ml}$  an Erythrozyten getestet. Bei allen drei Partikeln war die Lyse  $\leq 3\%$  (Abbildung 20). Dies stimmt mit den Beobachtungen in der Literatur überein. Auch hier war keine hämolytische Wirkung von Eisenoxidnanopartikeln auf Erythrozyten im Bereich von  $5\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  festzustellen [200]. Um die Aufnahme der Partikel mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie untersuchen zu können, wurden alle drei Partikel noch zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC). Auch die Fluoreszenzmarkierung hatte sowohl unter serumhaltigen (Abbildung 16 A-C) als auch unter serumfreien Bedingungen (Abbildung 18 A-C) keinen Einfluss auf die Vitalität der Parasiten. Im Gegenteil, unter serumfreien Bedingungen überlebten Trypanosomen, die mit Konzentrationen  $\geq 100\mu\text{g/ml}$  der BSA-beschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel inkubiert wurden sogar länger als die Kontrollzellen (Abbildung 18 B). Dieser Effekt war bei Parasiten, die mit den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikeln inkubiert wurden nicht zu erkennen

Abbildung 18 A und C). Dass unterschiedlich beschichtete Eisenoxidnanopartikel eine geringe beziehungsweise gar keine Toxizität aufweisen, konnte auch bei anderen Zelllinien gezeigt werden, jedoch meistens unterhalb einer Konzentration von 100µg/ml [230]. Bei einigen Zelltypen war aber auch eine Behandlung mit sehr viel höheren Konzentrationen möglich. So zeigten z.B. menschliche Makrophagen, die mit einer Konzentration von 1mg/ml Dextran umhüllter Eisenoxidpartikel ( ~30nm) inkubiert wurden, keinen zytotoxischen Effekt [234], und die IC<sub>50</sub> von Silizium beschichteten Eisenoxidnanopartikeln (~50nm) lag bei der humanen Zelllinie A549 bei 4mg/ml [235].

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von Nanopartikeln in Medium und während der medizinischen Anwendung bietet die Oberflächenmodifizierung mit Sialinsäurederivaten. Ein Vorteil gegenüber anderen Modifikationen besteht darin, dass es sich dabei um endogene Substanzen handelt, die nicht immunogen aber biologisch abbaubar sind [236]. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Toxizität unterschiedlicher Sialinsäurederivat-modifizierter Eisenoxidnanopartikel an Trypanosomen getestet. Keiner der getesteten Partikel (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA) zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Parasiten (Abbildung 17 A-C).



#### 4.1.3 Untersuchung der Endozytose von Eisenoxidpartikeln unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen mittels Durchflusszytometrie

Die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikel zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  bzw. 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC) sowohl unter serumfreien als auch serumhaltigen Bedingungen keine Toxizität auf *Trypanosoma brucei* (Abbildung 16, Abbildung 18). Deshalb sollte nun mittels Durchflusszytometrie analysiert werden, ob es überhaupt zu einer Aufnahme der Partikel in die Parasiten kam, ob es einen Unterschied in der Endozytose von unbeschichteten oder proteinbeschichteten Eisenoxidnanopartikeln gibt und ob das im Medium enthaltene Serum eine Wirkung auf die Endozytose hat. Hierfür wurden die Trypanosomen wie unter 2.4.5 mit den entsprechenden Partikelkonzentrationen behandelt (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC bzw. 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  für  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC) und für unterschiedliche Zeiträume (1h, 3h, 6h, 12h, 24h) inkubiert. Unter serumhaltigen Bedingungen zeigte sich bei allen drei Partikeln ein zeit- und konzentrationsabhängiger Anstieg im prozentualen Anteil der FITC-A positiven Zellen, wobei Inkubationszeiten bis zu 24h und Konzentrationen bis zu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  nötig waren, um eine Aufnahme in fast alle Zellen (ca. 80-95%) zu erreichen. Bei den Trypanosomen, die mit den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikeln behandelt wurden, zeigten nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ca. 90% der Zellen ein

Fluoreszenzsignal (Abbildung 21). Im Gegensatz hierzu, wurde das Maximum bei den beiden proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikeln bereits nach einer 12-stündigen Inkubation erreicht. So zeigten bei einer Konzentration von  $1000\mu\text{g/ml}$  jeweils ca. 80% der Zellen ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 22, Abbildung 23). Bei einer Konzentration von  $2000\mu\text{g/ml}$  war bei den mit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC Partikeln inkubierten Trypanosomen bei ca. 95% der Zellen ein FITC-Signal messbar (Abbildung 22). Diese langen Inkubationszeiten von bis zu 24h sind jedoch sehr ungewöhnlich für Trypanosomen, da sie eine sehr hohe Endozytoserate aufweisen und das obwohl die Flagellumtasche, der einzige Ort der Endo- und Exozytose, nur 5% der gesamten Zelloberfläche ausmacht [80]. So sind Blutform-Trypanosomen im Stande innerhalb von 2min eine Fläche von der gesamten Größe der Membran der Flagellumtasche zu endozytieren [129]. Das *turnover* des endosomalen Volumens in *T.brucei* ist 1,5 - 3 - mal schneller als in Makrophagen oder Fibroblasten und das *turnover* der Zelloberfläche 2,6 - mal schneller als in Makrophagen und 5- bis 9 -mal schneller als in Fibroblasten [80, 237]. Im Gegensatz zu den serumhaltigen Bedingungen war während der 1-stündigen Inkubation unter serumfreien Bedingungen eine sehr rasche Aufnahme der beiden proteinbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel zu erkennen. Hier zeigte sich ab einer Konzentration von  $10\mu\text{g/ml}$  ein langsamer konzentrationsabhängiger Anstieg im prozentualen Anteil der FITC-A positiven Zellen, wobei bei  $100\mu\text{g/ml}$  ca. 60% der Zellen Nanopartikel aufgenommen hatten und ab einer Konzentration von  $500\mu\text{g/ml}$  nahezu alle Zellen ( $\geq 90\%$ ) ein Fluoreszenzsignal zeigten (Abbildung 25, Abbildung 26). Jedoch war auch hier, wie bereits unter den serumhaltigen Bedingungen, kein Unterschied zwischen der

Pinozytose von BSA und der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Tf zu erkennen, obwohl die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Tf um das 2- bis 3-fache schneller ist als die *fluid-phase* Endozytose von BSA [129]. Im Vergleich hierzu war die Aufnahme der unbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF Partikel unter serumfreien Bedingungen kaum möglich. Auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000µg/ml zeigten nur ca. 20% der Zellen ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 24). Die Beobachtung, dass proteinbeschichtete Nanopartikel von *Trypanosoma brucei* besser aufgenommen werden als unbeschichtete, konnte auch bei Daunomycin beladenen PEG- Polyvinylalkohol Nanopartikeln festgestellt werden. Die anti-trypanosomale Wirkung nahm in folgender Reihenfolge ab: Tf-Rezeptor Antikörper-gekoppelte Nanopartikel > Tf- gekoppelte Nanopartikel > BSA-gekoppelte Nanopartikel > PEG- gekoppelte Nanopartikel > unmodifizierte Nanopartikel [238]. Leider ist mittels Durchflusszytometrie keine quantitative Aussage über die aufgenommene Menge an Nanopartikeln möglich. Deshalb wäre es in Zukunft empfehlenswert, die Eisenmenge z.B. mit Hilfe eines kolorimetrischen Ferrozin-basierenden Assays [239] oder der Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS) [240] zu analysieren. Auch bei anderen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Serum einen inhibitorischen Effekt auf die Endozytoserate von unterschiedlichen Nanopartikeln haben kann [189-193]. Diese Inhibition in der Aufnahme könnte dadurch erklärt werden, dass es zu einer Bindung von Serumproteinen an die Nanopartikel kommt und damit zur Bildung einer Proteinkorona [202]. Eine Analyse von Eisenoxidnanopartikeln mit humanem Serum zeigte, dass sowohl Albumin, α1 Antitrypsin, Apolipoproteine, Fibrinogen-Ketten, Immunglobulin-Ketten, Transferrin

und Transthyretin an die Oberfläche der Partikel adsorbierten [241]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Bindung von Serumproteinen an *supermagnetic iron oxide nanoparticles* (SPIONs) sehr stark von der Oberflächenladung der Partikel abhängig ist [242]. Die Interaktion von humanem Transferrin mit SPIONs führte zu einer irreversiblen Konformationsänderung von Tf [243] und durch die Bindung von Serumproteinen kam es während einer 4-stündigen Inkubation von SPIONs in der Anwesenheit von 10% Serum zu einer Verdopplung der Größe der Nanopartikel [189]. Möglicherweise wird die Aufnahme der Nanopartikel über die Flagellumtasche in Trypanosomen unter serumhaltigen Bedingungen durch eine Vergrößerung der Partikel, Strukturveränderungen der adsorbierten Proteine, einer Maskierung von Erkennungsstellen und einer Selektivität während der Aufnahme in die Flagellumtasche verhindert. Interessanterweise wurden die meisten Endozytosestudien von Nanopartikeln in Trypanosomen entweder in TDB [187], PBS [244], serumfreiem RPMI 1640 [245], serumfreiem Inkubationsmedium [129] oder in HMI9-Medium mit 1% Serum [246] durchgeführt, was dafür spricht, dass die im Medium enthaltenen Serumproteine ein Problem während der Endozytose sein könnten.

#### 4.1.4 Untersuchung der Endozytose von Eisenoxidpartikeln unter serumhaltigen und serumfreien Bedingungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem mittels Durchflusszytometrie gemessenen FITC-Signal (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26) tatsächlich um eine Aufnahme der unbeschichteten und proteinbeschichteten Eisenoxidnanopartikel handelte und um ihre genaue Lokalisation innerhalb der Zelle zu untersuchen, wurden die Trypanosomen für das TEM vorbereitet. Die Parasiten wurden hierfür wie unter 2.4.7.2.1 und 2.4.7.2.2 mit 1000µg/ml der entsprechenden Nanopartikel-Suspension (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC) für unterschiedliche Zeitpunkte in serumhaltigem (12h oder 24h) oder serumfreiem Medium (1h) inkubiert. Da die Sialinsäurederivat-modifizierte Eisenoxidpartikel (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA) im Bereich von 0,1µg/ml - 1000µg/ml keine Zytotoxizität auf die Parasiten zeigten (Abbildung 17 A-C), sollte ihre Aufnahme, auch mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie, näher untersucht werden. Hierfür wurden die Parasiten ebenfalls wie unter 2.4.7.2.1 mit 1000µg/ml der entsprechenden Nanopartikelsuspension behandelt und für 24h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung aller Proben wie unter 2.4.7.2.4 beschrieben und die Analyse der Ultradünnschnitte unter dem Mikroskop (EM10, Zeiss). Bei allen getesteten Chargen waren nach einer 24-stündigen Inkubation zahlreiche Nanopartikel in der Flagellumtasche und in den Lysosomen

zu finden (Abbildung 35). Auf der Oberfläche von *Trypanosoma brucei* findet man zwar eine Trans-Sialidase, jedoch nur bei der prozyklischen Form und nicht in den Blutform-Trypanosomen [247, 248]. Diese Trans-Sialidase führt in prozyklischen Trypanosomen durch eine Anheftung von Sialinsäure an Prozyklin [249] zum Aufbau einer intakten Sialoglykokalyx [250] und ist für das Überleben der Parasiten im Darm der Tsetse-Fliege unerlässlich [251]. Alle Sialinsäurederivat-modifizierten Nanopartikel waren in der Flagellumtasche zu finden, was dafür spricht, dass auch diese Partikel über Endozytose aufgenommen werden. Die Bindung von Serumproteinen an die Nanopartikeloberfläche [202] könnte eine mögliche Erklärung für die endozytotische Aufnahme sein, da Blutform-Trypanosomen keinen spezifischen Rezeptor oder Transporter für Sialinsäure besitzen [247, 248]. Trypanosomen haben während einer Infektion eine sehr schnelle Verdopplungszeit von ca. 6h, und sie beziehen ihre Nährstoffe über das Blut oder über andere Körperflüssigkeiten vom Wirt [252]. Sie benötigen in etwa 40.000 Eisenatome pro Verdopplung [152], welche sie über die Rezeptorvermittelte Endozytose von Transferrin beziehen [129]. BSA gelangt über die *fluid-phase* Endozytose in die Parasiten [129]. Die Aufnahme der beiden proteinbeschichteten Partikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC), sowie die Aufnahme der unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel konnte in *Trypanosoma brucei* nach einer 12- bzw. 24-stündigen Inkubation in serumhaltigem Medium nachgewiesen werden. Die Nanopartikel akkumulierten größtenteils in den Lysosomen und in den Endosomen (Abbildung 32, Abbildung 33, Abbildung 34). Auch in anderen Zelltypen konnte beobachtet werden, dass Eisenoxidnanopartikel nach ihrer Aufnahme hauptsächlich in Endosomen oder in Lysosomen zu finden waren [230, 253]. Es wird

vermutet, dass es aufgrund des sauren Milieus im Lysosom zu einer Freisetzung von Eisen und zur Bildung von ROS durch die Fenton-Reaktion kommt, wobei die gebildeten Hydroxyl-Radikale Schäden in der DNA, in Proteinen oder in Lipiden induzieren könnten [254]. Allerdings führte die Behandlung mit Eisenoxidnanopartikeln in Trypanosomen zu keinem zytotoxischen Effekt (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18). Die Aufnahme der Nanopartikel unterschied sich unter serumhaltigen Bedingungen deutlich von der Aufnahme unter serumfreien Bedingungen. Bei den unbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln konnte nach einer 1-stündigen Inkubation unter serumfreien Bedingungen keine Aufnahme in die Trypanosomen festgestellt werden (Abbildung 36). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie überein, denn bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000µg/ml war bei lediglich 20% der Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar (Abbildung 24). Bei den Parasiten, die mit den BSA-FITC und Tf-FITC beschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln inkubiert wurden, konnten hingegen zahlreiche Nanopartikel in der Flagellumtasche, in endozytotischen Vesikeln, Lysosomen und Autolysosomen gefunden werden (Abbildung 37, Abbildung 38). Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen der Durchflusszytometrie überein. Bei beiden Partikeltypen zeigten bei einer Konzentration von 1000µg/ml ca. 95-100% der Zellen ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 25, Abbildung 26). Die Aufnahme der Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC Partikel konnte noch zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (Abbildung 28). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass proteinbeschichtete Goldpartikel unter serumfreien Bedingungen oder in HMI9-Medium mit 1% Serum von *Trypanosoma brucei* [245, 246] und *Trypanosoma cruzi* [255] endozytiert werden. In *T. brucei* handelt es sich

bei der Rezeptor-vermittelte Endozytose von Tf-gekoppelten Goldpartikeln um einen sehr schnellen Prozess. So konnten die Tf-Au Partikel bereits nach einer 5-minütigen Inkubation innerhalb der Parasiten gefunden werden [256] und befanden sich nach einer 10- minütigen Inkubation bei 37°C in der Flagellumtasche, in Vesikeln und in Lysosomen [245]. Auch die Aufnahme von BSA-gekoppelten Goldpartikeln konnte in *T. brucei* durch transmissionselektronenmikroskopische Analysen bestätigt werden. Sie wurden ebenfalls sehr schnell, innerhalb von 20min, endozytiert und akkumulierten ausschließlich in multivesikularen, lysosomenähnlichen Strukturen, jedoch nicht in der Flagellumtasche oder in tubulären Strukturen [246]. In den Trypanosomen, die mit den proteinbeschichteten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikeln, während der 1-stündigen Inkubation unter serumfreien Bedingungen behandelt wurden, konnten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auch zahlreiche multivesikuläre Strukturen im Mitochondrium gefunden werden. Diese ultrastrukturellen Veränderungen könnten auf eine autophagische Antwort durch den Nanopartikel induzierten Stress hinweisen. Die Beobachtung, dass Nanopartikel die Fähigkeit besitzen Autophagie auszulösen, wurde auch bei anderen Nanopartikeln in unterschiedlichen Zelltypen gefunden [257-260].

#### 4.1.5 Blockade der Endozytose

Um zu bestätigen, dass es sich bei der Aufnahme der BSA-FITC und Tf- FITC Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA Partikel unter serumfreien Bedingungen tatsächlich um einen aktiven Prozess handelte, wurden die Parasiten wie unter



2.4.7.2.3 beschrieben mit einer Konzentration von 1000µg/ml der entsprechenden Nanopartikel-Charge behandelt ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) und für 1h bei 4°C in serumfreiem Medium inkubiert. Die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF Partikel waren weder in der Flagellumtasche noch innerhalb der Zellen zu finden (Abbildung 39 B), wohingegen die BSA-FITC und Tf-FITC beschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel ausschließlich in der Flagellumtasche gefunden werden konnten, jedoch nicht von den Parasiten endozytiert wurden (Abbildung 39 C und D). Das zeigt deutlich, dass es sich bei der Aufnahme der beiden proteinbeschichteten Eisenoxidpartikeltypen in Trypanosomen um einen aktiven Prozess und damit um Endozytose handelte. Die Beobachtung, dass die Aufnahme von Nanopartikeln in *T. brucei* durch ein Herabsetzen der Temperatur von 37°C auf 0°C oder 4°C verhindert werden kann, konnte auch bei proteinbeschichteten Goldpartikeln gezeigt werden. Nach einer Inkubation der Parasiten mit Tf-beschichteten Goldpartikeln auf Eis, konnten diese ebenfalls nicht innerhalb der Zelle gefunden werden. Sie adsorbierten nur an die Zelloberfläche und waren gelegentlich in der Flagellumtasche zu finden, wobei die meisten Flagellumtaschen jedoch keine Tf-Au Partikel enthielten [256]. Bei Trypanosomen, die mit BSA-Goldpartikeln bei 4°C für 30min inkubiert wurden, konnten die Partikel ausschließlich in der Flagellumtasche gefunden werden [246]. Erfolgte die Inkubation mit den BSA-Goldpartikeln bei 0°C, so adsorbierten sie nur an die Zelloberfläche. Sie wurden weder in die Flagellumtasche noch in den Parasiten gefunden [252]. Auch bei den proteinbeschichteten Goldpartikeln konnte eine Aufnahme in die Parasiten erst durch eine Temperaturerhöhung auf 12°C oder 37°C für die BSA-gekoppelten [246] und auf 37°C für die Tf-gekoppelten Partikel erreicht werden [256], was

mit den Beobachtungen für die in dieser Arbeit getesteten Eisenoxidpartikel übereinstimmt.

## 4.2 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verwendung von Silizium- und Eisenoxidnanopartikeln als mögliche Medikamenten-Carrier zur Behandlung der HAT führten dazu, dass die Siliziumpartikel aufgrund ihrer Toxizität auf Erythrozyten und auf Trypanosomen als ungeeignet eingestuft wurden. Die Eisenoxidnanopartikel zeigten hingegen im getesteten Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  keinen zytotoxischen Effekt auf die Trypanosomen und auf Erythrozyten ( $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $500\mu\text{g/ml}$ ) und könnten sich daher als Medikamenten-Carrier eignen (Tabelle 7). Jedoch sollte hinsichtlich ihrer Verwendung zum Medikamententransport berücksichtigt werden, dass ihre Aufnahme unter serumhaltigen Bedingungen zwar möglich im Vergleich zu den serumfreien Bedingungen aber deutlich reduziert ist.

Dieses Ergebnis macht es fraglich, ob die aufgenommene Menge an Nanopartikeln zur erfolgreichen Bekämpfung der Parasiten ausreichen würde. Ein gezieltes *targeting* der Trypanosomen könnte in Zukunft durch die Kopplung von einem Nanobody (z.B. NbAn33) an die Eisenoxidnanopartikel erreicht werden. NbAn33 erkennt ein konserviertes Epitop im GPI-Anker von VSG [261, 262], das für herkömmliche Antikörper aufgrund des dicken VSG-Mantels nicht zugänglich ist. Da die getesteten Nanopartikel durch Endozytose

aufgenommen werden und im Lysosom akkumulieren, könnte eine Abtötung der Parasiten eventuell durch die zusätzliche Kopplung von Cysteinprotease-Inhibitoren wie z.B. Benzyloxycarbonyl-Phenylalanin-Alanin Diazomethan (Z-Phe-Ala-CHN<sub>2</sub>) erreicht werden [263]. Im Lysosom würde der Inhibitor, die für den Parasiten überlebenswichtigen Cysteinproteasen blockieren [264]. Diese sind für die Trypanosomen sowohl für den Abbau eigener Proteine aber vor allem für den Abbau von Nährstoffen wie z.B. Transferrin aus dem Wirt notwendig [265]. Die Hemmung der Cysteinproteasen würde zu einem Nährstoffmangel und letztendlich zum Tod der Parasiten führen [263-266]. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die lysosomale Cysteinprotease CathepsinB für das Überleben der Trypanosomen unbedingt erforderlich ist [264] und eine Schlüsselrolle bei der Verwertung der vom Wirt stammenden Nährstoffe einnimmt [265]. Falls der Einsatz der Z-Phe-Ala-CHN<sub>2</sub>-gekoppelten Eisenoxidnanopartikel zu einer Abtötung der Parasiten führen würde, wäre es im weiteren Verlauf denkbar, einen spezifischen Inhibitor gegen das trypanosomale CathepsinB, dessen Struktur bekannt ist, zu entwickeln und somit eine selektive Abtötung der Parasiten zu erreichen [267].

## 5 Zusammenfassung

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind nur 5 Medikamente zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit (HAT) auf dem Markt, die aber alle aufgrund von starken Nebenwirkungen und Schwierigkeiten bei der Verabreichung nicht zufriedenstellend sind [51]. Nanopartikel könnten hierbei als Medikamenten-Carrier eingesetzt werden und einen neuen Therapieansatz bieten.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte deshalb zunächst die Toxizität der Silizium- und Eisenoxidnanopartikel auf *Trypanosoma brucei brucei* und Erythrozyten untersucht werden, um eruieren zu können welcher der Nanopartikel als möglicher Medikamenten-Carrier eingesetzt werden könnte. Die Siliziumpartikel waren ab einer Konzentration von  $\geq 50\mu\text{g/ml}$  trypanozid und die  $\text{TC}_{50}$  gegenüber Erythrozyten lag bei  $15,6\mu\text{g/ml}$ . Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Siliziumpartikel in die Membran der Erythrozyten inserierten und somit zu deren Lyse führten. Die nackten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  Partikel zeigten hingegen im getesteten Konzentrationsbereich von  $0,1\mu\text{g/ml}$  -  $1000\mu\text{g/ml}$  keinen Einfluss in der exponentiellen Wachstumsphase der Trypanosomen. Es kam jedoch ab einer Konzentration von  $100\mu\text{g/ml}$  zu einer verkürzten stationären Phase, die mit steigender Konzentration deutlich zunahm. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Siliziumpartikel in Bezug auf die Medikamentenentwicklung zur Bekämpfung der HAT als ungeeignet eingestuft. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher ausschließlich mit den Eisenoxidnanopartikeln weiter gearbeitet.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte nun die Oberfläche der Eisenoxidnanopartikel hinsichtlich der Medikamentenentwicklung verbessert und die Toxizität der modifizierten Eisenoxidnanopartikel an Trypanosomen getestet werden. Um die nackten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Partikel während der Anwendung in Medium zu stabilisieren und ihre geringe Toxizität auf Trypanosomen noch weiter zu verringern, wurden sie zunächst mit unterschiedlichen Sialinsäurederivaten (AllylthioNeu5AC, APS, NANA) oder mit dem synthetischen Polymer Polyvinylalkohol (PVA) ummantelt. Bei der Negativkontrastierung der nackten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel zeigte sich, dass die Agglomeration der Partikel durch den PVA-Mantel deutlich reduziert werden konnte. Deshalb wurde im weiteren Verlauf ausschließlich mit den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln weiter gearbeitet. Darüber hinaus wurde die Oberfläche der Nanopartikel noch zusätzlich mit den Proteinen *bovine serum albumin* (BSA) oder mit humanem Transferrin (Tf) modifiziert, um eine Aufnahme in die Parasiten durch Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose zu sichern [129]. Alle drei Nanopartikel-Chargen ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf) wurden noch zusätzlich mit dem Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) modifiziert, damit die Aufnahmekinetik mittels Durchflusszytometrie untersucht und verglichen werden konnte. Keiner der genannten modifizierten Partikel zeigte im Bereich von  $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$  -  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  einen inhibitorischen Effekt auf die Trypanosomen. Die hämolytische Wirkung der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf Partikel war  $\leq 3\%$ , weshalb diese Partikel als geeignete Kandidaten für den Medikamententransport eingestuft wurden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern ein Proteinmantel für die Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel nötig ist und ob Serumproteine einen Einfluss auf die Aufnahme der Partikel haben. Deshalb wurde die Aufnahmekinetik aller drei Eisenoxidnanopartikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-DTAF,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei allen drei Partikeln in serumhaltigem Medium zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg im prozentualen Anteil der FITC-A positiven Zellen kam. Jedoch zeigte sich, dass bei allen drei Partikeltypen, unabhängig vom Proteinmantel, Konzentrationen bis zu  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  nötig waren, um eine Aufnahme in ca. 80-95% der Zellen zu erreichen. Es zeigte sich ebenfalls, dass Inkubationszeiten von bis zu 12h bei den beiden proteinbeschichteten Partikeltypen und Inkubationszeiten bis zu 24h bei den unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikeln für eine effiziente Aufnahme nötig waren. Diese langen Inkubationszeiten waren aufgrund der hohen Endozytoserate von Trypanosomen nicht zu erwarten gewesen [129]. Wurden die Versuche hingegen unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, kam es bei den beiden proteinbeschichteten Partikeln während der 1-stündigen Inkubation ab einer Konzentration von  $\geq 10\mu\text{g}/\text{ml}$  zu einem rasanten konzentrationsabhängigen Anstieg im prozentualen Anteil der fluoreszierenden Zellen. Die Aufnahme der unbeschichteten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA Partikel war hingegen selbst unter serumfreien Bedingungen kaum möglich. Bei einer Konzentration von  $1\text{mg}/\text{ml}$  war nur bei ca. 20% der Zellen ein Fluoreszenzsignal messbar. So konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung von Nanopartikeln als Medikamenten-Carrier

sowohl die Wirkung von Serumproteinen als auch die Notwendigkeit eines Proteinmantels berücksichtigt werden sollte.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Aufnahme der Partikel bestätigt und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert werden. Es konnte sowohl die Aufnahme der Siliziumpartikel als auch die der Eisenoxidnanopartikel ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -AllylthioNeu5Ac,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APS,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -NANA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC) unter serumhaltigen Bedingungen bestätigt werden. Alle Partikel befanden sich größtenteils in den Lysosomen oder in den Endosomen. Unter serumfreien Bedingungen konnte nur die Aufnahme der beiden proteinbeschichteten Partikel nachgewiesen werden. Die Nanopartikel konnten in der Flagellumtasche, in endozytotischen Vesikeln, Lysosomen und Autolysosomen gefunden werden. Es konnten ebenfalls zahlreiche multivesikuläre Strukturen in den Mitochondrien detektiert werden, was für eine autophagische Antwort der Zellen auf einen durch Nanopartikel induzierten Stress hindeutet. Dass es sich bei der Aufnahme der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-BSA-FITC und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -PVA-Tf-FITC Partikel um einen aktiven Prozess handelte, konnte ebenfalls mittels TEM bestätigt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Siliziumpartikel als ungeeignet und die Eisenoxidnanopartikel als ein möglicher geeigneter Medikamenten-Carrier zur Bekämpfung der HAT eingestuft. Da die Eisenoxidnanopartikel keine Toxizität auf die Trypanosomen bis zu einer Konzentration von 1mg/ml zeigten und in den Lysosomen akkumulierten, könnte in Zukunft eine selektive Abtötung der Parasiten durch die Kopplung eines *Nanobodies* gegen ein konserviertes Epitop im

GPI-Anker von VSG [187, 204] und die zusätzliche Kopplung eines spezifischen Inhibitors lysosomaler Cysteinproteasen einen neuen Therapieansatz bieten.



## 6 Abstract

Till today there are just 5 drugs for treatment of Human african trypanosomiasis (HAT) on the market, but they are all due to massive side effects and administration problems non-satisfying [51]. Nanoparticles, which can be used as drug-carrier, could be a new therapeutic approach.

In the first part of this work, the toxicity of silica- and iron oxide nanoparticles should be investigated on both, *Trypanosoma brucei brucei* and erythrocytes, to determine which one could be a possible candidate as a drug-carrier. Silica particles were toxic to trypanosomes at concentrations  $\geq 50\mu\text{g/ml}$  and the  $\text{TC}_{50}$  on erythrocytes was  $15.6\mu\text{g/ml}$ . Fluorescence microscopy revealed that silica particles incorporated into the membrane of erythrocytes and finally lysed the cells. However, naked  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  particles did not show a toxic effect on exponentially growing parasites in a range of  $0.1\mu\text{g/ml} - 1000\mu\text{g/ml}$ . Nevertheless, concentrations  $\geq 100\mu\text{g/ml}$  led to a dose-dependent reduction on the stationary growth phase. Because of these results, silica particles were assessed to be unsuitable as drug-carrier for treatment of HAT and in the further work, exclusively iron oxide nanoparticles were analysed.

In the second part of this work, the surface of iron oxide nanoparticles should be improved with respect to drug development, followed by testing the toxicity of modified particles on trypanosomes. To stabilize naked  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  particles during

application in medium and to minimize the marginal toxicity on trypanosomes, nanoparticles were coated by different sialic acid derivates (AllylthioNeu5Ac, APS, NANA) or the synthetic polymer polyvinyl alcohol (PVA). Negative staining of both naked and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA particles showed that agglomeration was clearly minimized by the PVA-coat. Because of this, we kept on working exclusively with the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA particles. Particles were additionally coated with either bovine serum albumin (BSA) or human transferrin (Tf), to ensure an uptake by pinocytosis or receptor-mediated endocytosis [129]. All three particles (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf) were additionally coated with the fluorophore fluorescein isothiocyanate (FITC), to analyse and compare uptake kinetics by flow cytometry. None of the named modified nanoparticles caused an obvious toxic effect on trypanosomes in a range of 0.1µg/ml – 1000µg/ml. The haemolysis on erythrocytes of the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf particles was ≤ 3%. Therefore, these particles were assessed as suitable candidates for drug-carrier.

In the third part of this work it should be investigated at what extent a protein coat is necessary for uptake of iron oxide nanoparticles and if serum proteins have an impact on the uptake. Because of this, the uptake kinetic of all three particles (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-DTAF, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC) was analysed under serum free and serum containing conditions by flow cytometry. In the presence of serum a time- and dose dependent increase in the percentage of FITC-A positive cells was for all three particles detectable. However, independent of the protein-coat of the nanoparticles, concentrations up to 1000µg/ml were

necessary to achieve an uptake in nearly all cells (ca. 80-90%). To get an effective uptake for both protein-coated particles incubation times up to 12h were required while for uncoated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA particles up to 24h were necessary. These long incubations were unexpected because of the generally high endocytosis rate of trypanosomes [129]. In the absence of serum, there was a rapid increase in the percentage of FITC- A positive cells within 1h from concentrations  $\geq 10\mu\text{g/ml}$ , for both protein-coated particles. However, uptake of uncoated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA particles was hardly possible under serum free conditions. At a concentration of 1mg/ml, only ca. 20% displayed a fluorescence signal. These results indicate that for development of nanoparticles as drug-carrier the impact of serum proteins as well as the need of a protein coat should be considered.

In the last part of the work, the uptake of the particles was to be verified and the localisation within the cell was to be analysed by transmission electron microscopy (TEM). The uptake of both silica particles and iron oxide particles (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-AllylthioNeu5Ac, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APS, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NANA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-BSA-FITC, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC) was confirmed under serum containing conditions. All particles accumulated mostly in lysosomes or endosomes. Under serum free conditions, only the uptake of both protein-coated particles was approved. Nanoparticles were located within the flagellar pocket, in endocytic vesicles, lysosomes and autolysosomes. There were also many multivesicular structures detectable, indicating an autophagic response due to nanoparticle-induced stress. It was also shown by TEM, that the uptake of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- PVA- BSA-FITC and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PVA-Tf-FITC was an active process.

Because of these results, the silica particles were assessed as unsuitable and the iron oxide nanoparticles as a possible candidate for drug-carrier against HAT. Due to the fact that iron oxide nanoparticles themselves did not exhibit a toxicity on trypanosomes up to concentrations of 1mg/ml and that they accumulate in lysosomes, a selective killing of parasites could be achieved in future by coupling a nanobody against a conserved epitope of the GPI-anchor of VSG [187, 204] and a specific lysosomal cysteine protease inhibitor to the nanoparticle. This could be a new therapeutic approach for treatment of HAT.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Williams, B.I. *African trypanosomiasis. The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases.*, **1996**.
- [2] Cox, F.E., History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). *Infectious disease clinics of North America*, **2004**, 18, (2), 231-245.
- [3] Gruby, D., Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *Comptes rendus hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences*, **1843**, 17, 1134-1136.
- [4] Winkle, S. *Geißeln der Menschheit. Kulturgeschichte der Seuchen*. Artemis und Winkler Verlag, : Düsseldorf **2005**.
- [5] Bruce, D. *Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana, in Zululand*. Bennett & Davis, 1895.: Durban, **1985**.
- [6] Steverding, D., The history of African trypanosomiasis. *Parasites & vectors*, **2008**, 1, (1), 3.
- [7] Forde, R.M., Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosoma was observed. *J. trop. Med. Hyg.*, **1902**, 5, 261-263.
- [8] Dutton, J.E., Preliminary note upon a trypanosme occurring in the blood of man. *Thompson Yates Lab Rep*, **1902**.
- [9] Castellani, A., On the discovery of a species of trypanosoma in the cerebrospinal fluid of cases of sleeping sickness. *Proc. roy. Soc.*, **1903**, 71, 501-508.
- [10] de Raadt, P. The history of sleeping sickness. [http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/country/history/en/](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/history/en/)
- [11] Kleine, F.K. *Weitere wissenschaftliche Beobachtungen über die Entwicklung von Trypanosomen in Glossinen*, **1909**.
- [12] Stephens, J.W.W., Fantham, H. B., On the Peculiar Morphology of a Trypanosome from a Case of Sleeping Sickness and the Possibility of Its Being a New Species (*T. rhodesiense*) *The Royal Society*, **1910**, 83, 28-33.
- [13] Kennedy, P.G.E., The fatal sleep. *Luath Press Limited* 2007.
- [14] WHO Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>
- [15] Fevre, E.M.; Wissmann, B.V.; Welburn, S.C.; Lutumba, P., The burden of human African trypanosomiasis. *PLoS neglected tropical diseases*, **2008**, 2, (12), e333.
- [16] Barrett, M.P.; Burchmore, R.J.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasc, A.C.; Cazzulo, J.J.; Krishna, S., The trypanosomiasis. *Lancet*, **2003**, 362, (9394), 1469-1480.

- [17] Pepin, J.; Meda, H.A., The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. *Adv Parasitol*, **2001**, *49*, 71-132.
- [18] Franco, J.R.; Simarro, P.P.; Diarra, A.; Jannin, J.G., Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical epidemiology*, **2014**, *6*, 257-275.
- [19] Brun, R.; Blum, J.; Chappuis, F.; Burri, C., Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, **2010**, *375*, (9709), 148-159.
- [20] Molyneux, D.H., Host-trypanosome interactions in Glossina. *International Journal of Tropical Insect Science*, **1980**, *1*, 39-46.
- [21] Picozzi, K.; Fevre, E.M.; Odiit, M.; Carrington, M.; Eisler, M.C.; Maudlin, I.; Welburn, S.C., Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *Bmj*, **2005**, *331*, (7527), 1238-1241.
- [22] WHO *Control and Surveillance of African Trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 984*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.
- [23] Radwanska, M.; Chamekh, M.; Vanhamme, L.; Claes, F.; Magez, S.; Magnus, E.; de Baetselier, P.; Buscher, P.; Pays, E., The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **2002**, *67*, (6), 684-690.
- [24] Berberof, M.; Perez-Morga, D.; Pays, E., A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Molecular and biochemical parasitology*, **2001**, *113*, (1), 127-138.
- [25] Uilenberg, G. *A field guide for diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis* Rome, Italy **1998**.
- [26] Raper, J.; Portela, M.P.; Lugli, E.; Frevert, U.; Tomlinson, S., Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity. *Current opinion in microbiology*, **2001**, *4*, (4), 402-408.
- [27] Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Poelvoorde, P.; Nolan, D.P.; Lins, L.; Van Den Abbeele, J.; Pays, A.; Tebabi, P.; Van Xong, H.; Jacquet, A.; Moguilevsky, N.; Dieu, M.; Kane, J.P.; De Baetselier, P.; Brasseur, R.; Pays, E., Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature*, **2003**, *422*, (6927), 83-87.
- [28] Shiflett, A.M.; Faulkner, S.D.; Cotlin, L.F.; Widener, J.; Stephens, N.; Hajduk, S.L., African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. *J Eukaryot Microbiol*, **2007**, *54*, (1), 18-21.
- [29] Mogk, S.; Meiwes, A.; Shtopel, S.; Schraermeyer, U.; Lazarus, M.; Kubata, B.; Wolburg, H.; Duszenko, M., Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. *PLoS One*, **2014**, *9*, (3), e91372.

- [30] Wolburg, H.; Mogk, S.; Acker, S.; Frey, C.; Meinert, M.; Schonfeld, C.; Lazarus, M.; Urade, Y.; Kubata, B.K.; Duszenko, M., Late stage infection in sleeping sickness. *PLoS One*, **2012**, *7*, (3), e34304.
- [31] Checchi, F.; Filipe, J.A.; Haydon, D.T.; Chandramohan, D.; Chappuis, F., Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infect Dis*, **2008**, *8*, 16.
- [32] Sudarshi, D.; Lawrence, S.; Pickrell, W.O.; Eligar, V.; Walters, R.; Quaderi, S.; Walker, A.; Capewell, P.; Clucas, C.; Vincent, A.; Checchi, F.; MacLeod, A.; Brown, M., Human African trypanosomiasis presenting at least 29 years after infection--what can this teach us about the pathogenesis and control of this neglected tropical disease? *PLoS neglected tropical diseases*, **2014**, *8*, (12), e3349.
- [33] Odiit, M.; Kansime, F.; Enyaru, J.C., Duration of symptoms and case fatality of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Tororo, Uganda. *East Afr Med J*, **1997**, *74*, (12), 792-795.
- [34] WHO *Control and Surveillance of African Trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 881.*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998.
- [35] Chappuis, F.; Loutan, L.; Simarro, P.; Lejon, V.; Buscher, P., Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, **2005**, *18*, (1), 133-146.
- [36] Lejon, V.; Buscher, P., Review Article: cerebrospinal fluid in human African trypanosomiasis: a key to diagnosis, therapeutic decision and post-treatment follow-up. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **2005**, *10*, (5), 395-403.
- [37] Magnus, E.; Vervoort, T.; Van Meirvenne, N., A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of T. B. gambiense trypanosomiasis. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*, **1978**, *58*, (3), 169-176.
- [38] Chappuis, F.; Pittet, A.; Bovier, P.A.; Adams, K.; Godineau, V.; Hwang, S.Y.; Magnus, E.; Buscher, P., Field evaluation of the CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* on blood-impregnated filter papers for diagnosis of human African trypanosomiasis in southern Sudan. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **2002**, *7*, (11), 942-948.
- [39] Noireau, F.; Force-Barge, P.; Cattand, P., Evaluation of Testryp CATT applied to samples of dried blood for the diagnosis of sleeping sickness. *Bulletin of the World Health Organization*, **1991**, *69*, (5), 603-608.
- [40] Dukes, P.; Gibson, W.C.; Gashumba, J.K.; Hudson, K.M.; Bromidge, T.J.; Kankus, A.; Asonganyi, T.; Magnus, E., Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in

- Trypanosoma brucei gambiense stocks from Cameroon. *Acta tropica*, **1992**, 51, (2), 123-134.
- [41] Lutumba, P.; Robays, J.; Miaka, C.; Kande, V.; Simarro, P.P.; Shaw, A.P.; Dujardin, B.; Boelaert, M., The efficiency of different detection strategies of human African trypanosomiasis by *T. b. gambiense*. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **2005**, 10, (4), 347-356.
- [42] Robays, J.; Bilengue, M.M.; Van der Stuyft, P.; Boelaert, M., The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, **2004**, 9, (5), 542-550.
- [43] Noireau, F.; Lemesre, J.L.; Nzoukoudi, M.Y.; Louembet, M.T.; Gouteux, J.P.; Frezil, J.L., Serodiagnosis of sleeping sickness in the Republic of the Congo: comparison of indirect immunofluorescent antibody test and card agglutination test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1988**, 82, (2), 237-240.
- [44] Lejon, V.; Buscher, P.; Magnus, E.; Moons, A.; Wouters, I.; Van Meirvenne, N., A semi-quantitative ELISA for detection of *Trypanosoma brucei gambiense* specific antibodies in serum and cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients. *Acta tropica*, **1998**, 69, (2), 151-164.
- [45] Simarro, P.P.; Louis, F.J.; Jannin, J., Sleeping sickness, forgotten illness: what are the consequences in the field? *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*, **2003**, 63, (3), 231-235.
- [46] Van Meirvenne, N. *Biological diagnosis of human African trypanosomiasis. In: Dumas M, Bouteille B, Buguet A, eds. Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*. Springer-Verlag: Paris, **1999**.
- [47] Woo, P.T., The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica*, **1970**, 27, (4), 384-386.
- [48] Ancelle, T.; Paugam, A.; Bourlioux, F.; Merad, A.; Vigier, J.P., Detection of trypanosomes in blood by the Quantitative Buffy Coat (QBC) technique: experimental evaluation. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*, **1997**, 57, (3), 245-248.
- [49] Lumsden, W.H.; Kimber, C.D.; Evans, D.A.; Doig, S.J., *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **1979**, 73, (3), 312-317.
- [50] Kennedy, P.G., Diagnosing central nervous system trypanosomiasis: two stage or not to stage? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2008**, 102, (4), 306-307.



- [51] Fairlamb, A.H., Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology*, **2003**, *19*, (11), 488-494.
- [52] Sneader, W. *Drug Discovery A History*. 1 ed. John Wiley & Sons, **2005**.
- [53] Schlitzer, M., [Agents for the treatment of African sleeping sickness. Those developed in the last century]. *Pharm Unserer Zeit*, **2009**, *38*, (6), 552-558.
- [54] Travis, A.S., Paul Ehrlich: a hundred years of chemotherapy 1891-1991. *Biochemist*, **1991**, *13*, 9-12.
- [55] Steverding, D., The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasites & vectors*, **2010**, *3*, (1), 15.
- [56] Dressel, J.; Oesper, R.E., The discovery of Germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe. *Journal of Chemical Education*, **1961**, *38*, 620-621.
- [57] Bouteille, B.; Oukem, O.; Bisser, S.; Dumas, M., Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam Clin Pharmacol*, **2003**, *17*, (2), 171-181.
- [58] Bray, P.G.; Barrett, M.P.; Ward, S.A.; de Koning, H.P., Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in parasitology*, **2003**, *19*, (5), 232-239.
- [59] Lourie, E.M.; Yorke, W., Studies in chemotherapy XXI. The trypanocidal action of certain aromatic diamidines. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, **1939**, *33*, 289-304
- [60] Friedheim, E.A., L'acide triazine-arsinique dans le traitement de la maladie du sommeil. *Ann Inst Pasteur*, **1940**, *65*, 108-118.
- [61] Friedheim, E.A., Melarsen oxide in the treatment of human trypanosomiasis. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **1948**, *42*, (3-4), 357-363.
- [62] Friedheim, E.A., Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **1949**, *29*, (2), 173-180.
- [63] Meyskens, F.L., Jr.; Gerner, E.W., Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin Cancer Res*, **1999**, *5*, (5), 945-951.
- [64] Metcalf, B.W.; Bey, P.; Danzin, C.; Jung, M.J.; Casara, P.; Vevert, J.P., Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J Am Chem Soc* **1978**, *100*, 2551-2255.
- [65] Jennings, F.W., Combination chemotherapy of CNS trypanosomiasis. *Acta tropica*, **1993**, *54*, (3-4), 205-213.
- [66] Vickerman, K., The Diversity of the kinetoplastid flagellates. *Academic Press*, **1976**, 1-34.
- [67] Fairlamb, A.H.; Weislogel, P.O.; Hoeijmakers, J.H.; Borst, P., Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **1978**, *76*, (2), 293-309.

- [68] Maslov, D.A.; Podlipaev, S.A.; Lukes, J., Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2001**, *96*, (3), 397-402.
- [69] Melhorn, H. *Grundriss Der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere* Spektrum Akademischer Verlag, **2002**.
- [70] Lom, J., Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. *Academic Press*, **1976**, 269-337.
- [71] Mogk, S.; Meiwes, A.; Bosselmann, C.M.; Wolburg, H.; Duszenko, M., The lane to the brain: how African trypanosomes invade the CNS. *Trends in parasitology*, **2014**, *30*, (10), 470-477.
- [72] Field, M.C.; Allen, C.L.; Dhir, V.; Goulding, D.; Hall, B.S.; Morgan, G.W.; Veazey, P.; Engstler, M., New approaches to the microscopic imaging of *Trypanosoma brucei*. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, **2004**, *10*, (5), 621-636.
- [73] Gull, K., The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol*, **1999**, *53*, 629-655.
- [74] Scott, V.; Sherwin, T.; Gull, K., gamma-tubulin in trypanosomes: molecular characterisation and localisation to multiple and diverse microtubule organising centres. *J Cell Sci*, **1997**, *110* ( Pt 2), 157-168.
- [75] Robinson, D.R.; Sherwin, T.; Ploubidou, A.; Byard, E.H.; Gull, K., Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol*, **1995**, *128*, (6), 1163-1172.
- [76] Matthews, K.R., The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, **2005**, *118*, (Pt 2), 283-290.
- [77] Roditi, I.; Liniger, M., Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends Microbiol*, **2002**, *10*, (3), 128-134.
- [78] Cross, G.A., Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, **1975**, *71*, (3), 393-417.
- [79] Ferguson, M.A., The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **1997**, *352*, (1359), 1295-1302.
- [80] Overath, P.; Engstler, M., Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol*, **2004**, *53*, (3), 735-744.
- [81] Vaugham, S.; Gull, K., The trypanosome flagellum. *J Cell Sci*, **2003**, *116*, 757-759.
- [82] Parsons, M., Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol*, **2004**, *53*, (3), 717-724.

- [83] Vickerman, K., Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. *Nature*, **1965**, *208*, (5012), 762-766.
- [84] Docampo, R.; Moreno, S.N., Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today*, **1999**, *15*, (11), 443-448.
- [85] Barry, J.D.; Emery, D.L., Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly. *Parasitology*, **1984**, *88* ( Pt 1), 67-84.
- [86] Seed, J.R., The role of immunoglobulins in immunity to *Trypanosoma brucei* gambiense. *Int J Parasitol*, **1977**, *7*, (1), 55-60.
- [87] Vickerman, K., Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull*, **1985**, *41*, (2), 105-114.
- [88] Barrett, M.P.; Boykin, D.W.; Brun, R.; Tidwell, R.R., Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol*, **2007**, *152*, (8), 1155-1171.
- [89] Duszenko, M.; Figarella, K.; Macleod, E.T.; Welburn, S.C., Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends in parasitology*, **2006**, *22*, (11), 536-542.
- [90] Kubata, B.K.; Duszenko, M.; Kabututu, Z.; Rawer, M.; Szallies, A.; Fujimori, K.; Inui, T.; Nozaki, T.; Yamashita, K.; Horii, T.; Urade, Y.; Hayaishi, O., Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in *Trypanosoma brucei*. *J Exp Med*, **2000**, *192*, (9), 1327-1338.
- [91] Figarella, K.; Rawer, M.; Uzategui, N.L.; Kubata, B.K.; Lauber, K.; Madeo, F.; Wesselborg, S.; Duszenko, M., Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Differ*, **2005**, *12*, (4), 335-346.
- [92] Opperdoes, F.R.; Borst, P., Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett*, **1977**, *80*, (2), 360-364.
- [93] Opperdoes, F.R., Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*, **1987**, *41*, 127-151.
- [94] Opperdoes, F.R.; Nohynkova, E.; Van Schaftingen, E.; Lambeir, A.M.; Veenhuis, M.; Van Roy, J., Demonstration of glycosomes (microbodies) in the Bodonid flagellate *Trypanoplasma borelli* (Protozoa, Kinetoplastida). *Molecular and biochemical parasitology*, **1988**, *30*, (2), 155-163.
- [95] Ardelli, B.F.; Witt, J.D.; Woo, P.T., Identification of glycosomes and metabolic end products in pathogenic and nonpathogenic strains of *Cryptobia salmositica* (Kinetoplastida: Bodonidae). *Dis Aquat Organ*, **2000**, *42*, (1), 41-51.

- [96] Parsons, M.; Furuya, T.; Pal, S.; Kessler, P., Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Molecular and biochemical parasitology*, **2001**, *115*, (1), 19-28.
- [97] Michels, P.A.; Bringaud, F.; Herman, M.; Hannaert, V., Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*, **2006**, *1763*, (12), 1463-1477.
- [98] Stein, J.; Mogk, S.; Mudogo, C.N.; Sommer, B.P.; Scholze, M.; Meiwes, A.; Huber, M.; Gray, A.; Duszenko, M., Drug development against sleeping sickness: old wine in new bottles? *Curr Med Chem*, **2014**, *21*, (15), 1713-1727.
- [99] Opperdoes, F.R.; Aarsen, P.N.; van der Meer, C.; Borst, P., Trypanosoma brucei: an evaluation of salicylhydroxamic acid as a trypanocidal drug. *Exp Parasitol*, **1976**, *40*, (2), 198-205.
- [100] Minagawa, N.; Yabu, Y.; Kita, K.; Nagai, K.; Ohta, N.; Meguro, K.; Sakajo, S.; Yoshimoto, A., An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of Trypanosoma brucei brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, **1996**, *81*, (2), 127-136.
- [101] Priest, J.W.; Hajduk, S.L., Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in Trypanosoma brucei. *J Bioenerg Biomembr*, **1994**, *26*, (2), 179-191.
- [102] Bienen, E.J.; Saric, M.; Pollakis, G.; Grady, R.W.; Clarkson, A.B., Jr., Mitochondrial development in Trypanosoma brucei brucei transitional bloodstream forms. *Molecular and biochemical parasitology*, **1991**, *45*, (2), 185-192.
- [103] Horn, D., Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology*, **2014**, *195*, (2), 123-129.
- [104] Ross, R.; Thomson, D., A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *Br Med J*, **1910**, *1*, (2582), 1544-1545.
- [105] Vickerman, K., On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci*, **1969**, *5*, (1), 163-193.
- [106] Blum, M.L.; Down, J.A.; Gurnett, A.M.; Carrington, M.; Turner, M.J.; Wiley, D.C., A structural motif in the variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei. *Nature*, **1993**, *362*, (6421), 603-609.
- [107] Turner, C.M., The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of Trypanosoma brucei. *FEMS Microbiol Lett*, **1997**, *153*, (1), 227-231.
- [108] Davies, K.P.; Carruthers, V.B.; Cross, G.A., Manipulation of the vsg co-transposed region increases expression-site switching in Trypanosoma brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, **1997**, *86*, (2), 163-177.
- [109] Turner, C.M.; Barry, J.D., High frequency of antigenic variation in Trypanosoma brucei rhodesiense infections. *Parasitology*, **1989**, *99 Pt 1*, 67-75.

- [110] Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gurtler, R.E.; McKerrow, J.; Reed, S.; Tarleton, R., Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, **2008**, *118*, (4), 1301-1310.
- [111] Vanhamme, L.; Pays, E.; McCulloch, R.; Barry, J.D., An update on antigenic variation in African trypanosomes. *Trends in parasitology*, **2001**, *17*, (7), 338-343.
- [112] Donelson, J.E., Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta tropica*, **2003**, *85*, (3), 391-404.
- [113] Steverding, D.; Stierhof, Y.D.; Chaudhri, M.; Ligtenberg, M.; Schell, D.; Beck-Sickinger, A.G.; Overath, P., ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *Eur J Cell Biol*, **1994**, *64*, (1), 78-87.
- [114] Steverding, D.; Stierhof, Y.D.; Fuchs, H.; Tauber, R.; Overath, P., Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **1995**, *131*, (5), 1173-1182.
- [115] Bitter, W.; Gerrits, H.; Kieft, R.; Borst, P., The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **1998**, *391*, (6666), 499-502.
- [116] Overath, P.; Stierhof, Y.D.; Wiese, M., Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*, **1997**, *7*, (1), 27-33.
- [117] Webster, P.; Russell, D.G., The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today*, **1993**, *9*, (6), 201-206.
- [118] Duszenko, M.; Ivanov, I.E.; Ferguson, M.A.; Plesken, H.; Cross, G.A., Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **1988**, *106*, (1), 77-86.
- [119] Ogbadoyi, E.O.; Robinson, D.R.; Gull, K., A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell*, **2003**, *14*, (5), 1769-1779.
- [120] Bastin, P.; Pullen, T.J.; Moreira-Leite, F.F.; Gull, K., Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect*, **2000**, *2*, (15), 1865-1874.
- [121] Field, M.C.; Carrington, M., The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol*, **2009**, *7*, (11), 775-786.
- [122] Oberholzer, M.; Langousis, G.; Nguyen, H.T.; Saada, E.A.; Shimogawa, M.M.; Jonsson, Z.O.; Nguyen, S.M.; Wohlschlegel, J.A.; Hill, K.L., Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Proteomics*, **2011**, *10*, (10), M111 010538.

- [123] Gadelha, C.; Wickstead, B.; de Souza, W.; Gull, K.; Cunha-e-Silva, N., Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryot Cell*, **2005**, *4*, (3), 516-525.
- [124] Bonhivers, M.; Nowacki, S.; Landrein, N.; Robinson, D.R., Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol*, **2008**, *6*, (5), e105.
- [125] Balber, A.E., The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. *Crit Rev Immunol*, **1990**, *10*, (3), 177-201.
- [126] Landfear, S.M.; Ignatushchenko, M., The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, **2001**, *115*, (1), 1-17.
- [127] Cross, G.A., Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *Bioessays*, **1996**, *18*, (4), 283-291.
- [128] Vanhollebeke, B.; De Muylder, G.; Nielsen, M.J.; Pays, A.; Tebabi, P.; Dieu, M.; Raes, M.; Moestrup, S.K.; Pays, E., A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science*, **2008**, *320*, (5876), 677-681.
- [129] Coppens, I.; Opperdoes, F.R.; Courtoy, P.J.; Baudhuin, P., Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool*, **1987**, *34*, (4), 465-473.
- [130] Mayor, S.; Pagano, R.E., Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**, *8*, (8), 603-612.
- [131] Allen, C.L.; Goulding, D.; Field, M.C., Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **2003**, *22*, (19), 4991-5002.
- [132] Hung, C.H.; Qiao, X.; Lee, P.T.; Lee, M.G., Clathrin-dependent targeting of receptors to the flagellar pocket of procyclic-form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, **2004**, *3*, (4), 1004-1014.
- [133] Field, M.C.; Carrington, M., Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic*, **2004**, *5*, (12), 905-913.
- [134] Morgan, G.W.; Hall, B.S.; Denny, P.W.; Carrington, M.; Field, M.C., The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends in parasitology*, **2002**, *18*, (11), 491-496.
- [135] Grunfelder, C.G.; Engstler, M.; Weise, F.; Schwarz, H.; Stierhof, Y.D.; Morgan, G.W.; Field, M.C.; Overath, P., Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Mol Biol Cell*, **2003**, *14*, (5), 2029-2040.
- [136] McMahon, H.T.; Boucrot, E., Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2011**, *12*, (8), 517-533.

- [137] Morgan, G.W.; Hall, B.S.; Denny, P.W.; Field, M.C.; Carrington, M., The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends in parasitology*, **2002**, *18*, (12), 540-546.
- [138] Danino, D.; Hinshaw, J.E., Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol*, **2001**, *13*, (4), 454-460.
- [139] Morgan, G.W.; Goulding, D.; Field, M.C., The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem*, **2004**, *279*, (11), 10692-10701.
- [140] Ackers, J.P.; Dhir, V.; Field, M.C., A bioinformatic analysis of the RAB genes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, **2005**, *141*, (1), 89-97.
- [141] Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renaud, H.; Bartholomeu, D.C.; Lennard, N.J.; Caler, E.; Hamlin, N.E.; Haas, B.; Bohme, U.; Hannick, L.; Aslett, M.A.; Shallom, J.; Marcello, L.; Hou, L.; Wickstead, B.; Alsmark, U.C.; Arrowsmith, C.; Atkin, R.J.; Barron, A.J.; Bringaud, F.; Brooks, K.; Carrington, M.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.J.; Churcher, C.; Clark, L.N.; Corton, C.H.; Cronin, A.; Davies, R.M.; Doggett, J.; Djikeng, A.; Feldblyum, T.; Field, M.C.; Fraser, A.; Goodhead, I.; Hance, Z.; Harper, D.; Harris, B.R.; Hauser, H.; Hostetler, J.; Ivens, A.; Jagels, K.; Johnson, D.; Johnson, J.; Jones, K.; Kerhornou, A.X.; Koo, H.; Larke, N.; Landfear, S.; Larkin, C.; Leech, V.; Line, A.; Lord, A.; Macleod, A.; Mooney, P.J.; Moule, S.; Martin, D.M.; Morgan, G.W.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Ormond, D.; Pai, G.; Peacock, C.S.; Peterson, J.; Quail, M.A.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.A.; Reitter, C.; Salzberg, S.L.; Sanders, M.; Schobel, S.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Simpson, A.J.; Tallon, L.; Turner, C.M.; Tait, A.; Tivey, A.R.; Van Aken, S.; Walker, D.; Wanless, D.; Wang, S.; White, B.; White, O.; Whitehead, S.; Woodward, J.; Wortman, J.; Adams, M.D.; Embley, T.M.; Gull, K.; Ullu, E.; Barry, J.D.; Fairlamb, A.H.; Opperdoes, F.; Barrell, B.G.; Donelson, J.E.; Hall, N.; Fraser, C.M.; Melville, S.E.; El-Sayed, N.M., The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **2005**, *309*, (5733), 416-422.
- [142] Helenius, A.; Mellman, I.; Wall, D.; Hubbard, A., Endosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, **1983**, *8*, (7), 245-250.
- [143] Huotari, J.; Helenius, A., Endosome maturation. *Embo J*, **2011**, *30*, (17), 3481-3500.
- [144] Field, H.; Farjah, M.; Pal, A.; Gull, K.; Field, M.C., Complexity of trypanosomatid endocytosis pathways revealed by Rab4 and Rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **1998**, *273*, (48), 32102-32110.
- [145] Maxfield, F.R.; Yamashiro, D.J., Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol*, **1987**, *225*, 189-198.

- [146] Checchi, F.; Filipe, J.A.; Barrett, M.P.; Chandramohan, D., The natural progression of Gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS neglected tropical diseases*, **2008**, *2*, (12), e303.
- [147] Perez-Morga, D.; Vanhollebeke, B.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D.P.; Lins, L.; Homble, F.; Vanhamme, L.; Tebabi, P.; Pays, A.; Poelvoorde, P.; Jacquet, A.; Brasseur, R.; Pays, E., Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science*, **2005**, *309*, (5733), 469-472.
- [148] Gibson, W.; Backhouse, T.; Griffiths, A., The human serum resistance associated gene is ubiquitous and conserved in *Trypanosoma brucei* rhodesiense throughout East Africa. *Infect Genet Evol*, **2002**, *1*, (3), 207-214.
- [149] Coppens, I.; Baudhuin, P.; Opperdoes, F.R.; Courtoy, P.J., Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**, *85*, (18), 6753-6757.
- [150] Coppens, I.; Levade, T.; Courtoy, P.J., Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **1995**, *270*, (11), 5736-5741.
- [151] Steverding, D., The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int*, **2000**, *48*, (3), 191-198.
- [152] Steverding, D., Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* require only small amounts of iron for growth. *Parasitol Res*, **1998**, *84*, (1), 59-62.
- [153] Pays, E.; Tebabi, P.; Pays, A.; Coquelet, H.; Revelard, P.; Salmon, D.; Steinert, M., The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell*, **1989**, *57*, (5), 835-845.
- [154] Pays, E.; Lips, S.; Nolan, D.; Vanhamme, L.; Perez-Morga, D., The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Molecular and biochemical parasitology*, **2001**, *114*, (1), 1-16.
- [155] Zomerdijk, J.C.; Kieft, R.; Duyndam, M.; Shiels, P.G.; Borst, P., Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: a telomeric expression site for variant-specific surface glycoprotein genes with novel features. *Nucleic Acids Res*, **1991**, *19*, (7), 1359-1368.
- [156] Salmon, D.; Hanocq-Quertier, J.; Paturiaux-Hanocq, F.; Pays, A.; Tebabi, P.; Nolan, D.P.; Michel, A.; Pays, E., Characterization of the ligand-binding site of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei* demonstrates a structural relationship with the N-terminal domain of the variant surface glycoprotein. *Embo J*, **1997**, *16*, (24), 7272-7278.



- [157] Duszenko, M.; Ginger, M.L.; Brennand, A.; Gualdrón-Lopez, M.; Colombo, M.I.; Coombs, G.H.; Coppens, I.; Jayabalasingham, B.; Langsley, G.; de Castro, S.L.; Menna-Barreto, R.; Mottram, J.C.; Navarro, M.; Rigden, D.J.; Romano, P.S.; Stoka, V.; Turk, B.; Michels, P.A., Autophagy in protists. *Autophagy*, **2011**, *7*, (2), 127-158.
- [158] Xie, Z.; Klionsky, D.J., Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, **2007**, *9*, (10), 1102-1109.
- [159] He, C.; Klionsky, D.J., Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, **2009**, *43*, 67-93.
- [160] Maiuri, M.C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G., Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**, *8*, (9), 741-752.
- [161] Alvarez, V.E.; Kosec, G.; Sant Anna, C.; Turk, V.; Cazzulo, J.J.; Turk, B., Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy*, **2008**, *4*, (3), 361-363.
- [162] Alvarez, V.E.; Kosec, G.; Sant'Anna, C.; Turk, V.; Cazzulo, J.J.; Turk, B., Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, **2008**, *283*, (6), 3454-3464.
- [163] Klionsky, D.J., The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, **2005**, *118*, (Pt 1), 7-18.
- [164] Klionsky, D.J.; Cregg, J.M.; Dunn, W.A., Jr.; Emr, S.D.; Sakai, Y.; Sandoval, I.V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; Ohsumi, Y., A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, **2003**, *5*, (4), 539-545.
- [165] Herman, M.; Gillies, S.; Michels, P.A.; Rigden, D.J., Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy*, **2006**, *2*, (2), 107-118.
- [166] Granqvist, C.G.; Buhrmann, R.A., Ultrafine metal particles. *J Appl Phys*, **1976**, *47*, (5), 2200-2219.
- [167] Marty, J.J.; Oppenheim, R.C.; Speiser, P., Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv*, **1978**, *53*, (1), 17-23.
- [168] McNeil, S.E., Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol*, **2005**, *78*, (3), 585-594.
- [169] Medina, C.; Santos-Martinez, M.J.; Radomski, A.; Corrigan, O.I.; Radomski, M.W., Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol*, **2007**, *150*, (5), 552-558.
- [170] Sahoo, S.K.; Labhasetwar, V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, **2003**, *8*, (24), 1112-1120.
- [171] Adler-Moore, J., AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant*, **1994**, *14 Suppl 5*, S3-7.

- [172] Manzano, M.; Colilla, M.; Vallet-Regi, M., Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Deliv*, **2009**, *6*, (12), 1383-1400.
- [173] Valdíglesias, V.; Kilic, G.; Costa, C.; Fernandez-Bertolez, N.; Pasaro, E.; Teixeira, J.P.; Laffon, B., Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ Mol Mutagen*, **2015**, *56*, (2), 125-148.
- [174] Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; S.K., J.; Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2003**, *36*, 167-181.
- [175] Lee, J.H.; Huh, Y.M.; Jun, Y.W.; Seo, J.W.; Jang, J.T.; Song, H.T.; Kim, S.; Cho, E.J.; Yoon, H.G.; Suh, J.S.; Cheon, J., Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med*, **2007**, *13*, (1), 95-99.
- [176] Arami, H.; Khandhar, A.; Liggitt, D.; Krishnan, K.M., In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*, **2015**.
- [177] McBain, S.C.; Yiu, H.H.; Dobson, J., Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine*, **2008**, *3*, (2), 169-180.
- [178] Gamarra, L.F.; Amaro, E., Jr.; Alves, S.; Soga, D.; Pontuschka, W.M.; Mamani, J.B.; Carneiro, S.M.; Brito, G.E.; Figueiredo Neto, A.M., Characterization of the biocompatible magnetic colloid on the basis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with dextran, used as contrast agent in magnetic resonance imaging. *J Nanosci Nanotechnol*, **2010**, *10*, (7), 4145-4153.
- [179] Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M.; Milani, A.S.; Stroeve, P., An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*, **2009**, *20*, (22), 225104.
- [180] Schulze, K.; Koch, A.; Petri-Fink, A.; Steitz, B.; Kamau, S.; Hottiger, M.; Hilbe, M.; Vaughan, L.; Hofmann, M.; Hofmann, H.; von Rechenberg, B., Uptake and biocompatibility of functionalized poly(vinylalcohol) coated superparamagnetic maghemite nanoparticles by synoviocytes in vitro. *J Nanosci Nanotechnol*, **2006**, *6*, (9-10), 2829-2840.
- [181] Peng, Z.G.; Hidajat, K.; Uddin, M.S., Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J Colloid Interface Sci*, **2004**, *271*, (2), 277-283.
- [182] Jiang, W.; Xie, H.; Ghoorah, D.; Shang, Y.; Shi, H.; Liu, F.; Yang, X.; Xu, H., Conjugation of functionalized SPIONs with transferrin for targeting and imaging brain glial tumors in rat model. *PLoS One*, **2012**, *7*, (5), e37376.
- [183] Veerananarayanan, S.; Poulouse, A.C.; Mohamed, S.; Aravind, A.; Nagaoka, Y.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D.S., FITC labeled silica nanoparticles as efficient cell

- tags: uptake and photostability study in endothelial cells. *J Fluoresc*, **2012**, *22*, (2), 537-548.
- [184] Gabizon, A.; Martin, F., Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs*, **1997**, *54 Suppl 4*, 15-21.
- [185] Date, A.A.; Joshi, M.D.; Patravale, V.B., Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, **2007**, *59*, (6), 505-521.
- [186] Campbell, R.B.; Balasubramanian, S.V.; Straubinger, R.M., Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel-containing liposomes. *J Pharm Sci*, **2001**, *90*, (8), 1091-1105.
- [187] Arias, J.L.; Unciti-Broceta, J.D.; Maceira, J.; Del Castillo, T.; Hernandez-Quero, J.; Magez, S.; Soriano, M.; Garcia-Salcedo, J.A., Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *J Control Release*, **2015**, *197*, 190-198.
- [188] Kreuter, J., Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*, **2004**, *4*, (5), 484-488.
- [189] Geppert, M.; Petters, C.; Thiel, K.; Dringen, R., The presence of serum alters the properties of iron oxide nanoparticles and lowers their accumulation by cultured brain astrocytes. *Journal of Nanoparticle Research*, **2013**, *15*, (1349).
- [190] Bajaj, A.; Samanta, B.; Yan, H.; Jerry, D.J.; Rotello, V.M., Stability, toxicity and differential cellular uptake of protein passivated-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, **2009**, *19*, (35), 6233-6428.
- [191] Zhu, Y.; Li, W.; Li, Q.; Li, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Huang, Q., Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon*, **2009**, *47*, (5), 1351-1358.
- [192] Guarnieri, D.; Guaccio, A.; Fusco, S.; Netti, P.A., Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, **2011**, *13*, (9), 4295-4309.
- [193] Tedja, R.; Lim, M.; Amal, R.; Marquis, C., Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano*, **2012**, *6*, (5), 4083-4093.
- [194] Eagle, H., Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **1959**, *130*, (3373), 432-437.
- [195] Duszenko, M.; Ferguson, M.A.; Lamont, G.S.; Rifkin, M.R.; Cross, G.A., Cysteine eliminates the feeder cell requirement for cultivation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vitro. *J Exp Med*, **1985**, *162*, (4), 1256-1263.

- [196] Duszenko, M.; Muhlstadt, K.; Broder, A., Cysteine is an essential growth factor for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Molecular and biochemical parasitology*, **1992**, *50*, (2), 269-273.
- [197] Lanham, S.M., Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature*, **1968**, *218*, (5148), 1273-1274.
- [198] Vieira, C.S.; Almeida, D.B.; de Thomaz, A.A.; Menna-Barreto, R.F.; dos Santos-Mallet, J.R.; Cesar, C.L.; Gomes, S.A.; Feder, D., Studying nanotoxic effects of CdTe quantum dots in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2011**, *106*, (2), 158-165.
- [199] Lin, Y.S.; Haynes, C.L., Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J Am Chem Soc*, **2010**, *132*, (13), 4834-4842.
- [200] Niemirowicz, K.; Swiecicka, I.; Wilczewska, A.Z.; Markiewicz, K.H.; Surel, U.; Kulakowska, A.; Namiot, Z.; Szyńska, B.; Bucki, R.; Car, H., Growth arrest and rapid capture of select pathogens following magnetic nanoparticle treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2015**, *131*, 29-38.
- [201] Lesniak, A.; Fenaroli, F.; Monopoli, M.P.; Aberg, C.; Dawson, K.A.; Salvati, A., Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano*, **2012**, *6*, (7), 5845-5857.
- [202] Saptarshi, S.R.; Duschl, A.; Lopata, A.L., Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*, **2013**, *11*, 26.
- [203] Webster, P.; Griffiths, G., A novel method for mean cell volume estimation. *Journal of Microscopy*, **1994**, *174*, (2), 85-92.
- [204] Unciti-Broceta, J.D.; Arias, J.L.; Maceira, J.; Soriano, M.; Ortiz-Gonzalez, M.; Hernandez-Quero, J.; Munoz-Torres, M.; de Koning, H.P.; Magez, S.; Garcia-Salcedo, J.A., Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. *PLoS Pathog*, **2015**, *11*, (6), e1004942.
- [205] Jain, T.K.; Morales, M.A.; Sahoo, S.K.; Leslie-Pelecky, D.L.; Labhasetwar, V., Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm*, **2005**, *2*, (3), 194-205.
- [206] Kayal, S.; Ramanujan, R.V., Anti-cancer drug loaded iron-gold core-shell nanoparticles (Fe@Au) for magnetic drug targeting. *J Nanosci Nanotechnol*, **2010**, *10*, (9), 5527-5539.
- [207] Park, E.J.; Park, K., Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett*, **2009**, *184*, (1), 18-25.
- [208] Xie, G.; Sun, J.; Zhong, G.; Shi, L.; Zhang, D., Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Arch Toxicol*, **2010**, *84*, (3), 183-190.

- [209] Napierska, D.; Thomassen, L.C.; Rabolli, V.; Lison, D.; Gonzalez, L.; Kirsch-Volders, M.; Martens, J.A.; Hoet, P.H., Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*, **2009**, *5*, (7), 846-853.
- [210] Lin, W.; Huang, Y.W.; Zhou, X.D.; Ma, Y., In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2006**, *217*, (3), 252-259.
- [211] Chang, J.S.; Chang, K.L.; Hwang, D.F.; Kong, Z.L., In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ Sci Technol*, **2007**, *41*, (6), 2064-2068.
- [212] Yang, X.; Liu, J.; He, H.; Zhou, L.; Gong, C.; Wang, X.; Yang, L.; Yuan, J.; Huang, H.; He, L.; Zhang, B.; Zhuang, Z., SiO<sub>2</sub> nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. *Part Fibre Toxicol*, **2010**, *7*, 1.
- [213] Ahmad, J.; Ahamed, M.; Akhtar, M.J.; Alrokayan, S.A.; Siddiqui, M.A.; Musarrat, J.; Al-Khedhairy, A.A., Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2012**, *259*, (2), 160-168.
- [214] Kim, I.Y.; Joachim, E.; Choi, H.; Kim, K., Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine*, **2015**, *11*, (6), 1407-1416.
- [215] Nabeshi, H.; Yoshikawa, T.; Matsuyama, K.; Nakazato, Y.; Tochigi, S.; Kondoh, S.; Hirai, T.; Akase, T.; Nagano, K.; Abe, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Itoh, N.; Tsunoda, S.; Tsutsumi, Y., Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. *Part Fibre Toxicol*, **2011**, *8*, 1.
- [216] de Planque, M.R.; Aghdaei, S.; Roose, T.; Morgan, H., Electrophysiological characterization of membrane disruption by nanoparticles. *ACS Nano*, **2011**, *5*, (5), 3599-3606.
- [217] Ye, Y.; Liu, J.; Xu, J.; Sun, L.; Chen, M.; Lan, M., Nano-SiO<sub>2</sub> induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. *Toxicol In Vitro*, **2010**, *24*, (3), 751-758.
- [218] Allahverdiyev, A.M.; Abamor, E.S.; Bagirova, M.; Baydar, S.Y.; Ates, S.C.; Kaya, F.; Kaya, C.; Rafailovich, M., Investigation of antileishmanial activities of TiO<sub>2</sub>@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. *Exp Parasitol*, **2013**, *135*, (1), 55-63.
- [219] Yamamoto, A.; Honma, R.; Sumita, M.; Hanawa, T., Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J Biomed Mater Res A*, **2004**, *68*, (2), 244-256.
- [220] Al-Rawi, M.; Diabate, S.; Weiss, C., Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO<sub>2</sub> particles in HeLa cells. *Arch Toxicol*, **2011**, *85*, (7), 813-826.

- [221] Sun, L.; Li, Y.; Liu, X.; Jin, M.; Zhang, L.; Du, Z.; Guo, C.; Huang, P.; Sun, Z., Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicol In Vitro*, **2011**, *25*, (8), 1619-1629.
- [222] Chen, M.; von Mikecz, A., Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Exp Cell Res*, **2005**, *305*, (1), 51-62.
- [223] Slowing, II; Wu, C.W.; Vivero-Escoto, J.L.; Lin, V.S., Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*, **2009**, *5*, (1), 57-62.
- [224] Yu, T.; Malugin, A.; Ghandehari, H., Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano*, **2011**, *5*, (7), 5717-5728.
- [225] Zhao, Y.; Sun, X.; Zhang, G.; Trewyn, B.G.; Slowing, II; Lin, V.S., Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano*, **2011**, *5*, (2), 1366-1375.
- [226] Pamme, N.; Wilhelm, C., Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis. *Lab Chip*, **2006**, *6*, (8), 974-980.
- [227] Sun, C.; Lee, J.S.; Zhang, M., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **2008**, *60*, (11), 1252-1265.
- [228] Kim, B.Y.; Rutka, J.T.; Chan, W.C., Nanomedicine. *N Engl J Med*, **2010**, *363*, (25), 2434-2443.
- [229] Park, J.H.; Im, K.H.; S.H., L.; Kim, D.H.; Lee, D.J.; Lee, Y.K.; Kim, K.M.; Kim, K.N., Preparation and characterization of magnetic chitosan particles for hyperthermia application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2005**, *293*, (1), 328-333.
- [230] Lei, L.; Ling-Ling, L.; Yun, Z.; Gang, L., Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Research strategies and implications for nanomedicine. *Chinese Physics B*, **2013**, *22*, 127503-127501 -127510.
- [231] Amstad, E.; Textor, M.; Reimhult, E., Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*, **2011**, *3*, (7), 2819-2843.
- [232] Ma, H.L.; Qi, X.R.; Maitani, Y.; Nagai, T., Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *Int J Pharm*, **2007**, *333*, (1-2), 177-186.
- [233] Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M.; Shokrgozar, M.A.; Milani, A.S.; Hafeli, U.O.; Stroeve, P., A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2010**, *75*, (1), 300-309.
- [234] Muller, K.; Skepper, J.N.; Posfai, M.; Trivedi, R.; Howarth, S.; Corot, C.; Lancelot, E.; Thompson, P.W.; Brown, A.P.; Gillard, J.H., Effect of ultrasmall

- superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials*, **2007**, *28*, (9), 1629-1642.
- [235] Kim, J.S.; Yoon, T.J.; Yu, K.N.; Noh, M.S.; Woo, M.; Kim, B.G.; Lee, K.H.; Sohn, B.H.; Park, S.B.; Lee, J.K.; Cho, M.H., Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J Vet Sci*, **2006**, *7*, (4), 321-326.
- [236] Zhang, T.; She, Z.; Huang, Z.; Li, J.; Luo, X.; Deng, Y., Application of sialic acid/polysialic acid in the drug delivery systems *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2014**, *9*, (2), 75-81.
- [237] Thilo, L., Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, **1985**, *822*, (2), 243-266.
- [238] Flaig, R.M.; Rosenkranz, V.; Wink, M.; Fricker, G., Ktenate nanoparticles (bdellosoemes): a novel strategy for delivering drugs to parasites or tumours. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2005**, *15*, (1), 59-63.
- [239] Geppert, M.; Hohnholt, M.; Gaetjen, L.; Grunwald, I.; Baumer, M.; Dringen, R., Accumulation of iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *J Biomed Nanotechnol*, **2009**, *5*, (3), 285-293.
- [240] Kamruzzaman Selim, K.M.; Ha, Y.S.; Kim, S.J.; Chang, Y.; Kim, T.J.; Ho Lee, G.; Kang, I.K., Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes. *Biomaterials*, **2007**, *28*, (4), 710-716.
- [241] Jansch, M.; Stumpf, P.; Graf, C.; Ruhl, E.; Muller, R.H., Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. *Int J Pharm*, **2012**, *428*, (1-2), 125-133.
- [242] Hirsch, V.; Kinnear, C.; Moniatte, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Clift, M.J.; Fink, A., Surface charge of polymer coated SPIONs influences the serum protein adsorption, colloidal stability and subsequent cell interaction in vitro. *Nanoscale*, **2013**, *5*, (9), 3723-3732.
- [243] Mahmoudi, M.; Shokrgozar, M.A.; Sardari, S.; Moghadam, M.K.; Vali, H.; Laurent, S.; Stroeve, P., Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale*, **2011**, *3*, (3), 1127-1138.
- [244] Eger, I.; Soares, M.J., Endocytosis in *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Kinetoplastea) epimastigotes: visualization of ingested transferrin-gold nanoparticle complexes by confocal laser microscopy. *J Microbiol Methods*, **2012**, *91*, (1), 101-105.
- [245] Webster, P.; Grab, D.J., Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **1988**, *106*, (2), 279-288.

- [246] Brickman, M.J.; Cook, J.M.; Balber, A.E., Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes. *J Cell Sci*, **1995**, *108* ( Pt 11), 3611-3621.
- [247] Engstler, M.; Reuter, G.; Schauer, R., Purification and characterization of a novel sialidase found in procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, **1992**, *54*, (1), 21-30.
- [248] Engstler, M.; Reuter, G.; Schauer, R., The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein. *Molecular and biochemical parasitology*, **1993**, *61*, (1), 1-13.
- [249] Pontes de Carvalho, L.C.; Tomlinson, S.; Vandekerckhove, F.; Bienen, E.J.; Clarkson, A.B.; Jiang, M.S.; Hart, G.W.; Nussenzweig, V., Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J Exp Med*, **1993**, *177*, (2), 465-474.
- [250] Schauer, R.; Kamerling, J.P., The chemistry and biology of trypanosomal trans-sialidases: virulence factors in Chagas disease and sleeping sickness. *Chembiochem*, **2011**, *12*, (15), 2246-2264.
- [251] Nagamune, K.; Acosta-Serrano, A.; Uemura, H.; Brun, R.; Kunz-Renggli, C.; Maeda, Y.; Ferguson, M.A.; Kinoshita, T., Surface sialic acids taken from the host allow trypanosome survival in tsetse fly vectors. *J Exp Med*, **2004**, *199*, (10), 1445-1450.
- [252] Webster, P., Endocytosis by African trypanosomes. I. Three-dimensional structure of the endocytic organelles in *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Eur J Cell Biol*, **1989**, *49*, (2), 295-302.
- [253] Wilhelm, C.; Billotey, C.; Roger, J.; Pons, J.N.; Bacri, J.C.; Gazeau, F., Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, **2003**, *24*, (6), 1001-1011.
- [254] Singh, N.; Jenkins, G.J.; Asadi, R.; Doak, S.H., Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*, **2010**, *1*.
- [255] Soares, M.J.; de Souza, W., Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*, **1991**, *77*, (6), 461-468.
- [256] Webster, P.; Marsh, M., Endocytosis by African Trypanosomes. **1989**.
- [257] Khan, M.I.; Mohammad, A.; Patil, G.; Naqvi, S.A.; Chauhan, L.K.; Ahmad, I., Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, **2012**, *33*, (5), 1477-1488.
- [258] Zabinryk, O.; Yezhelyev, M.; Seleverstov, O., Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. *Autophagy*, **2007**, *3*, (3), 278-281.
- [259] Sun, T.; Yan, Y.; Zhao, Y.; Guo, F.; Jiang, C., Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS One*, **2012**, *7*, (8), e43442.



- [260] Yu, K.N.; Yoon, T.J.; Minai-Tehrani, A.; Kim, J.E.; Park, S.J.; Jeong, M.S.; Ha, S.W.; Lee, J.K.; Kim, J.S.; Cho, M.H., Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicol In Vitro*, **2013**, *27*, (4), 1187-1195.
- [261] Stijlemans, B.; Conrath, K.; Cortez-Retamozo, V.; Van Xong, H.; Wyns, L.; Senter, P.; Revets, H.; De Baetselier, P.; Muyldermans, S.; Magez, S., Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem*, **2004**, *279*, (2), 1256-1261.
- [262] Baral, T.N.; Magez, S.; Stijlemans, B.; Conrath, K.; Vanhollebeke, B.; Pays, E.; Muyldermans, S.; De Baetselier, P., Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med*, **2006**, *12*, (5), 580-584.
- [263] Scory, S.; Caffrey, C.R.; Stierhof, Y.D.; Ruppel, A.; Steverding, D., Trypanosoma brucei: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Exp Parasitol*, **1999**, *91*, (4), 327-333.
- [264] Mackey, Z.B.; O'Brien, T.C.; Greenbaum, D.C.; Blank, R.B.; McKerrow, J.H., A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem*, **2004**, *279*, (46), 48426-48433.
- [265] O'Brien, T.C.; Mackey, Z.B.; Fetter, R.D.; Choe, Y.; O'Donoghue, A.J.; Zhou, M.; Craik, C.S.; Caffrey, C.R.; McKerrow, J.H., A parasite cysteine protease is key to host protein degradation and iron acquisition. *J Biol Chem*, **2008**, *283*, (43), 28934-28943.
- [266] Scory, S.; Stierhof, Y.D.; Caffrey, C.R.; Steverding, D., The cysteine proteinase inhibitor Z-Phe-Ala-CHN2 alters cell morphology and cell division activity of Trypanosoma brucei bloodstream forms in vivo. *Kinetoplastid biology and disease*, **2007**, *6*, 2.
- [267] Redecke, L.; Nass, K.; DePonte, D.P.; White, T.A.; Rehders, D.; Barty, A.; Stellato, F.; Liang, M.; Barends, T.R.; Boutet, S.; Williams, G.J.; Messerschmidt, M.; Seibert, M.M.; Aquila, A.; Arnlund, D.; Bajt, S.; Barth, T.; Bogan, M.J.; Caleman, C.; Chao, T.C.; Doak, R.B.; Fleckenstein, H.; Frank, M.; Fromme, R.; Galli, L.; Grotjohann, I.; Hunter, M.S.; Johansson, L.C.; Kassemeyer, S.; Katona, G.; Kirian, R.A.; Koopmann, R.; Kupitz, C.; Lomb, L.; Martin, A.V.; Mogk, S.; Neutze, R.; Shoeman, R.L.; Steinbrener, J.; Timneanu, N.; Wang, D.; Weierstall, U.; Zatsepin, N.A.; Spence, J.C.; Fromme, P.; Schlichting, I.; Duszynski, M.; Betzel, C.; Chapman, H.N., Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser. *Science*, **2013**, *339*, (6116), 227-230.

**Kooperationspartner:**

Prof. Dr. Thomas Wieder, Universitätsklinikum Tübingen, Hautklinik,  
Tübingen, Deutschland, Erythrozyten

Dr. Bernd Reinhard, Leibniz-Institut für Neue Materialien, Saarbrücken,  
Deutschland, Nanopartikelpräparation

Dr. Céline Belot, Leibniz-Institut für Neue Materialien, Saarbrücken,  
Deutschland, Nanopartikelpräparation