

Aus der Abteilung für Immunologie  
(Wiss. Leiter Prof. Dr. B. Fleischer)  
des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin

**Chemotaktische und aktivierende Wirkung der Nagerfilarie  
*Litomosoides sigmodontis* auf primäre humane Natürliche Killer-  
(NK) Zellen und NK-Zelllinien**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Christiane Zepig

aus Lüneburg

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 26.01.2009  
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof Dr. B. Fleischer  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof Dr. F. Koch-Nolte  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof Dr. H.-W. Mittrücker

**Abkürzungen**

$\alpha$	Alpha
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
ACA	Acrylamid
A. dest.	Aqua destillata
ADV	Advanced protein assay reagent
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
$\beta$	Beta
BSA	Bovines Serum Albumin
$Ca^{2+}$	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CI	Chemotaktischer Index
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CMV	Cytomegalivirus
DEC	Diethylcarbamazin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>Enzyme linked immunospot technique</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FPR	Formylpeptidrezeptor
FSC	<i>Forward scatter</i>
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
$\gamma$	Gamma
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IP	Interferon-induzierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
KP	Komplettpuffer
LAK	Lymphokin aktivierte Killerzellen
LGL	<i>Large granular lymphocytes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LsE	<i>Litomosoides sigmodontis</i> Extrakt
LT	Leukotrien
m	Männchen
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
Mf	Mikrofilarien
MG	Molekulargewicht

Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na-Pyruvat	Natrium-Pyruvat
n.d.	nicht getestet ( <i>not done</i> )
neg	negativ
<i>p.i.</i>	nach Infektion ( <i>post infectionem</i> )
PBMC	periphere Blutmonozyten ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetate
PMN	<i>Polymorphonuclear leukocytes</i>
PTX	Pertussistoxin
RT	Raumtemperatur
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T expressed and secreted</i>
RPMI-1640 medium	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS	Natriumdisulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SFC	<i>Spot forming cells</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
Tab.	Tabelle
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPE	Tropische Pulmonale Eosinophilie
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
w	Weibchen
Maßeinheiten:	
cm	Zentimeter
d	Tag
°C	Grad Celsius
kD	Kilodalton
L	Liter
M	Mol
mA	Milliamper
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
sec	Sekunde
h	Stunde

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Das menschliche Immunsystem in der Infektabwehr</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Natürliche Killerzellen</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Migration und Chemotaxis (CT) von Natürlichen Killerzellen</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b>Filarien</b> .....	<b>10</b>
1.4.1	Inzidenzraten und Bedeutung.....	10
1.4.2	Infektionszyklus .....	10
1.4.3	Verbreitung .....	11
1.4.4	Immunreaktion.....	13
1.4.5	Lymphatische Filariose.....	14
1.4.6	Loiasis.....	16
1.4.7	Onchozerkose.....	17
1.4.8	Therapie mit Doxycyclin.....	20
<b>1.5</b>	<b>Die Nagerfilarie <i>Litomosoides sigmodontis</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.6</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>27</b>
2.1.1	Geräte.....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3	Chemikalien .....	28
2.1.4	Antikörper .....	30
2.1.4.1	Enzyme linked immunospot (ELISPOT) technique .....	30
2.1.4.2	NK-Zell Isolierung.....	30
2.1.4.3	Fluorescence-activated cell sorter (FACS)-Färbung.....	30
2.1.5	Lösungen und Medien .....	31
2.1.6	Buffy coat.....	34
2.1.7	NKL- und YT-Zelllinien.....	34
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.2.1	Gewinnung von Wurmextrakt .....	36
2.2.2	Gewinnung von Mikrofilarien .....	37
2.2.3	Gewinnung von Wurmkulturüberständen .....	37
2.2.4	Herstellung von Fraktionen.....	37
2.2.4.1	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC)-Säule .....	37
2.2.4.2	<i>Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography</i> (RP-HPLC)-Säule .....	38
2.2.5	Proteinbestimmung.....	38
2.2.6	Proteinnachweis im Wurmextrakt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
	(SDS-PAGE) und Silberfärbung .....	38
2.2.7	Lymphozytenaufreinigung aus Spenderblut ( <i>Buffy coats</i> ).....	39
2.2.8	Entfernung der B-Lymphozyten mittels Nylonwollensäule .....	40
2.2.9	Immunomagnetische Separation von NK-Zellen (MACS).....	40
2.2.10	FACS-Färbung.....	41
2.2.11	FACS-Sorten .....	41
2.2.12	NK-Zelllinien .....	42
2.2.12.1	Kultivierung von NK-Zelllinien .....	42
2.2.12.2	Einfrieren von Zellen.....	42
2.2.12.3	Zellzählung.....	43

2.2.13	Chemotaxisversuche .....	43
2.2.13.1	Boyden-Kammer.....	44
2.2.13.2	Transwell®-Platte .....	45
2.2.13.2.1	Chemotaxisversuche mit lebenden Mikrofilarien.....	45
2.2.13.3	AP48 Mikrokammer .....	46
2.2.13.3.1	Fibronektinbehandlung der Membran .....	47
2.2.14	Behandlung der primären humanen NK-Zellen mit Pertussistoxin .....	47
2.2.15	Checkerboardanalyse.....	47
2.2.16	Nachweis von Aktivierungsmarkern .....	47
2.2.16.1	Nach Stimulation (ohne CT) .....	48
2.2.16.2	Nach Chemotaxis .....	48
2.2.17	FACS-Analyse .....	48
2.1.18	Enzyme linked immunospot (ELISPOT) technique .....	49
2.2.19	Statistik und Berechnungen.....	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorversuche .....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Analyse der Wurmextrakte mittels SDS-PAGE .....	51
3.1.2	Ermittlung der NK-Zell-Frequenz im Spenderblut .....	52
3.1.3	Chemotaxis von NK-Zellen auf Positivkontrollen .....	54
3.1.4	Chemotaxisversuch mit Fibronektin beschichteter Membran.....	55
<b>3.2</b>	<b>Chemotaxis naiver humaner NK-Zellen auf Mikrofilarien, Wurmextrakt und Kulturüberstände von <i>L. sigmodontis</i>.....</b>	<b>57</b>
3.2.1	Chemotaxis auf lebende Mikrofilarien von <i>L. sigmodontis</i> .....	57
3.2.2	Chemotaxis auf Kulturüberstände von <i>L. sigmodontis</i> .....	57
3.2.3	Chemotaxis auf Extrakte von homogenisierten <i>L. sigmodontis</i> Würmern.....	58
3.2.4	Wirkung von Pertussistoxin auf die NK-Zell Wanderung.....	61
3.2.5	Checkerboardanalyse.....	62
3.2.6	Einfluss einer zuvorigen Doxycyclinbehandlung von mit <i>L. sigmodontis</i> infizierten Mäusen .....	63
<b>3.3.</b>	<b>Chemotaxis humaner NK-Zelllinien auf Wurmextrakt.....</b>	<b>65</b>
<b>3.4</b>	<b>Analyse von Wurmextraktfraktionen von <i>L. sigmodontis</i> Weibchen zur weiteren Charakterisierung NK-Zell chemotaktischer Moleküle .....</b>	<b>68</b>
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung gewanderter NK-Zellen: Einfluß der Chemotaxis auf Aktivierung und Zytokinproduktion der primären NK-Zellen.....</b>	<b>73</b>
3.5.1	CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> Subpopulationen von NK-Zellen.....	73
3.5.2	Aktivierungsmarker CD69 und CD25 .....	75
3.5.3	Zytokinantwort naiver primärer NK-Zellen .....	79
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodenkritik .....</b>	<b>84</b>
<b>4.2</b>	<b>Chemotaxis von naiven primären humanen NK-Zellen .....</b>	<b>87</b>
4.2.1	Chemotaxis auf lebende Mikrofilarien und Kulturüberstände von Mikrofilarien von <i>L. sigmodontis</i> .....	87
4.2.2	Chemotaxis mit Extrakt von homogenisierten <i>L. sigmodontis</i> .....	87
4.2.3	Wirkung von Pertussistoxin auf die NK-Zell Wanderung.....	89
4.2.4	Checkerboardanalyse.....	89
4.2.5	Einfluss der Endobakterien auf die Chemotaxis.....	90
<b>4.3</b>	<b>Chemotaxis humaner NK-Zelllinien ausgelöst durch Wurmextraktmoleküle .....</b>	<b>90</b>
<b>4.4</b>	<b>Analyse von Wurmextraktfraktionen aus adulten <i>L. sigmodontis</i> Weibchen .....</b>	<b>91</b>

<b>4.5</b>	<b>Charakterisierung gewanderter NK-Zellen: Aktivierung und Zytokinproduktion</b> .....	<b>93</b>
	<b>der NK-Zellen</b> .....	<b>93</b>
4.5.1	CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> Subpopulation von NK-Zellen .....	93
4.5.2	Aktivierungsmarker CD69 und CD25 .....	94
4.5.3	Zytokinantwort .....	96
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsnachweis</b> .....	<b>118</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>119</b>

## 1. Einleitung

### 1.2 Das menschliche Immunsystem in der Infektabwehr

Zum Schutz vor Viren, Pilzen, Bakterien, Parasiten, aber auch vor Tumorzellen und körperfremden Molekülen besitzen Pflanzen, Tiere und der Mensch verschiedene physikalische und chemische Abwehrmechanismen und ein komplexes Immunsystem. Das humane Immunsystem besteht aus zwei Achsen, dem angeborenen (*innate*), natürlichen Anteil, und dem adaptiven, spezifischen Teil. Beide sind über mehrere Schnittpunkte miteinander verknüpft. Während bei der spezifischen Immunantwort der zelluläre Anteil von den B- und T-Lymphozyten gebildet wird, werden zu der angeborenen Immunantwort Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und einige T-Zellsubpopulationen wie u.a. die NKT-Zellen gezählt. Der humorale Anteil besteht bei beiden Achsen aus dem Komplementsystem, welches bei der unspezifischen Immunantwort über den alternativen Weg und bei der adaptierten über den klassischen Weg aktiviert wird. Bei der spezifischen humoralen Abwehr bilden die von den B-Lymphozyten produzierten Immunglobuline den bedeutenderen Anteil. Naive B-Zellen werden durch Quervernetzung eines Antigens durch Oberflächenantikörper aktiviert. Dies führt zu einer Internalisierung und Aufarbeitung des Antigens mit den verbundenen Antikörpern. Durch weitere Signale z.B. durch Interleukin (IL)-4 Produktion und *cluster of differentiation* (CD)40-Ligand einer T<sub>H2</sub>-Zelle wird die B-Zelle zur Proliferation und Differenzierung in eine Plasmazelle oder Gedächtniszelle angeregt. T-Lymphozyten, die die spezifische zelluläre Abwehr bilden, werden mittels Antigenpräsentation durch Antigen präsentierende Zellen aktiviert. Naive T-Lymphozyten erkennen ihr spezifisches Antigen und werden über ein Doppelsignal zur IL-2-Sekretion und -Rezeptorhochregulierung angeregt. Dies führt zur klonalen Expansion. Die T-Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen oder zu T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub>-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen initiieren ohne weitere Stimulation die Apoptose infizierter Zellen und aktivieren im Fall der Helferzellen Makrophagen (T<sub>H1</sub>) oder B-Zellen (T<sub>H2</sub>). Sowohl die humorale, als auch die zelluläre spezifische Immunantwort benötigen bei einer Infektion eine Anlaufzeit bis sie effektiv wirken. Zunächst ist daher die unspezifische

Immunabwehr von großer Bedeutung. Durch Antigene oder nach Opsonierung durch Antikörper oder Komplementsystem werden Granulozyten und Monozyten zur Phagozytose und Entzündungsmediatorenfreisetzung angeregt. Dies bewirkt eine Chemotaxis weiterer Zellen z.B. von NK-Zellen in den Entzündungsherd. NK-Zellen wirken zytotoxisch und produzieren Zytokine. Außerdem sind sie in der Lage B- und T-Zellen zu kostimulieren (Zingoni et al., 2004; Blanca et al., 2001) und T-Zellen über Chemokinproduktion zur Migration anzuregen (Roda et al., 2006). Dies bedeutet, dass NK-Zellen eine Brückenfunktion zwischen dem spezifischen und natürlichen Immunsystem einnehmen.

(Zusammengefasst nach Janeway, 2005; Silbernagel & Despopoulos, 2001)

## **1.2 Natürliche Killerzellen**

NK-Zellen zählen zu den Lymphozyten und entstehen im Knochenmark. Zunächst aufgrund ihrer Morphologie als large granular lymphocytes (LGL), also große, granuläre Lymphozyten beschrieben (Timonen, 1997), führte ihre Fähigkeit Tumorzellen zu lysieren zu dem Terminus „Natürliche Killerzellen“ (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975; Korbel et al., 2004). NK-Zellen sind im inaktiven Zustand zwischen 7-8 µm und im aktiven Zustand 10-12 µm groß, haben einen nierenförmigen Kern und ein mit Granula gefülltes Zytoplasma (Whiteside & Herberman, 1994).

Der Anteil der NK-Zellen an Lymphozyten des peripheren Blutsystems wird zwischen 10-15 % (Robertson & Ritz, 1990), 10-20 % (Moretta et al., 2002) und 5-30 % (Bisset et al., 2004) angegeben. Er variiert in einzelnen Lebensabschnitten. Direkt nach der Geburt ist er am größten, nimmt bis zu einem Alter von 9 Monaten ab und steigt dann bis in die späte Adoleszenz wieder an (Comans-Bitter et al., 1997). Weiterhin besteht ein Geschlechterunterschied. Gesunde männliche Studienteilnehmer hatten prozentual mehr NK-Zellen und mehr HLA-DR Expression, und somit mehr aktivierte NK-Zellen, als weibliche Studienteilnehmer (Bisset et al., 2004).

Periphere NK-Zellen werden in ihrer Konzentration und in ihrer Zytotoxizität durch Katecholaminanstieg, wie er bei psychischem Stress (Schedlowski et al., 1993a+b) und sportlichen Aktivitäten entsteht, beeinflusst. Intensives körperliches Training führt zu einer Reduktion der Zytotoxizität und einer signifikanten Steigerung der CD56<sup>bright</sup> Zellen (Suzui et al., 2004). In einer Studie zu intensivem Training bei älteren Menschen zeigte sich eine Reduktion der Anzahl der NK-Zellen (Bermon et al., 2001). Des Weiteren ist die Aktivität der NK-Zellen bei Personen, die an einer *Major Depression* erkrankt sind, herabgesetzt (Nerozzi et al., 1989).

Für Ethanol konnte im Tierexperiment ein negativer Einfluss auf NK-Zellen nachgewiesen werden (Boyadjieva et al., 2001). Für humane NK-Zellen gelang dies nur *in vitro*, nicht aber *in vivo* (Saxena et al., 1986; Ochshorn-Adelson et al., 1994).

Bei den humanen NK-Zellen handelt es sich, in Bezug auf die Oberflächenmarker, um eine heterogene Population. Ihnen allen zueigen ist die Expression des Markers CD56 (N-CAM) und das Fehlen des Oberflächenproteins CD3, das mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist. Bei der Ausprägung von CD56 werden zwei Untergruppen unterschieden. Bei der einen handelt es sich um CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Zellen, somit um Zellen, die viel CD56 exprimieren, aber kein CD16. Die andere Gruppe ist die CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> Untergruppe. Sie exprimiert wenig CD56, dafür aber CD16 (Cooper et al., 2001a). Genexpressionsprofile anhand von Mikroarray-Analysen konnten zeigen, dass es sich um separate Populationen handelt (Hanna et al., 2004; Wendt et al., 2006). Im peripheren Blutsystem bilden die CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> mit 90% den Großteil der NK-Zellpopulation. Diese Untergruppe ist aufgrund der Rezeptorausprägung und der hohen Expression von Perforin für die zytotoxischen Fähigkeiten der NK-Zellen verantwortlich. Die CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Zellen hingegen produzieren mehr Zytokine und spielen somit eine wichtige Rolle bei Entzündungen und deren Regulierung (Cooper et al., 2001b). Weiterhin ist es die CD56<sup>bright</sup> Untergruppe, die in den sekundären Lymphorganen, wie Lymphknoten, Milz, Waldeyer-Rachenring, Peyer-Plaques, vermehrt nachweisbar ist und dort mittels Zytokinen mit dendritischen und T-Zellen in Verbindung steht (Fehniger et al., 2003; Mocikat et al., 2003).

Im aktivierten Zustand bilden NK-Zellen Aktivierungsmarker aus. CD25 stellt einen späten und CD69 einen frühen Aktivierungsmarker dar. Beide Marker sind nicht spezifisch für NK-Zellen, sondern werden auch von aktivierten B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert. Bei CD25 handelt es sich um die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, auch *T-cell activation antigen* genannt, welches keine Signaltransduktion vermittelt. CD69 wird unter anderem bei der Inkubation von NK-Zellen mit der humanpathogenen Filarie *Brugia malayi* hochreguliert (Babu et al., 2007), ansonsten ist über seine Funktion wenig bekannt. Bei eosinophilen Granulozyten wird eine Agonisten vermittelte Apoptose über unter anderem CD69 berichtet (Förster et al., 2000).

Es ist bekannt, dass NK-Zellen die Typ 1-Zytokine produzieren können. Dazu zählen Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Leukotrien (LT) und Interleukin-8 (IL-8) (Trinchieri, 1989). *In vitro* ist es gelungen in Gegenwart von IL-4, NK-Zellen zur Produktion von IL-5 und IL-13 zu stimulieren (Peritt et al., 1998). Dies führt zu der Unterscheidung von NK<sub>1</sub>- und NK<sub>2</sub>-Zellen, ähnlich der Differenzierung von T-Helferzellen. Für *B. malayi* konnte sowohl eine NK<sub>1</sub>- als auch eine NK<sub>2</sub>-Reaktion der NK-Zellen nachgewiesen werden. Diese war vom Entwicklungsstadium der Filarie abhängig (Babu et al., 2007). Das dritte Larvenstadium (L3) und Mikrofilarien induzierten eine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Zytokinantwort. Dies entspricht den Ergebnissen von Hsieh et al. (2004) die eine IFN- $\gamma$  produzierende Wirkung des Helminthen *Necator americanus* auf NK-Zellen nachwies. Darüber hinaus reagierten NK-Zellen auf lebende Mikrofilarien mit einer Produktion von IL-4 und IL-5.

NK-Zellen sind in der Lage Tumorzellen und virusinfizierte Zellen ohne vorherige Stimulation zu lysieren. Dies wurde von Kärre 1985 zunächst mit der *missing-self*-Theorie, die sich auf die Herabregulierung von MHC-I-Molekülen auf der Membran veränderter Zellen und somit auf die verminderte Bindung an inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen bezog, erklärt. Mittlerweile sind eine Reihe inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren bekannt. Diese spielen eine Rolle bei der Regulierung der NK-Zellen bei der Reaktion auf Infektionserreger, Tumoren und körperfremde Zellen bei Transplantationen (Biassoni et al., 2002;

Korbel et al., 2004; Bryceson & Long, 2008). Korten et al. (2002) konnten erstmalig einen Einfluss eines Parasiten, der Filarie *Litomosoides sigmodontis*, auf die Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen zeigen (siehe Abschnitt 1.6 und 4.5.2). Des Weiteren können NK-Zellen über Zytokine aus aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert werden und so indirekt auf Pathogene reagieren, aber auch direkt über ihre Expression von *Toll-like-Rezeptoren (TLR)*, die z.B. Lipopolysaccharide (LPS) aus Bakterien erkennen können (Goodier & Londei, 2000; Lodoen & Lanier, 2006; Newman & Riley, 2007).

### 1.3 Migration und Chemotaxis (CT) von Natürlichen Killerzellen

In Abgrenzung zur Chemokinese, bei der es aufgrund von Zellaktivierung zu einer ungerichteten Wanderung der Zellen kommt, handelt es sich bei der Chemotaxis um eine zielgerichtete Zellwanderung entlang eines Konzentrationsgefälles eines Botenstoffes (Keller et al., 1977).

Es werden zwei Arten der Chemotaxis unterschieden: Positive Chemotaxis in Richtung der höheren Stoffkonzentration und negative Chemotaxis in die entgegengesetzte Richtung. Eine strikte Trennung der beiden Begrifflichkeiten Chemotaxis und Chemokinese wird von einigen Autoren abgelehnt. Wilkinson postulierte 1988, dass Chemotaxis und Chemokinese nicht getrennt von einander betrachtet werden könnten und Chemotaxine auch einen chemokinetischen Effekt haben. Für chemotaktische Experimente wird zum Beispiel ein Versuchsaufbau, wie in Abb. 1 skizziert, verwendet.

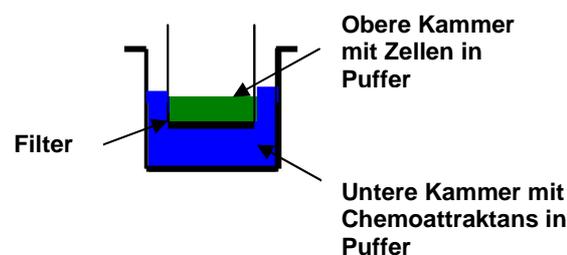


Abb. 1 Schematische Darstellung einer Boyden-Kammer für Chemotaxisversuche.

NK-Zellen können in Entzündungsgewebe und zu Tumoren entlang eines Zytokingradienten einwandern. 1985 wurde erstmals die Migration von NK-Zellen *in vitro* auf zwei klassische Chemoattraktantien: Kasein und aktiviertes Medium, beschrieben (Bottazzi et al., 1985). Mittlerweile wurden eine große Anzahl verschiedener Chemoattraktantien für NK-Zellen entdeckt. Zu der heterogenen Gruppe der Substanzen, die eine Chemotaxis induzieren, gehören unter anderem:

- das 9 kD Protein des Granulysin (Deng et al., 2005)
- *Heat Shock Protein* (HSP)70 (Gastpar et al., 2004)
- Plättchen aktivierender Faktor (PAF)
- Lysolipide wie Sphingosylphosphorylcholin und Lysophosphatidylcholin aus der Gruppe der Lysophosphatiden (Jin et al., 2005)
- Sphingosin-1-phosphat und dessen Phospholipid (Kveberg et al., 2002).

Von den Zytokinen wirken TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , als nicht zu den Chemokinen gehörend, auf NK-Zellen chemotaktisch. Auch das Tripeptid Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) als Bestandteil bakterieller Membranen hat eine chemotaktische Wirkung. Diese ist hinreichend für Neutrophile (Harvath et al., 1980) und NK-Zellen bekannt (Pohajdak et al., 1986). FMLP bindet an den hoch affinen Formylpeptidrezeptor (FPR) und an das weniger affine FPR-*like*1-Protein (Gauthier et al., 2007).

Bei Chemokinen handelt es sich um Zytokine, die zwischen 8 und 15 kD groß sind. Aufgrund ihrer konservierten Aminosäurenstruktur am N-Terminus, mit mindestens vier nahe liegenden Cysteinen, werden sie zusammengefasst und weiter in vier Untergruppen aufgeteilt (Tab. 1):

- CXC - zwei Cysteinmoleküle durch eine andere Aminosäure (AS) getrennt,
- CC - zwei direkt aufeinander folgende Cysteinmoleküle,
- CX<sub>3</sub>C - zwei Cysteinmoleküle durch drei andere AS getrennt
- C - ein Cysteinmolekül

Als Beispiel kann *Regulated upon activation normal T expressed and secreted* (RANTES) angeführt werden, welches ein CC-Chemokin ist und auf NK-Zellen wirkt (Taub et al., 1995; Inngjerdingen et al., 2001).

Die meisten chemotaktisch wirksamen Moleküle binden an sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren, die an Guanylnucleotidbindende Proteine

(G-Proteine) gekoppelt sind. Durch eine Aufspaltung des G-Protein in seine  $\alpha$ -GTP- und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten werden je nach G-Proteintyp verschiedene Signalsysteme und -moleküle so genannte *second messenger* aktiviert. In Bezug auf  $G_0$  handelt es sich um eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung, bei  $G_i$  um eine Senkung der intrazellulären Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP)-Konzentration durch Hemmung der Adenylatcyclase (Maghazachi & Al-Aoutkaty, 1998). Pertussistoxin (PTX) ist in der Lage Cysteinreste am Carboxylende der  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_0$ - oder  $G_i$ -Proteinen zu ADP zu ribosylieren und somit den Rezeptor zu blockieren. Dies wurde für einige Chemokine (Maghazachi et al., 1994), für Sphingosine-1-phosphat (Kveberg et al., 2002) und für Lysophosphatide (Jin et al., 2005) nachgewiesen.

Chemokine bewirken nicht nur eine Chemotaxis der NK-Zellen, sondern verstärken auch deren Zytotoxizität (Taub et al., 1995; Robertson, 2002). Erwähnenswert bei den Chemokinen ist die Tatsache, dass einige von ihnen auf nicht aktivierte NK-Zellen wirken, obwohl deren bekannte Rezeptoren nicht nachweisbar sind (Robertson, 2002). Außerdem können verschiedene Liganden an einzelne Rezeptoren binden und die Rezeptoren verschiedene Liganden (Robertson, 2002, Tab. 1). Bei allen Ergebnissen ist zu beachten, dass von den Autoren unterschiedlich aktivierte bzw. nicht aktivierte NK-Zellen verwendet wurden. Die Expression der für die gerichtete Migration wichtigen Chemokinrezeptoren ist individuell unterschiedlich (Berahovich et al., 2006). Weiterhin liegen Diskrepanzen in Veröffentlichungen in Bezug darauf vor, welche Rezeptoren von NK-Zellen exprimiert werden (Campbell et al., 2001; Inngjerdigen et al., 2001). Dies könnte an unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden liegen (Robertson, 2002). Es wurde beschrieben, dass Rezeptoren bei Aufreinigung der NK-Zellen herunterreguliert werden könnten (Taub et al., 1995). Für humane NK-Zellen konnte ein unterschiedliches Migrationsverhalten der beiden Untergruppen  $CD56^{\text{dim}}$  und  $CD56^{\text{bright}}$  nachgewiesen werden (Robertson, 2002). Dies spiegelt sich unter anderem in der unterschiedlichen Rezeptorexpression der Subpopulationen wider (Tab. 1 und Robertson, 2002). Für murine NK-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich Subpopulationen, hier in Bezug auf  $CD27^{\text{dim}}$  und  $CD27^{\text{bright}}$

Untergruppen, im Migrationsverhalten unterscheiden (Hayakawa & Smyth, 2006). Eine Migration von NK-Zellen auf Moleküle von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Parasiten wurde, mit der Ausnahme von fMLP als Bakterienmembranbestandteil, bisher nicht untersucht.



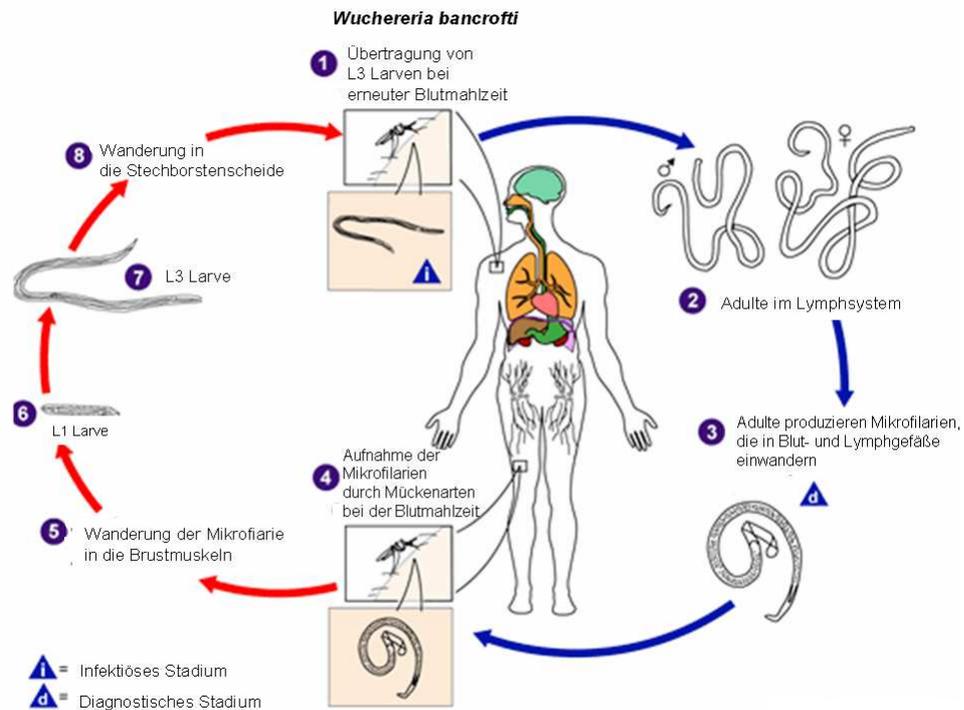
## 1.4 Filarien

### 1.4.1 Inzidenzraten und Bedeutung

Weltweit sind laut WHO ca. 2 Milliarden Menschen mit parasitischen Helminthen infiziert (WHO, 2002). Diese lassen sich in zwei Phyla einteilen: zum einem die Nematoden (Fadenwürmer) und zum anderem die Plathelminthes (Plattwürmer). Zu dem zweiten Stamm gehören die Klassen der Trematoda (Saugwürmer) und Cestoda (Bandwürmer). Die Mehrzahl der Infektionen ist auf gastrointestinale Nematoden zurückzuführen. Mit Filarien, die zum Stamm der Nematoden gehören und Erreger der Filariosen sind, sind ca. 150 Millionen Menschen infiziert. Die Bedeutung der Infektion mit Filarien ergibt sich weniger aus der Mortalität der Erkrankung, sondern aus der Morbidität und den sozioökonomischen Folgen für die Betroffenen. Dies wird durch die Einstufung der Filariosen durch die WHO in Bezug auf wirtschaftliche Folgen verdeutlicht. Hier sind lediglich die Infektionen mit Malaria und Tuberkulose bedeutsamer (WHO, 2002).

### 1.4.2 Infektionszyklus

Filarien werden durch Vektoren, blutsaugende Arthropoden, übertragen. Im Fall der Onchozerkose handelt es sich um *Simulien*-Arten. Es gibt drei Haupterkrankungen die durch humanpathogene Filarien hervorgerufen werden: Die lymphatische Filariose durch die Erreger *Wuchereria bancrofti*, *B. malayi* und *Brugia timori*, Loa loa durch *Loa loa* und die Onchozerkose, auch Flussblindheit genannt, durch *Onchocerca volvulus*. In Abbildung 2 wird der Infektionszyklus von Filarien beispielhaft an *W. bancrofti* dargestellt.



**Abb. 2** Lebenszyklus der Filarie *Wuchereria bancrofti* als Beispiel infektionszyklus (modifiziert nach cdc, [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

### 1.4.3 Verbreitung

Die Erkrankungen sind in den Tropen endemisch. Die Verbreitungsgebiete sind je nach Erreger und Vektor verschieden (Tab. 2, Abb. 3 und 4). Sie werden in den nachfolgenden Abschnitten 1.3.4 bis 1.3.6 im Einzelnen beschrieben.

**Tab. 2** Verbreitungsgebiete einiger humanpathogener Filarien (nach Höfler, 1999).

Erreger	Endemiegebiet
<i>Wuchereria bancrofti</i>	in den Tropen
<i>Brugia malayi</i>	Ostasien
<i>Brugia timori</i>	Ostasien
<i>Loa loa</i>	afrikanischer Regenwald
<i>Onchocerca volvulus</i>	tropisches Afrika und Amerika

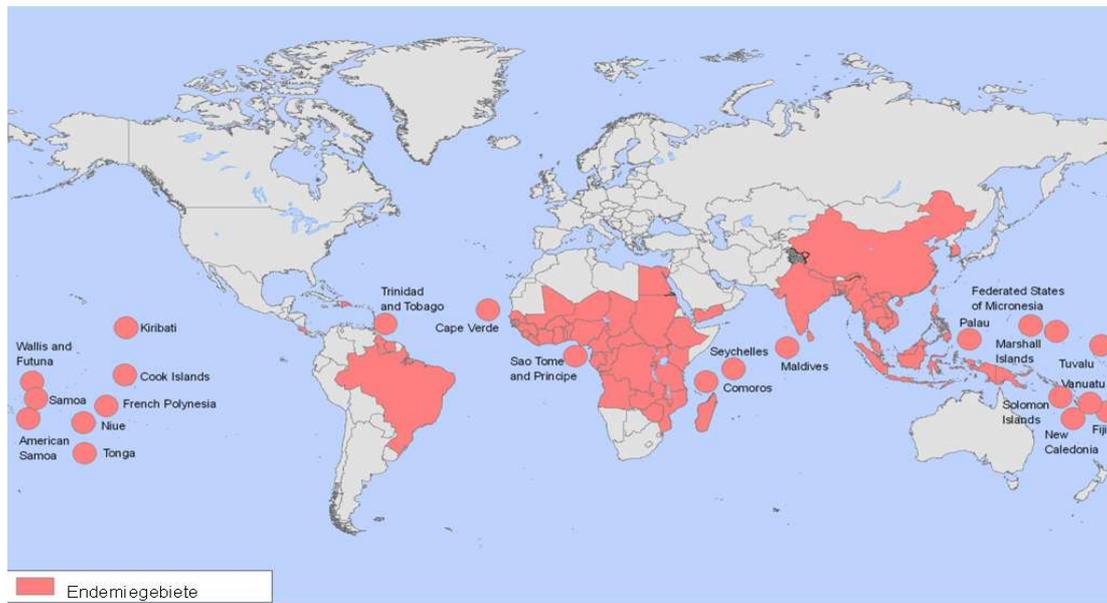


Abb. 3 Endemiegebiete der lymphatischen Filariose (modifiziert nach WHO, 2006).

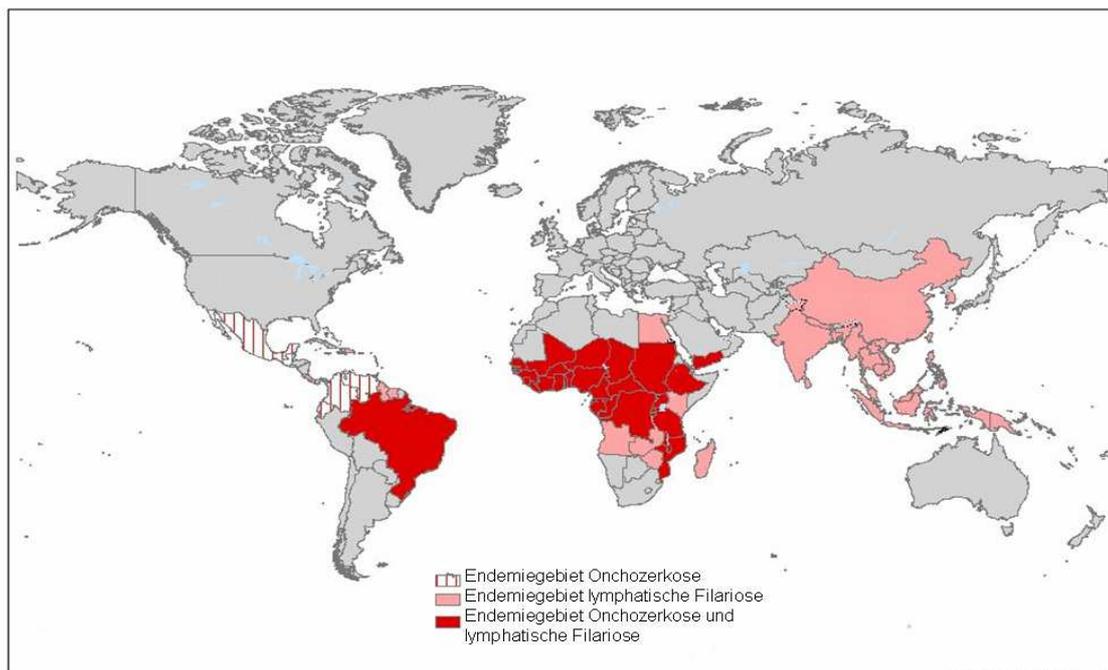


Abb. 4 Endemiegebiete der lymphatischen Filariose und der Onchozerkose (modifiziert nach WHO, 2002).

#### 1.4.4 Immunreaktion

Im Rahmen einer Filarieninfektion kommt es zu einer für Wurmerkrankungen charakteristischen Eosinophilie, zu einer unspezifischen Erhöhung von IgE, IgG, IgM und spezifischen Erhöhung von IgG1 und IgG4 Antikörpern. Zudem zeigt sich eine Zytokinproduktion des  $T_{H2}$ -Typs mit IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Maizels et al., 2004).

Infektionen mit Filarien sind langwierige Erkrankungen, bei denen die Parasiten sowohl abwehrende als auch immunsupprimierende Immunreaktionen hervorrufen. So induzieren Filarien lokal im infizierten Gewebe regulatorische T-Zellen, die sowohl die  $T_{H1}$  als auch  $T_{H2}$  Immunantwort unterdrücken (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003; Hoerauf et al., 2005; Korten et al., 2008). Diese Immunmodulation ist vor allem in Bezug auf Koinfektionen wie mit Malaria bedeutend. Sie unterdrückt aber auch die antigenspezifische Antwort auf Impfungen wie die Tetanusimpfung (Cooper et al., 1998). Die verschiedenen Symptome, mit denen Individuen auf eine Infektion mit Filarien reagieren, werden mit unterschiedlichen Immunreaktionen der Menschen auf den Parasiten erklärt, vergleichbar mit der Lepra.

Bei Filariosen lassen sich drei Immunreaktionen auf Filarien im Sinne eines Immunspektrums unterscheiden. Individuen, die in Endemiegebieten leben, bei denen aber keine Infektionen nachweisbar sind, so genannte putativ Immune, haben eine ausgeglichene  $T_{H1}$ -/ $T_{H2}$ -Antwort und mehr IgE als IgG4 im Blut nachweisbar. Bei lymphatischer Filariose führt eine überschießende  $T_{H1}$ -Antwort mit reduzierten IgG4-Titern zu klinischen Erkrankungen. Infizierte, aber klinisch unauffällige Patienten, oder Patienten mit einer milden Symptomatik weisen vermehrt regulatorische T-Zellen auf, die die Immunantwort modifizieren (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003). Bei der Onchozerkose lässt sich die Auswirkung verschiedener Immunreaktionen anhand der hyperreaktiven (<1% der Infizierten, stärkere  $T_{H2}$ -Antwort) und der hyporeaktiven (>90% der Infizierten, gemischte Antwort mit  $T_{H3}$  und  $T_{H1}$ ) Form der Onchozerkose, darlegen. Bei der generalisierten, hyporeaktiven Form werden nur degenerierte Mikrofilarien von Eosinophilen erkannt und angegriffen (Wildenburg et al., 1996). Bei der hyperreaktiven Form werden mittels Antikörper auch intakte

Mikrofilarien opsoniert. Dies führt zu einer starken lokalbegrenzten Dermatitis und zu einer Mastozytose im Onchozerkom (Korten et al., 1998).

#### 1.4.5 Lymphatische Filariose

Aufgrund der mannigfaltigen Symptomatik der lymphatischen Filariose, die nicht in Korrelation mit der Parasitämie steht, gibt es verschiedene Einteilungen. In einer Klassifizierung unterteilte die WHO 1995 die lymphatische Filariose in vier Hauptgruppen:

##### I. Asymptomatische amikrofilarämische Form

Bei exponierten Personen, die in diese Gruppe gezählt werden, ließen sich weder klinische Symptome noch Parasiten, jedoch Immunantworten auf Filarien nachweisen.

##### II. Akute lymphatische Filariose

Diese Form wird auch Filarienfieber genannt. Es kommt neben unspezifischen Symptomen wie Fieber und Erschöpfung zu Phasen mit Lymphadenitis, Lymphangitis und bei Männern zu Funikulitis, Epididymitis und Orchitis. Diese akuten Symptome dauern einige Wochen an, rezidivieren mehrmals im Jahr und können über die Jahre, besonders bei Immigranten, exazerbieren.

##### III. Asymptomatische mikrofilarämische Form

Dieser Gruppe werden Individuen zugeordnet, die eine Mikrofilariämie haben, klinisch aber keine Symptome aufweisen.

##### IV. Chronische lymphatische Filariose.

Die jahrelange Infektion, bei der es zu einem Fortschreiten der Fibrosierung der Lymphgefäße und somit zu einer Obstruktion kommt, führt zu Symptomen wie Lymphödem und Elephantiasis (Abb. 5). Bei einigen Patienten treten nur Chylurie und Hämaturie auf.



**Abb. 5 Patient mit Lymphödem des linken Beines (Elephantiasis)** ([www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/index.htm)).

Eine bereits 1984 von Ottesen veröffentlichte Einteilung verknüpft die akute und chronische lymphatische Filariose zu einem Unterpunkt und zählt die Tropische Pulmonale Eosinophilie (TPE) extra auf. Hierbei kommt es bei Betroffenen zu nächtlichem Husten und Belastungsdyspnoe. Bei der TPE handelt es sich um eine Überempfindlichkeitsreaktion insbesondere gegen Mikrofilarienantigene (Ottesen et al., 1979).

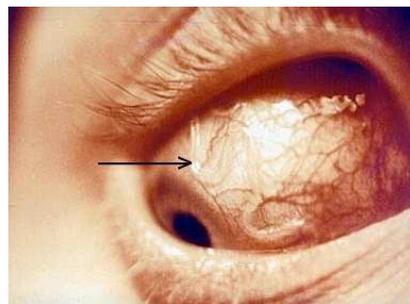
Sowohl bei der lymphatischen Filariose als auch bei der unten beschriebenen Onchozerkose kann es zu Superinfektionen durch Bakterien und Filarien kommen.

Die sicherste Methode zum Nachweis einer lymphatischen Filariose ist, unter Berücksichtigung der Nachtperiodik, der Mikrofilariennachweis im Blut.

Die aktuelle Therapieempfehlung lautet 6 mg/kg Körpergewicht (KG) Diethylcarbamazin (DEC) plus 0,15-0,4 mg/kg KG Albendazol alle sechs bis zwölf Monate für Afrika und 6 mg/kg DEC plus 400 mg Albendazol alle 6 oder 12 Monate außerhalb Afrikas. Alternativ ist eine Therapie mit 0,2-0,4% DEC versetztem Natriumchlorid über neun bis zwölf Monate möglich (WHO, 2005). Für eine makrofilarizide Therapie bei einzelnen Patienten, nicht der Massentherapie, kann DEC für 3x2 mg/kg/Tag für 6-12 Tage gegeben werden.

### 1.4.6 Loiasis

Die Überträger der Loiasis sind mit metazyklischen Larven infizierte Bremsen der Gattung Chrysops. Bei dieser nur im west- und zentralafrikanischen Regenwald vorkommenden Filariose kommt es ca. drei Monate nach Infektion zur typischen Kalabar oder Kamerun-Schwellung. Diese häufig im Gesicht oder an den oberen Extremitäten vorkommende Schwellung ist flüchtig auftretend (ein bis drei Tage) und rezidivierend. Neben dieser häufigsten Manifestation kann es zuvor schon zu Lokalreaktionen auf die Larven mit Schwellungen und Juckreiz kommen. Manchmal ist es möglich einen Wurm bei der Durchwanderung der Konjunktiven zu beobachten (Abb. 6).

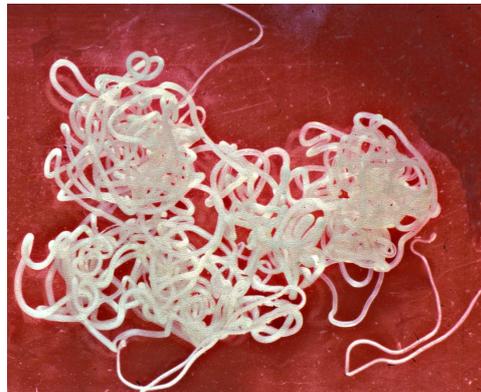


**Abb. 6** *Loa loa* bei Durchwanderung der Konjunktiven (University of Ohio).

Die gefährlichste Komplikation dieser Infektion sind Enzephalitis, auch durch unsachgemäße Therapie hervorgerufen, und andere neurologische Symptome. Für die Diagnostik sind eine positive Auslandsanamnese, die charakteristischen Schwellungen und eine Eosinophilie wegweisend. Ein Mikrofilariennachweis sollte aufgrund der zirkadianen Rhythmik der Mikrofilarienfreisetzung zur Mittagszeit durchgeführt werden. Aufgrund der teilweise geringen Parasitämie ist ein sicherer Mikrofilariennachweis nicht immer gegeben. DEC in einer Dosierung von 6 mg/kg KG/d für drei Wochen und in Fällen, in denen die Therapie versagt, Albendazol (zweimal 200 mg für 21 Tage) sind zurzeit Medikamente der Wahl.

### 1.4.7 Onchozerkose

Die Onchozerkose wird durch die Knäuefilarie *Onchocerca volvulus* verursacht und wird auch Flußblindheit genannt, da eine Infektion zu Erblindung führen kann und die Vektoren an Flüssen brüten. Infektiöse L3-Larven werden von Kriebelmücken (Simulien) während einer Blutmahlzeit über den Speichel übertragen. Die Larven entwickeln sich im subkutanen Bindegewebe innerhalb von 18 Monaten zu adulten Würmern, die in bis zu 5 cm großen Knoten im subkutanen Bindegewebe leben (Albiez et al., 1988, Abb. 8B). Die Knoten enthalten unterschiedlich viele Würmer. Zwei bis drei Weibchen und ein oder zwei Männchen befinden sich in ca. 80% aller Knoten (WHO, 1995, Abb. 7).



**Abb. 7** Adulte *O. volvulus* Würmer.

Drei weibliche Würmer und ein Männchen (unten rechts), nach Isolierung durch Kollagenase-verdau des Onchozerkoms (Bildarchiv des BNI).

Um die Knoten bildet sich eine feste Pseudokapsel aus. Des Weiteren werden sie reich mit Blut- und Lymphgefäßen versorgt (Mackenzie et al., 1987). Die Würmer können dort bis zu 15 Jahre alt werden (Habbema et al., 1990). Weibchen werden 330 bis 500 mm lang und haben einen Durchmesser von ca. 250-400  $\mu\text{m}$ . Die Männchen sind deutlich kleiner (20-42 mm), haben einen geringeren Durchmesser (130-210  $\mu\text{m}$ ) und sind mobil. Sie wandern zwischen den Knoten umher, um sich mit den Weibchen zu paaren.

In den subkutanen Knoten produzieren die Weibchen für etwa neun Jahre bis zu einer Million Mikrofilarien pro Jahr, welche 220-360 µm lang und 5-9 µm dick sind. Ihre Lebensspanne beträgt ca. zwei Jahre (Schulz-Key & Karam, 1986). Ihre typischen Lokalisationen sind die Haut und die Lymphgefäße, sie können aber auch im Blut, Urin und Sputum nachgewiesen werden. Durch die Aufnahme von Mikrofilarien während einer Blutmahlzeit können diese in einer weiteren Kriebelmücke ihren Lebenszyklus fortsetzen und innerhalb von zwei Wochen zu infektiösen L3 heranreifen. Wie auch andere Filarien ist *O. volvulus* mit Wolbachien Endobakterien besiedelt (Brattig, 2004).

Bei der Onchozerkose kommt es in erster Linie zu den Namen gebenden Augenveränderungen Visusverlust und Blindheit, sowie zu Hautveränderungen (Dermatitis, Lichenifizierung, Leopardenhaut etc.). Außerdem tritt eine Lymphadenitis durch abgestorbene Mikrofilarien auf, die über die Lymphbahnen abtransportiert werden und dort eine Entzündungsreaktion auslösen, auf. Das erstmals 1875 von O`Neill beschriebene Krankheitsbild wird, wie bei den anderen Filariosen auch, durch die Mikrofilarien hervorgerufen.

Augenschädigungen treten nur bei der generalisierten Onchozerkose auf. Sie beruhen auf der Immunantwort gegen absterbende Mikrofilarien. Durch eine zu schwache lokale Abwehr in und um den Knoten können diese in großer Zahl in die umliegende Haut und von dort ins Auge gelangen. In hyperendemischen Gebieten erblinden bis zu 15% der Bevölkerung aufgrund einer sklerosierenden Keratitis (Abb. 8A) oder einer Augenhintergrundentzündung, weitere 40% haben starke Sehstörungen.

Die Knoten sind vor allem ein kosmetisches Problem und bereiten nur bei Verwachsungen mit sensiblen Versorgungsgebieten Beschwerden. Therapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung (Nodulektomie). Dies führt zu einer Senkung der Mikrofilarienkonzentration und zu einer Besserung der Symptomatik (Guderian et al., 1987).

A



B



**Abb. 8** Klinische Zeichen einer Infektion mit *O. volvulus*.

A) Durch Onchozerkose erblindetes Auge mit sklerosierender Keratitis eines Patienten aus Guinea. B) Onchozerkome am Thorax eines Patienten aus Westafrika (Bildarchiv des BNI).

Neben den für die Gesamtbevölkerung bedeutenden Augenerkrankungen sind für den einzelnen Betroffenen die dermatologischen Symptome, welche sich unter dem Sammelbegriff Onchodermatitis verbergen, von großer Bedeutung. Erstes Symptom ist häufig Juckreiz, der zusammen mit Hyperpigmentierung und Pachydermie bei der hyperreaktiven Form auftritt. Sie wird bei einer Erstinfektion (ohne Präimmunität) beobachtet. Weitere Hauterscheinungen sind eine chronische papulöse Dermatitis, Ödeme, Lichenifikationen und Hautatrophie.

A



B



**Abb. 9** Hautveränderungen bei Onchozerkose.

A) Papuläre makulöse Dermatitis. B) Asymmetrisch lokalisierte lichenifizierte Dermatitis bei einem Patienten mit hyperreaktiver Onchozerkose (Bildarchiv des BNI).

Zur Diagnostik der Erkrankung gibt es verschiedene Möglichkeiten: Mittels der Spaltlampe lassen sich Mikrofilarien in der hinteren Augenkammer nachweisen. Durch Hautproben, sog. *skin-snips*, können Mikrofilarien in der Haut diagnostiziert werden. Außerdem sind histologische Nachweisverfahren und die spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert. Mit Hilfe des Mazzotti-Tests, der auf eine überschießende Immunantwort auf absterbende Mikrofilarien nach lokaler Applikation von DEC auf die Haut oder nach systemischer (oral)er Gabe beruht, können Mikrofilarien indirekt nachgewiesen werden. Dieser Test hat allerdings schwere, teilweise letal verlaufende Nebenwirkungen und findet keine Verwendung mehr. Aufgrund der Kosten sind immundiagnostische Tests nicht für Endemiegebiete geeignet.

Zurzeit wird eine Therapieempfehlung mit 150 µg/kg KG Ivermectin einmal pro Jahr propagiert (WHO, 2005), welche eine temporär mikrofilarizide Wirkung hat. Studien mit einer erhöhten Dosis Ivermectin von bis zu 800 µg/kg KG oder mehrfache Gabe pro Jahr konnten teilweise einen makrofilariziden Effekt zeigen (Duke, 2005). Bei Ivermectin handelt es sich um ein makrozyklisches Lacton aus der Gruppe der Avermectine. Durch Induktion eines Chlorideinstroms (Cully et al., 1994) kommt es zu einer Hyperpolarisation, die zu Muskellähmungen führt und folglich zu einem Absterben der Mikrofilarien (Estler, 2000). Das Auftreten von Resistenzfällen in Afrika, die mit genetischen Markern assoziiert (Awadzi et al., 2004) sind, bezeugt die Wichtigkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze.

#### **1.4.8 Therapie mit Doxycyclin**

Als neuer Therapieansatz wird seit einigen Jahren eine antibiotische Behandlung mit Tetrazyklinen getestet, die sich jedoch nicht für die Massenbehandlung eignet. Tetrazykline wirken an den in humanpathogenen Filarien in Symbiose lebenden Endobakterien, den Wolbachien. 1975 wurden diese zu den Rickettsien gehörigen Bakterien von McLaren et al. in Filarien nachgewiesen. Zurzeit sind nur vier Filarienspezies bekannt die keine intrazellulären Symbionten enthalten: *Acanthocheilonema viteae* (Nagerfilarie)

und *Onchocerca flexuosa* (Wildfilarie) (Taylor et al., 2000) sowie *Loa loa* und *Setaria equina* (Büttner et al., 2003). Tetracycline hemmen die Proteinbiosynthese durch Inhibition der Anlagerung der tRNA-AS-Komplexe. Bereits 1999 konnte im Tiermodell mit der Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis* (siehe auch Abschnitt 1.5) gezeigt werden, dass eine antibiotische Therapie zu Infertilität der Filarie führt (Hoerauf et al., 1999). In Studien ergab eine sechswöchige Gabe von Doxycyclin gefolgt von Ivermectin nach sechs Monaten bei Onchozerkose eine Makrofilarizität (Hoerauf et al., 2008) und bei lymphatischer Filariose eine Verringerung der Pathologie (Debrah et al., 2006).

### 1.5 Die Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis*

Neben den humanpathogenen Filarien gibt es eine Reihe von Filarien, die spezifisch in Tierspezies parasitieren. Einige finden als Modellinfektionen in der Forschung Verwendung. Dieser Zwischenschritt ist nötig, da die humanpathogenen Filarien wirtsspezifisch sind und nicht in Versuchstieren persistieren beziehungsweise nicht den gesamten Zyklus durchlaufen.

Ein etabliertes Modell beruht auf der 1931 von Chandler beschriebenen Nagerfilarie *L. sigmodontis* (Wenk, 1967, Abb. 10). Deren natürlicher Endwirt ist die aus den südlichen USA stammende Baumwollratte *Sigmodon hispidus*. Der Vektor der Filarie ist die tropische Milbenart *Ornithonyssus bacoti*. Bereits 1946 wurde der Entwicklungszyklus, damals noch als *L. carinii* bezeichnet, von J.A. Scott beschrieben.



**Abb. 10** Weibliche adulte *L. sigmodontis* Würmer.

Würmer in Kulturmedium nach Isolation aus der Pleurahöhle einer infizierten Baumwollratte (S. Korten).

Durch den Biss einer mit *L. sigmodontis* infizierten Milbe gelangen metazyklische infektiöse Larven des dritten Larvenstadiums über das Lymphsystem in die Blutbahn der Baumwollratte. Bei Passage der Lunge wandern die Larven in die Pleurahöhle ein (Wenk, 1967). Durch zweimaliges Häuten (Tag 8-10 *post infectionem* (*p.i.*) und Tag 26-30 *p.i.*) entwickelt sich das vierte Larvenstadium (L4) und innerhalb von drei Wochen die Adulten. Adulte Weibchen und Männchen lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge und dem spiralförmigen Hinterende des Männchens leicht von einander unterscheiden. Weibchen (w) erreichen eine Länge von ca. 10-12 cm, Männchen (m) von ca. 2-3 cm.

50-130 Tage nach der Infektion treten die von den Weibchen freigesetzten Mikrofilarien (erstes Larvenstadium, L1) in der Blutbahn des Wirtes auf. Die Mikrofilarien werden beim Blutsaugakt von der Milbe aufgenommen, wandern in das Darmepithel des Vektors und durchlaufen dort zwei Häutungen bis zur infektiösen L3. Diese wird bei einer weiteren Blutmahlzeit auf eine andere Baumwollratte oder Maus übertragen.

Außer im natürlichen Endwirt können die Filarien ihren Entwicklungszyklus auch in BALB/c-Mäusen komplett durchlaufen (Petit et al., 1992). Dieser susceptible Mausstamm wird häufig für experimentelle Fragestellungen verwendet. Diese Infektion stellt den derzeit einzigen bekannten kompletten Filarienzklus mit Auftreten von Patenz, Mikrofilarien im Blut, im Mausmodell dar. Allerdings ist auch die BALB/c Maus in der Lage, die Infektion erfolgreich zu bekämpfen und hat die Würmer innerhalb von 120 Tagen abgebaut. Für die Abwehr sind

CD4<sup>+</sup>T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen sowie die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-5, also eine gemischte T<sub>H1/2</sub> Antwort, wichtig. Im Rahmen der Immunreaktionen der infizierten Mäuse ist eine Zunahme der NK-Zellen nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in der Pleurahöhle der Mäuse zu beobachten. Diese NK-Zellen zeigen außerdem eine verminderte Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf (Korten et al., 2002). Eine Behandlung der infizierten Mäuse mit Doxycyclin führt zu einer Abnahme der Endobakterien, den *Wolbachien*. Ihre Depletion mittels antibiotischer Behandlung führt zu einer Sterilität und Längenabnahme von *L. sigmodontis*, sowie deren Degeneration und Tod (Volkman et al., 2003).

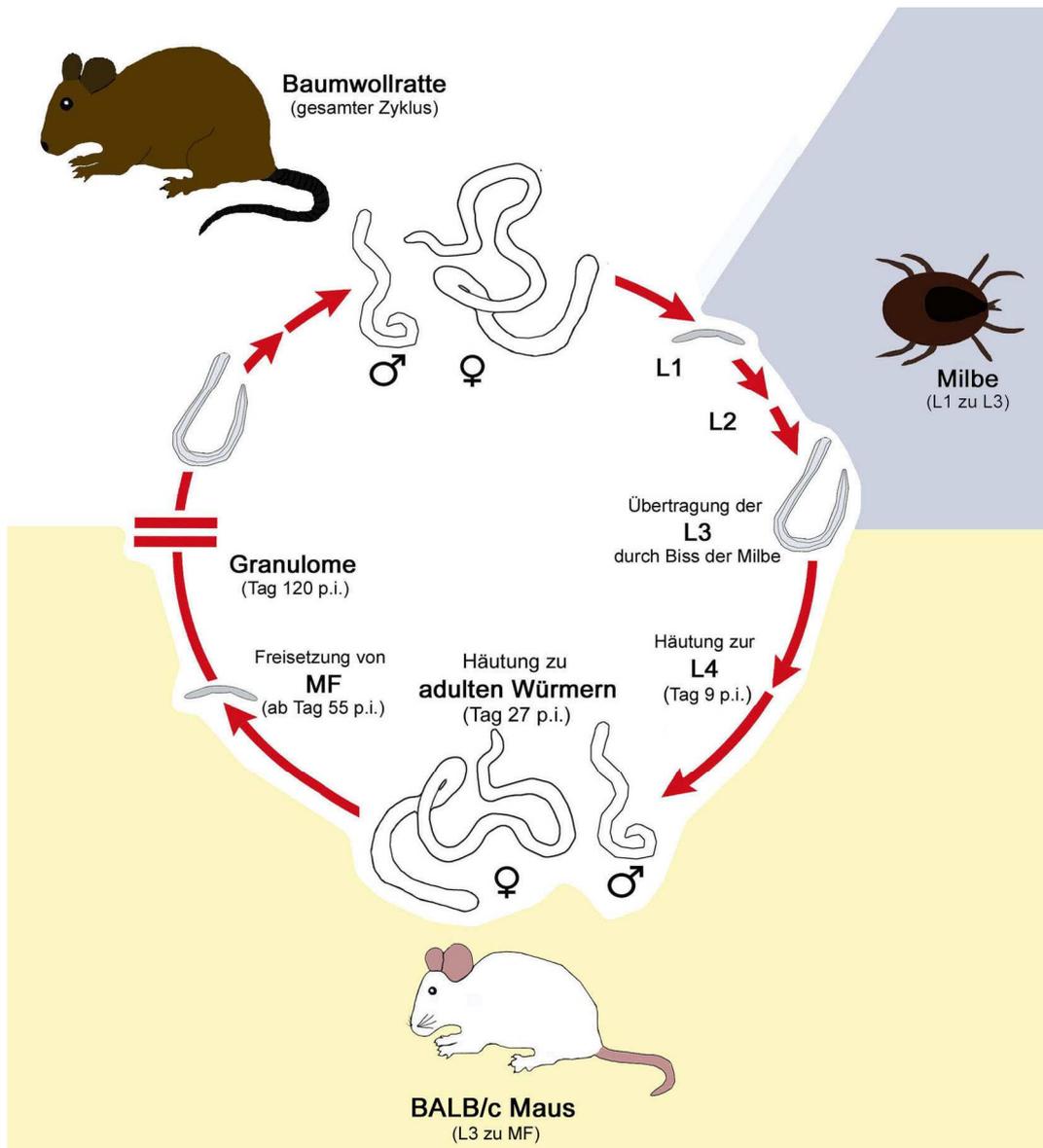


Abb. 11 Lebenszyklus von *L. sigmodontis* in Nagern (W. Hartmann).

## 1.6 Arbeitshypothese und Fragestellung

Es ist hinreichend bekannt, dass NK-Zellen in der Immunabwehr von Infektionen, besonders in der Abwehr von Viren, Bakterien und Protozoen, eine wichtige Rolle spielen. Ihre Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten und speziell von Helminthen im Besonderen ist wenig untersucht. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass NK-Zellen in der frühen Infektionsphase der Maus für das frühe Wachstum von *B. malayi* (Babu et al., 1998) im Wirt notwendig sind. In der fortgeschrittenen Infektion der suszeptiblen BALB/c Maus mit *L. sigmodontis* zeigte sich im Gegensatz dazu, dass NK-Zellen für die unspezifische Abwehr der adulten Filarien und Mikrofilarien wichtig sind (Korten et al., 2002). Die Anzahl von NK-Zellen nimmt im Laufe der Infektion in der Pleurahöhle zu. Es wurde bisher nicht untersucht, ob diese NK-Zellen indirekt über Mediatoren anderer Immunzellen oder direkt über Wurmmoleküle angelockt werden.

Die Fähigkeit von NK-Zellen zur Chemotaxis wurde bisher für bestimmte Chemokine gezeigt, jedoch nicht für Wurmantigene oder andere Parasiten. Die Fähigkeit zur Chemotaxis haben humane sowie murine NK-Zellen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob die Wanderung von NK-Zellen eine Auswirkung auf den allgemeinen Aktivierungszustand und die Zytokinproduktion von NK-Zellen hat. Es ist kürzlich gezeigt worden, dass verschiedene *B. malayi* Stadien humane NK-Zellen zur Rezeptorexpression und Zytokinproduktion aktivieren können (Babu et al., 2007). NK-Zellen sind mit ihrer Fähigkeit Zytokine zu produzieren wichtige Mediatoren des Immunsystems, insbesondere zwischen dem natürlichen und adaptiven Teil. Ein Zusammenhang zwischen Wurmmolekülen und Rezeptorexpression bzw. Zytokinexpression von NK-Zellen wurde ansatzweise *in vivo* während der Infektion von Mäusen mit *L. sigmodontis* bereits beschrieben (Korten et al., 2002). Hier zeigte sich eine abnehmende Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf murinen NK-Zellen im Laufe einer Infektion mit *L. sigmodontis* und ein verändertes Zytokinprofil nach Depletion der NK-Zellen. Diese beiden Ergebnisse weisen auf eine aktivierte NK-Zell-Population hin. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal zu untersuchen, ob Wurmmoleküle direkt chemotaktisch auf NK-Zellen

wirken und NK-Zellen aktivieren z.B. die Zytokinproduktion oder Expression von Aktivierungsmarkern anregen. Durch die Verwendung von humanen primären NK-Zellen (CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup>) und von Wurmmaterial der Nagerfilarie *L. sigmodontis* wird untersucht, ob diese Effekte kreuzreaktiv zwischen verschiedenen Spezies auftreten, was den unspezifischen, für NK-Zellen typischen Charakter unterstreicht. Es wird dabei hauptsächlich der Gesamtextrakt (Homogenisat) der adulten Würmer auf eine chemotaktische Aktivität untersucht, aber auch lebende Würmer und Wurmkulturüberstände, einschließlich Mikrofilarien werden getestet. Es soll damit geklärt werden, ob Filarien NK-Zell-chemotaktische Moleküle sekretieren oder enthalten, und ob ihre *Wolbachia* Endobakterien dabei eine Rolle spielen.

Die Erkenntnisse aus dieser Studie geben Hinweise auf die immunmodulatorischen Funktionen von Wurmolekülen im Wirtsorganismus. Darüber hinaus kann diese immunmodulatorische Funktion Einfluss auf andere Erkrankungen haben und könnte möglicherweise für deren Therapie genutzt werden. Bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn kann z.B. durch die Eier des Schweinepeitschenwurmes *Trichuris suis* die Symptomatik gemildert werden (Summers et al., 2005). Die Identifizierung und Beschreibung immunmodularischer Moleküle aus Würmern ist derzeit ein Schwerpunkt in der internationalen helminthologischen Forschung und die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten.

**2. Material und Methoden****2.1 Material****2.1.1 Geräte**

Allegra™ 6R Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
AP48 Mikrokammer	Neuroprobe, Inc., Gaithersburg, USA
Bechergläser, Standzylinder, Laborflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
BD FACSAria™	BD Biosciences Discovery Labware, San Jose, USA
BD FACSCalibur™	BD Biosciences Discovery Labware, San Jose, USA
Boyden-Kammern	Neuroprobe, Inc., Gaithersburg, USA
CleanBench: BSB 6 A	Gelaire Flow Laboratories, Sydney, Australien
Deckgläschen	Menzel GmbH und Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISPOT-Reader	Bio-Sys, Karben-Frankfurt, Deutschland
Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Brand GmbH und Co.KG, Wertheim, Deutsch- land
GS-6KR Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Hepa class 100 Forma Series II	
Water Jacketed CO <sub>2</sub> Incubator	Therma Electron Corporation, Wathman, USA
MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikrotiterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multidrive xl Power Supply	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCT basic Magnetrührer und Rührfisch	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Ph Meter Ph 526	Wtw, Weilheim, Deutschland
Pipetteur Pipetus	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Vibrofix VF1 Electronic Waage	Janke & Kenkel, Staufen, Deutschland Sartorius, Göttingen, Deutschland

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einmalspritzen (10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

FACS-Röhrchen	Cellstar® Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Filtropur S	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FP13/0.2 RC-S	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
HSA-Platten 96 Vertiefungen	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Isopore Membranfilter (Porengröße 3, 5 und 8 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
MACS Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS Präseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 Loch, Rund- und V-boden	Cellstar® Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Nylonwolle	Polysciences, Inc., Warrington, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Transwell®-Platten, 12 Vertiefungen, 6,5 mm Membrandurchmesser, 5 µm Porengröße	Costar Corning, Inc., Corning, USA
Zellkulturflaschen	Cellstar® Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

Acrylamid (ACA)	Sigma, München, Deutschland
<i>Advanced protein assay reagent 5*concentrate</i>	Cytoskeleton Inc., Denver, USA
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma, München, Deutschland
Amphotericin B	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, München, Deutschland
<i>Biocoll separating solution</i>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA), Albumine bovine fraction V	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, München, Deutschland
Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulmen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München, Deutschland
<i>1x Dulbecco´s phosphate buffered (PBS)</i>	Gibco, Eggenstein, Deutschland
<i>10x Dulbecco´s phosphate buffered (PBS)</i>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Doxycyclin	Sigma, München, Deutschland

Endotoxin-freies Wasser	Sigma, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäurelösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP)	Sigma, München, Deutschland
Fibronektin	BD Biosciences Discovery Labware, San Jose, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Glucose	Sigma, München, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma, München, Deutschland
Hepes	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Humanes rekombinantes IL-2	
Proleukin	Cetus Corp., Berkley, USA
Ionomycin	Sigma, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, München, Deutschland
Kaliumphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, München, Deutschland
Karbonat-Bikarbonatpufferkapseln	Sigma, München, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
<i>Minimal essential medium</i> (MEM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma, München, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdisulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (RPMI) 1640	
Saline	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Percoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA)	Sigma, München, Deutschland
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochemie, Bad Soden, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma, München, Deutschland
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Temed	Sigma, München, Deutschland
Tris	Serva, Heidelberg, Deutschland

Trypanblau-Lösung	Sigma, München, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, München, Deutschland

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 *Enzyme linked immunospot (ELISPOT) technique*

Nachfolgende Antikörper von Mabtech, Nacka Strand, Schweden:

IFN $\gamma$ , 1-D1K, Maus IgG1, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
IFN $\gamma$ , 7-B6-1, Maus IgG1, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper  
IL-4, II-4-I (82.4), Maus IgG1, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
IL-4, II-4-II (12.1), Maus IgG1, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper  
TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ -I, Maus IgG1, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ -II, Maus IgG1, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper  
GM-CSF, 21C11, Ratte IgG2<sub>a</sub>, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
GM-CSF, 23B6, Ratte IgG2<sub>a</sub>, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper

Nachfolgende Antikörper von Natutec, Frankfurt/Main, Deutschland:

IL-5, TRFK5, Ratte IgG1, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
IL-5, JES1-5A10, Ratte IgG2<sub>a</sub>, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper  
IL-10, JES3-9D7, Ratte IgG1, anti-human, primärer, *coating* Antikörper  
IL-10, JES3-12G8, Ratte IgG2, anti-human, biotinylierter Sekundärantikörper

Substrat: Streptavidin-HRP      Mabtech, Nacka Strand, Schweden

### 2.1.4.2 NK-Zell Isolierung

NK cell isolation kit II      Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

### 2.1.4.3 Fluorescence-activated cell sorter (FACS)-Färbung

Alle Antikörper von BD Biosciences Discovery Labware, San Jose, USA:

CD3, SK7, Maus IgG1, anti-human, FITC-markiert  
CD16/56, B73.1 MY31, Maus IgG anti-human, PE-markiert  
CD19, 4G7, Maus IgG1, anti-human, PE-markiert  
CD25, 2A3, Maus IgG1, anti-human, PE-markiert  
CD69, L78, Maus IgG1, anti-human, PE-markiert  
CD56, NCAM16.2, Maus IgG2, anti-human, APC-markiert

Cohn II, humane IgG Fraktion.      Sigma, München, Deutschland

### 2.1.5 Lösungen und Medien

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für zelluläre

Arbeiten vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert.

#### Zellaufreinigung und Chemotaxis

1xPBS 1x D-PBS (Gibco) oder aus 10x Dulbecco's PBS 1:10 (1+9) mit endotoxin-freiem Wasser (Sigma) für die Herstellung von Komplettpuffer;

1xPBS für Waschschritte 8 g NaCl  
0,2 g KCl  
11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen

FCS 30 min bei 56°C Hitze deaktivieren, dann 30 min bei 3000 rpm und RT zentrifugieren.

Komplett-Puffer (KP) 0,1% BSA in 1x PBS

Puffer für Nylonsäule 1% BSA in 1x PBS(37°C)

Transwell-Waschpuffer 5 mM EDTA/1x PBS

#### Lösung für Membranvorbehandlung

I) 70% Ethanol/NaOH 1 M = 20 g NaOH  
250 ml A. dest.  
250 ml Ethanol

II) 0,1 M Phosphat-Puffer = 7,12 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O,  
auf 400 ml A. dest., pH 7

#### Waschlösung für Boyden-Kammern und AP48 Mikroammer

1,5 g SDS  
20 g NaOH-Plätzchen  
5 L A. dest.  
SDS in ca. 500 ml A. dest. lösen, danach NaOH langsam dazugeben.

#### Medium für lebende Adulte und Mikrofilarien

500 ml Komplettpuffer  
500 mg Glucose  
100 mg Gentamycin  
250 µg Amphotericin B

Lösungen für FACS-AK-Färbungen

FACS-Puffer	2% FCS in 1x PBS
FACS-Fix-Puffer	2% FCS in 1 x PBS, plus 4% Formaldehyd

Puffer für Immunomagnetische Zellaufreinigung (MACS)

0,5% BSA mit 2 mM EDTA (Aufbewahrung bei 4-8°C)

Lösungen für Acrylamidgel

a) Trenngel 12%	1,8 ml ACA 40% 1,5 ml Puffer A 1,5 ml A. dest. 45 µl APS 10% 7 µl Temed
b) Sammelgel	0,5 ml ACA 40% 1,25 ml Puffer B 3,3 ml A. dest. 25 µl APS 10% 10 µl Temed
c) Puffer A	300 ml A. bidest. 91 g Tris Base 2 g SDS (oder 10 ml 20% SDS) PH 8,8 mit 1 N HCL einstellen.
d) Puffer B	200 ml A. bidest. 30,25 g Tris Base 2 g SDS (oder 10 ml 20%SDS) PH 6,8 mit 1N HCL einstellen.
e) SDS-Laufpuffer	5x = 75,5 g Tris 360 g Glycin 125 ml 20% SDS Alles mit NaOH auf ph 8,8 einstellen, auf 5 L mit A. dest. auffüllen.
f) 5x Probenpuffer	250 mM Tris-Cl 5% Mercaptoethanol 10% SDS 0,5% Bromphenolblau 50% Glycerol (100%) PH 6,8 mit 100 ml A. bidest. auffüllen.

Lösungen für Silberfärbung

Lösung 1:	30% Ethanol 10% Essigsäure, auf 500 ml mit A. dest. auffüllen
Lösung 2:	30% Ethanol 0,5 M Natriumacetat (MG136,08) 0,5% Glutaraldehyd 0,2% Natriumthiosulfat oder 0,2% Natriumthiosulfat (5xH <sub>2</sub> O)
Lösung 3:	Leitungswasser
Lösung 4:	0,1% Silbernitrat 0,02% Formaldehyd
Lösung 5:	2,5% Natriumcarbonat 0,01% Formaldehyd pH 11,3-11,8
Lösung 6:	0,05 M EDTA-Na-Salz (MG 372,22)

ELISPOT-Lösungen

a) PBS	8g NaCl 0,2 g KCl 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen
b) Zellmedium	500 ml MEM 5 ml L-Glutamine 5 ml Gentamycin 0,5 ml Mercaptoethanol 50 ml FCS (> 10%) 5 ml HEPES
c) Blockierungslösung R10	450 ml RPMI 50 ml FCS
d) Waschpuffer	0,5 ml Tween 20 auf 1 L PBS
e) <i>Coating</i> Puffer	Eine Karbonat-Bikarbonatpufferkapsel in 100 ml A. dest. aufgelöst. Lösung autoklaviert und bei RT aufbewahrt
f) Substrat	Lösung 1: 6 mg AEC in 750 µl DMF auflösen Lösung 2: 18,8 ml A. dest. 1,8 ml Essigsäurelösung 4,4 ml Natriumacetat Lösung 3: 14,25 ml von Lösung 2

750µl Lösung 1

7,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Lösung 3 mittels 0,2 µm Filtrapur filtrieren und innerhalb einer halben Stunde verwenden.

### 2.1.6 Buffy coat

Als *Buffy coat* wird die Phase zwischen den Erythrozyten und dem Plasma bezeichnet, die bei der Zentrifugation zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten aus Blutspenden entsteht. In dieser Zwischenschicht sind der Großteil der Thrombozyten und Leukozyten enthalten. Für die vorgelegte Arbeit wurden frische *Buffy coats* von gesunden Blutspendern des Blutspendedienstes des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf verwendet. Es wurden nur Cytomegalievirus (CMV) negativ getestete Proben verwendet.

### 2.1.7 NKL- und YT-Zelllinien

Die *natural killer cell like* (NKL)-Zelllinie ist ursprünglich aus dem peripheren Blut eines Patienten, der an *Large Granular Lymphocyte* Leukämie erkrankt war, isoliert worden. Die neoplastischen Zellen weisen natürliche Killerzellfähigkeit und Antikörper vermittelte Zytotoxizität, sowie eine ähnliche Proliferationsfähigkeit wie die CD56<sup>dim</sup> Untergruppe auf. Die NKL-Zellen entsprechen von der Morphologie her aktivierten NK-Zellen (Robertson et al., 1996). Die YT-Zelllinie wurde aus dem Perikarderguss eines an akute Lymphatische Leukämie erkrankten Patienten gewonnen und zeigt eine natürliche Killerzellfähigkeit auf (Yodoi et al., 1985). Mittlerweile wurden Epstein-Barr-Virus-Gene und T-Zellrezeptorgene in der Zelllinie nachgewiesen (Yoneda et al., 1992).

Beide Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Jacobs aus der Abteilung für Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

### Medien für Zelllinien

- a) YT-Zellen
- 220 ml RPMI1640
  - 2,5 ml L-Glutamin
  - 2,5 ml Na-Pyruvat
  - 2,5 ml Gentamycin
  - 25 ml 10% FCS
  - 1,7 µl 100U/ml IL-2
- b) NKL-Zellen
- 190-200 ml RPMI1640
  - 2,5 ml L-Glutamin
  - 2,5 ml Na-Pyruvat
  - 2,5 ml Gentamycin
  - 50 ml 20% FCS
  - 0,9 µl 50U/ml IL-2
- c) Reduziertes Medium für NKL-Zellen
- 190-200 ml RPMI1640
  - L-Glutamin
  - 2,5 ml Na-Pyruvat
  - 2,5 ml Gentamycin
  - 25 ml 10% FCS
- d) Einfriermedium
- 50% FCS
  - 40% RPMI mit 5% FCS
  - 10% DMSO

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Wurmextrakt

Für diese Arbeit wurden bereits im Vorfeld hergestellte Wurmextrakte von *L. sigmodontis* (LsE) aus Nagetieren verwendet und von Dr. Simone Korten zur Verfügung gestellt. Für die Gewinnung der Wurmextrakte wurden ausschließlich vitale adulte und geschlechtsreife Würmer aus der Patenzphase verwendet, die frisch nach der Isolation am selben Tag verarbeitet wurden. Sie wurden in sterilem PBS gewaschen, um Zellen aus der Pleurahöhle des Nagers zu entfernen.

Die adulten Würmer wurden auf Eis homogenisiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und der Proteingehalt bestimmt.

In weiteren Experimenten wurden Wurmextrakte verwendet, die von mit Doxycyclin behandelten Mäusen stammten. Hierfür wurden die Mäuse ab dem 33. Tag *post infectionem* (*p.i.*) (im fortgeschrittenen Infektionsstadium) mit 1 mg Doxycyclin/Tag, in Anlehnung an die Behandlung von Baumwollratten (Hoerauf et al., 1999; Volkman et al., 2003), von Dr. Simone Korten behandelt. Der Depletionserfolg wurde exemplarisch mittels immunhistologischer Färbung des *Wolbachien*-Surface-Proteins (*WSP*), von PD Dr. Norbert Brattig zur Verfügung gestellt, ermittelt. Am Tag 64 *p.i.* wurden die adulten Würmer aus der Pleurahöhle gewonnen und LsE hergestellt.

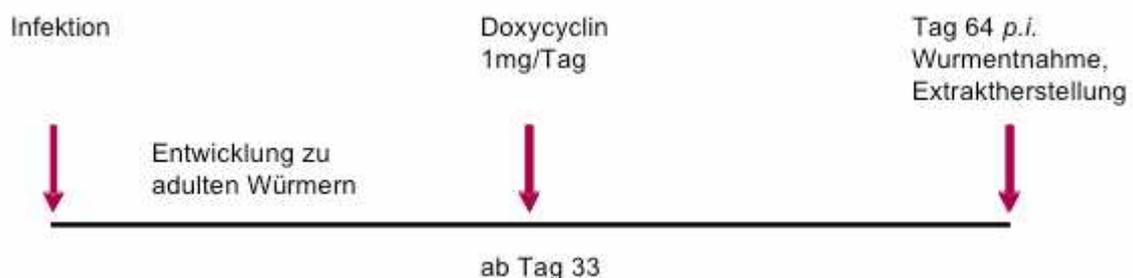


Abb. 12 Behandlungszyklus von BALB/c Mäusen mit Doxycyclin.

### 2.2.2 Gewinnung von Mikrofilarien

Zur Gewinnung von Mikrofilarien wurden zunächst 2 ml Blut einer infizierten Baumwollratte 1:2 mit 0,2 mM EDTA/PBS verdünnt. Je 2 ml dieser Verdünnung wurden über einen 25%, 30%, 35% Percollgradienten geschichtet und für 30 min bei 2000 rpm bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und zweimal mit 4% FCS/PBS gewaschen. Hierfür wurde die Lösung 8 min bei 3000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die aufgereinigten Mikrofilarien für Versuche mit lebenden Mikrofilarien in KP mit 8% Glucose aufgenommen.

### 2.2.3 Gewinnung von Wurmkulturüberständen

Aus der Pleurahöhle gewonnene Würmer und Mikrofilarien wurden für einige Versuche von einander getrennt für bis zu einer Woche in Medium für lebende Adulte und Mikrofilarien im Brutschrank bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Proben eingefroren und unmittelbar vor den Chemotaxisversuchen aufgetaut. Bei diesen Kulturüberständen wurden keine Bestimmungen des Proteingehaltes durchgeführt.

### 2.2.4 Herstellung von Fraktionen

#### 2.2.4.1 *Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Säule*

Die Fraktionen wurden in Kolaboration mit Dr. Kai Lüersen (Abteilung für Biochemie des Bernhard-Nocht-Instituts, jetzt Universität Münster) hergestellt. Es wurde eine Superdex S-75 Säule von Amersham-Biosciences (Freiburg, Deutschland) und Endotoxin-freies PBS verwendet. Bei 4°C wurden bei einer Durchflussrate von 1 ml/min Fraktionen von 2 ml PBS aufgefangen. In den Chemotaxisversuchen wurden diese Fraktionen in den Konzentrationen 1:1, 1:2 und 1:4 mit KP verdünnt eingesetzt.

#### **2.2.4.2 Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC)-Säule**

Des Weiteren wurde von Prof. Jens-M. Schröder (Abteilung für Dermatologie der Universität Kiel) Fraktionen von Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LsE) mittels Mikro-RP-HPLC hinsichtlich ihrer Hydrophilie separiert. Der LsE wurde über Mikro-RP-18 (C2/C18) Säulen (Pharmacia, Schweden) nach bekanntem Protokoll (Schröder, 2001) aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden die Fraktionen konzentriert und lyophilisiert. Somit konnten die möglichen chemotaktischen Moleküle in ausreichender Menge eingesetzt werden. Die lyophilisierten Fraktionen wurden in 54 µl KP aufgenommen. Diese Lösung wurde als 1:1 Verdünnung bezeichnet und für die Herstellung der Verdünnungsstufen mit KP auf 1:2, 1:3 und 1:4 verwendet.

#### **2.2.5 Proteinbestimmung**

0.29 ml ADV 01 wurden in einer flachen 96 Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu wurden je 10 µl Proteinlösung bzw. für die Leerwerte A. dest hinzupipettiert. Für jede Proteinfraction wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und sofort gemessen. Die Absorption wurde bei 590 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:  
Proteinkonzentration = (gemessene OD) x 37,5 x 30 x (ursprüngliche Verdünnung).

#### **2.2.6 Proteinnachweis im Wurmextrakt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung**

Mittels eines SDS-PAGE können Proteine allein aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Für ein SDS-PAGE wurden zwei Glasplatten entfettet und mittels zweier Platzhalter getrennt und plan im Halter befestigt. Dann wurde zu zweidrittel das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol mit A. dest. abgespült und das Sammelgel wurde gegossen. Der Kamm wurde seitlich eingeschoben und

wieder entfernt, wenn das Sammelgel ausgehärtet und in der Laufkammer mit Laufpuffer überschichtet war. Der Wurmextrakt von *L. sigmodontis* Weibchen wurde mit 5x Probenpuffer versetzt, bei 95°C denaturiert und neben dem Marker in die Kammern gefüllt.

Das Gel lief bei einer Spannung von 1750 Volt mit einer Stromstärke von 25 mA und einer Leistung von 65 Watt, bis die blauen Banden aus dem Gel liefen.

Anschließend wurde das Gel gefärbt. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen, wobei Silberionen durch Aminosäureseitenketten komplexiert werden und anschließend zu Silber reduziert werden.

Lösung 1: 10 min

Lösung 2: 10 min

Lösung 3: 3x 10 min

Lösung 4: 10 min

Lösung 5: Entwickeln bis Banden sichtbar sind, einmal wechseln

Lösung 6: 1 min in Stopp-Lsg., danach in Leitungswasser

### 2.2.7 Lymphozytenaufreinigung aus Spenderblut (*Buffy coats*)

Aus Spenderblut wurden zunächst periphere Blutmonozyten (PBMC) isoliert. Dazu wurden frische *Buffy coats* im Verhältnis 2:1 mit 2 mM EDTA/PBS verdünnt. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 3:1 über Biocoll *Separating Solution* geschichtet und 15 min bei 1000 g und 4°C ohne Bremsen zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde vorsichtig abgenommen und mit 2 mM EDTA/PBS gewaschen. Eventuell noch vorhandene Erythrozyten wurden mittels A. dest für 30 sec lysiert. Die Reaktion wurde mit 2x PBS gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend in 1x PBS/1% BSA aufgenommen. Um die Makrophagen aus der Zellsuspension zu entfernen wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> für 30 min inkubiert, so dass die Makrophagen an der Plastikfläche adhären.

konnten. Der Überstand wurde abpipettiert und je nach Fragestellung weiter verwendet.

### 2.2.8 Entfernung der B-Lymphozyten mittels Nylonwollensäule

Eine sterile, mit 1 g Nylonwolle gefüllte 10 ml Plastikspritze wurde bei 37°C mit 1x PBS/1% BSA für eine Stunde präinkubiert. Anschließend wurde die Lösung bis zur Nylonwolle abgelassen, die Säule verschlossen und  $1-2 \times 10^8$  Zellen in 2ml 1x PBS/1% BSA auf die Säule gegeben. Die Lösung ließ man in die Wolle einlaufen und spülte anschließend einmal mit 2 ml 1x PBS/1% BSA. Man ließ die Lösung wieder einlaufen und überschichtete die Säule vor der Inkubation von 1h bei 37°C mit 2-5 ml einmal PBS/1% BSA. Nach der Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen mittels zweimaliger Waschung eluiert. Die aufgereinigten Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und entsprechend den Vorschriften des weiterführenden Protokolls behandelt.

### 2.2.9 Immunomagnetische Separation von NK-Zellen (MACS)

Mittels des NK-Zell-Isolierung-Kits II für die Aufreinigung über *Magnetic Cell Sorting* (MACS) ist es möglich NK-Zellen durch negative Depletion aus Zellsuspension anzureichern. Dabei werden nur Antikörper gegen andere Zelltypen verwendet, nicht aber gegen NK-Zellen. Somit ist es möglich unmarkierte Zellen, die so wenig wie möglich beeinflusst sind, zu gewinnen. Alle Arbeitsschritte wurden zügig und auf Eis durchgeführt. Die Lösungen wurden vorgekühlt verwendet. Zunächst wurde die Zellzahl der vorliegenden Zellsuspension bestimmt und dann diese für 10 min bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert. Wenn der Überstand verworfen und 40 µl Puffer pro  $10^7$  Zellen hinzu gegeben war, wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden noch 10 µl biotinylierter Antikörper pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt. Die Suspension wurde gemischt und 10 min bei 4°C inkubiert.

Darauf folgend wurden 30  $\mu\text{l}$  Lösung pro  $10^7$  Zellen und 20  $\mu\text{l}$  Anti-Biotin-MikroBeads pro  $10^7$  Zellen dazu pipettiert, gemischt und 15 min inkubiert.

Nun wurden die Zellen mittels 10-20 facher Menge Lösung gewaschen und 10 min bei 1300 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und bis zu  $10^8$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Lösung aufgenommen.

Eine MACS-LS-Säule wurde im MACS-Magneten befestigt und mit 3 ml Lösung vorgespült.

Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und dreimal mit 3 ml Lösung gespült. Diese 9 ml mit NK-Zellen angereicherte Zellsuspension wurde aufgefangen und versuchsabhängig weiterverwendet.

### 2.2.10 FACS-Färbung

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1300 rpm für 8 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Vom Überstand wurde soviel wie möglich verworfen und das Zellpellet aufgelockert. Für je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 10  $\mu\text{l}$  Cohn II dazu pipettiert und dies für 10 min inkubiert. Nach 10 min wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen 1  $\mu\text{l}$  AK hinzu gegeben und für 30 min dunkel inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, jeweils 5 min bei 1300 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und das Pellet aufgelockert. Die Zellen wurden in der für den jeweiligen Versuch benötigten Zellkonzentration (für das Sorten  $5 \times 10^6$  Zellen/ml) eingestellt.

### 2.2.11 FACS-Sorten

Mittels Durchflusszytometer können optische Signale unterschiedlicher Art (Lichtstreuung und Fluoreszenz) detektiert werden. Im Durchflusszytometer wird die zu analysierende Zellsuspension in Einzelzellsuspension gebracht und die einzelnen Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Streuung des Laserlichts korreliert im *forward scatter* (FSC) mit der Zellgröße und im *sideward scatter* (SSC) mit der Granularität. Durch die Färbung von

Zellpopulationen mittels Fluoreszenz markierten Antikörpern lassen sich diese analysieren und im FACS-Aria<sup>TM</sup> in einzelne Zellsubgruppen sortieren, das heißt auftrennen.

### **2.2.12 NK-Zelllinien**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### **2.2.12.1 Kultivierung von NK-Zelllinien**

Die Zelllinien NKL und YT wurden in ihren jeweiligen Medien in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle zwei Tage wurde ein Teil der Zellsuspension abgenommen und 1:10 in neuem Medium ausverdünnt.

Für Chemotaxisversuche wurden NKL-Zellen am Vortag der CT auf reduziertes Medium gesetzt: Acht Millionen Zellen wurden in 10 ml Medium plus 40 ml reduziertem Medium in eine mittelgroße Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden vor der Chemotaxis zweimal mit KP gewaschen und mit 1400 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die für den Versuch gewünschte Zellkonzentration mit KP eingestellt. Für die Testung der mittels HPLC gewonnenen Fraktionen wurde jeweils ein Aliquot an NKL-Zellen aus einem zuvor bei -70°C angelegten Stock zwei Tage vor der Chemotaxis aufgetaut. Die Zellen wurden zunächst in Vollmedium aufgenommen und am darauf folgenden Tag in reduziertes Medium überführt.

#### **2.2.12.2 Einfrieren von Zellen**

Mindestens  $5 \times 10^7$  Zellen wurden auf Eis in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen langsam auf -70°C abgekühlt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen dreimal mit Kulturmedium gewaschen, so dass das toxische DMSO zügig entfernt wurde.

### 2.2.12.3 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden trypanblaugefärbte Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierbei wurde die Tatsache, dass lebende Zellen den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren eliminieren, während tote Zellen angefärbt blieben, ausgenutzt, um lebende und tote Zellen differenzieren zu können. 10 µl Zellsuspension wurden mit 40 µl Trypanblau-Lösung gemischt, und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

### 2.2.13 Chemotaxisversuche

Für alle Chemotaxisversuche wurden die aufgereinigten NK-Zellen (2.2.7-2.2.11) und die zu testenden Chemotaxin-Lösungen, sowie positive und negative Kontrollen in KP aufgenommen. Die Positivkontrolle RANTES wurde in den Konzentrationen 100, 10 und 2,5 ng/ml verwendet, die Positivkontrolle fMLP in den Konzentrationsstufen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M. LsE-Lösungen wurden in den Konzentrationen 100 (pur), 10, 1, 0,1 und 0,01 µg/ml verwendet. Die Verdünnungen wurden jeweils zeitnah zu den Chemotaxisversuchen in sterilen KP auf Eis angesetzt. Die Kammern wurden anschließend bei RT bestückt. Bei allen Chemotaxisversuchen wurde die Membran, welche die obere von der untern Kammer trennt, mit Pinzetten gehandhabt. Bei den einzelnen Versuchen wurden drei verschiedene Chemotaxissysteme verwendet. Allen gemein ist, dass bei der Bestückung der einzelnen Kammern darauf geachtet wurde, dass weder oberhalb noch unterhalb der Membran Luftblasen entstanden.

### 2.2.13.1 Boyden-Kammer

Bei der Verwendung von Boyden-Kammern (Abb. 13) für die Chemotaxis wurden diese mit je 105  $\mu\text{l}$  Chemotaxinverdünnung gefüllt. Bei den Versuchen, die in der Boyden-Kammer durchgeführt wurden, wurden die Membranen zur besseren Chemokinhaftung vorbehandelt. Zunächst wurden die Membranen 30 min in Lösung I inkubiert und dann 10 min in Lösung II. Anschließend wurden die Membranen in A. dest. gespült und luftgetrocknet. Die so vorbereiteten Membranen wurden mittig platziert und die Kammern mit den Deckeln zugeschraubt. Nachdem alle Kammern mit Chemotaxin beladen waren, wurden 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension, mit der Zellkonzentration  $2 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ , auf den Filter pipettiert und die Kammern 1 h 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  und anschließend 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Überstand aus dem Deckel wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Boyden-Kammer auseinander geschraubt und die Zellsuspension abpipettiert. Pro Konzentrationsansatz wurden die Suspensionen von 2-4 Kammern in FACS -Röhrchen zusammengefügt. Die Zellen wurden bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und für FACS- Analysen in 200  $\mu\text{l}$  FACS-Fix aufgenommen.

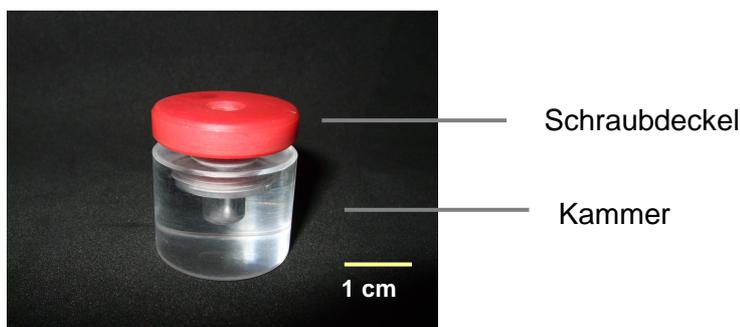


Abb. 13 Boyden-Kammer mit aufgeschraubten Deckel. Deckel und Kammer aus Acryl.

### 2.2.13.2 Transwell®-Platte

Je Vertiefung in der Transwell®-Platte (Abb. 14) wurden 100 µl Zellsuspension (Zellkonzentration abhängig vom jeweiligen Experiment; Standard:  $5 \times 10^4$ /100 µl) und 600 µl Chemotaxinlösung eingesetzt. Die Chemotaxin-Lösungen wurden in die Vertiefungen und die Zellsuspension in die Einsätze vorgelegt. Die Einsätze wurden mittels Pinzette auf die entsprechenden Vertiefungen gesetzt. Die Platten wurden für 1 h 15 min bei 37°C und anschließend 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Einsätze mittels Pinzetten abgenommen und die Lösung aus den Vertiefungen abpipettiert und in FACS-Röhrchen überführt. Zum Lösen eventuell noch adhärrierender Zellen wurde 500 µl 5 mM EDTA/PBS 15 min auf die Vertiefungen gegeben, anschließend abpipettiert und zu den jeweiligen Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen je nach weiterem Versuch in Medium aufgenommen.



Abb. 14 Transwell®-Platte mit 12 Vertiefungen, 2 lose Einsätze.

#### 2.2.13.2.1 Chemotaxisversuche mit lebenden Mikrofilarien

Die Chemotaxis von NK-Zellen auf lebende Mikrofilarien wurde in Transwell®-Platten untersucht. Sowohl die Würmer als auch die Zellen wurden in Mikrofilarienmedium aufgenommen. Es wurden  $5 \times 10^5$  Mikrofilarien in die Vertiefungen vorgelegt und dann mit Medium auf 600 µl aufgefüllt. Die

Zellkonzentration betrug bei diesen Versuchen  $5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ . Die Inkubationszeiträume umfassten 24 h, 48 h und 72 h.

### 2.2.13.3 AP48 Mikroammer

Bei Versuchen, bei denen die AP48 Mikroammer (Abb. 15) verwendet wurde, wurden  $27 \mu\text{l}$  Chemotaxinlösung in den Vertiefungen vorgelegt. Sie eignete sich somit zur Testung der Extraktionsfraktionen, da nur geringe Mengen eingesetzt werden mussten. Nachdem zwei zurechtgeschnittene Polycarbonatfilter auf die Vertiefungen gelegt wurden, wurde die Kammer zusammengesetzt. Es wurden  $45 \mu\text{l}$  der Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^5 / 45 \mu\text{l}$  auf die jeweiligen Chemotaxine gegeben. Die Inkubationszeiten entsprachen denen der anderen Methoden. Nach der Chemotaxis wurde als erstes die obere Zellsuspension entweder mittels Wasserstrahlpumpe oder Eppendorfpipette entfernt und verworfen. Anschließend wurde die Kammer auseinander geschraubt und die Lösungen aus zwei bis drei Vertiefungen gepoolt in Medium aufgenommen.



Abb. 15 Zugeschraubte AP48 Mikroammer mit 48 Vertiefungen.

### **2.2.13.3.1 Fibronektinbehandlung der Membran**

Um die Migrationsbedingungen den im Organismus vorhandenen Bedingungen anzupassen, wurde die Membran vor dem eigentlichen CT-Versuch mit 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronektin in KP gelöst für eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurde die Lösung abpipettiert und die Chemotaxisversuche wurden durchgeführt.

### **2.2.14 Behandlung der primären humanen NK-Zellen mit Pertussistoxin**

Zur Klärung, ob die durch Wurmextrakte ausgelöste Chemotaxis der NK-Zellen auf G-Protein vermittelte Signalkaskaden beruht, wurde bei einigen Versuchen eine Hälfte der NK-Zellen vor der Chemotaxis 30 min mit 200 ng/ml PTX bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und auf die benötigte Zellzahl in KP eingestellt.

### **2.2.15 Checkerboardanalyse**

Für die Checkerboardanalysen wurde das Standardschema für Chemotaxis mit der AP48 Mikrokammer verwendet. Das Besondere an diesem Versuchsaufbau ist, dass die Zellen in verschiedenen Konzentrationen des vermuteten Chemotaxins aufgenommen wurden und auf jeweils alle Chemotaxinkonzentrationen gegeben wurden. So entstanden verschiedene Konzentrationsgradienten an Chemotaxinlösung, wobei die Zellen als Beweis für die Chemotaxis nur in Richtung der höheren Konzentration migrieren sollten.

### **2.2.16 Nachweis von Aktivierungsmarkern**

Für den Nachweis von Aktivierungsmarkern als Zeichen des Aktivierungsgrads der NK-Zellen wurden zwei verschiedene Versuchsmethoden eingesetzt. Zu

einem die Stimulation mit *LsE* ohne CT und zu einem anderen mit CT. Beiden gemeinsam war die Verwendung von NK-Zellen, die durch immunomagnetische Separation aufgereinigt wurden.

#### **2.2.16.1 Nach Stimulation (ohne CT)**

NK-Zellen wurden für 1 h 15 min bei 37°C mit Medium als Kontrolle und weiblichem, männlichem und gemischtem *LsE* (jeweils 10 µg/ml), wie auch mit Mikrofilarienkulturüberstand inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend nach dem Protokoll für FACS-Färbungen mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und CD25 oder CD69 gefärbt und anschließend im FACS-Calibur® gemessen und ausgewertet (2.2.17 und 2.2.19).

#### **2.2.16.2 Nach Chemotaxis**

In Chemotaxisversuchen unter Standardbedingungen eingesetzte NK-Zellen, sowohl gewanderte, als auch in der oberen Kammer verbliebene Zellen wurden anschließend getrennt von einander nach dem FACS-Färbungs-Protokoll mit Antikörpern (siehe 2.2.10) gegen CD3, CD56 und CD25 oder CD69 gefärbt und, wie unter 2.2.17 beschrieben, gemessen und ausgewertet.

#### **2.2.17 FACS-Analyse**

Zur Auswertung der einzelnen Versuche wurden die mit Fluoreszenz-Antikörpern markierten Zellen im FACS-Calibur® gemessen. Die FACS-Daten wurden mit Hilfe des Programms Cell-Quest-Pro 2003 für Macintosh analysiert.

### 2.1.18 Enzyme linked immunospot (ELISPOT) technique

Mittels ELISPOT lässt sich die Produktion von Zytokinen von einer einzelnen Zelle auf einen Stimulus hin nachweisen. Der primäre Antikörper wurde auf eine Konzentration von 10 µg/ml durch Verdünnung mit dem Bindungspuffer eingestellt und in einem Volumen von 50 µl/ Vertiefung auf die ELISPOT-Platte gegeben. Die Inkubationszeit betrug 3-8 h bei RT oder wahlweise 8-48 h bei +4°C. Danach wurde der Bindungspuffer entfernt und die Platte sechsmal mit 250 µl sterilem PBS gewaschen. Dann wurden die Vertiefungen mittels 100 µl R10 für 1-8 h bei RT oder 8-48 h bei +4°C geblockt. Die Lösung wurde entfernt und im Anschluss wurden 50 µl der Stimuli-Lösungen und 50 µl Zellen in R10 gelöst in der gewünschten Zellkonzentration in jede Vertiefung gegeben. Aufgrund der niedrigen Zellkonzentration nach der Migration konnte bei diesen Proben keine definierte Zellkonzentration eingestellt werden. Die Platte wurde für 24-36 h bei +37°C 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Die Lösung wurde nach der Inkubation verworfen und die Platte zunächst einmal mit unsterilem A. dest. für 5 min inkubiert. Das A. dest. wurde anschließend ebenfalls verworfen und die Platte fünfmal mit unsterilem PBS (ohne Wartezeit) gewaschen.

Eine in PBS auf 1 µg/ml konzentrierte Verdünnung des biotinylierten Antikörpers wurde mit 50 µl/Vertiefung aufgebracht. Die Platte wurde für 2-4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Lösung verworfen und die Vertiefung sechsmal mit PBS-Tween gewaschen worden war, wurde 50 µl/Vertiefung Streptavidin-HRP, 1:1000 mit PBS verdünnt, aufgetragen. Die Platte wurde für 1-2 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Vertiefungen wurden sechsmal mit PBS-Tween gewaschen. 100 µl des Substrates wurden auf die Platten gegeben, nach der makroskopisch sichtbaren Entwicklung der *Spots* (rote Punkte) wurde die Reaktion durch Wässerung mit Leitungswasser gestoppt. Anschließend wurde die Platte für ein bis zwei Tage bei RT getrocknet. Die Anzahl der *spot forming cells* (SFC) pro eine Million eingesetzter Zellen wurde anhand der jeweiligen Ausgangskonzentration und dem eingesetztem Volumen errechnet.

### 2.2.19 Statistik und Berechnungen

Der chemotaktische Index (CI) ergab sich aus dem Quotient der auf einen Stimulus gewanderten Zellen zu den auf das Medium gewanderten Zellen.

$$CI = \frac{\text{Anzahl der auf die Testsubstanz gewanderten Zellen}}{\text{Anzahl der auf Medium gewanderten Zellen}}$$

Ein CI > 2 wurde als signifikant im Sinne von bedeutend (mind. 2 fach) erhöht bezeichnet ohne weitere statistische Berechnungen.

Der arithmetische Mittelwert berechnet sich aus der Summe der Messwerte dividiert durch die Anzahl der Versuche entsprechend der folgenden Formel:

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Diagramme sind mit dem Programm Microsoft Excel 2003 und Prism 4 erstellt worden. Es wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Werte unter 0,05 galten als signifikant, Werte unter 0,005 als hochsignifikant. Des Weiteren wurden Microsoft Word 2003 und PowerPoint 2003 zu der Erstellung der Arbeit eingesetzt.

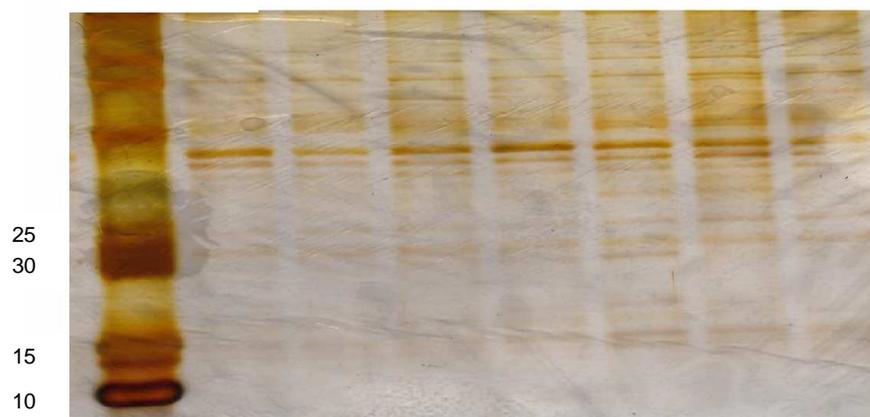
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche

##### 3.1.1 Analyse der Wurmextrakte mittels SDS-PAGE

Im silbergefärbten SDS-Gel (Abb. 16) wurde gezeigt, dass alle hier untersuchten Extrakte von männlichen und weiblichen adulten Würmern von *L. sigmodontis* ähnliche Banden aufweisen. Relevant für die CT-Versuche war, dass sich im Gesamtextrakt von weiblichen und männlichen Würmern beziehungsweise in deren exkretorisch-sekretorischen Produkten, niedermolekulare Moleküle, wie Proteine mit einem Molekulargewicht von unter 15 kD befanden, die chemotaktisch wirken könnten. Bekannte Chemotaxine, wie zum Beispiel IL-8, haben diese Molekülgröße (Graves & Jiang, 1995). Aufgrund einer variablen Anzahl an Weibchen und Männchen pro infizierter Maus und möglicher bisher unbekannter Unterschiede der somatischen und exkretorischen Produkte, sowie der größeren Körperlänge und –masse der Weibchen wurde Extrakt hauptsächlich aus dem Homogenisatüberstand von Weibchen für die Chemotaxisversuche hergestellt und verwendet.

kD    Marker    m    w    gemischt    m    m    gemischt    w

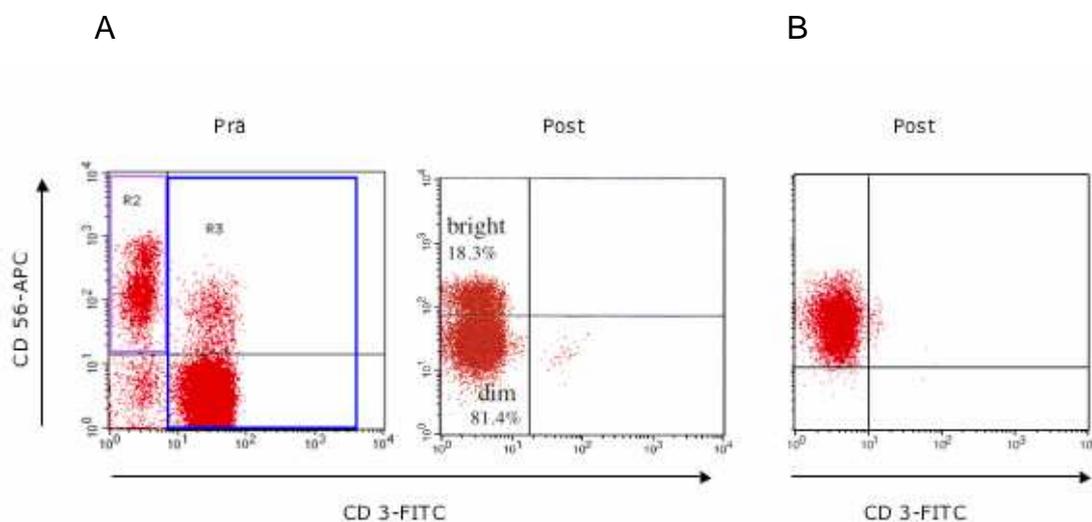


**Abb. 16** SDS-Gelelektrophorese nach Silberfärbung von *L. sigmodontis* Extrakten (LsE).

Gemischt aus Weibchen und Männchen (gemischt), Weibchen (w) und Männchen (m) getrennt. Regenbogenmarker.

### 3.1.2 Ermittlung der NK-Zell-Frequenz im Spenderblut

Nach spezifischer FACS-Färbung über monoklonale Antikörper wurden naive  $CD56^+/CD16^+/CD3^-$  NK-Zellen aus *buffy coats* mittels FACS-Sort isoliert. Dabei wurden die NK-Zellen über die direkte Markierung von CD16/56 und das Fehlen der mit dem T-Zell-Rezeptor-assoziierten CD3epsilon-Kette ( $CD3\epsilon$ ) erfasst. Zunächst wurden die Lymphozyten aufgrund ihrer Größe, im FSC, und Granularität, im SSC in einem Rahmen ausgewählt. Aus dieser Zellpopulation wurden nur Zellen, die in der Darstellung der Doppelfärbung im *dot plot*  $CD3^-/CD16^+/56^+$  NK-Zellen waren, gesortet und weiter verwendet (Abb. 17A).

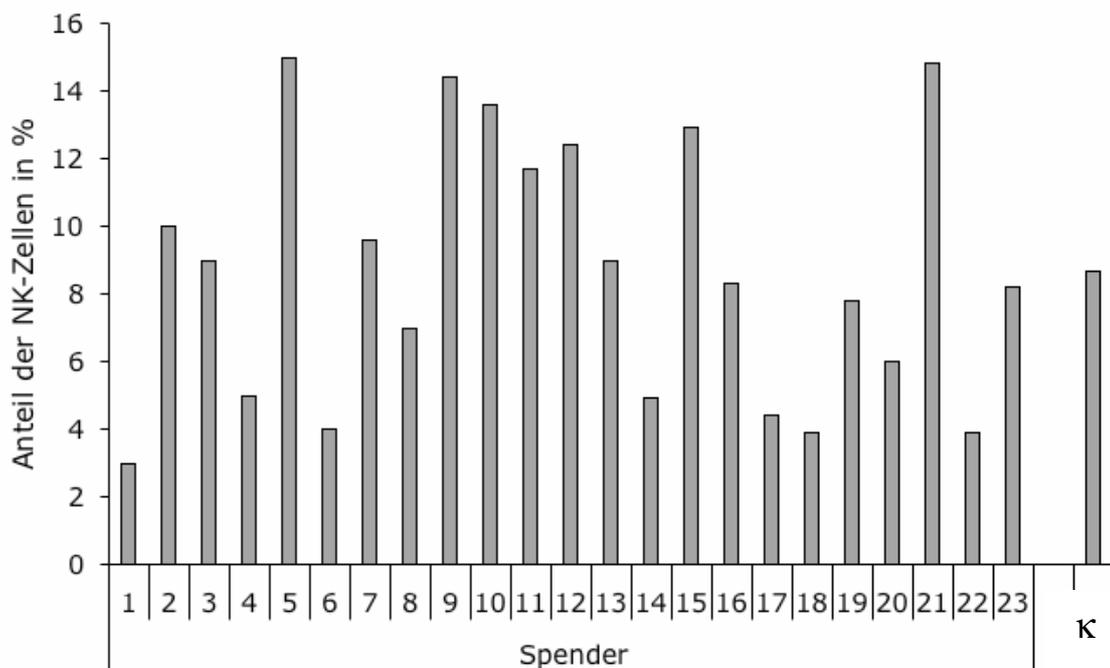


**Abb. 17** Verteilung der  $CD56^{dim}$  und  $CD56^{bright}$  NK-Zellsubpopulationen vor und nach Chemotaxis.

A) NK-Zellen (R2 = linker oberer Quadrant) und T-Zellen (R3 = rechter oberer Quadrant). Vorliegen einer  $CD56^{bright}$  und einer  $CD56^{dim}$  NK-Zellsubpopulation vor (prä) und nach (post) dem Sort. Beide Populationen wurden zusammen gesortet. Die Reinheit der NK-Zellen nach dem Sort betrug 99,7%. Subpopulationen waren für 4 von 7 Donoren repräsentativ. B) Bei 3 von 7 Spendern konnten die NK-Zellsubpopulationen nicht deutlich voneinander differenziert werden. Repräsentativer *dot plot* von NK-Zellen eines Spenders, nach dem Sort, ohne Differenzierungsmöglichkeit von Subpopulationen.

Der Aufreinigungserfolg lag mit dieser Methode um 99%. Es wurden keine Proben verwendet, deren Aufreinigungsergebnis unter 98% lagen. Bei vier Proben war es möglich CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> Subpopulationen eindeutig zu differenzieren, bei dreien hingegen nicht (Abb. 17B).

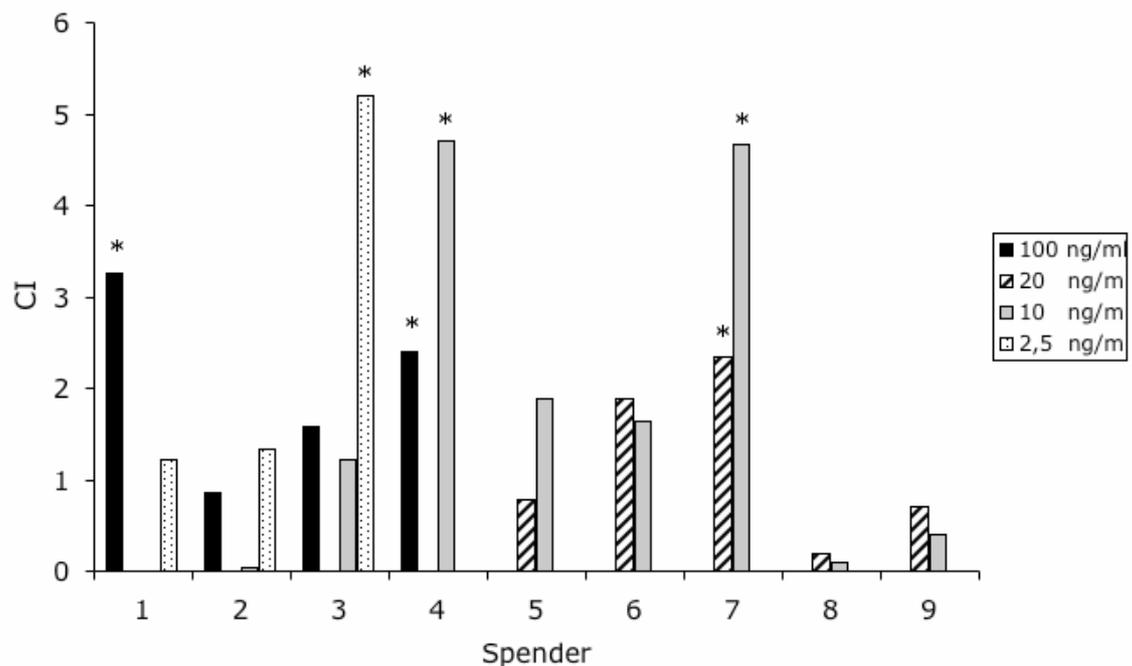
Während der Feineinstellung des FACS-Aria auf die NK-Zellen des jeweiligen Spenders war es möglich den prozentualen Anteil der NK-Zellen an den aufgereinigten PBMC zu ermitteln (Abb. 18). Diese Analyse ergab für den Anteil der NK-Zellen einen Mittelwert ( $\kappa$ ) von 8,6% der Lymphozyten bei 23 Spendern. Die NK-Zell-Frequenzen schwankten bei den einzelnen Spendern zwischen 3% und 15%.



**Abb. 18** Prozentualer Anteil der NK-Zellen an Lymphozyten in peripheren Blutmonozyten von gesunden Spendern, Mittelwert ( $\kappa$ ).

### 3.1.3 Chemotaxis von NK-Zellen auf Positivkontrollen

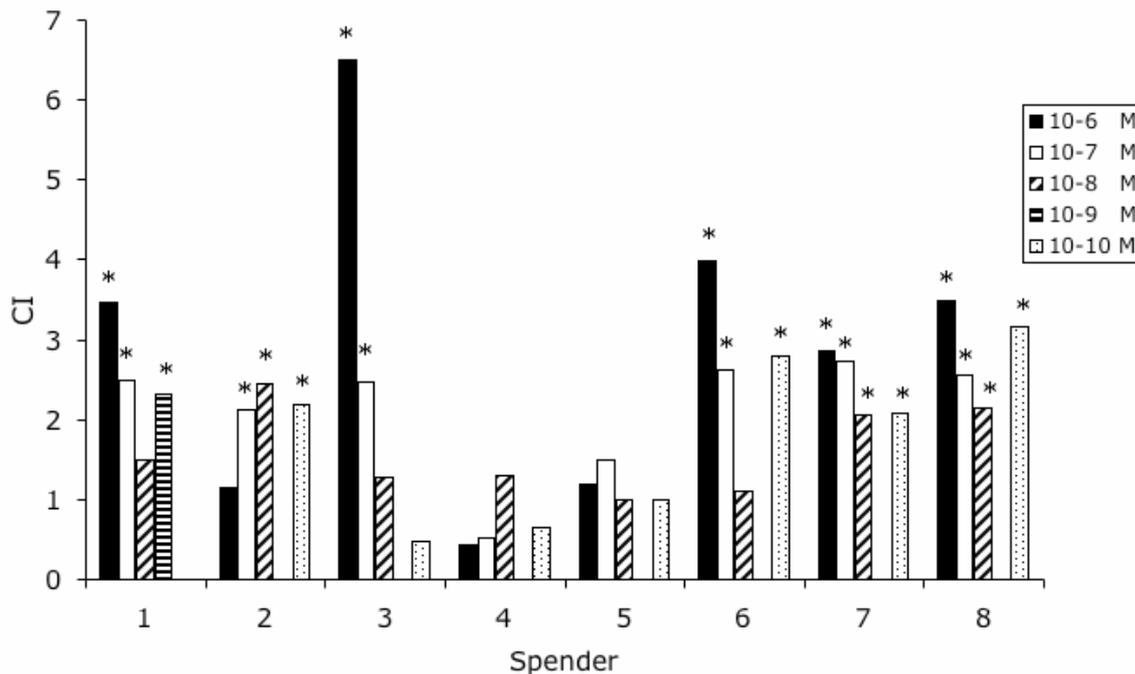
RANTES wurde als Positivkontrolle bei Chemotaxisversuchen mit den naiven NK-Zellen von neun verschiedenen Spendern gegen Wurmextrakt in Boyden-Kammern in verschiedenen Verdünnungsstufen von 100 ng/ml KP bis zu 2,5 ng/ml eingesetzt (Abb. 19). Es konnte nur bei vier Spendern eine signifikante Wanderung der NK-Zellen auf RANTES hin gezeigt werden. Es wurden je zwei signifikante Wanderungen auf die Konzentration von 100 ng/ml und von 10 ng/ml beobachtet und je einmal auf 20 ng/ml und 2,5 ng/ml. Aufgrund dieser Varianz wurde in den folgenden Chemotaxisversuchen vermehrt mit fMLP als Positivkontrolle gearbeitet (s. Kapitel 4.2.).



**Abb. 19 Chemotaxis von naiven primären NK-Zellen auf RANTES bei verschiedenen Spendern.**

$5 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$  Zellen/Kammer, Testung in Boyden-Kammer und AP48 Mikroammer. Eine signifikante Chemotaxis erfolgte bei 44.4% (4/9) der Spender. \* = CI signifikant > 2. Keine Angabe = Konzentration nicht getestet.

Bei fMLP konnte bei 6 von 8 anderen Spendern (75%) eine signifikante Wanderung der NK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 20). Im Vergleich zu RANTES lagen die einzelnen chemotaktischen Indizes meist zwischen zwei und vier, während bei RANTES die meisten unter 2 lagen, dafür aber höhere Spitzenwerte auftraten.



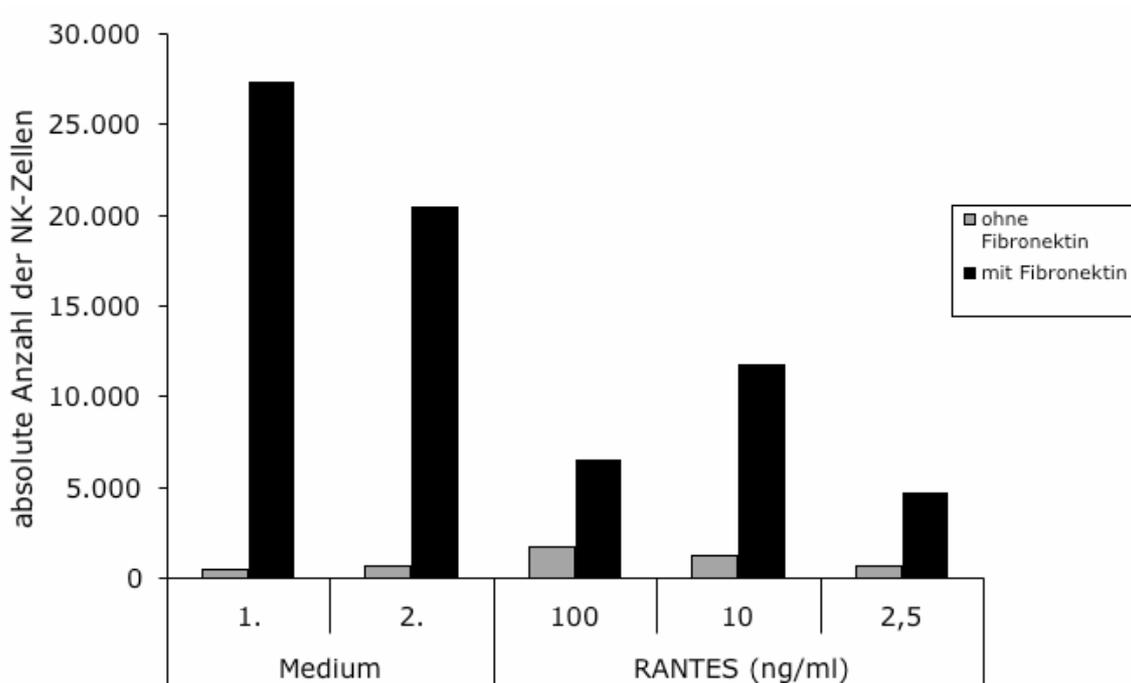
**Abb. 20 Chemotaxis von naiven primären NK-Zellen auf fMLP bei verschiedenen Spendern.**

Testung in Boyden-Kammer,  $2 \times 10^5$  Zellen/Kammer, zwei bis vier Kammern/Ansatz. Vorliegen einer signifikanten Chemotaxis bei 75% (6/8) der Spender. \* = CI signifikant > 2. Keine Angabe = Konzentration nicht getestet.

### 3.1.4 Chemotaxisversuch mit Fibronectin beschichteter Membran

Eine Fibronectinbeschichtung der Membran der AP48 Mikrokammer sollte die Versuchsbedingungen den Bedingungen *in vivo*, bei denen Fibronectin Bestandteil des Endothels ist, angleichen. Mittels Fibronectinbeschichtung konnte dann auch die absolute Anzahl der gewanderten naiven NK-Zellen bei

der Positivkontrolle RANTES deutlich erhöht werden (Abb. 21). Im Vergleich zu der Hintergrundwanderung auf KP konnte allerdings keine Signifikanz ermittelt werden, da Fibronektin auch die Hintergrundwanderung auf Medium stark erhöhte. Es wurde daher bei weiteren Untersuchungen auf eine Fibronektinbehandlung der Membran verzichtet.



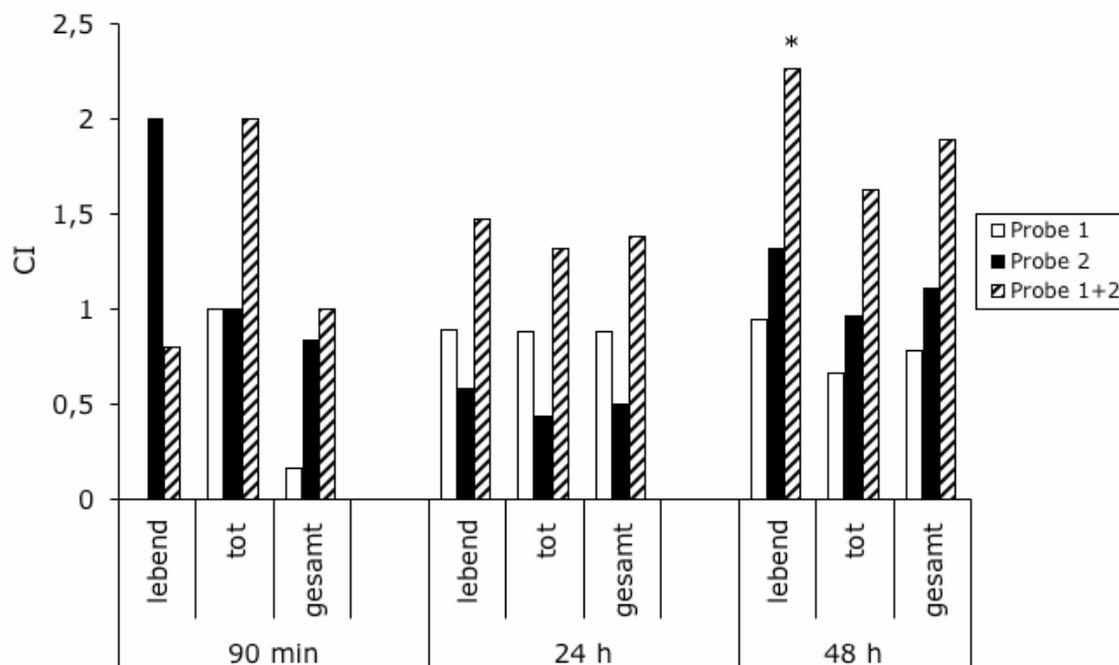
**Abb. 21 Chemotaxis naiver NK-Zellen unter Verwendung einer fibronektinbeschichteten Membran.**

Fibronektin verstärkte die gesamte NK-Zellwanderung sowohl gegen RANTES, als auch auf Medium (Hintergrundwanderung). Testung in AP48 Mikrokammer,  $1 \times 10^5$  Zellen/Kammer, 3 Kammern/Ansatz.

### 3.2 Chemotaxis naiver humaner NK-Zellen auf Mikrofilarien, Wurmextrakt und Kulturüberstände von *L. sigmodontis*

#### 3.2.1 Chemotaxis auf lebende Mikrofilarien von *L. sigmodontis*

In einem Chemotaxisversuch sollte getestet werden, ob lebende Filarien eine Chemotaxis von NK-Zellen auslösen können. Dafür wurden primäre NK-Zellen eines Spenders mittels FACS-Sorten aufgereinigt und im Transwellssystem zur Chemotaxis auf lebende Mikrofilarien, die sich aufgrund ihrer Größe eigneten, eingesetzt (Abb. 22). Nach 90 min konnte nur bei einer Probe ein  $CI > 2$  ermittelt werden. Nach 24 h gab es keine signifikante Wanderung. Nach 48 h war die Summe aus zwei Versuchen anhand der Mittelwerte signifikant, die einzelnen Versuche waren es nicht. Die Zellen waren in KP sichtlich kaum über 24 h überlebensfähig. Eine signifikante Wanderung bei 48 h ergab sich für die nach Trypanblau-Färbung noch als lebendig gewerteten Zellen.

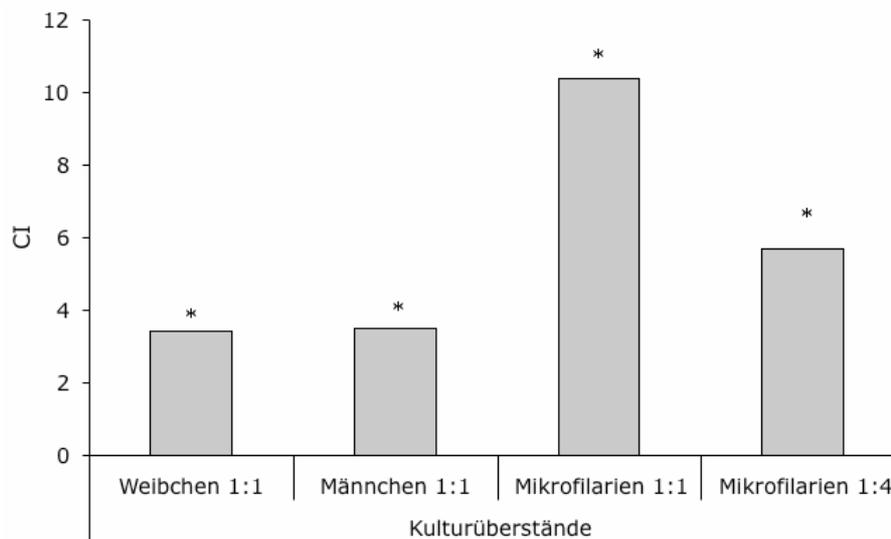


**Abb. 22 Chemotaxis von NK-Zellen auf lebende Mikrofilarien von *L. sigmodontis*.** FACS-gesortete primäre NK-Zellen wurden auf lebende Mikrofilarien von *L. sigmodontis* *in vitro* auf im Transwellssystem ( $5 \times 10^5$  Zellen/Kammer) über 1-2 Tage eingesetzt.

\* = CI signifikant  $> 2$ .

### 3.2.2 Chemotaxis auf Kulturüberstände von *L. sigmodontis*

Bei Chemotaxisversuchen auf Wurmkulturüberstände zeigte sich, dass unverdünnter Mikrofilarienkulturüberstand auf NK-Zellen die stärkste chemotaktische Wirkung hatte und eine Verdünnung des Überstandes zu einer Abnahme führte (Abb. 23). Die Überstände von weiblichen und männlichen Würmern ergaben ein gleichstarkes Migrationsergebnis. Diese lagen aber insgesamt unter den Ergebnissen für Mikrofilarienüberstand (Abb. 23).



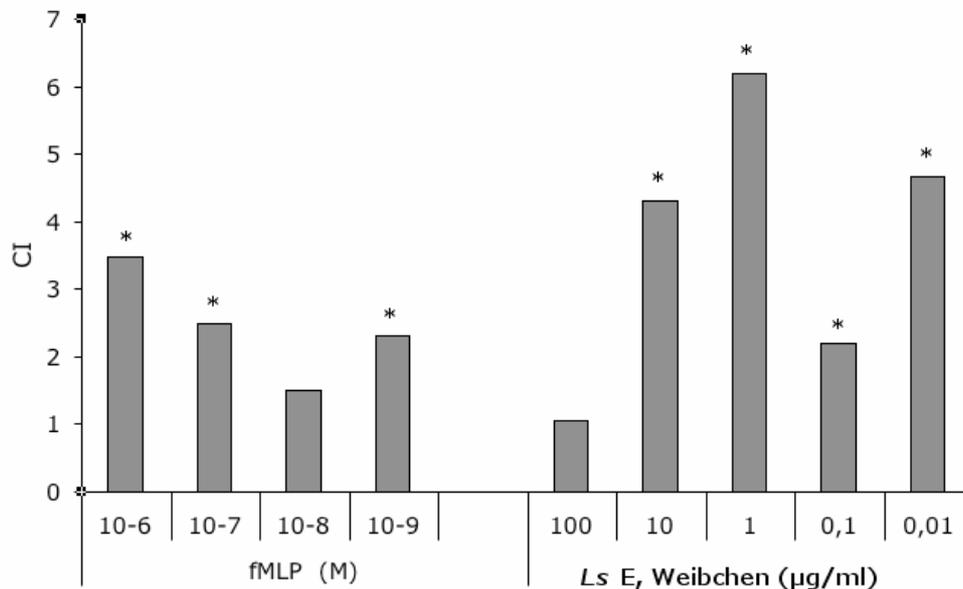
**Abb. 23 Chemotaxis von NK-Zellen auf Wurmkulturüberstände von *L. sigmodontis*.**

Chemotaktische Wirkung der Wurmkulturüberstände (weibliche, männliche Würmer und Mikrofilarien). Testung in AP48 Mikrokammer,  $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer, 3 Kammern/Ansatz. Verdünnungsfaktor 1:1 oder 1:4 mit KP. \* = CI signifikant > 2.

### 3.2.3 Chemotaxis auf Extrakte von homogenisierten *L. sigmodontis* Würmern

Zunächst wurden in Boyden-Kammern verschiedene Konzentrationen von gemischtem Wurmextrakt bezüglich ihrer chemotaktischen Wirkung auf frisch isolierte NK-Zellen getestet (Abb. 24). Es ergab sich ein zweiphasiger Kurvenverlauf, wobei bei 0,1  $\mu\text{g/ml}$  eine Inzession, jedoch mit einem

signifikanten Wert, vorlag. Lediglich bei der Ausgangskonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  fand keine signifikante Wanderung statt.

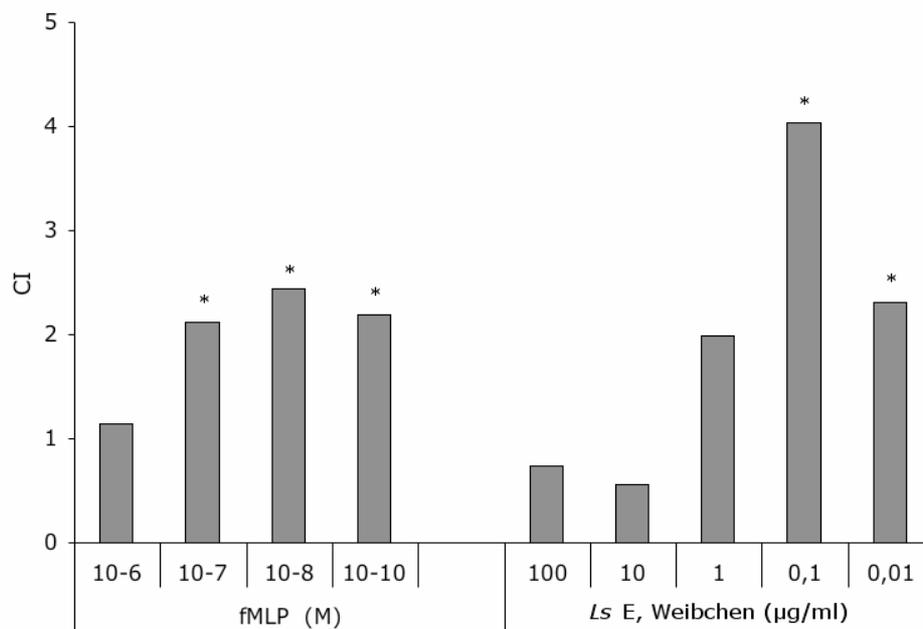


**Abb. 24 Chemotaxis primärer NK-Zellen auf Extrakt von gemischten adulten *L. sigmodontis* Würmern (LsE).**

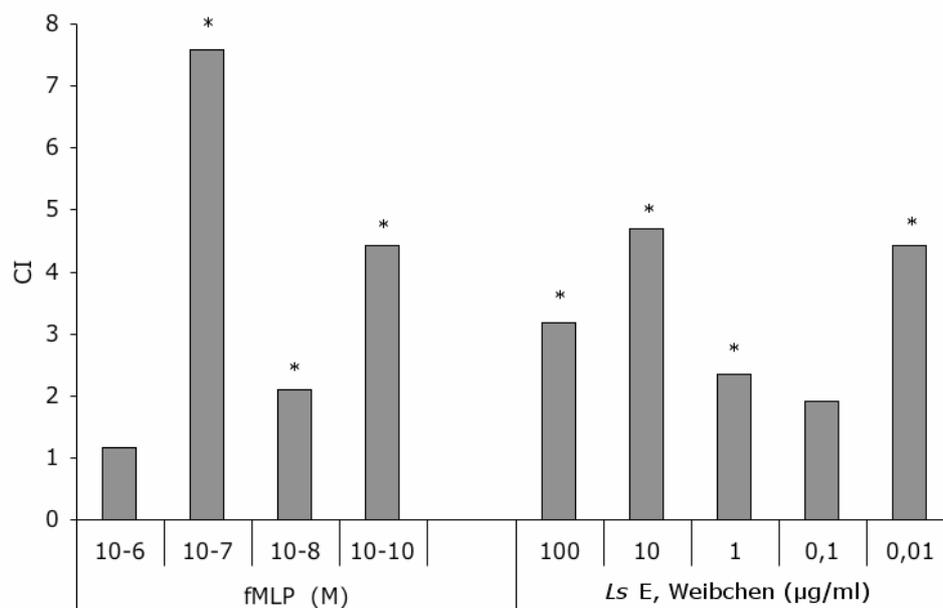
Verwendung der Boyden-Kammer, biphasischer Kurvenverlauf. \* = CI signifikant > 2. FMLP als Positivkontrolle.

Im weiteren Verlauf wurden sieben Chemotaxisversuche mit Wurmextrakt von Weibchen in Boyden-Kammern durchgeführt. Bei allen sieben Spendern wurde eine signifikante Chemotaxis von primären gesorteten NK-Zellen auf den Wurmextrakt beobachtet. In dieser Arbeit werden nicht alle einzelne Datensätze gezeigt. Dabei kam es zu zwei verschiedenen Kurvenverläufen. Bei fünf von sieben Spendern ergab sich ein eingipfliger Kurvenverlauf (Abb. 25A). Der jeweilige Spitzenwert variierte bei den jeweiligen Spendern sowohl in der Höhe des CI als auch bei welcher Konzentration des Extraktes dieser auftrat. Abb. 25A zeigt einen repräsentativen Kurvenverlauf. Bei zwei Spendern wurden für die verwendeten Konzentrationen des weiblichen Wurmextraktes zwei Höchstwerte, also ein biphasischer Verlauf, ermittelt (Abb. 25B). Auch hierbei lagen die Spitzenwerte bei allen Spendern bei unterschiedlichen Konzentrationen des Extraktes.

A



B

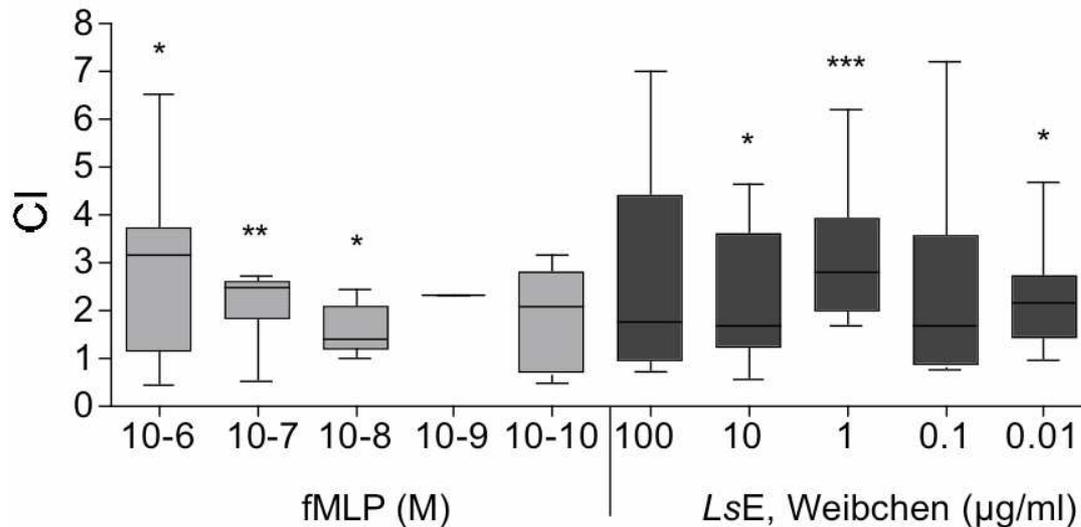


**Abb. 25 Chemotaxis primärer NK-Zellen auf Extrakt von weiblichen adulten *L. sigmodontis* Extrakt (LsE).**

A) Chemotaxis naiver NK-Zellen auf Extrakt von weiblichen adulten *L. sigmodontis* Würmern (LsE) Verwendung von Boyden-Kammern,  $2 \times 10^5$  Zellen/Kammer eingesetzt, 2 Kammern/Ansatz. Repräsentativer Verlauf für 5 von 7 Spendern. FMLP als Positivkontrolle. \* = CI signifikant > 2.

B) Biphasischer Kurvenverlauf bei 2/7 Spendern, repräsentativ. Verwendung von Boyden-Kammern,  $2,8 \times 10^5$  Zellen/Kammer eingesetzt, 2 Kammern/ Ansatz. \* = CI signifikant > 2.

Alle sieben Chemotaxisversuche auf weiblichen LsE in den Standardkonzentrationen wurden zusammen statistisch ausgewertet (Abb. 26). Es ergibt sich in der Summe ein einkurviger Graphenverlauf. Bei drei verschiedenen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,014$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,0003$  und 10  $\mu\text{g/ml}$   $p=0,0205$ ) ließ sich eine signifikante Chemotaxis im Vergleich zu Medium berechnen.



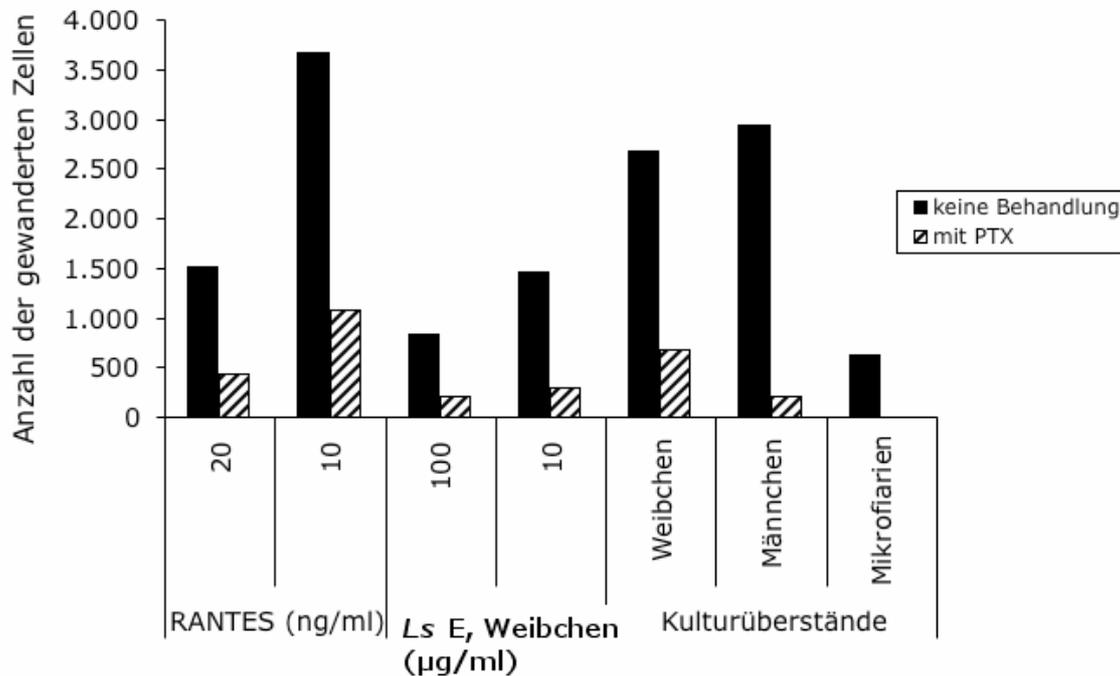
**Abb. 26 Zusammenfassung von sieben Chemotaxisversuchen mit primären NK-Zellen.**

Verwendung von Boyden-Kammern mit  $2-3 \times 10^5$  Zellen und 2 Kammern pro Ansatz. Signifikante Abweichungen vom Chemotaxis-Basiswert 1 für sieben Donoren bei  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0,05$  (\*\*),  $p < 0.0005$  (\*\*\*). Mann-Whitney U-Test. Mittelwerte und Standardfehler.

### 3.2.4 Wirkung von Pertussistoxin auf die NK-Zell Wanderung

Pertussistoxin ist ein potenter Blocker von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie sie in der Familie der Chemokinrezeptoren vorliegen. In drei Versuchen wurde jeweils eine Hälfte der primären naiven NK-Zellen vor der Chemotaxis mit Pertussistoxin inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen, deren Chemokinerezeptoren geblockt waren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, keine Wanderung, weder auf das als Positivkontrolle verwendete

Zytokin RANTES, noch auf den Wurmextrakt oder die Überstände, zeigten (Abb. 27).



**Abb. 27** Pertussistoxin (PTX) hebt die chemotaktische Wirkung von weiblichem Wurmextrakt (LsE) und Kulturüberständen auf.

Einsatz der AP48 Mikrokammer mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Kammer, 3 Kammern/Ansatz. Repräsentativ für drei Versuche. Darstellung der absolut gewanderten Zellzahl.

### 3.2.5 Checkerboardanalyse

Mittels Checkerboardanalyse kann unterschieden werden, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen um eine Chemotaxis oder um Chemokinese handelt. In einem Experiment mit primären naiven NK-Zellen konnten für die Konzentration von 10 µg/ml Extraktlösung in der unteren Kammer bei je drei verschiedenen Konzentrationen der Extraktlösung in der oberen Kammer signifikante Wanderungen anhand des berechneten CI beobachtet werden: Für Medium, für 0,01 µg/ml und für 10 µg/ml (Tab. 3). Dies weist auf eine Chemotaxis (Tab. 3), eine gerichtete Wanderung der Zellen, gekoppelt mit einer

Chemokinese, einer Aktivierung der Zellen, ab einer bestimmten Konzentration (Tab. 3) des LsE hin.

**Tab. 3 Checkerboardanalyse mit primären NK-Zellen**

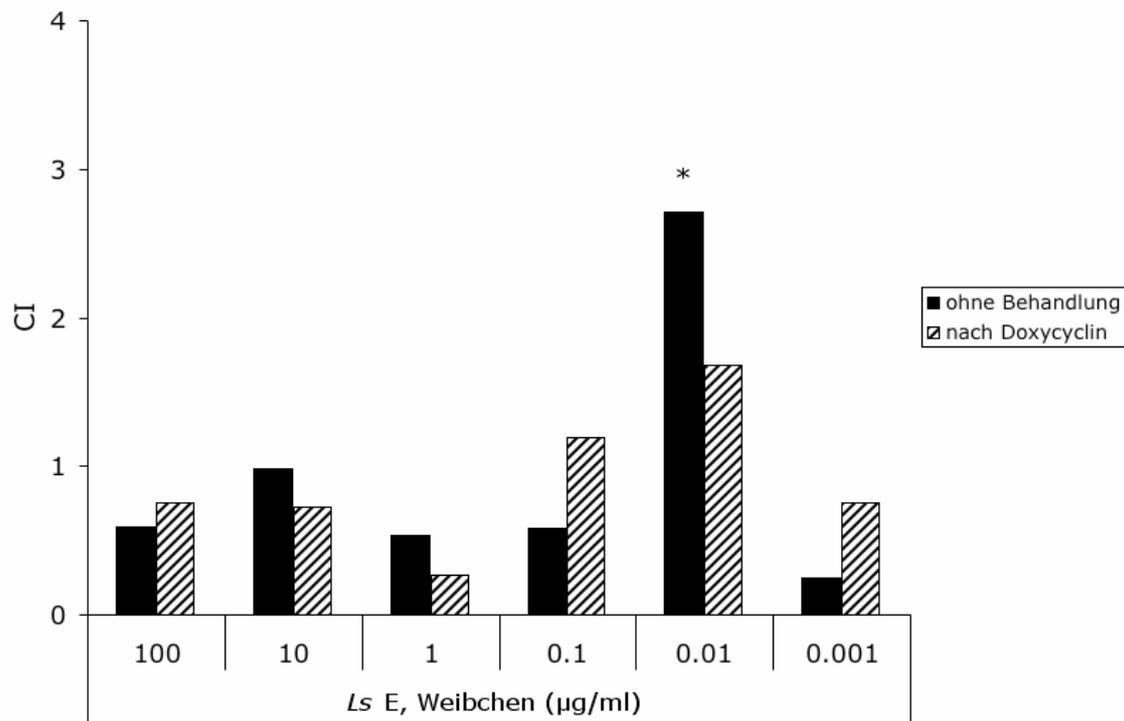
Verwendung der AP48 Mikrokammer ( $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer, 2 Kammern/Ansatz, n.d. = nicht gemacht). Angabe der chemotaktischen Indizes auf die Hintergrundwanderung einer Negativprobe bezogen.

jeweils $\mu\text{g/ml}$ Extrakt untere Kammer	obere Kammer				
	0,00	0,01	0,10	1,00	10,00
0,00	1,00	0,52	0,59	1,19	1,19
0,01	1,02	n.d.	n.d.	1,02	1,29
0,10	0,62	1,29	1,12	0,82	0,99
1,00	0,29	0,94	1,45	1,62	1,50
10,00	2,85	1,37	2,71	0,95	2,31

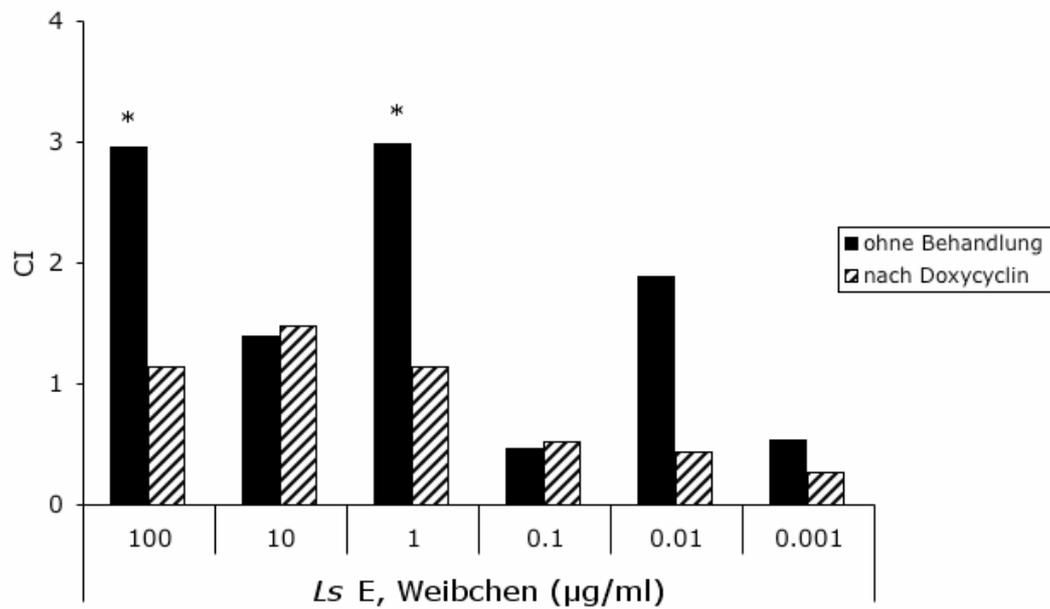
### 3.2.6 Einfluss einer zuvorigen Doxycyclinbehandlung von mit *L. sigmodontis* infizierten Mäusen

Im Vergleich von Wurmextrakt aus Tieren, bei denen eine Doxycyclinbehandlung vorgenommen wurde, mit Wurmextrakt aus unbehandelten Tieren zeigte sich, dass naive, primäre NK-Zellen keine signifikante Wanderung auf den *Wolbachien* depletierten Extrakt von weiblichen Würmern aufwiesen, im Gegensatz zum Extrakt mit *Wolbachien*. Der wolbachienhaltige LsE ergab im Fall eines Spenders (Abb. 28A) einen Spitzenwert bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Wurmextrakt. Bei einem weiteren Spender waren wiederum zwei signifikante Wanderungen gemessen worden (Abb. 28B). Diese Varianz der Spitzenwerte spiegeln die Beobachtungen aus den bisherigen Versuchen mit LsE wieder (Abb. 24-26). Dargestellt sind zwei unabhängige Versuche.

A



B



**Abb. 28 Einfluss einer anti-endobakteriellen Behandlung der Würmer im Mäusewirt mit Doxycyclin.**

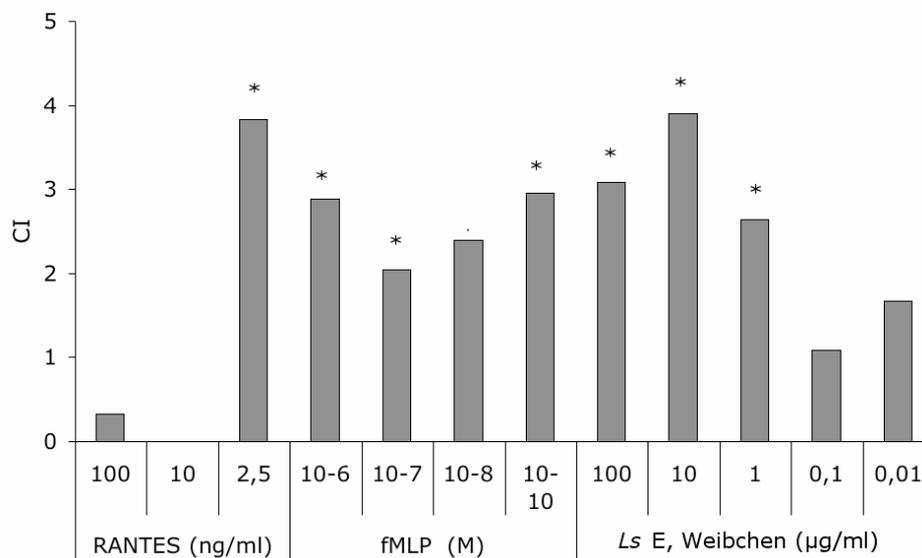
Chemotaxis primärer NK-Zellen auf *Wolbachien* depletierten Extrakt versus unbehandelten Wurmextrakt aus Weibchen (LsE). A) Spender eins B) Spender zwei. Verwendung der AP48 Mikrokammer mit  $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer und 2 Kammern/Ansatz. \* = CI signifikant > 2.

### **3.3. Chemotaxis humaner NK-Zelllinien auf Wurmextrakt**

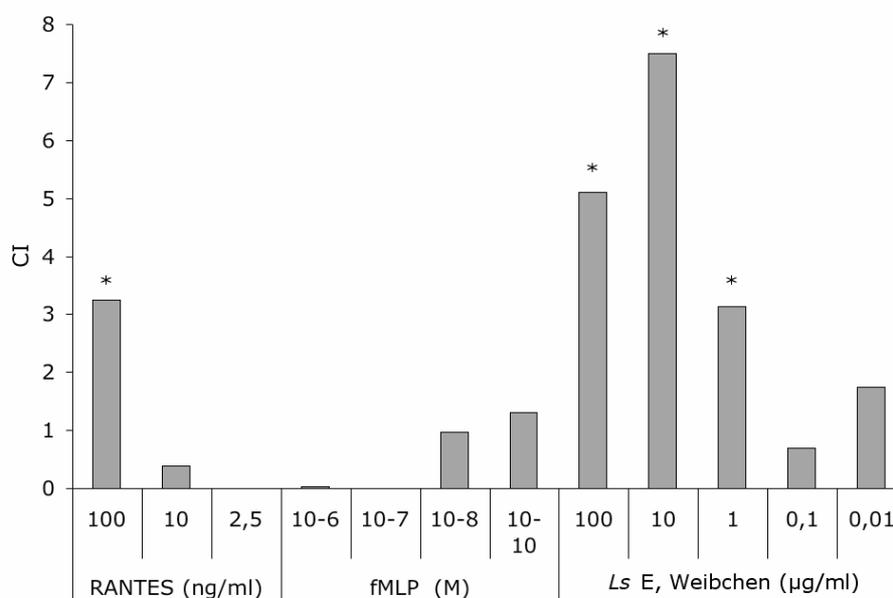
Da die Ergebnisse der Chemotaxis von humanen naiven NK-Zellen auf Wurmextrakt kein homogenes Migrationsverhalten für einzelne Konzentrationen des Extraktes ergaben, wurden im Hinblick auf die Feinanalyse der Extraktfraktionen für weitere Chemotaxisversuche zwei humane NK-Zelllinien, NKL und YT, getestet und bei Weiteren Versuchen die NKL-Zelllinie verwendet. Zunächst wurden mit beiden Zelllinien Chemotaxisversuche auf Positivkontrollen und weiblichen Wurmextrakt durchgeführt. Bei beiden Zelllinien wurde auf eine FACS-Färbung verzichtet und die Messung und Analyse der Lymphozyten nur im FSC und SSC vorgenommen.

Beide zeigten auf RANTES eine signifikante Migration (Abb. 29). Bei den YT-Zellen lag sie bei 100 ng/ml, bei den NKL-Zellen bei 2,5 ng/ml. Deutliche Unterschiede ergaben sich bei der Verwendung von fMLP als Positivkontrolle. Die YT-Zellen zeigten keinerlei Wanderungsverhalten auf fMLP, die NKL-Zellen wiesen bei allen Verdünnungen eine signifikante CT auf. Beim Wurmextrakt kam es bei den NKL-Zellen zu einer signifikanten Wanderung bei drei Konzentrationen: Bei 1, 10 und 100 µg/ml, mit dem höchsten Wert bei 10 µg/ml. Bei der YT-Zelllinie bildeten sich ebenfalls bei den Konzentrationen 1, 10 und 100 µg/ml drei signifikante Wanderungen aus. Hier lag der Höchstwert bei 7,5 (Abb. 28B). Da fMLP nur bei der NKL-Zelllinie als Positivkontrolle wirkte, wurde alleine diese für weitere Versuche verwendet.

A



B



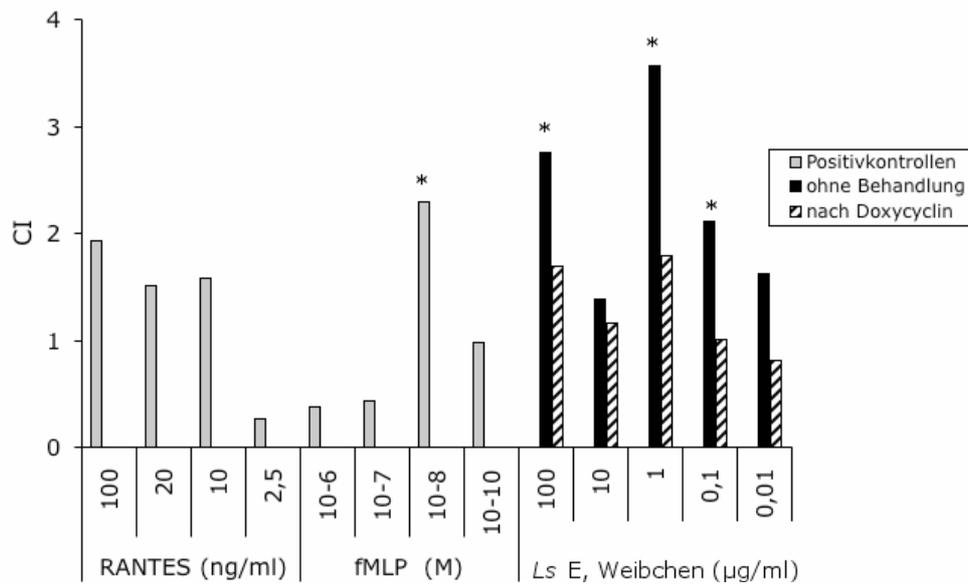
### Abb. 29 Chemotaxis der NK-Zelllinien.

A) NKL-Zelllinie ( $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer) und B) YT-Zelllinie ( $8 \times 10^4$  Zellen/Kammer). Chemotaxis auf RANTES und fMLP als Positivkontrollen und weiblichen Wurmextrakt (LsE) bei Einsatz der AP48 Mikroammer (3 Kammern/Ansatz). \* = CI signifikant > 2. Für die NKL-Zelllinie repräsentativ für 5 Versuche.

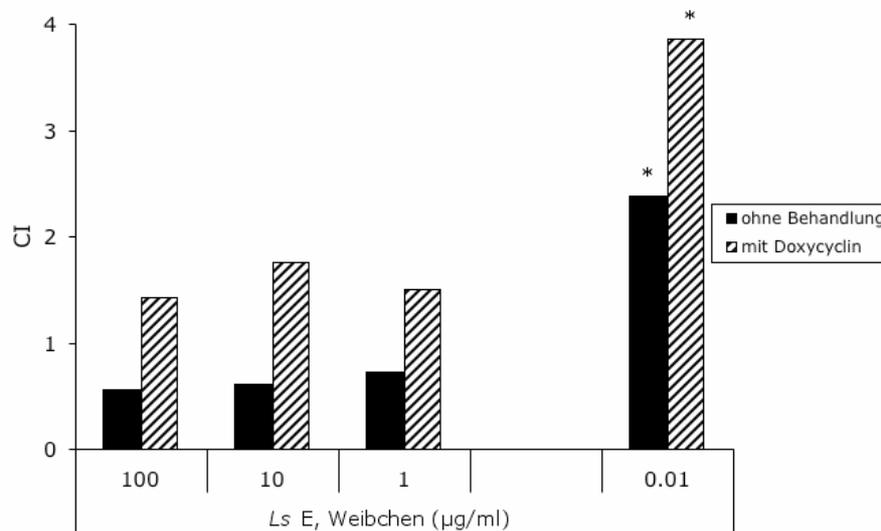
Auch bei der NKL-Zelllinie zeigte sich teilweise, dass Würmer aus mit Doxycyclin behandelten Mäusen keine chemotaktische Wirkung mehr haben im Vergleich zu Wurmextrakt aus unbehandelten Mäusen (Abb. 30A). Bei einem

Versuch zeigte sich jedoch ein gegenteiliges Bild. Hier war bei den Proben nach Doxycyclinbehandlung sowohl eine signifikante Wanderung nachweisbar, als auch ein höherer CI (Abb. 30B).

A



B



**Abb. 30 Vergleich der Chemotaxis von NKL-Zellen auf weiblichen Wurmextrakt (LsE) aus unbehandelten Mäusen mit Extrakt aus mit Doxycyclin behandelten Würmern.**

A) Reduzierende Wirkung der Behandlung, Verwendung der AP48 Mikrokommer,  $1,4 \times 10^5$  Zellen/Kammer, 2 Kammern/Ansatz. \* = CI signifikant > 2. Repräsentativ für zwei Versuche.

B) Mit CT-verstärkender Wirkung der Behandlung in einem Versuch (AP48 Mikrokommer  $1 \times 10^5$  Zellen/Kammer, 2 Kammern/Ansatz). \* = CI signifikant > 2.

### 3.4 Analyse von Wurmextraktfraktionen von *L. sigmodontis* Weibchen zur weiteren Charakterisierung NK-Zell chemotaktischer Moleküle

In Kolaboration mit Dr. Kai Lüersen aus der Abteilung für Biochemie des Bernhard-Nocht-Instituts wurden von *L. sigmodontis* Weibchen mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Säule 30 Fraktionen des Extraktes hergestellt. In Abb. 44 im Anhang ist die Aufreinigung nach Fraktionen unterteilt graphisch dargestellt.

Mittels eines SDS-Geles, welches silbergefärbt wurde, ließ sich bei den einzelnen Fraktionen die Auftrennung der einzelnen Proteine nach ihrer unterschiedlichen Größe in kD nach FPLC nachweisen (Abb. 31). Da in dem Wurmextrakt Chemokin-ähnliche Moleküle identifiziert werden sollten, waren vor allem die Fraktionen mit Proteinen mit einem Gewicht von ca. 8-15 kD von Interesse.

In den Fraktionsnummern 36 und 38 mit größeren Proteinen wurden im 10-15 kD Bereich kräftige Banden und damit mögliche Chemokine in ausreichender Konzentration gefunden. In den Fraktionsnummern 42 und 44 traten nur zarte Banden, also geringe Konzentrationen von Proteinen auf.

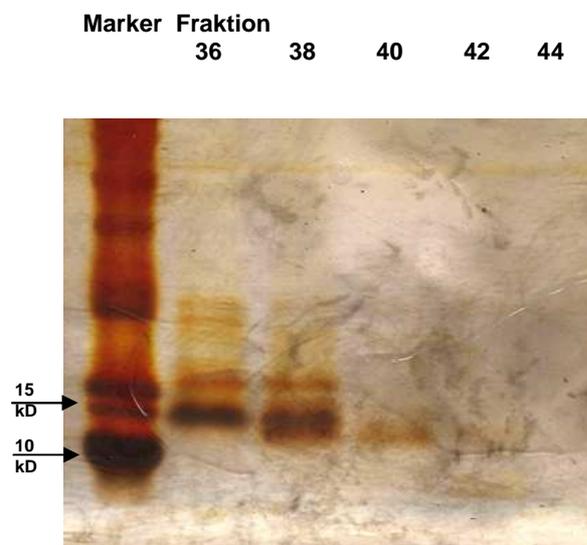
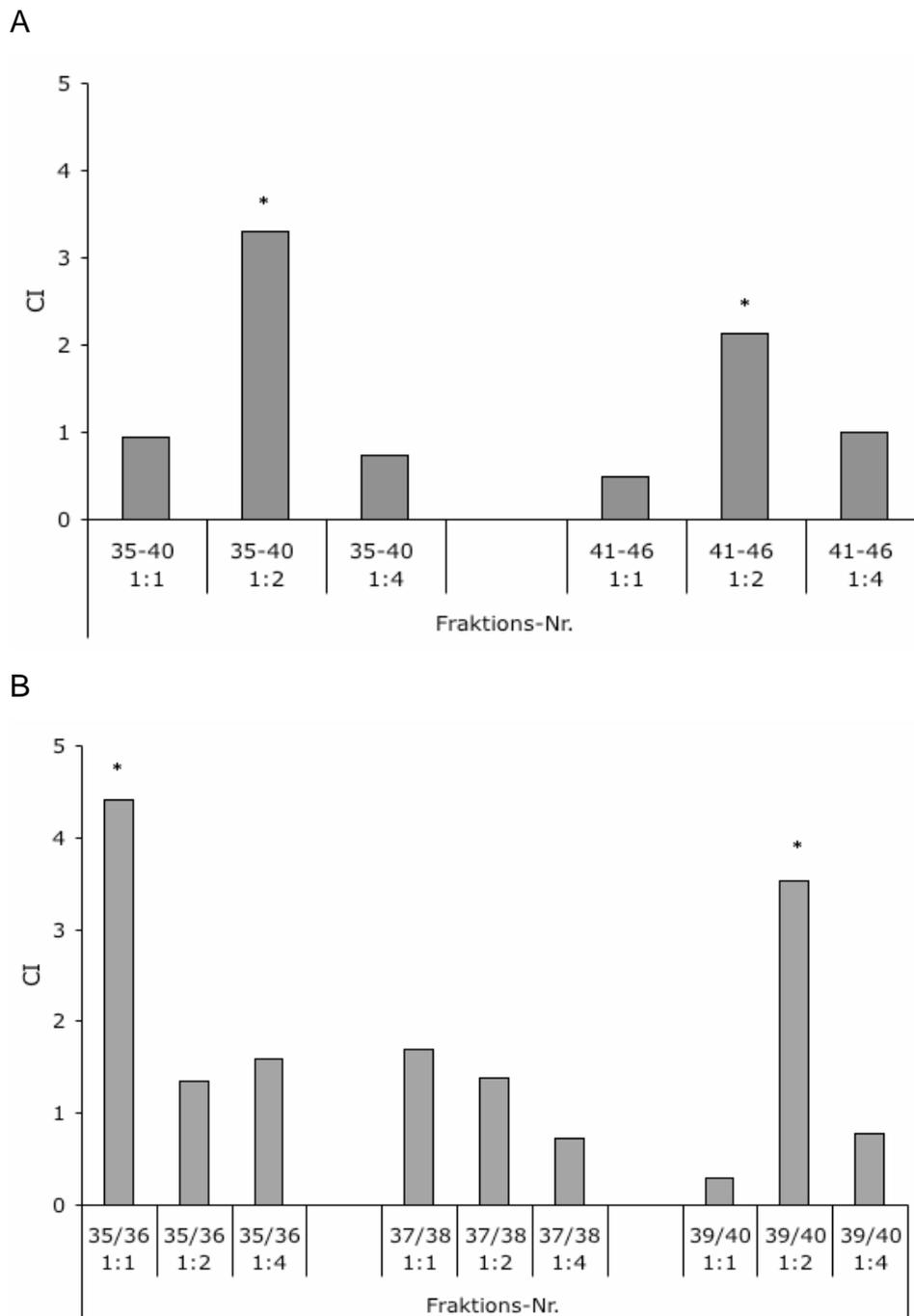


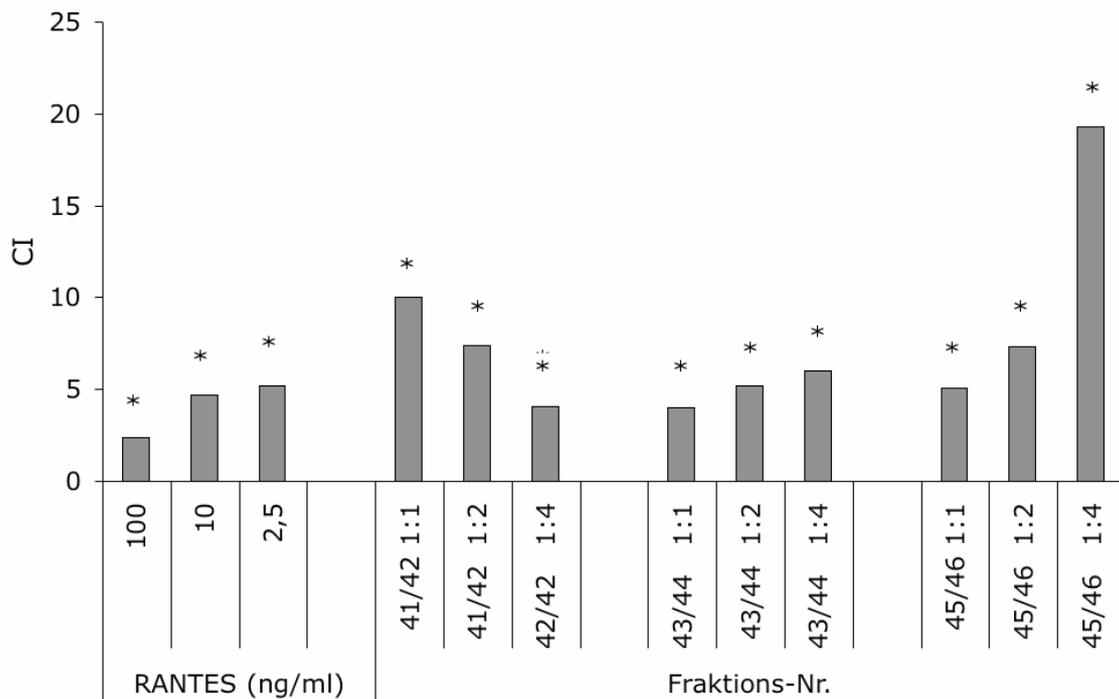
Abb. 31 SDS-Gelelektrophorese der Fraktionsnummern 36-44 aus Wurmextrakt von *L. sigmodontis* Weibchen.

Zur Orientierung und Übersicht wurden zunächst jeweils fünf Fraktionen als Fraktionenpool zusammengefasst und in CT-Versuchen in je drei verschiedenen Konzentrationsstufen eingesetzt. Hierbei zeigte sich bei dem ersten Spender, dass sowohl in den Fraktionen mit den größeren Proteinen als auch mit kleineren bei der 1:2 Verdünnung signifikante Wanderungen stattfanden (Abb. 32A), während der gleiche Spender nicht auf RANTES reagierte. In diesem Versuch zeigte sich in der Gruppe mit den größeren Proteinen (Fraktionsnummern 35-40) ein höherer CI bei der 1:2 Verdünnung als bei den kleineren Proteinen (Fraktionsnummern 41-46). In zwei weiteren Versuchen mit NK-Zellen von zwei verschiedenen Spendern wurden jeweils Fraktionenpaare gebildet. Mit den Zellen des zweiten Spenders wurden die Fraktionsnummern 35-40 abgedeckt. Sie enthielten Proteine mit einer Molekülgröße von ca. 9-25 kD (Abb. 32B). Mit den Zellen des dritten Donors wurde der Bereich der kleineren Proteine mit einer Größe von ca. 8-5 kD (Fraktionsnummern 41-45) analysiert (Abb. 33). Bei der Gruppe 35-40 ergaben die 1:1 Verdünnung des Fraktionspaares 35/36 und die 1:2 Verdünnung des Paares 39/40 eine signifikante Wanderung. Bei den Fraktionspaaren 41/42, 43/44 und 45/46 wurden deutlich höhere Indizes, bei dem Fraktionspaar mit den kleinsten Proteinen (45/46) bis zu einem CI von 20, im Vergleich zu den Fraktionen 35-40 mit größeren Proteinen beobachtet. Insgesamt wiesen bei der Fraktionsgruppe 41-46 alle Verdünnungen signifikante Wanderungen auf. Die Werte des dritten Spenders waren die höchsten, die insgesamt in der vorliegenden Arbeit auftraten. Der Spender hatte ebenfalls sehr gut auf RANTES reagiert.



**Abb. 32 Chemotaxis auf mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-generierte Fraktionen.**

A) Chemotaxis gesorteter NK-Zellen von einem Spender auf größere Fraktionengruppen des *L. sigmodontis* Weibchen Extraktes (Fraktionsnummern 35-40 (ca. 25-9 kD), Fraktionsnummern 41-45 (ca. 8-5 kD), Transwell®Platten, je  $3 \times 10^5$  Zellen/Kammer, 1 Kammer/Ansatz. \* = CI signifikant > 2. Verdünnungsfaktor 1:1, 1:2 oder 1:4. B) Chemotaxis gesorteter NK-Zellen von einem zweiten Spender auf gepoolte Fraktionenpaare der Fraktionsnummern 35-40 des *L. sigmodontis* Weibchen Extraktes (25-9 kD) (AP48 Multikammer,  $8 \times 10^4$  Zellen/Kammer, 2 Kammern/Ansatz). \* = CI signifikant > 2. Verdünnungsfaktor 1:1, 1:2 oder 1:4.



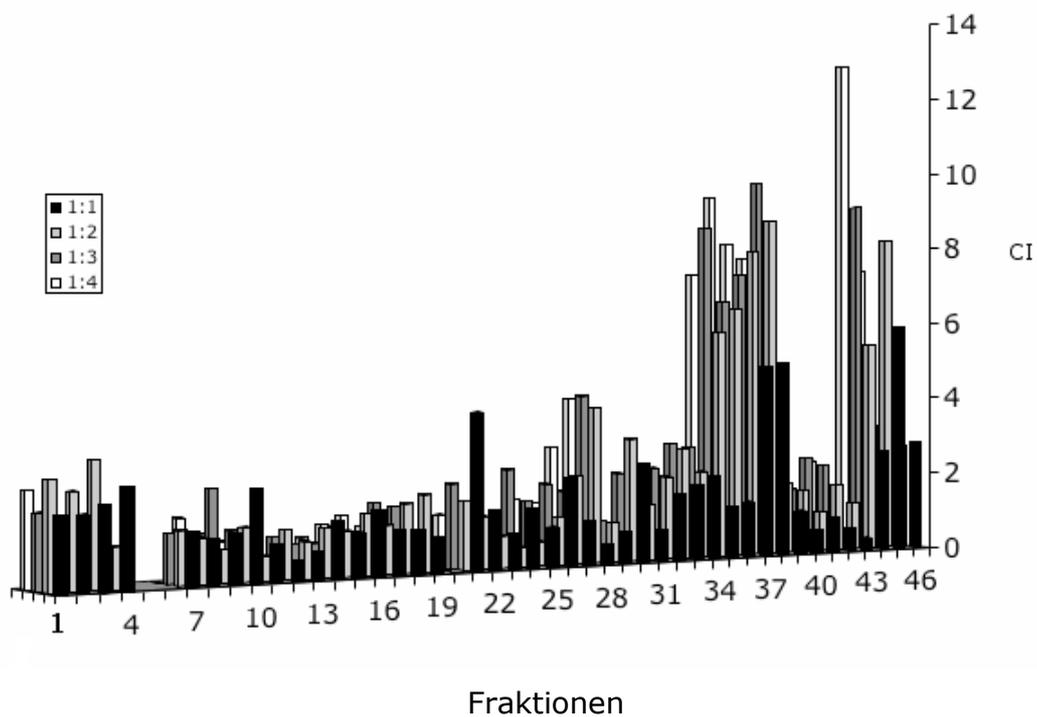
**Abb. 33 Chemotaxis auf mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-generierte Fraktionen.**

Chemotaxis gesorteter NK-Zellen von einem dritten Spender auf gepoolte Fraktionenpaare der Fraktionsnummern 41-46 des Weibchen Extraktes von *L. sigmodontis* mit niedrigem Molekulargewicht (Fraktion 41:  $\approx$  8 kD Fraktion 46:  $\approx$  5 kD). \* = CI signifikant  $>$  2. Verdünnungsfaktor 1:1, 1:2 oder 1:4.

Des Weiteren wurden von Prof. Jens-M. Schröder aus der Abteilung für Dermatologie der Universität Kiel 46 Weibchen LsE Fraktionen mittels *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) hinsichtlich ihrer Hydrophilie separiert (Anhang, S. 117-120).

Zur Analyse der chemotaktischen Wirkung der einzelnen Fraktionen wurden NKL-Zellen zur Vermeidung interindividueller Schwankungen verwendet. Es zeigten sich vor allem bei den höheren Fraktionsnummern, also bei den hydrophoben Extraktbestandteilen, die stärksten Wanderungen der NK-Zellen. Allerdings waren auch bei Fraktionen mit stärker hydrophilen Molekülen die Wanderungen teilweise signifikant (Fraktionsnummern 3,4 und 10, siehe Abb. 34), aber nicht durchgängig zwischen den Fraktionsnummern 11 und 20. Eine weiterführende Analyse der auffälligen Fraktionen zeigte in der von der

Arbeitsgruppe Schröder in Kiel durchgeführten ESI-MS Analyse in den Fraktionen 1-3 ein dominierendes Ion mit einer Größe von 9,8 kD, welches keine UV-Absorption zeigte.



**Abb. 34 Chemotaxis von NKL-Zellen auf RP-HPLC-isolierte Fraktionen des *L. sigmodontis* Weibchenextraktes.**

Benutzung der AP48 Mikroammer, je  $5 \times 10^4$  Zellen/Kammer, 2 Kammern/Ansatz. Verwendung von NKL-Aliquots eines NKL-Kultivierungsansatzes. CI auf der y-Achse. Zunehmende Hydrophobizität von links nach rechts.

### 3.5 Charakterisierung gewanderter NK-Zellen: Einfluss der Chemotaxis auf Aktivierung und Zytokinproduktion der primären NK-Zellen

#### 3.5.1 CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> Subpopulationen von NK-Zellen

Bei vier Spendern war es möglich nach der Aufreinigung der NK-Zellen die schwach CD56<sup>+</sup> (dim) und stark CD56<sup>+</sup> (bright) exprimierenden Untergruppen deutlich zu differenzieren. In einem Fall waren die prozentualen Anteile dieser beiden NK-Zelluntergruppen im Vergleich mit Angaben aus der Literatur vertauscht. Es lagen mehr CD56<sup>bright</sup> als CD56<sup>dim</sup> Zellen vor. Bei den anderen drei Fällen zeigte sich, dass in der Population mehr CD56<sup>dim</sup> als CD56<sup>bright</sup> Zellen vorkamen. Nach der Migration im Chemotaxis-Assay näherten sich die Anteile der Untergruppen auf jeweils ca. 50% an, unabhängig von der Art des Chemotaxins. Es wanderten relativ gesehen die CD56<sup>bright</sup> Zellen stärker als CD56<sup>dim</sup> Zellen (Abb. 35 und 36). Dies wird vor allem durch die Verdoppelung des Anteils der CD56<sup>bright</sup> Zellen von ca. 20% auf 40-50% in Abb. 36 verdeutlicht. Die Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nahm hingegen ab. Bezogen auf die absoluten Zahlen wanderten beide Subpopulationen im Vergleich zu Medium deutlich (Tab. 4).

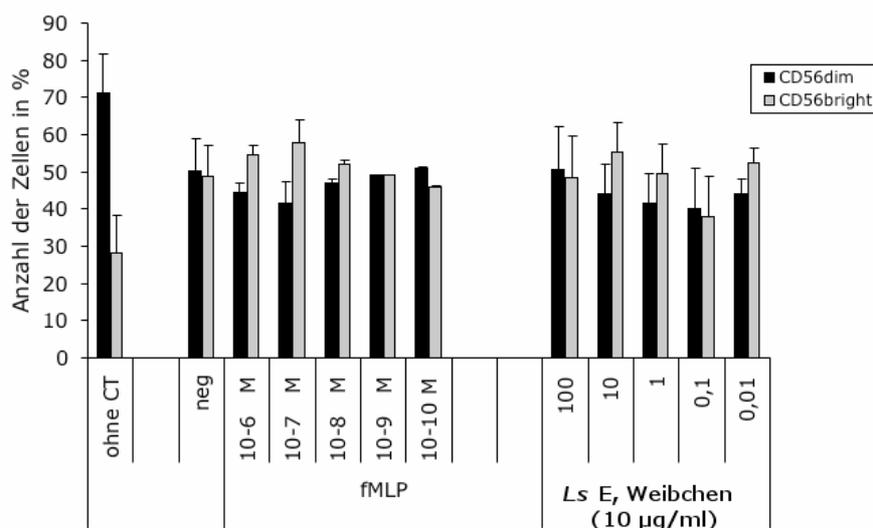


Abb. 35 Prozentualer Anteil der CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subpopulationen vor und nach Chemotaxis auf Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LSE). Mittelwerte + Standardfehler.

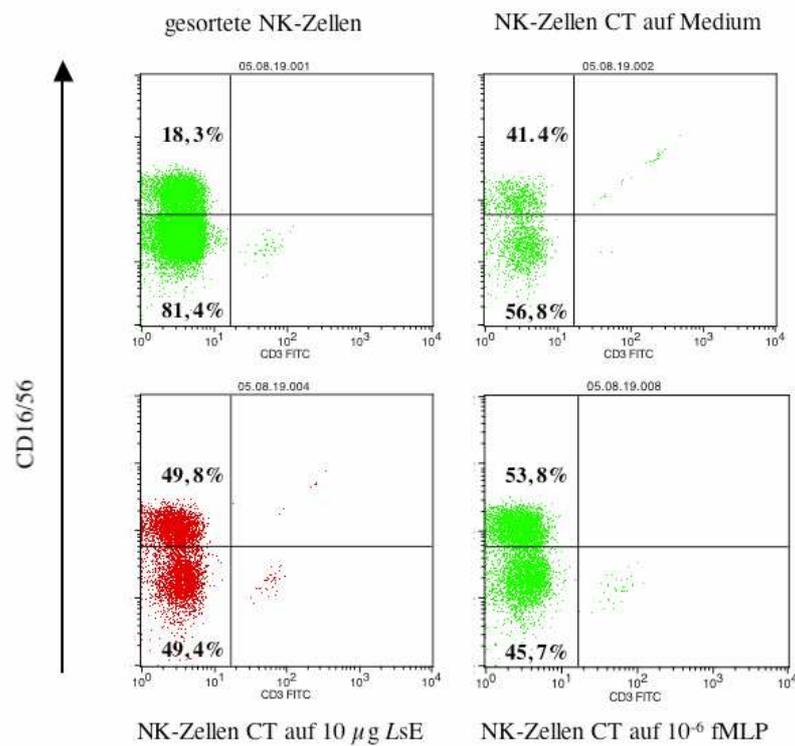


Abb. 36 Verschiebung der  $CD56^{\text{dim}}$  und  $CD56^{\text{bright}}$  NK-Zellsubpopulationen nach Chemotaxis im Vergleich zu den Frequenzen vor der Chemotaxis.

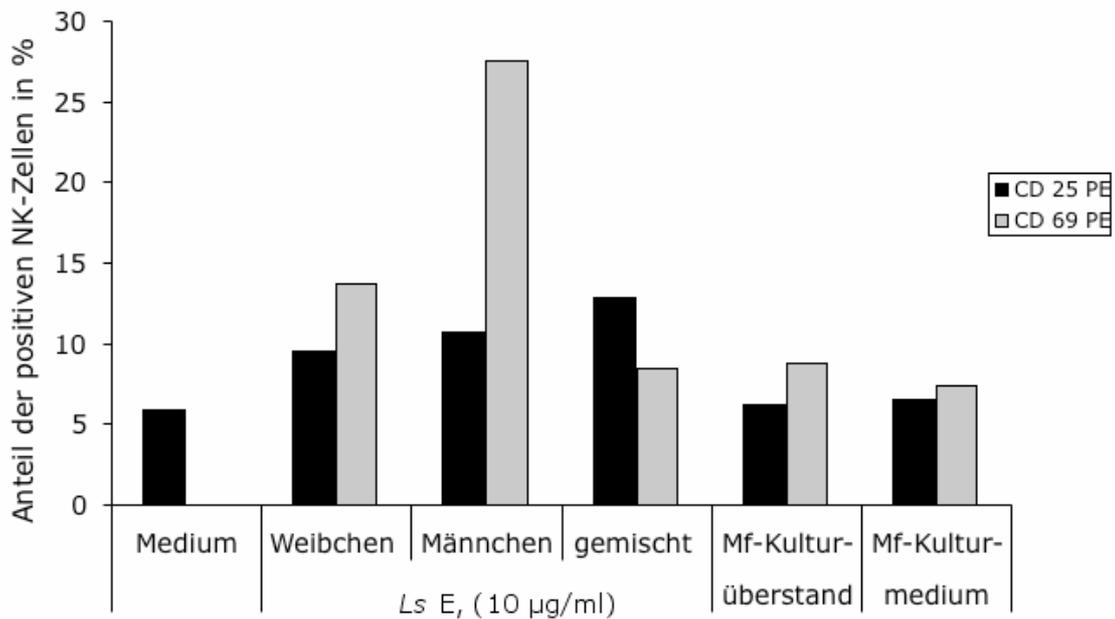
Tab. 4 Repräsentativer Vergleich der gewanderten absoluten Gesamtzellzahl der beiden Subpopulationen eines Spenders.

	$CD56^{\text{dim}}$	$CD56^{\text{bright}}$
Medium	783	570
FMLP	2511	2956
LsE, Weibchen 10 µg/ml	3168	3193

### **3.5.2 Aktivierungsmarker CD69 und CD25**

Zunächst wurde untersucht, ob der Wurmextrakt direkt NK-Zellen stimulieren kann, unabhängig von ihrer Migration. Naive humane NK-Zellen, die durch immunomagnetische Separation aufgereinigt wurden, wurden direkt anschließend für 1 h 15 min im regulären Komplettpuffer für Chemotaxis mit Wurmextrakt und Mikrofilarienüberstand inkubiert. Nach anschließender FACS-Färbung des als frühen Aktivierungsmarker geltenden Oberflächenproteins CD69 und dem späten Aktivierungsmarker CD25, zeigte sich deutlich eine Hochregulierung der Aktivierungsmarker nach Inkubation mit Wurmextrakten im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 37).

Um die aktivierende Wirkung des Mikrofilarienkulturüberstandes beurteilen zu können, wurde die gemessene Expression in Relation zum Effekt des Mikrofilarienkulturmediums gesetzt. Es wurde deutlich, dass der Überstand der Mikrofilarienkultur ähnlich wie das Kultivierungsmedium der Mikrofilarien und KP die NK-Zellen dieses Spenders aktivierte, wohin gegen LsE die Expression sowohl des frühen Aktivierungsmarker CD69 als auch von CD25 stärker stimuliert. Dabei wurde die stärkste Expression von CD69 auf 25% aller NK-Zellen nach Stimulation mit männlichem Extrakt beobachtet.

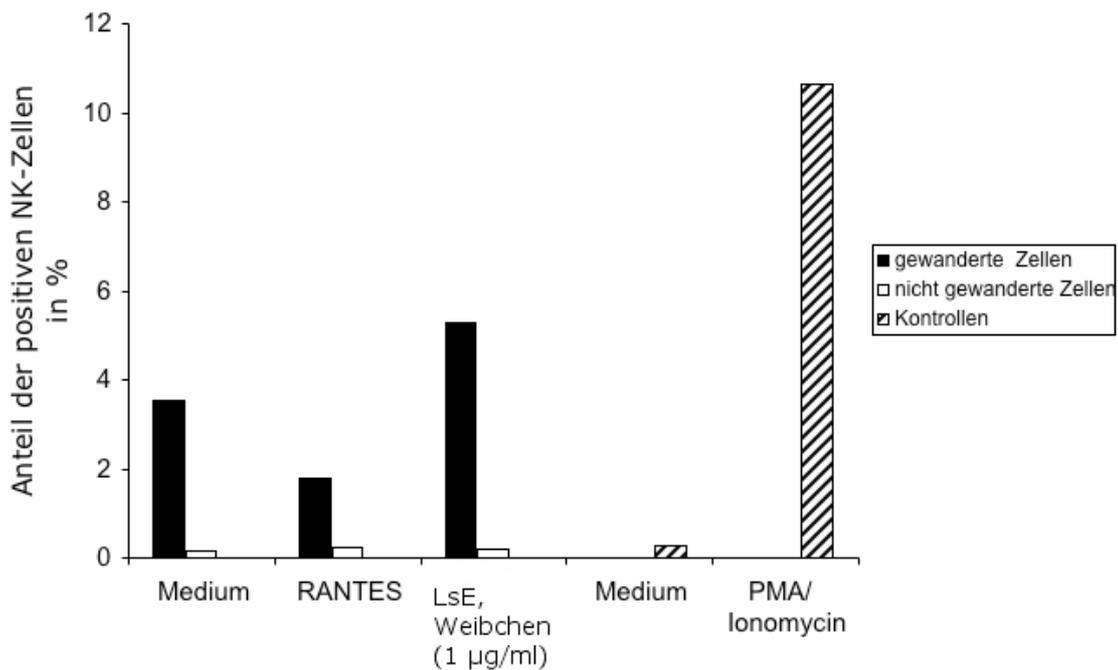


**Abb. 37 Analyse der CD69 und CD25 Expression auf MACS-isolierten primären humanen NK-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit Wurmextrakten (10 µg/ml) und Mikrofilarien(Mf)-Kulturüberstand.**

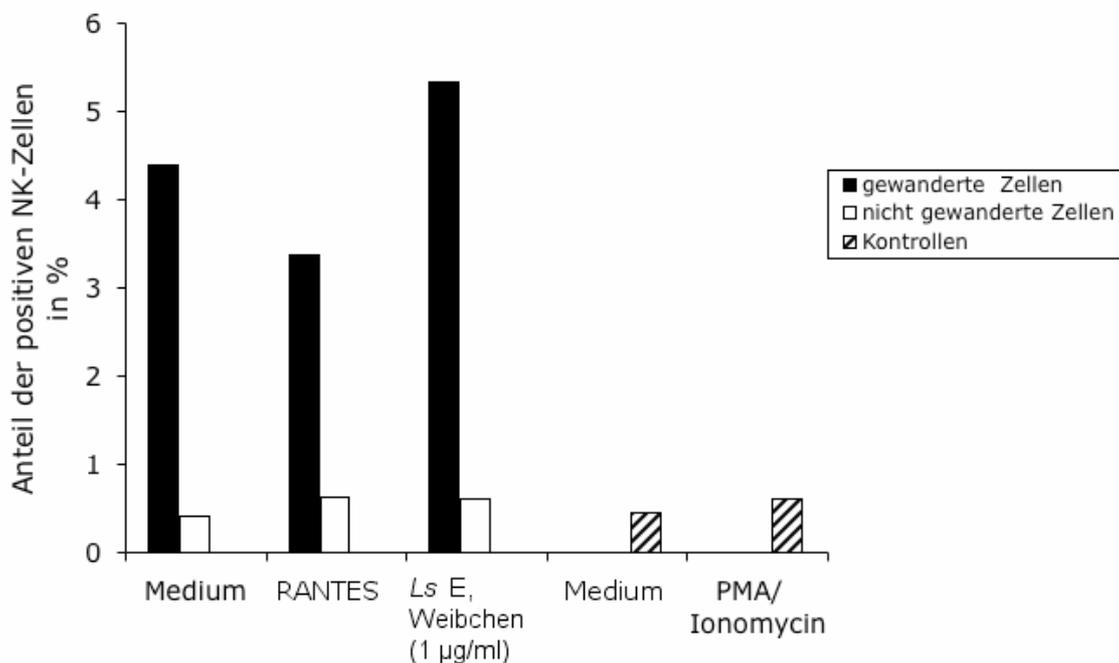
Zellen in KP-Medium und glucosehaltigem Mikrofilarien (Mf)-Kulturmedium als unstimulierte Zellen zum Vergleich.

Als zweiter Schritt wurde untersucht, ob die Wanderung auf Extrakt die NK-Zellen aktiviert. Hierbei wurden die NK-Zellen erst nach Inkubation der PBMC über Nacht in Vollmedium mittels immunomagnetischer Zellseparation aufgereinigt. Nach Chemotaxis exprimierten NK-Zellen, die durch die Filter gewandert waren, vermehrt CD69 und CD25 und waren somit aktivierter als Zellen, die nach der Chemotaxis noch in der oberen Kammer verblieben waren. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um LsE, RANTES oder Medium in der unteren Kammer handelte (Abb. 38A und B). Es zeigte sich auch, dass die Zellen, die auf LsE gewandert waren, die höchste Expression von Aktivierungsmarkern zeigten im Vergleich zu Medium und der Positivkontrolle (Abb. 38A). Dies wird sowohl für CD69 als auch für CD25 deutlich (Abb. 38B). Die Stimulation mit PMA/Ionomycin erwies sich im Fall von CD69 als deutlich stärkstes Stimulanz, jedoch nicht bei CD25.

A



B



**Abb. 38** Expressierung der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 von primären NK-Zellen nach Chemotaxis.

A) Mehr gewanderte NK-Zellen exprimierten den frühen Aktivierungsmarker CD69 als nicht gewanderte NK-Zellen. B) Mehr gewanderte NK-Zellen exprimierten den späten Aktivierungsmarker CD25 als nicht gewanderte NK-Zellen. Chemotaxis in AP48 Mikrokammer (drei Kammern/Ansatz).

Bei einer Aufschlüsselung der Expression der Aktivierungsmarker nach CD56<sup>+</sup> NK-Subgruppen zeigt sich in der FACS-Graphik, dass vor allem CD56<sup>dim</sup> Zellen Aktivierungsmarker nach CT ausbilden (Abb. 39). In der Graphik ist CD56-APC gegen CD25-PE und CD69-PE aufgetragen. Es wird deutlich, dass sowohl auf RANTES als auch auf LsE mehr Zellen gewandert sind als gegen Medium und dass die Zellen, die zur CD56<sup>dim</sup> Untergruppe gehören, CD25-PE und CD69-PE positiv sind. Weiterhin wird deutlich, dass nach Migration mehr Zellen CD25/CD69 positiv sind.

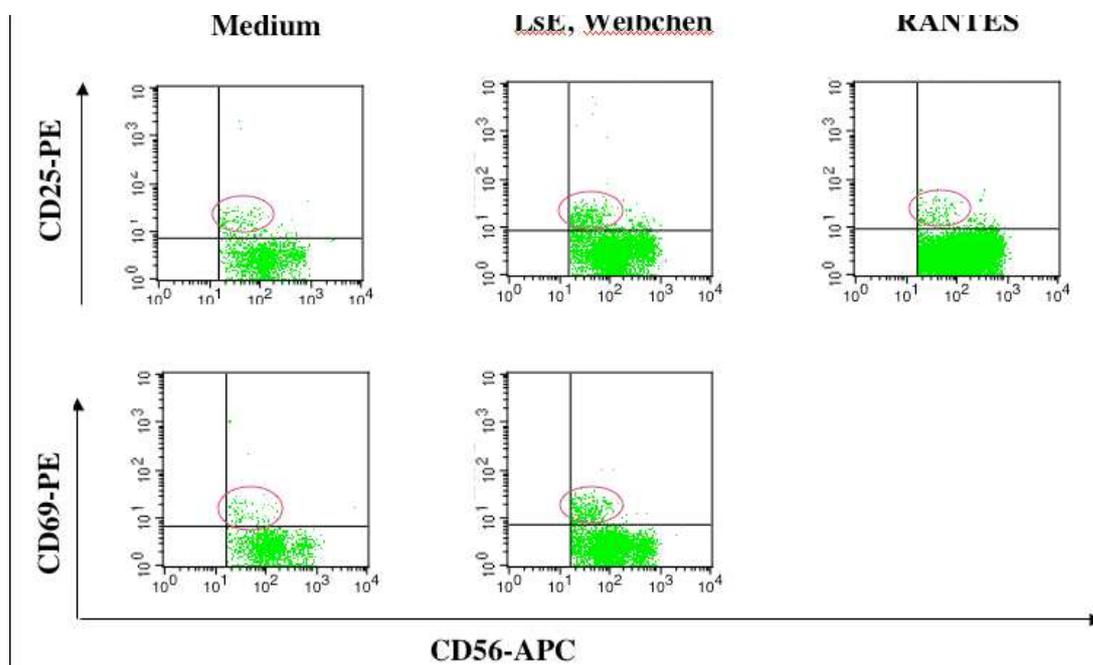
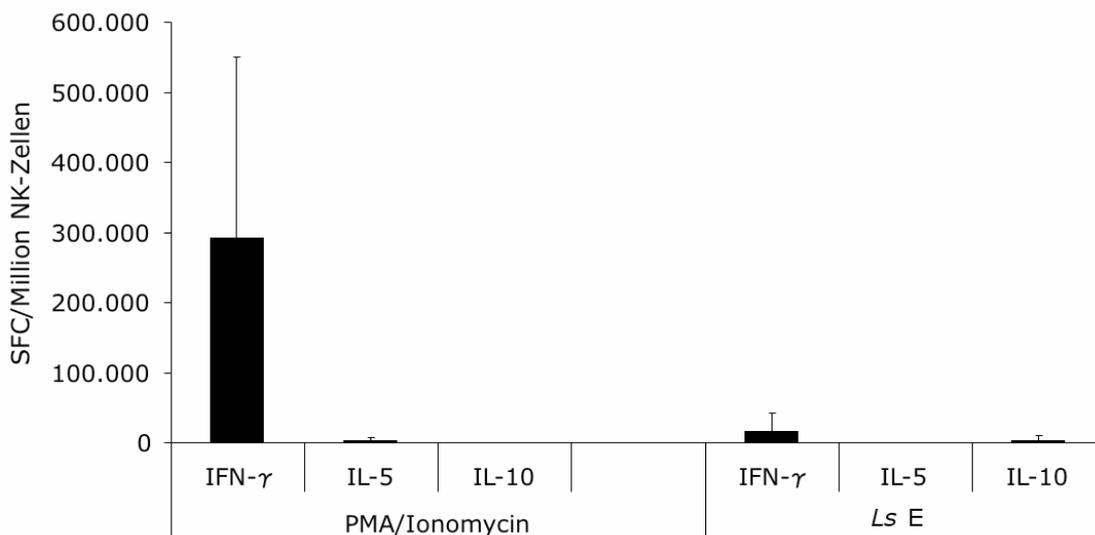


Abb. 39 Hauptsächlich CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimieren Aktivierungsmarker nach Chemotaxis. FACS-Analyse von einem repräsentativen Spender.

### 3.5.3 Zytokinantwort naiver primärer NK-Zellen

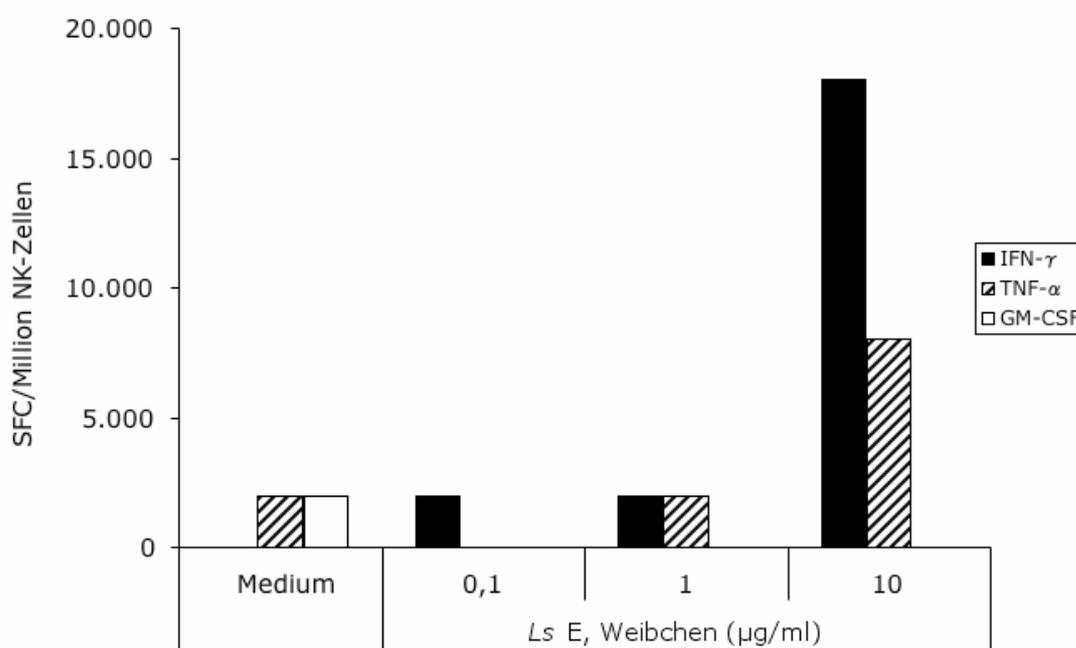
Für die Analyse der Zytokinproduktion von NK-Zellen wurde der ELISPOT-Assay ausgewählt, da er sensitiver als die intrazelluläre FACS-Analyse ist und sich damit für die Analyse kleiner Zellzahlen wie nach CT eignet. Zuerst wurde in ELISPOT-Versuchen die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , GM-CSF und TNF- $\alpha$ , sowie IL-5 und IL-10 von primären über FACS-Sorten aufgereinigte NK-Zellen nach Stimulation mit *L. sigmodontis* Extrakt ohne CT untersucht. Aufgereinigte naive NK-Zellen zeigten auf eine *in vitro* Stimulation mit Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt eine Produktion von IFN- $\gamma$ . (Abb. 40). Dieser Wert lag unter der deutlichen Reaktion auf die Positivkontrolle mit PMA/Ionomycin, machte aber 2,15% der NK-Zellen aus. In diesem Versuch wurde nur eine LsE-Konzentration (1  $\mu$ g/ml) getestet.



**Abb. 40** T<sub>H1</sub>-Zytokinantwort von naiven primären FACS-gesorteten NK-Zellen auf eine *in vitro* Stimulation mit Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LsE), 1  $\mu$ g/ml oder PMA/Ionomycin. ELISPOT-Assay über 24 h.

In einem weiteren Versuch mit NK-Zellen eines anderen Spenders zeigte sich eine spontane GM-CSF und TNF- $\alpha$  Produktion von primären NK-Zellen auf

Medium (Abb. 41). Eine IFN- $\gamma$  Produktion konnte auf alleinige Stimulation mit Medium hier nicht nachgewiesen werden. Auf drei verschiedene Extraktkonzentrationen (0,1, 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) konnte hingegen eine deutliche IFN- $\gamma$  Sekretion von max. 18.000 SFC/Million NK-Zellen auf 10  $\mu\text{g/ml}$  nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Anzahl TNF- $\alpha$  produzierender NK-Zellen bei Medium verdreifachte sich die Zahl der TNF- $\alpha$  sekretierenden Zellen bei einer Extraktkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  auf 8.000 SFC/Million NK-Zellen. Eine Stimulation zur GM-CSF Produktion durch LsE ließ sich nicht nachweisen.

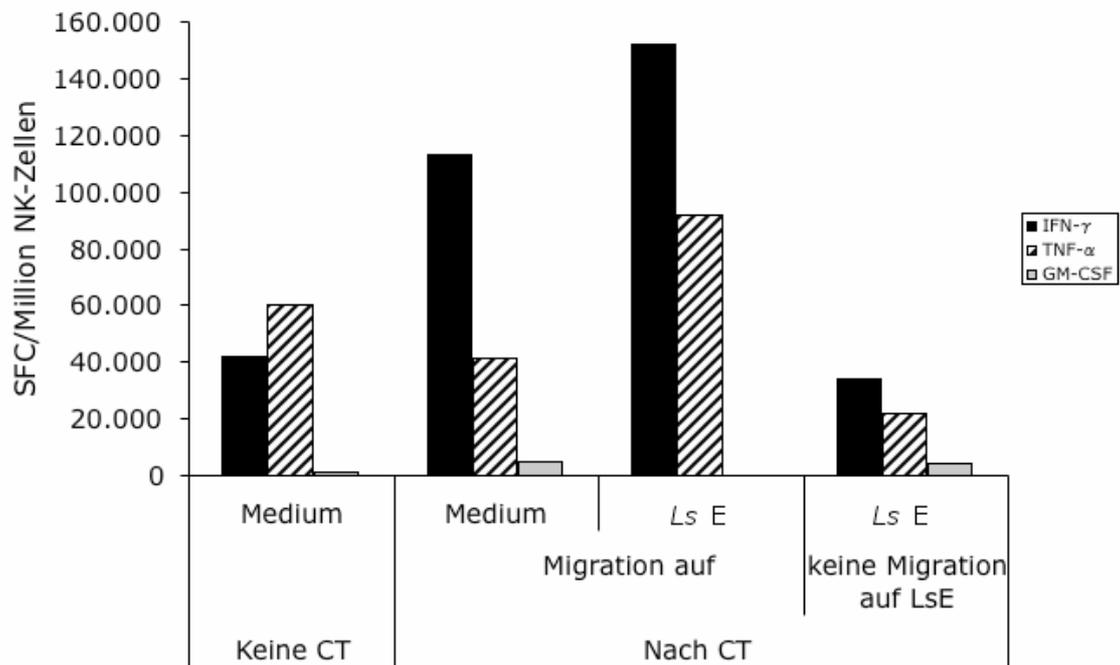


**Abb. 41** Naive primäre FACS-gesortete NK-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach *in vitro* Stimulation mit Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LsE). ELISPOT-Assay über 24 h.

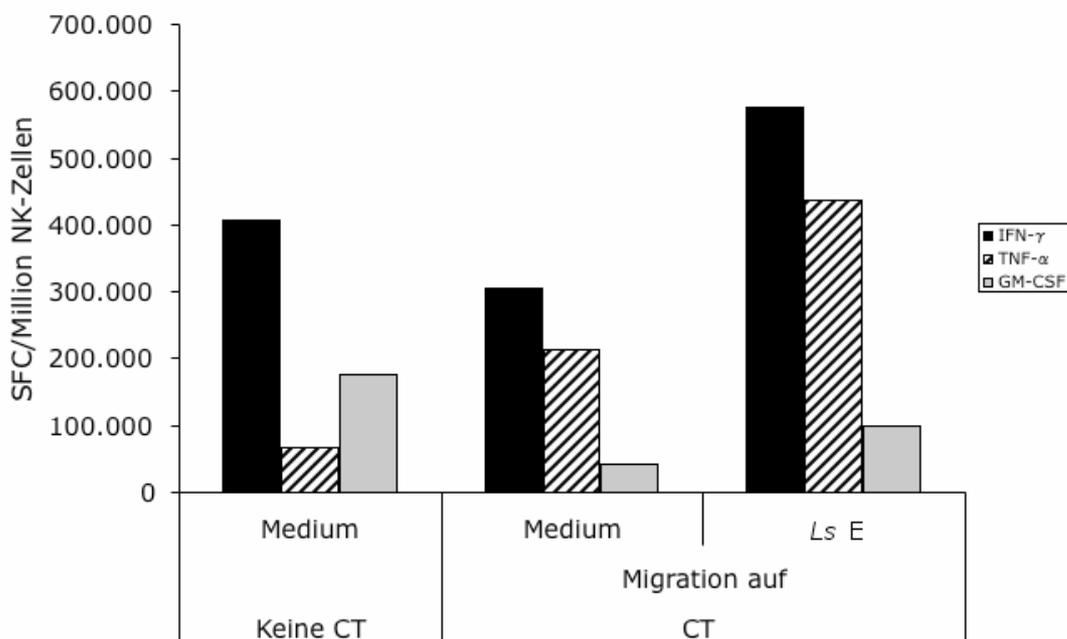
In drei fortführenden Versuchen wurde die Zytokinproduktion von naiven, gesorteten NK-Zellen von drei verschiedenen Spendern in Abhängigkeit von ihrer chemotaktischen Aktivität untersucht. Bei diesem Versuchsaufbau wurde die Zytokinproduktion von NK-Zellen vor und nach Chemotaxis verglichen. Dabei wurden in zwei ersten Versuchen die gewanderten und nicht gewanderten Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert (Abb. 42). Es zeigten sich, ähnlich wie bei vorherigen Versuchen, deutliche Unterschiede zwischen den

beiden Spendern. Für die NK-Zellen des ersten Spenders zeigte sich bei den Kontrollzellen in Medium eine PMA/Ionomycin stimulierte IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion der NK-Zellen. Die IFN- $\gamma$  Freisetzung erhöhte sich bei den auf Medium und mehr noch auf LsE gewanderten Zellen aus der Chemotaxis (Abb. 42A). Für TNF- $\alpha$  war diese Erhöhung ebenfalls auf LsE, aber nicht bei den auf Medium migrierten Zellen zu sehen. Damit stieg die Freisetzung von TNF- $\alpha$  bei den NK-Zellen aus der Chemotaxis im Verhältnis zu denen, die nicht in einer Chemotaxis verwendet wurden, deutlich an. Die NK-Zellen des zweiten Spenders zeigten nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin insgesamt höhere absolute Anzahlen von zytokinproduzierenden NK-Zellen (max. 157.000 SFC/Million NK-Zellen versus max. 575.000 SFC/Million NK-Zellen) (Abb. 42B). Auch hier war die Anzahl der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  freisetzenden Zellen, die bereits auf Extrakt gewandert waren, höher als bei den naiven Zellen und den auf Medium gewanderten Zellen. Die relative Steigerung der Zytokinfreisetzung war hier am stärksten bei TNF- $\alpha$  und bei IFN- $\gamma$  geringer, bei einem Anstieg von 100.000-200.000 Zellen noch stärker als bei dem ersten Spender. Die GM-CSF Produktion lag beim zweiten Spender etwas höher als beim ersten, verringerte sich aber durch Migration. Zusammenfassend ergab sich bei beiden Spendern im Chemotaxisversuch sowie bei alleiniger Stimulation mit Wurmextrakt eine Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als Reaktion auf Wurmmoleküle, die durch Wanderung anstieg.

A



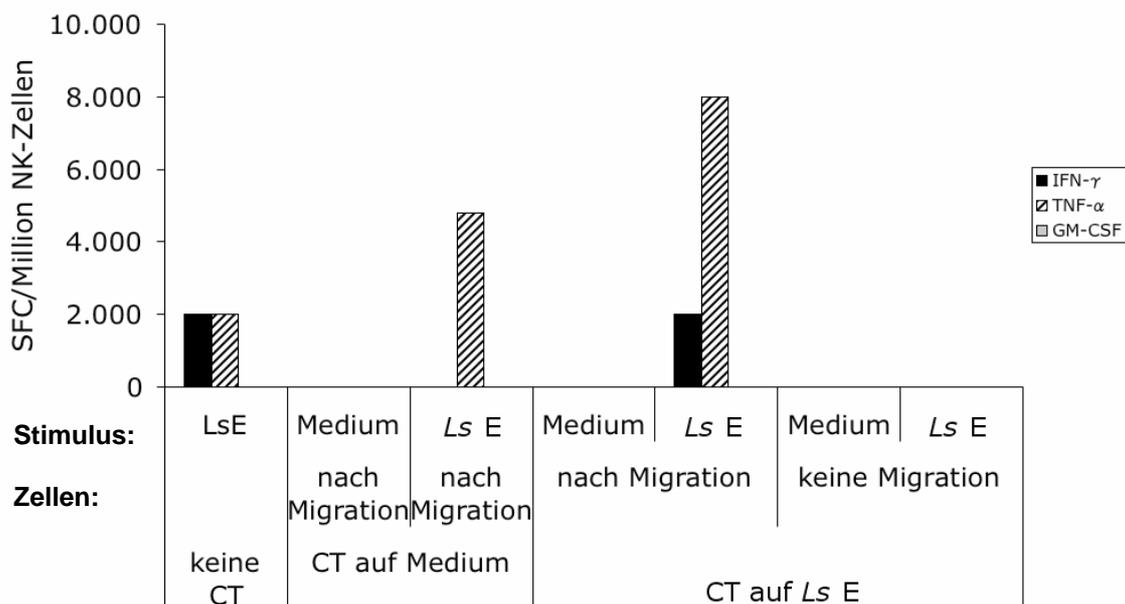
B



**Abb. 42 Zytokinproduktion von primären NK-Zellen nach Chemotaxis.**

Nach Migration auf Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LsE) (1  $\mu\text{g/ml}$ ) steigt die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion der naiven primären FACS-gesorteten NK-Zellen auf Stimulation mit PMA/Ionomycin im ELISPOT-Assay an. A) Spender 1. B) Spender 2.

Abschließend wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die gewanderten und nicht gewanderten Zellen mit 10 µg/ml von *L. sigmodontis* Extrakt restimuliert oder mit Medium inkubiert wurden (Abb. 43). Es zeigte sich bei der Stimulation der naiven NK-Zellen mit Extrakt eine Produktion von IFN-γ und TNF-α. Im Vergleich zu dieser Erststimulation ohne Chemotaxis zeigte sich nach Migration auf Medium mit LsE-Restimulation eine Steigerung der TNF-α Produktion, die bei auf LsE gewanderten NK-Zellen noch höher lag. Dies traf aber nicht auf IFN-γ oder GM-CSF zu. Bei IFN-γ blieb die Anzahl der Zytokinproduzenten auf Restimulation bei den gewanderten Zellen im Vergleich zur Stimulation ohne CT gleich. GM-CSF konnte bei diesem Spender nicht nachgewiesen werden. Bei naiven NK-Zellen, die erstmalig mit Extrakt stimuliert wurden, ergaben sich bei diesem Spender jeweils 2.000 SFC/Million NK-Zellen für IFN-γ und TNF-α Zellen, die auf Medium gewandert waren und anschließend mit LsE stimuliert wurden, produzierten vermehrt TNF-α.



**Abb. 43 Zytokinproduktion von NK-Zellen nach Chemotaxis.**

Nach Migration auf Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt (LsE) (1 µg/ml) und Medium steigt die TNF-α Produktion der naiven primären FACS-gesorteten NK-Zellen auf Restimulation mit LsE (10 µg/ml) an. Stimulation über 24 h. CT in Transwell®Platten durchgeführt. Nicht gewanderte Zellen aus der oberen Kammer wurden von den gewanderten Zellen aus der unteren Kammer getrennt analysiert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodenkritik

Die vorliegende Arbeit beleuchtet das bisher wenig untersuchte Wanderungsverhalten, die chemotaktische Aktivität, von NK-Zellen auf Parasiten im Allgemeinen und NK-Zellen auf den Fadenwurm *L. sigmodontis* im Besonderen.

Im Gegensatz zu den meisten Veröffentlichungen über NK-Zellen wurden hier die NK-Zellen *ex vivo* untersucht und nicht kultiviert. In wieweit sich dies auf die Varianz der Rezeptorexpression auf den NK-Zellen und ihre Chemotaxis auswirkt, ist nicht untersucht worden. In der Kultivierung von NK-Zellen benötigtes IL-2 aktiviert NK-Zellen und bewirkt eine Entwicklung zu Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK). Aktivierte NK-Zellen zeigen eine höhere Hintergrundwanderung in der Chemotaxis als nicht aktivierte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher weitgehend mit frisch isolierten NK-Zellen gearbeitet, um den alleinigen Effekt der Wurmmoleküle zu untersuchen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden für die Chemotaxis Membranen mit der Porengröße 5 µm verwendet. Dies ist zusammen mit 8 µm die übliche in Veröffentlichungen über Chemotaxis von NK-Zellen verwendete Porengröße (Sebok et al., 1993; Chen et al., 2007; Berahovich et al., 2006). In nicht dargestellten Versuchen zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden Filter mit der Porengröße 3 µm und 8 µm eingesetzt. Die 8 µm Porengröße erhöhte den unspezifischen Hintergrund. Die 3 µm Porengröße sollte in Bezug auf einen zu großen Einfluss der Schwerkraft auf die NK-Zellen zu eindeutigeren Versuchsergebnissen führen, da für die 7-10 µm großen Zellen bei kleineren Porengrößen ein durch die Schwerkraft bedingtes passieren erschwert und die Hintergrundwanderung minimiert wird. Es zeigte sich auch, dass der Hintergrund geringer wurde, aber die gewanderte Anzahl der NK-Zellen auf Chemokine ebenso auf ein nicht auswertbares Maß reduziert wurde. Daher wurde die 5 µm Porengröße gewählt.

Bei den einzelnen Versuchen wurden drei verschiedene Chemotaxiskammersysteme verwendet. Die Systeme wurden jedoch nicht bei einzelnen Wiederholungsexperimenten getauscht, sondern um eine optimale Versuchsdurchführung bei den einzelnen Fragestellungen zu gewährleisten. Es wurden die Boyden-Kammer und die AP48 Mikrokammer als mehrfach verwendbare Kammern und das Transwellsystem als einmal verwendbares Produkt verwendet. Die Transwell®-Platten waren aufgrund des Einmalsystems das sterilste System und somit bei Arbeiten unter der Sterilbank frei von Kontaminationen. Dieses System wurde aufgrund des größeren Chemotaxinvolumens und aus Kostengründen auf einige wenige Versuche beschränkt. Sowohl die Boyden-Kammern als auch die Mikrokammer wurden zwischen den einzelnen Versuchen gründlich chemisch gereinigt. Eine mögliche Kontamination kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, was die Bedeutung der Negativ- und Positivkontrollen in allen Versuchen unterstreicht. Die Mikrokammer hat im Vergleich zu der Boyden-Kammer den Vorteil, mit der gleichen Anzahl an NK-Zellen schneller und mehr Proben auf einmal analysieren zu können und ist somit von allen Systemen am besten für die Analyse von Fraktionen geeignet. Neben der möglichen Kontamination haben diese beiden Systeme aber den Nachteil in der Handhabung komplexer und somit störanfälliger zu sein. So ist die Filterplatzierung fragiler und diffiziler, als bei den industriell vorgefertigten Transwell®-Platten. Mittels Routine konnten Fehler bei der Filterplatzierung minimiert, aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Als Medium für die NK-Zellen und als Lösung für die Chemokine wurde eine BSA-haltige Lösung verwendet. BSA ist im Vergleich zu FCS reiner. Somit wurde eine Zellaktivierung und Chemotaxis durch Moleküle im FCS vermieden (Schröder, 2001).

Bei den Chemotaxis-Assays wurden verschiedene Positivkontrollen verwendet. Zum einen wurde fMLP eingesetzt, da es ein Bestandteil bakterieller Membranen ist und Endobakterien in *L. sigmodontis* vorhanden sind. Zu Beginn wurde in einigen Experimenten wahlweise RANTES statt fMLP verwendet, welches an eine Reihe von Rezeptoren bindet, aber nur von der Minderheit der

Spender-NK-Zellen erkannt wurde. Dieses Vorgehen wurde nötig, da sich zeigte, dass NK-Zellen spenderabhängig gut oder schlecht auf die Positivkontrollen RANTES und fMLP reagierten (Abb. 19 und 20). In Untersuchungen, die sich mit der Interaktion von Chemokinen und NK-Zellen beschäftigten, zeigten sich unter anderem große Differenzen bezüglich der chemotaktischen Wirkung der Chemokine auf NK-Zellen (Robertson, 2002). In den Studien, die in Robertsons Metaanalyse dargestellt wurden, wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt. Teilweise wurden aktivierte und nicht aktivierte NK-Zellen, mit antigenpräsentierenden Zellen und mit Interleukinen inkubierte NK-Zellen oder reine NK-Zellen verwendet, so dass keine homogene Datenlage vorliegt. Aus der Studie von Robertson und der Arbeit von Berahovich et al. (2006) geht neben RANTES auch SDF1-alpha als weitere potentielle Positivkontrolle für einen Teil der Donoren hervor. Diese wurde aber für diese Arbeit nicht verwendet, weil neben fMLP nicht genügend Zellen pro Donor für alle Kontrollen zur Verfügung standen, und auch SDF-1alpha nicht, wie Folgestudien zu dieser Arbeit zeigten, verlässlich bei allen Donoren wirkte.

Zur Angleichung der Versuchsbedingungen *in vitro* an die Situation *in vivo* wurde in einem Versuch die Membran mit Fibronectin beschichtet, welches ein Bestandteil des Endothels ist. Von Fibronectin ist bekannt, dass NK-Zellen über die  $\alpha 4\beta 1$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine an Fibronectin adhären. Außerdem führt Fibronectin zu einer Erhöhung der zytotoxischen Aktivität (Palmieri et al., 1995). Fibronectin selbst wirkt somit auf NK-Zellen aktivierend. Eine Beschichtung der Membran führte zu einer Erhöhung der Zellzahlen im unteren Kompartiment. Dies war allerdings auch bei der Hintergrundwanderung auf Medium der Fall. Hierbei ergaben sich sogar noch höhere absolute Zellzahlen. Dies weist darauf hin, dass Fibronectin allein die NK-Zellen aktivierte und dies zu einer erhöhten chemokinetischen Aktivität führte. Daraus wird deutlich, dass eine Aktivierung NK-Zellen zur Migration anregt. Wir verzichteten daher auf dieses Protein oder andere Matrixproteine, wie auch in der Literatur für Migrationsexperimente in der Mehrzahl keine Behandlung der Membranen durchgeführt wird.

## 4.2 Chemotaxis von naiven primären humanen NK-Zellen

### 4.2.1 Chemotaxis auf lebende Mikrofilarien und Kulturüberstände von Mikrofilarien von *L. sigmodontis*

Zandbergen et al. (2002) konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten direkt durch einen Granulozyten-Chemotaktischen-Faktor von lebenden Leishmanien in Kultur angezogen werden, wohingegen NK-Zellen dabei durch die Inhibierung des  $\gamma$ -Interferon-induzierenden Proteins (IP-10), welches als Chemokin und Aktivator von NK-Zellen bekannt ist (Gasperini et al., 1999), geblockt werden. Es gestaltete sich in der vorliegenden Arbeit schwierig zu zeigen, dass NK-Zellen auf lebende Mikrofilarien reagieren, da die Chemotaxisversuche auf lebende Mikrofilarien unter der Annahme, dass die chemotaktisch wirkenden Moleküle erst sekretiert werden müssen, über einen Zeitraum bis zu 48 h durchgeführt wurden und die Zellen nach 24 h nicht mehr homogen vital wirkten. Insgesamt waren die Ergebnisse nicht überzeugend, da nur geringgradige Werte über 2 erreicht wurden (Abb. 22). Adulte Filarien konnten aufgrund ihrer Größe (2-12  $\mu$ m) nicht eingesetzt werden. Im Nachhinein könnte ein Vorschlag sein, die Mikrofilarien in der Transwellplatte vorzuinkubieren und dann die Einsätze mit Zellen zu bestücken. Die Chemotaxisversuche auf Kulturüberstände hingegen waren überzeugend (Abb. 23). Bei diesen ist jedoch zu beachten, dass durch das Aufreinigungsverfahren bedingt Zellverunreinigungen aus der Pleurahöhle im Kulturmedium vorhanden sein könnten. Es ist somit zu diskutieren, ob die Reaktion der NK-Zellen durch diese beeinflusst war.

### 4.2.2 Chemotaxis mit Extrakt von homogenisierten *L. sigmodontis*

Es wurde bei allen untersuchten Donoren eine signifikante Chemotaxis von isolierten NK-Zellen auf Weibchenextrakt von *L. sigmodontis* beobachtet (Abb. 25 und 26). Damit lag der Anteil höher als bei den Positivkontrollen RANTES und fMLP und anderen in der Literatur beschriebenen Chemokinen (Robertson, 2002). Diese Ergebnisse sprechen erstens dafür, dass Wurmoleküle

chemotaktisch wirken können, und zweitens, dass sie Rezeptoren auf NK-Zellen ansprechen, die von allen Donoren exprimiert werden. Somit kann die Wanderung von NK-Zellen an den Ort der Filarieninfektion im Menschen, bei der Maus in die Pleurahöhle (Korten et al., 2005), direkt über Wurmoleküle ausgelöst werden.

Insgesamt ist aber über alle Versuche hinweg zu beobachten gewesen, dass die NK-Zellen in Bezug auf die Höhe der chemotaktischen Indizes und die Konzentrationen des weiblichen Wurmextraktes sehr variabel von Donor zu Donor reagierten. Dies könnte man dadurch erklären, dass es sich bei den NK-Zellen um eine Zellpopulation handelt, die, wie in der Einleitung erwähnt, konstitutiv von Mensch zu Mensch verschieden ist und auf viele Einflüsse, wie Infektionen und Stress reagiert. Es ergeben sich viele sowohl interindividuelle als auch intraindividuelle Unterschiede der NK-Zell-Populationen. Dies spiegelt sich nicht nur in dem sehr variablen prozentualen Anteil von NK-Zellen an der Gesamtzahl der PBMC wieder, sondern auch in der unterschiedlichen Anzahl von aktivierten NK-Zellen im peripheren Blutsystem bei gesunden Probanden (Bisset et al., 2004). Die Spannweite des Anteils der NK-Zellen an Leukozyten beträgt laut Literatur 5-30% (Robertson & Ritz, 1990; Moretta et al., 2002; Bisset et al., 2004). In unseren Proben konnten Schwankungen von 3-15% nachgewiesen werden, wobei der Mittelwert bei 8,6% lag. Die Werte sind mit denen aus der Literatur übereinstimmend. Um Einflüsse durch Viren zu vermeiden, wurden nur buffy coats von Blutspendern verwendet, die CMV negativ waren. Andere Viren, wie z.B. Rhinoviren und andere Erreger, auch Bakterien, welche NK-Zellen aktivieren könnten, konnten nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigte sich im Mittel nur bei mittleren und hohen Verdünnungen, somit bei geringeren Konzentrationen der Wurmextrakte eine signifikante Wanderung. Dies entspricht dem aktuellen Verständnis von Chemokinen, die ihre Wirkung erst im nano- und picomolaren Bereich entfalten (Berahovich et al., 2006).

### 4.2.3 Wirkung von Pertussistoxin auf die NK-Zell Wanderung

Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass Pertussistoxin in der Lage ist, die chemotaktische Wirkung von fMLP und IL-2 auf NK-Zellen zu unterbinden (Whalen et al., 1992). Dies bedeutet, dass diese beiden Moleküle an G-Proteine binden und dadurch eine Signalkaskade in den NK-Zellen aktiviert wird, die eine Chemotaxis bewirkt. Da PTX auch in der vorliegenden Arbeit (Abb. 27) in der Lage war, die Migration auf Wurmextrakt und Mikrofilarien zu unterbinden, ist zu vermuten, dass Moleküle, die die Migration bewirkten, über G-Proteine auf die NK-Zelle wirken. Insgesamt waren die NK-Zellen nach der Behandlung mit PTX mikroskopisch jedoch nicht so vital wie die unbehandelten Zellen. Eine geringere Chemotaxis könnte somit nicht nur auf einer Blockierung der Signalwege beruhen, sondern auch an dem zusätzlichen Stress, dem die Zellen durch die Behandlung mit PTX ausgesetzt waren. Eine spezifischere Blockade und Analyse einzelner Chemokinrezeptoren vor Chemotaxis mit Wurmextrakt, wie zum Beispiel mittels monoklonaler Antikörper möglich, war nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, sondern eine weitere Feinanalyse der Komponenten des Extraktes wie im Folgenden ausgeführt.

### 4.2.4 Checkerboardanalyse

In Tabelle 3 wird dargestellt, dass *L. sigmodontis* Extrakt vorrangig eine chemotaktische Aktivität hat und nur eine geringe chemokinetische. Bereits 1998 konnte für Neutrophile in Bezug auf Extrakt von *O. volvulus* eine ähnliche Beobachtung gemacht werden (Rubio de Krömer et al., 1998). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird diskutiert, dass Chemotaxis und Chemokinese keine zwei von einander getrennt zu bewertenden Phänomene darstellen.

#### 4.2.5 Einfluss der Endobakterien auf die Chemotaxis

Zur näheren Bestimmung des chemotaktischen Moleküls wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob dieses aus den Endobakterien oder den Filarien selbst stammt. Nach Doxycyclinbehandlung der Mäuse während der Infektionsphase, in der das adulte Wurmstadium vorlag, wurde keine signifikante Chemotaxis der NK-Zellen auf LsE, gewonnen aus den behandelten Würmern, beobachtet. Doxycyclin ist ein bakteriostatisches Antibiotikum, auf welches die mit den meisten Filarien in Symbiose lebenden Wolbachien-Endobakterien sensibel reagieren. Durch das Behandlungsschema mit 30 Tagen Therapie wurden die Bakterien aus den Filarien fast vollständig eliminiert, was histologisch mittels anti-*Wolbachia* Surface Protein 60 (WSP60) Färbungen bestätigt wurde. Die Behandlung führt zu einer Infertilität der Würmer, Hemmung der Entwicklung von Mikrofilarien und als Spätfolge zur Degeneration und Tod eines Teils der adulten Würmer (Hoerauf et al., 1999). In den *L. sigmodontis* Extrakten waren sämtliche Bestandteile der Filarien verarbeitet, somit auch die Endobakterien. Das Ergebnis der geringeren Wanderung nach Doxycyclinbehandlung weist darauf hin, dass bakterielle Moleküle und nicht Filarienmoleküle chemotaktisch auf NK-Zellen wirkten (Abb. 28A und B). Bei einem Versuch zeigte sich ein höherer Index bei dem Extrakt aus behandelten Mäusen. Aufgrund der schwierigen Proteineinstellung mittels ADV 01 Reagenz, könnte es sein, dass fehlerhafte Konzentrationen miteinander verglichen wurden.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass NK-Zellen ähnlich wie Neutrophile auf Endobakterien reagieren (Brattig et al., 2001) und damit Endobakterien die Proinflammation und, wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben, den T<sub>H1</sub>-Arm der Immunantwort verstärken (Taylor & Hoerauf, 2001).

#### 4.3 Chemotaxis humaner NK-Zelllinien ausgelöst durch Wurmextraktmoleküle

Die Ergebnisse mit NK-Zellen verschiedener Spender führten zu variablen Chemotaxisergebnissen in Bezug auf die Konzentration, welche den stärksten

Einfluss auf NK-Zellen hatte. Daher wurden die beiden NK-Zelllinien NKL und YT auf ihr chemotaktisches Verhalten hin getestet. Damit sollten die interindividuellen Schwankungen umgangen werden. Es zeigte sich, dass beide Zelllinien auf Wurmextrakt reagieren und migrieren. Da die NKL-Zelllinie auf die Positivkontrollen besser reagierte (Abb. 29A und B) und für die YT-Zelllinie sowohl T-Zell-spezifische Rezeptoren als auch virale Kontaminationen (s.o.) beschrieben wurden, wurden für die Versuche, in denen das chemotaktisch wirksame Molekül anhand der Fraktionen näher charakterisiert werden sollte, die NKL-Zelllinie verwendet. Jedoch zeigte sich bei den Wiederholungsexperimenten auch eine Varianz der CT auf den Gesamtextrakt sowie eine verstärkte Hintergrundwanderung (siehe 4.4).

Für NKL-Zellen konnte bei Extrakt, welcher aus mit Doxycyclin behandelten Mäusen gewonnen wurde, nicht einheitlich eine Reduktion des CI in Vergleich zu unbehandeltem Extrakt nachgewiesen werden (Abb. 30A und B). Die Schwankungen im Ausmaß der Reduzierung lassen sich möglicherweise mit der schwierigen, variablen Einstellung der Proteinmenge (s.o.) in den beiden Extraktlösungen und durch die schwankende Hintergrundwanderung (siehe auch Abschnitt 4.4.) erklären.

#### **4.4 Analyse von Wurmextraktfraktionen aus adulten *L. sigmodontis* Weibchen**

Zur Herstellung von Subfraktionen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen die FPLC-Methode, welche Proteine nach Molekülgröße auftrennt, und zum anderen die RP-HPLC-Methode, bei der die Moleküle nach Hydrophobizität aufgetrennt werden. Zunächst wurden die mittels FPLC generierten Fraktionen mit primären NK-Zellen getestet. Die FPLC-Fraktionen wurden mit insgesamt drei Spendern getestet (Abb. 32 und 33). Hier zeigten sich wie beim Gesamtextrakt Schwankungen zwischen den Spendern, wobei zwei Spender nicht auf RANTES aber auf LsE reagierten. Beim ersten Spender lag die größte chemotaktische Aktivität bei den Fraktionsnummern 35-40 (25-9 kD), während bei Spender drei diese bei Nr. 45 und 46 (ca. 5 kD) vorlag. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass bei allen

drei Spendern die Migrationsantwort der NK-Zellen stärker auf Wurmextraktfraktionen als auf RANTES war, was den potenten Charakter der Wurm- bzw. Endobakterienmoleküle unterstreicht. Eine Inhibition oder eine andere Art der Interferenz könnte durch die unterschiedliche Anzahl der Fraktionen (Gruppen von 2 bzw. 5 Fraktionen zusammen gefasst) bei Spender eins und zwei bedingt sein. Bei Spender zwei und drei wurden Fraktionenpaare mit gleichen Volumen getestet. Insgesamt zeigte sich anhand der hohen chemotaktischen Indizes von Spender drei, dass kleinere Moleküle stärker chemotaktisch wirken. Da keine Wiederholungsversuche mit weiteren Spendern durchgeführt werden konnten, lässt sich diese Aussage nicht weiter bestätigen. Im SDS-Gel (Abb. 31), welches von den Fraktionen angefertigt wurde, zeigten sich im niedermolekularen Bereich <15 kD zarte Banden. Es könnten sich potentiell chemotaktische Moleküle in diesen Fraktionen befinden.

Um den interindividuellen Einfluss humaner NK-Zellen auszuschließen, wurde bei der Analyse der mittels RP-HPLC gewonnenen Fraktionen die NKL-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie benötigt IL-2 zur Kultivierung. Hier besteht somit eine Diskrepanz zu den naiven NK-Zellen, die ohne Zytokinstimulation verwendet wurden.

Es zeigte sich hierbei eine verstärkte chemotaktische Aktivität bei den hydrophoben Fraktionsnummern 34-48. Da sich mittels ESI-MS Analyse dieser Fraktionen durch die Arbeitsgruppe Schröder in Kiel keine auffälligen Ionen für den hydrophoben Bereich ergaben (siehe Anhang), können keine weiteren Aussagen zum Molekülcharakter gemacht werden. Weiter vorgeschlagene Aufreinigungsverfahren lagen außerhalb der Reichweite dieser Arbeit. Interessanterweise zeigte sich bei den hydrophilen Fraktionen (Nr. 1-3) mit einer frühen Retentionszeit ein dominierendes Ion. Dessen kalkulierte Molekülmasse betrug 9,8 kD. Da sich in diesen Fraktionen keine UV-Absorption nachweisen ließ, handelt es sich vermutlich weder um ein Peptid noch um ein Lipid, sondern wahrscheinlich um eine Glykostruktur.

Da die Zelllinie im Laufe der Kultivierung trotz Optimierungsversuchen eine zu große Aktivierung mit erhöhter Hintergrundwanderung der NKL-Zellen zeigte, war es in dieser Arbeit nicht möglich, die Moleküle, die die Chemotaxis induzieren können, weiter zu identifizieren. Dies könnte in Zukunft mit primären

NK-Zellen unter Inkaufnahme interindividueller Schwankungen weiter vorangetrieben werden.

#### **4.5 Charakterisierung gewanderter NK-Zellen: Aktivierung und Zytokinproduktion der NK-Zellen**

##### **4.5.1 CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> Subpopulation von NK-Zellen**

Bei den Versuchen, bei denen die NK-Zellen eindeutig in zwei Subpopulationen zu differenzieren waren, zeigte sich, dass beide Populationen auf LsE signifikant wandern, aber Zellen der CD56<sup>bright</sup> Untergruppe prozentual stärker wanderten als Zellen aus der CD56<sup>dim</sup> Gruppe (Abb. 35 und 36). Die CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> Zellen stellen die Zytokin-produzierenden Zellen dar und somit die NK-Zellen, welche eine wichtige Mediatorrolle bei entzündlichen Prozessen zwischen den einzelnen Komponenten des Immunsystems spielen, insbesondere bei der Verknüpfung des unspezifischen und spezifischen Immunsystems (Cooper et al., 2001b). Eine verstärkte Wanderung der Zytokin-produzierenden Zellen auf Wurmextrakt lässt vermuten, dass bei parasitären Erkrankungen, wie bei den Filariosen, vor allem die Aktivierung weiterer Komponenten des Immunsystems durch NK-Zellen im Vordergrund steht und nicht die zytotoxische Aktivität. Für murine NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese über CD27 in zwei Subpopulationen zu differenzieren sind, die ebenfalls unterschiedliche Chemotaxismuster aufweisen (Hayakawa & Smyth, 2006). Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt eine Differenzierungsmöglichkeit von humanen NK-Zellen mittels CD27. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden und ist somit ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Versuche.

#### 4.5.2 Aktivierungsmarker CD69 und CD25

NK-Zellen können durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPS), die an TLR binden, direkt aktiviert werden (Chalifour et al., 2004). Dazu zählen auch Lipopolysaccharide (LPS) aus Bakterien (Goodier & Londei, 2000).

So können Humane NK-Zellen *in vitro* direkt durch Schizonten des humanpathogenen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* aktiviert werden (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002). Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe um T. Nutman zeigten eine Aktivierung von humanen NK-Zellen durch lebende infektiöse Larven (L3) und Mikrofilarien von *B. malayi* durch den Nachweis von verschiedenen Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche der NK-Zellen (Babu et al., 2007). In derselben Arbeit demonstrierten die Autoren, dass reine NK-Zellen und durch eine Filtermembran von den Filarien getrennte NK-Zellen, keine vermehrte Heraufregulierung von Oberflächenaktivierungsmarkern aufwiesen, also lebende Filarien selbst nicht aktivierend wirkten. Dies ist mit der vorherrschenden Auffassung zu NK-Zellen übereinstimmend, dass NK-Zellen akzessorische Zellen zur Aktivierung benötigen (Newman & Riley, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden durch reine Inkubation der NK-Zellen mit weiblichem LsE ohne Chemotaxis die beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD69 von NK-Zellen vermehrt exprimiert (Abb. 37) sowie verstärkt von allen auf Medium, RANTES oder LsE gewanderten NK-Zellen (Abb. 38). Die auf LsE gewanderten Zellen zeigten die höchste Expression von 5% im Vergleich zu unter 1% der nicht gewanderten NK-Zellen (Abb. 38). Insgesamt waren die Expressionsfrequenzen höher bei direkter Inkubation (10-25%) als im Chemotaxisversuch (5%). Dies könnte zum einen durch die niedrigere Konzentration des LsE im Konzentrationsgefälle bei der CT bedingt sein, zum anderen durch den Einfluss von Monozyten. Die Ergebnisse der direkten Inkubation sind mit der Einschränkung zu interpretieren, dass die NK-Zell-Stimulation möglicherweise sekundär über verunreinigende, potentiell Zytokinproduzierende Monozyten in derselben Suspension nach MACS-Isolation verursacht wurden im Gegensatz zur Chemotaxis, wo 98-99% reine gesortete NK-Zellen verwendet wurden. Die MACS-Isolation hatte eine geringere Reinheit von NK-Zellen ergeben; allerdings ist diese Methode der negativen Selektion zurzeit der Goldstandard zur Gewinnung reiner und nicht durch

Antikörperinteraktion aktivierter NK-Zellen. Eine Vorstimulation, die eine weitere Aktivierung durch die Wanderung begünstigt hat, kann durch solche Monozyten sowie bei Übernachtinkubation der PBMC durch das bekanntermaßen immunstimulierende FCS trotz Komplementinaktivierung stattgefunden haben. Auf der anderen Seite spricht für eine direkte Aktivierung, dass die nicht gewanderten NK-Zellen aus der oberen Kammer, die eher durch vereinzelte benachbarte Monozyten hätten aktiviert werden können, weniger aktiviert waren als die gewanderten NK-Zellen.

Um die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe mit den Ergebnissen der Chemotaxis zu vergleichen, wurde die gleiche Inkubationszeit von 1 h und 15 min beibehalten wie in den Chemotaxisversuchen. Da es sich um eine kurze Stimulationsphase handelt, sind die Frequenzen der Aktivierungsmarkern niedrig. Für CD69 wäre ein Spitzenwert nach 24 h und für CD25 nach 48 h zu erwarten. Die Positivkontrolle mit PMA/Ionomycin, einem unspezifischen Stimulanz, zeigte bei der Chemotaxis unabhängigen Stimulation eine gute Wirkung auf die CD69 Expression, aber nicht auf die CD25 Expression.

Darüber hinaus konnte ansatzweise erstmalig ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Würemern hinsichtlich der Immunmodulation festgestellt werden. Da aufgrund der Verfügbarkeit Weibchenextrakt als Standardchemoattraktans in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, sind keine weiteren Versuche mit Männchen *LsE* dargestellt. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass zum ersten Mal und im Gegensatz zur vorherrschenden Ansicht gezeigt wurde, dass Filarien Moleküle enthalten, welche NK-Zellen direkt aktivieren können. In dieser Versuchsreihe wurden keine Extrakte aus Würemern nach Doxycyclintherapie untersucht und daher kann keine Aussage zur Rolle der Endobakterien bei CD25 und CD69 getroffen werden. Eine zukünftige Untersuchung von reinen Wolbachien-Extrakten aus kultivierten Insekten-Wolbachien könnte darüber hinaus Aufschluss geben.

Diese beobachtete Aktivierung der NK-Zellen durch Filarien kann die Kompartimentalisierung, das heißt die Wanderung der NK-Zellen in bestimmte infizierte und entzündete Gewebe entscheidend beeinflussen (Maghazachi, 2005). Dazu passt, dass inhibitorische Ly49-Rezeptoren zu Beginn der *L. sigmodontis* Infektion auf NK-Zellen herunterreguliert werden (Korten et al., 2002) und dass nach Beobachtungen von Inngjerdings et al. (2003) eine

verminderte Expression dieser Rezeptoren die Chemotaxis von NK-Zellen beeinflusst. In der vorliegenden Studie wurden keine inhibitorischen Rezeptoren untersucht. Die Befunde sprechen aber für ein Zusammenspiel von chemotaktisch-induzierter Migration und Aktivitätszustand der NK-Zellen. Kürzlich wurde beschrieben, dass CD69 ein immunmodulatorisches Molekül ist, den Sphingosine-1-phosphat (SIP) Rezeptor 1 reguliert und damit die Auswanderung von Lymphozyten aus Lymphorganen (Sancho et al., 2005; Cyster 2007).

#### **4.5.3 Zytokinantwort**

Bei der Untersuchung der Zytokinproduktion von NK-Zellen im ELISPOT-Assay zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Aktivierungsmarkern. Gewanderte NK-Zellen produzierten mehr Zytokine als nicht gewanderte (Abb. 42 und 43). Für diese Experimente wurden FACS-gesortete Zellen mit 98-99% reinen Populationen verwendet. Dieses Ergebnis unterstreicht die direkte aktivierende Wirkung der Filarienmoleküle auf NK-Zellen und deren Verstärkung durch Migration unabhängig von Monozyten. LsE stimulierte NK-Zellen ohne Chemotaxisversuch zur Produktion der T<sub>H1</sub>-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Dass NK-Zellen auf Protozoen und Helminthen mit einer IFN- $\gamma$  Produktion reagieren, konnte bereits für *Leishmania donovani*, *L. aethiopica* (Nylén et al., 2003), sowie auf *Necator americanus* (Hsieh et al., 2004) und die Filarie *B. malayi* (Babu et al., 2007) gezeigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass hauptsächlich CD56<sup>+</sup> Zellen mit Freisetzung von IFN- $\gamma$  auf Stimulierung mit einem rekombinanten *O. volvulus* Protein (*activation-associated secreted protein-1*) reagierten (MacDonald et al., 2008). 2004 wurde für *N. americanus* darüber hinaus beschrieben, dass ein Wurmmolekül direkt an NK-Zellen bindet und IFN- $\gamma$  Freisetzung auslöst (Hsieh et al., 2004). Lipophosphoglycane von *Leishmania major* stimulieren NK-Zellen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Becker et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit kann erstmalig eine Rolle von TNF- $\alpha$  aus NK-Zellen in Bezug auf Filarien gezeigt werden. Bisher wurde ein Einfluss von murinen NK-Zellen auf die generelle Produktion der Zytokine IL-4,

IL-5 und IL-10 indirekt durch ihre Depletion bei *L. sigmodontis* Infektion beschrieben (Korten et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Arbeit auch einen Einfluss von *L. sigmodontis* auf die IFN- $\gamma$  Freisetzung von NK-Zellen *in vitro*.

Ein Ansatzpunkt für weiterführende Versuche wäre die Frage, ob die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Freisetzung in derselben Zelle stattfindet. Eine gleichzeitige Produktion von Zytokinen wurde für antigenspezifische T-Zellen, so genannte polyfunktionale T-Zellen, in der protektiven Antwort gegen Malaria beschrieben (Korten et al., 2005; Reyes-Sandoval et al., 2008). Bei der malaria-spezifischen Stimulation von NK-Zellen spielt TNF- $\alpha$  keine Rolle (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002).

Auch die Aktivierung der T<sub>H1</sub>-Zytokinproduktion kann wie die Chemotaxis durch die in den Würmern enthaltenen Bakterien, den Wolbachien, hervorgerufen worden sein. Es wurde bereits für Monozyten gezeigt, dass sie auf Wolbachien aus *O. volvulus* mit einer T<sub>H1</sub>-Antwort reagieren (Brattig et al., 2000).

Für *B. malayi* konnte auch eine Produktion der T<sub>H2</sub>-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 aus NK-Zellen nachgewiesen werden (Babu et al., 2007). Bei den hier vorliegenden Versuchen konnte keine Produktion von IL-5 und IL-10 von aufgereinigten NK-Zellen, sowohl nach Stimulation mit LsE, als auch nach einer Chemotaxis auf LsE, festgestellt werden. IL-4 und IL-13 wurden nicht untersucht.

Interessanterweise konnte die TNF- $\alpha$  Freisetzung durch Restimulation von auf LsE gewanderten NK-Zellen gesteigert werden. Auch auf Medium gewanderte Zellen waren durch die Migration aktiviert TNF- $\alpha$  zu produzieren. Eine spezifische Aktivierung von NK-Zellen durch Restimulation im Allgemeinen und speziell mit Wurmmolekülen wurde noch nicht beschrieben. Ob es sich um eine spezifische Aktivierung oder einfach eine weitere unspezifische Steigerung handelt, kann nur diskutiert werden.

Die verstärkte Produktion von T<sub>H1</sub>-Zytokinen durch frisch in den Infektionsherd eingewanderte NK-Zellen könnte die Immunbalance besonders am Anfang der Infektion so beeinflussen, dass die schützende T<sub>H2</sub>-Antwort und damit die Wirtsabwehr die Filarien geschwächt ist. Diese Beobachtung ist damit grundsätzlich von Bedeutung für das Verständnis der Immunmechanismen von

Abwehr und Suszeptibilität des Wirtes, die von der Filarie möglicherweise zu Beginn für seine Entwicklung genutzt werden. Dieses konnte für NK-Zellen und *Brugia* in der Maus bereits gezeigt werden (Babu et al., 1998). In dieser Arbeit konnten somit anhand des chemotaktischen Verhaltens, der Expression von Aktivierungsmarkern und der Produktion von Zytokinen aktivierende immunmodulatorische Effekte von Filarien- bzw. Wolbachienmolekülen auf NK-Zellen gezeigt werden.

**5. Zusammenfassung**

NK-Zellen haben eine große Bedeutung in der akuten Phase der Immunantwort. Sie sind in der Lage Pathogene und infizierte Zellen schnell und direkt aktiviert zu lysieren. Sie wirken über Zytokinproduktion, hauptsächlich von  $T_{H1}$ -Zytokinen, als Mediatoren. Darüber hinaus produzieren NK-Zellen selbst Chemokine und wandern über Chemokinrezeptoraktivierung ins Gewebe. Es ist nicht bekannt, ob Wurm- oder andere Parasitenmoleküle direkt chemotaktisch auf NK-Zellen wirken; eine Aktivierung mit  $IFN-\gamma$  Freisetzung wurde beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass Parasiten und speziell Filarien bzw. ihre Endobakterien *in vitro* direkt auf NK-Zellen chemotaktisch und aktivierend wirken und dies unspezifisch über Speziesgrenzen (Nagerfilarie – humane NK-Zellen) hinweg. Bei allen gesunden, naiven Spendern konnten signifikante Wanderungen der durchflusszytometrisch oder immunomagnetisch-isolierten NK-Zellen auf Extrakt von homogenisierten *Litomosoides sigmodontis* (LsE) Weibchen gemessen werden. Durch eine antibiotische Depletion der Endobakterien war dies teilweise aufgehoben. Die chemotaktische Aktivität war bei FPLC generierten Fraktionen des LsE bei kleinen Proteinen am stärksten, nach RP-HPLC im hydrophoben Bereich sowie schwächer im sehr hydrophilen. Eine ESI-MS-Analyse ergab nur im hydrophilen Bereich ein dominierendes Ion (9,8 kD), das als Glykostruktur eingeschätzt wurde. Auch lebende Mikrofilarien und Wurmkulturüberstände lösten signifikante NK-Zell-Wanderungen aus. Ein Teil der gewanderten Zellen exprimierte verstärkt Aktivierungsmarker (CD25/CD69) im Vergleich zu gewanderten Zellen und produzierten die  $T_{H1}$ -Zytokine  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$ . Somit verdeutlicht die vorliegende Arbeit, dass die Filarie *L. sigmodontis* eine ausschließlich NK-Zell-aktivierende Wirkung hat in Bezug auf chemotaktisches Verhalten, Rezeptorexpression und Zytokinfreisetzung. Solch eine direkte NK-Zell-Aktivierung führt zu einer schnellen Induktion einer Immunantwort in Form einer  $IFN-\gamma$   $T_{H1}$ -Zytokinantwort. Dadurch kann sowohl die Abwehr als auch die Suszeptibilität des Wirtes zu Beginn der Infektion entscheidend beeinflusst werden. Diese Studie erweitert somit das Verständnis zur Rolle der angeborenen Immunität während einer Helmintheninfektion. Die

gewonnenen Erkenntnisse könnten auch für aktuell untersuchte, auf Wurmolekülen basierende immunmodulatorische Therapieansätze bei entzündlichen Erkrankungen sowie für Vakzinierungen und Koinfektionen von Bedeutung sein.

## 6. Summary

NK cells play a key role in the first line defence against pathogens, which implies direct cytotoxic and indirect cytokine-mediated effector functions - mainly of the Th1 type - bridging innate and adaptive immune responses. In mouse models of filarial infection NK cells promote early worm development, but augments defense against the worms later. The balance between the T<sub>H1</sub> and T<sub>H2</sub> response is important for this, which can be influenced by NK cells. NK cells also produce chemokines and migrate into infected tissues via activation of their chemokine receptors. It is not known, whether helminths or other parasites contain or secrete NK cell-chemoattractant molecules; activation and IFN- $\gamma$  release has been described. This study shows for the first time, that NK cells are directly attracted and activated by filariae, but rather by their endobacteria-derived molecules *in vitro*. This applied to primary naive human NK cells in a non-specific, cross-species (rodent filaria - human NK cells) manner. All blood samples from healthy, naive donors showed significant chemotaxis of their flow cytometrically or immunomagnetically isolated NK cells to extract from homogenised *Litomosoides sigmodontis* females (LsE). This was partially abrogated applying to endobacteria-free or -low LsE, generated by antibiotic treatment of mice. NK cells migrated most strongly to FPLC-generated extract fractions containing low molecular weight proteins, and after RP-HPLC, to the most hydrophobic fractions as well as less strongly to very hydrophilic fractions. ESI-MS analysis yielded a single dominant ion (9,8 kD) in the latter, possibly a sugar structure. Live microfilariae and worm culture supernatants also induced chemotaxis. Higher numbers of migrated NK cells expressed the activation markers CD25 and CD69 than non-migrated ones and secreted the T<sub>H1</sub> cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Therefore, this study clearly shows that the filaria *L. sigmodontis* releases exclusively NK cell-activating molecules, probably endobacterial, with respect to chemotaxis, receptor expression and cytokine release. Such a swift and direct induction of an innate, T<sub>H1</sub> biased cytokine response by activation of NK cells could have an important influence on the defence against the worms, but also on the susceptibility of the host at the beginning of the infection. These findings deepen the understanding of innate

immune mechanisms during helminth infection and could also be of interest for newly emerging helminth-based immunomodulatory therapies of inflammatory diseases, for vaccinations and coinfections.

## 7. Literaturverzeichnis

Albiez, EJ, Büttner, DW, Duke, BO, 1988. Diagnosis and extirpation of nodules in human onchocerciasis. *Trop. Med. Parasitol.* 39:331-346

Artavanis-Tsakonas, K, Riley, EM, 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 169:2956-2963

Awadzi, K, Boakye, DA, Edwards, G, Opoku, NO, Attah, SK, Osei-Atweneboana, MY, Lazdins-Helds, JK, Ardrey, AE, Addy, ET, Quartey, BT, Ahmed, K, Boatman, BA, Soumbeay-Alley, EW, 2004. An investigation of persistent microfilaridermias despite multiple treatments with ivermectin, in two onchocerciasis-endemic foci in Ghana. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 98:231-249

Babu, S, Porte, P, Klei, TR, Schultz, LD, Rajan, TV, 1998. Host NK cells are required for the growth of the human filarial parasite *Brugia malayi* in mice. *J. Immunol.* 161:1428-1432

Babu, S, Blauvelt, CP, Nutman, TB, 2007. Filarial parasites induce NK cell activation, type 1 and type 2 cytokine secretion, and subsequent apoptotic cell death. *J. Immunol.* 179:2445-2456

Becker, I, Salaiza, N, Aguirre, M, Delgado, J, Carrillo-Carrasco, N, Kobeh, LG, Ruiz, A, Cervantes, R, Torres, AP, Cabrera, N, González, A, Maldonado, C, Isibasi, A, 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130:65-74

Berahovich, RD, Lai, NL, Wei, Z, Lanier, LL, Schall, TJ, 2006. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J. Immunol.* 177:7833-7840

Bermon, S, Philip, P, Candito, M, Ferrari, P Dolisi, C, 2001. Effects of strength exercise and training on the natural killer cell counts in elderly humans. J. Sports. Med. Phys. Fitness. 41:196-202

Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Moretta A, 2002. Human natural killer cells receptors and their ligands. Curr. Protoc. Immunol. 14:Unit 14.10. Review

Bisset, LR, Lung, TL, Kaelin, M, Ludwig, E, Dubs, RW, 2004. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. Eur. J. Haematol. 72:203-212

Blanca, IR, Bere, EW, Young, HA, Ortaldo, JR, 2001. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5<sup>+</sup> B cells. J. Immunol. 167:6132-6139

Bottazzi, B, Introna, M, Allavena, P, Villa, A, Mantovani, A, 1985. *In vitro* migration of human large granular lymphocytes. J. Immunol. 134:2316-2321

Boyadjieva, N, Dokur, M, Advis, JP, Meadows, GG, Sarkar, DK, 2001. Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. J. Immunol. 167:5645-5652

Brattig, NW 2004. Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of *Onchocerca filariae* and *Wolbachia* endobacteria. Microbes Infect. 6:113-128. Review

Brattig, NW, Rathjens, U, Ernst, M, Geisinger, F, Renz, A, Tischendorf, FW, 2000. Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. Microbes Infect. 2:1147-1157

Brattig, NW, Büttner, DW, Hoerauf, A, 2001. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia*

endobacteria. *Microbes Infect.* 3:439-446

Bryceson YT, Long EO, 2008. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr. Opin. Immunol.* 20:344-352

Büttner, DW, Wanji, S, Bazzochi, C, Bain, O, Fischer, P, 2003. Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa loa*. *Filaria J.* 2:10

Campbell, JJ, Qin, S, Unutmaz, D, Soler, D, Murphy, KE, Hodge, MR, Wu, L, Butcher, EC, 2001. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression. *J. Immunol.* 166:6477-6482

Chalifour, A, Jeannin, P, Gauchat, JF, Blaecke, A, Malissard, M, N'Guyen, T, Thieblemont, N, Delneste, Y, 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104:1778-1783

Chen, Y, Perussia, B, Campbell, KS, 2007. Prostaglandin D2 supresses human NK cell function via signaling through D prostanoid receptor. *J. Immunol.* 179:2766-2773

Comans-Bitter, WM, de Groot, R, van den Beemd, R, Neijens, HJ, Hop, WC, Groeneveld, K, Hooijkaas, H, van Dongen JJ, 1997. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.* 130:388-393

Cooper, PJ, Espinel, I, Paredes, W, Guderian, RH, Nutman, TB, 1998. Impaired tetanus-specific cellular and humoral response following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J. Infect. Dis.* 178:1133-1138

Cooper, MA, Fehniger, TA, Caliguri, MA, 2001a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633-640

Cooper, MA, Fehniger, TA, Turner, SC, Chen, KS, Ghaheri, BA, Ghayur, T, Carson, WE, Caligiuri, MA, 2001b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subsets. *Blood* 97:3146-3151

Cully, DF, Vassilatis, DK, Liu, KK, Paress, PS, Van der Ploeg, LH, Schaeffer, JM, Arena, JP, 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 371:707-711

Cyster, JG, 2007. Specifying the patterns of immune cell migration. *Novartis Found. Symp.* 281:54-61

Debrah, AY, Mand, S, Specht, S, Marfo-Debrekyei, Y, Batsa, L, Pfarr, K, Larbi, J, Lawson, B, Taylor, M, Adjei, O, Hoerauf, A, 2006. Doxycycline reduces plasma VEGF-C/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *PLoS Pathog.* 9:e92

Deng, A, Chen, S, Li, Q, Lyu, SC, Clayberger, C, Krensky, AM, 2005. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J. Immunol.* 174:5243-5248

Duke, BO, 2005. Evidence for macrofilaricidal activity of ivermectin against female *Onchocerca volvulus*: further analysis of a clinical trial in the Republic of Cameroon indicating two distinct killing mechanisms. *Parasitology.* 130:447-453

Estler, CJ, 2000. *Pharmakologie und Toxikologie*, Estler, C.-J, 5. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart: 667

Fehniger, TA, Cooper, MA, Nuovo, GJ, Cella, M, Facchetti, F, Colonna, M, Caligiuri, MA, 2003. CD56 (bright) natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-3057

Förster, M, Braun, RK, Kroegel, C, 2000. Molekularer Mechanismus der Signaltransduktion im Rahmen der CD95- und CD69-Rezeptor-induzierten Apoptose humaner eosinophiler Granulozyten. *Pneumologie*. 54:464-467

Gasperini, S, Marchi, M, Calzetti, F, Laudanna, C, Vicentini, L, Olsen, H, Murphy, M, Liao, F, Farber, J, Cassatella, MA, 1999. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J. Immunol*. 162:4928-4937

Gastpar, R, Gross, C, Rossbacher, L, Ellwart, J, Riegger, J, Multhoff, G, 2004. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J. Immunol*. 172:972-980

Gauthier, JF, Fortin, A, Bergeron, Y, Dumas, MC, Champagne, ME, Bergeron, MG, 2007. Differential contribution of bacterial N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and host-derived CXC chemokines to neutrophil infiltration into pulmonary alveoli during murine pneumococcal pneumonia. *Infect. Immun*. 75:5361-5367

Goodier, MR, Londei, M, 2000. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56+CD3- NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10. *J. Immunol*. 165:139-147

Graves, DT, Jiang, Y, 1995. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med*. 6:109:118

Guderian, RH, Proaño, R, Beck, B, Mackenzie, CD, 1987. The reduction in microfilariae loads in the skin and eye after nodulectomy in Ecuadorian onchocerciasis. *Trop. Med. Parasitol*. 38:275-258

Habbema, JD, Plaisier, AP, van Oortmarsen, GJ, Remme, J, 1990. Prospective evaluation of onchocerciasis control strategies. *Acta Leiden*. 59:387-398

Hanna, J, Bechtel, P, Zhai, Y, Youssef, F, McLachlan, K, Mandelboim, O, 2004. Novel insights on human NK cells` immunological modalities revealed by gene expression profiling. J. Immunol. 173:6547-6563

Harvath, L, Falk, W, Leonard, EJ, 1980. Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. J. Immunol. Methods 37:39-45

Hayakawa, Y, Smyth, MJ, 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. J. Immunol. 176:1517-1524

Herberman, RB, Nunn, ME, Lavrin, DH, 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. Int. J. Cancer 15:216-229

Höfler, W, 1999. Lymphatische und andere Filariosen, in Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Lang, W, Löscher, T, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 190

Hoerauf, A, Nissen-Pähle, K, Schmetz, C, Henkel-Dührsen, K, Blaxter, ML, Büttner, DW, Gallin, MY, Al-Qaoud, KM, Lucius, R, Fleischer, B, 1999. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. J. Clin Invest. 103:11-18

Hoerauf, A, Satoguina, J, Saefel, M, Specht, S, 2005. Immunmodulation by filarial nematodes. Parasite Immunol. 27:417-429. Review

Hoerauf, A, Specht. S, Büttner, M, Pfarr, K, Mand, S, Fimmers, R, Marfo-Debrekeyei, Y, Konadu, P, Debrah, AY, Bandi, C, Brattig, NW, Albers, A, Larbi, J, Batsa, L, Adjei, O, Büttner, DW. 2008. *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis:

a randomized placebo-controlled study. *Med. Microbiol. Immunol.* 197:295-311

Hsieh, GC, Loukas, A, Wahl, AM, Bhatia, M, Wang, Y, Williamson, AL, Kehn, KW, Maruyama, H, Hotez, P.J, Leitenberg, D, Bethony, J, Constant, SL, 2004. A secreted protein from the human hookworm *Necator americanus* binds selectively to NK cells and induces IFN-gamma production. *J. Immunol.* 173:2699-2704

Inngjerdigen, M, Damaj, B, Maghazachi, AA, 2001. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97:367-375

Inngjerdigen, M, Rolstad, B, Ryan, JC, 2003. Activating and inhibitory Ly49 receptors modulate NK cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and CXCL12. *J. Immunol.* 171:2889-2895

Janeway, jr, CA, Travers, P, Walport, M, Shlomchik, M, 2005. *Immunobiology, the immune system in health and disease.* 6 th Edition. Garland Science Publishing, New York.

Jin, Y, Damaj, BB, Maghazachi, AA, 2005. Human resting CD16-, CD16+ and IL-2-, IL-12-, IL-15- or IFN-alpha-activated natural killer cells differentially respond to sphingosylphosphorylcholine, lysophosphatidylcholine and platelet-activating factor. *Eur. J. Immunol.* 35:2699-2708

Kärre, K, 1985. Role of target histocompatibility in regulation of natural killer activity: a reevaluation and a hypothesis, in: Callewaert, D, Herberman, R.B. (Eds.), *Mechanisms of cytotoxicity by NK cells.* Academic Press, San Diego, 81-91

Keller, HU, Wilkinson, PC, Abercrombie, M, Becker, EL, Hirsch, JG, Miller, ME, Ramsey, WS, Zigmond, SH, 1977. A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Clin. Exp. Immunol.* 27:377-380

Kiessling R, Klein E, Wigzell H, 1975. „Natural“ killer cells in the mouse: I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Eur. J. Immunol. 5:112-117

Korbel, DS, Finney, OC, Riley, EM, 2004. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. Int. J. Parasitol. 34:1517-1528 Review

Korten, S, Wildenburg, G, Darge, K, Büttner, DW, 1998. Mast cells in onchocercomas from patients with hyperreactive onchocerciasis (sowda). Acta Trop. 70:217-231.

Korten, S, Volkmann, L, Saefel, M, Fischer, K, Taniguchi, M, Fleischer, B, Hoerauf, A, 2002. Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. J. Immunol. 168:5199-5206

Korten, S, Anderson, RJ, Hannan, CM, Sheu, EG, Sinden, R, Gadola, S, Taniguchi, M, Hill, AV, 2005. Invariant Valpha14 chain NKT cells promote *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein-specific gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-producing CD8<sup>+</sup> T cells in the liver after poxvirus vaccination of mice. Infect. Immun. 73:849-858

Korten, S, Badusche, M, Büttner, DW, Hoerauf, A, Brattig, NW, Fleischer, B, 2008. Natural death of adult *Onchocerca volvulus* and filaricidal effects of doxycycline induce local FOXP3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and granzyme expression. Microbes Infect. 10:313-324

Kveberg, L, Bryceson, Y, Inngjerdigen, M, Rolstad, B, Maghazachi, AA, 2002. Sphingosine 1 phosphate induces the chemotaxis of human natural killer cells. Role for heterotrimeric G proteins and phosphoinositide 3 kinases. Eur. J Immunol. 32:1856-1864

Lodoen, MB, Lanier, LL, 2006. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. Curr. Opin. Immunol. 18:391-398

MacDonald, AJ, Libri, NA, Lustigmann, S, Barker, SJ, Whelan, MA, Semper, AE, Rosenberg, WM, 2008. A novel helminth-derived immunosimulant enhances human recall responses to hepatitis C virus and tetanus toxoid and is dependent on CD56<sup>+</sup> cells for its action. *Clin. Exp. Immunol.* 152:265-273

Mackenzie, CD, Williams, JF, Guderian, RH, 1987. The onchocercal nodule: its structure and cellular composition. *Onchocerciasis/Filariasis, Proceedings of the Upjohn Company Symposium, Brook Lodge*, 95-120

Maghazachi, AA, Al-Aoukaty, A, Schall, TJ, 1994. C-C Chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2 activated NK cells. Role for G proteins. *J. Immunol.* 153:4969-4977

Maghazachi, AA, Al-Aoukaty, A, 1998. Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. *FASEB J.* 12:913-914. Review

Maghazachi, AA, 2005. Compartmentalization of human killer cells. *Mol. Immunol.* 42:523-529. Review

Maizels, RM, Yazdanbakhsh, M, 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3:733-744

Maizels, R.M, Balic, A, Gomez-Escobar, N, Nair, M, Taylor, M.D, Allen, J.E, 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201:89-116

McLaren, DJ, Worms, MJ, Laurence, BR, Simpson, MG, 1975. Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69:509-514

Mocikat, R, Braumuller, H, Gumy, A, Egeter, O, Ziegler, H, Reusch, U, Bubeck, A, Louis, J, Mailhammer, R, Riethmuller, G, Koszinowski, U, Rocken, M, 2003. Natural killer cells activated by MHC class I low targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19:561-569

Moretta, L, Biassoni, R, Bottino, C, Mingari, MC, Moretta, A, 2002. Natural killer cells: a mystery no more. *Scand. J. Immunol.* 55:229-232. Review

Nerozzi, D, Santoni, A, Bersani, G, Magnani, A, Bressan, A, Pasini, A, Antonozzi, I, Frajese, G, 1989. Reduced natural killer cell activity in major depression: neuroendocrine implications. *Psychoneuroendocrinology.* 14:295-301

Newman, KC, Riley, EM, 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 7:279-291

Nylén, S, Maasho, K, Söderstrom, K, Ilg, T, Akuffo, H, 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 131:457-467

Ochshorn-Adelson, M, Bodner, G, Toraker, P, Albeck, H, Ho, A, Kreek, MJ, 1994. Effects of ethanol on human natural killer cell activity: *in vitro* and acute, low-dose *in vivo* studies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18 (6):1361-1367

Ottesen, EA, Neva, FA, Paranjape, RS, Tripathy, SP, Thiruvengadam, KV, Beaven, MA, 1979. Specific allergic sensitisation to filarial antigens in tropical eosinophilia syndrome. *Lancet* 1158-1161

Ottesen, EA, 1984. Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 78:9-18

Palmieri, G, Serra, A, De Maria, R, Gismondi, A, Milella, M, Piccoli, M, Frati, L, Santoni, A, 1995. Cross-linking of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 fibronectin receptors enhances natural killer cell cytotoxic activity. *J. Immunol.* 155:5314-5322

Peritt, D, Robertson, S, Gri, G, Showe, L, Aste-Amezaga, M, Trinchieri, G, 1998. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.* 161:5821-5824

Petit, G, Diagne, M, Maréchal, P, Owen, D, Taylor, D, Bain, O, 1992. Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 67:144-150

Pohajdak, B, Gomez, J, Orr, FW, Khalil, N, Talgoy, M, Greenberg, AH, 1986. Chemotaxis of large granular lymphocytes. *J. Immunol.* 136:278-284

Reyes-Sandoval, A, Sridhar, S, Berthoud, T, Moore, AC, Harty, JT, Gilbert, SC, Gao, G, Ertl, HC, Wilson, JC, Hill, AV, 2008. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. *Eur. J. Immunol.* 38:732:741

Robertson, MJ, Ritz, J, 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421-2438

Robertson, MJ, Cochran, KJ, Cameron, C, Le, JM, Tantravahi, R, Ritz, J, 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp. Hematol.* 24:406-415

Robertson, MJ, 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 71:173-183

Roda, JM, Parihar, R, Magro, C, Nuovo, GJ, Tridandapani, S, Carson, WE, 3rd 2006. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res.* 66:517-526

Rubio de Krömer, MT, Krömer, M, Lüersen, K, Brattig, NW, 1998. Detection of a chemotactic factor for neutrophils in extracts of female *Onchocerca volvulus*. *Acta tropica* 71:45-56

Sancho, D, Gómez, M, Sánchez-Madrid, F, 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. Trends. Immunol. 26:136-140

Saxena, QB, Saxena, RK, Adler, WH, 1986. Inhibition of human natural killer cell activity by ethanol *in vitro*. Indian J. Exp. Biol. 24:561-564

Schedlowski, M, Jacobs, R, Stratmann, G, Richter, S, Hädicke, A, Tewes, U, Wagner TO, Schmidt, RE, 1993a. Changes of natural killer cells during acute psychological stress. J. Clin. Immunol. 13:119-126

Schedlowski, M, Falk, A, Rohne, A, Wagner TO, Jacobs, R, Tewes, U, Schmidt, RE, 1993b. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. J. Clin. Immunol. 13:344-351

Schröder, JM, 2001. Isolation and purification of chemokines from natural sources. Mol. Biotechnol.18:71-77

Schulz-Key, H, Karam, M, 1986. Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. Parasitol. Today 2:284-286

Scott, JA, 1946. Observations on the rate of growth and maturity of *Litomosoides carinii* a filarial worm of the cotton rat. J. Parasitol. 32:570-573

Sebok, K, Woodside, D, al-Aoukaty, A, Ho, A.D, Gluck, S, Maghazachi, AA, 1993. IL-8 induces the locomotion of human IL-2-activated natural killer cells. Involvement of a guanine nucleotide binding (G0) protein. J. Immunol. 150:1524-1534

Silbernagel, S, Despopoulos, A, 2001. Taschenatlas der Physiologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 94-99

Summers, RW, Elliott, DE, Urban, JF. jr, Thompson, RA, Weinstock, JV, 2005. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. Gastroenterology. 128:825-832

Suzui, M, Kawai, T, Kimura, H, Takeda, K, Yagita, H, Okumura, K, Shek, PN, Shepard, RJ, 2004. Natural killer cell lytic activity and CD56 (dim) and CD56 (bright) cell distributions during and after intensive training. J. Appl. Physiol. 96:2167-2173

Taub, DD, Sayers, TJ, Carter, CR, Ortaldo, JR, 1995. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 155:3877-3888

Taylor, MJ, Bandi, C, Hoerauf, AM, Lazdins, J, 2000. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target for control? Parasitol. Today 16:179-180

Taylor, MJ, Hoerauf, AM, 2001. A new approach to the treatment of filariasis. Curr. Opin. Infect. Dis. 14:727-731. Review

Timonen, T, 1997. Natural killer cells: endothelial interactions, migration, and target cell recognition. J. Leukoc. Biol. 62:693-701. Review.

Trinchieri, G, 1989. Biology of natural killer cells. Adv. Immunol. 47:187-367

Volkman, L, Fischer, K, Taylor, M, Hoerauf, A, 2003. Antibiotic therapy in murine filariasis (*Litomosoides sigmodontis*): comparative effects of doxycycline and rifampicin on *Wolbachia* and filarial viability. Trop. Med. Int. Health. 8:392-401

Wendt, K, Wilk, E, Buyny, S, Buer, J, Schmidt, RE, Jacobs, R, 2006. Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56 (dim) and CD56 (bright) NK cells. J. Leukoc. Biol. 80:1529-1541

Wenk, P, 1967. Der Invasionsweg der metazyklischen Larven von *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae). Z. Parasitenkd. 28:240-263

Whalen, MM, Doshi, RN, Bankhurst, AD, 1992. Effects of pertussis toxin treatment on human natural killer cell function. *Immunology* 76:402-407

Whiteside, TL, Herberman, RB, 1994. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:125-133

WHO 1995. World health report, 1995. Genf

WHO 2002. World health report, 2002. Genf

WHO 2005. Annual report on Lymphatic Filariasis, 2003. Genf

Wildenburg, G, Krömer, M, Büttner, DW, 1996. Dependence of eosinophil granulocyte infiltration into nodules on the presence of microfilariae producing *Onchocerca volvulus*. *Parasitol Res* 82:117-124.

Wilkinson, PC, 1988. Chemotaxis and chemokinesis: confusion about definitions. *J. Immunol. Methods.* 110:143-149

Yodoi, J, Teshigawara, K, Nikaido, T, Fukui, K, Noma, T, Honjo, T, Takigawa, M, Sasaki, M, Minato, N, Tsudo, M, Uchiyama, T, Maeda, M, 1985. I. Regulation of IL-2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells). *J. Immunol.* 134:1623-1630

Yoneda, N, Tatsumi, E, Kawano, S, Teshigawara, K, Oka, T, Fukuda, M, Yamaguchi, N, 1992. Detection of Epstein-Barr virus genome in natural-killer-like cell line, YT. *Leukemia* 6:136-141

Zandbergen, G.v, Herman, N, Laufs, H, Solbach, W, Laskay, T, 2002. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect. Immun.* 70:4177-4184

Zingoni, A, Sornasse, T, Cocks, BG, Tanaka, Y, Santoni, A, Lanier, LL, 2004.  
Cross-talk between activated human NK cells and CD4<sup>+</sup> T cells via OX40-OX40  
ligand interactions. J. Immunol. 173:3716-3724

**8. Abbildungsnachweis**

Abb. 2 Lebenszyklus der Filarie *Wuchereria bancrofti* als Beispiel für einen Filarieninfektionszyklus. CDC, [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Abb. 3 Endemiegebiete der lymphatischen Filariose. WHO 2006, Lymphatic Filariasis Elimination Programme.

Abb. 4 Endemiegebiete der lymphatischen Filariose und der Onchozerkose. WHO 2002.

Abb. 5 Patient mit Lymphödem linkes Beines (Elephantiasis). Aus [www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/lymphaticfilariasis/index.htm).

Abb. 6 *Loa Loa* bei Durchwanderung der Konjunktiven. Graphic Images of Parasites, *Loa Loa*. Parasites and Parasitological Resources Website, the University of Ohio.

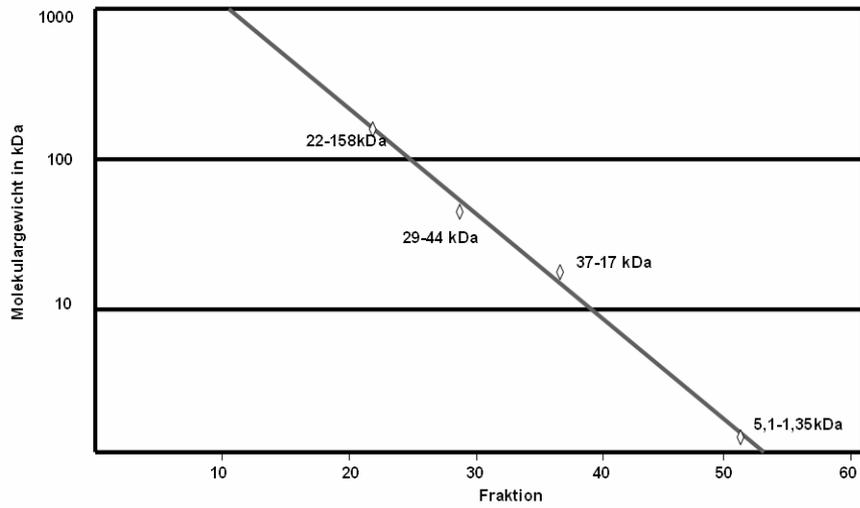
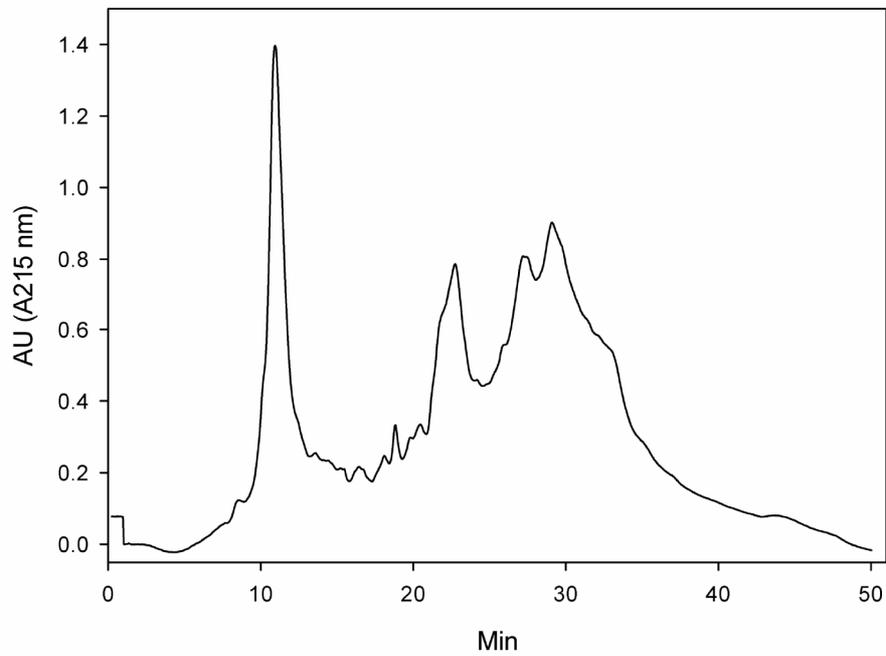
Abb. 7 Adulte *O. volvulus*, Würmer 3 weibliche Würmer und ein Männchen (unten rechts), nach Isolierung durch Kollagenaseverdau des Onchozerkoms. Aus dem Bildarchiv des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin.

Abb. 8-10 Aus dem Bildarchiv des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin.

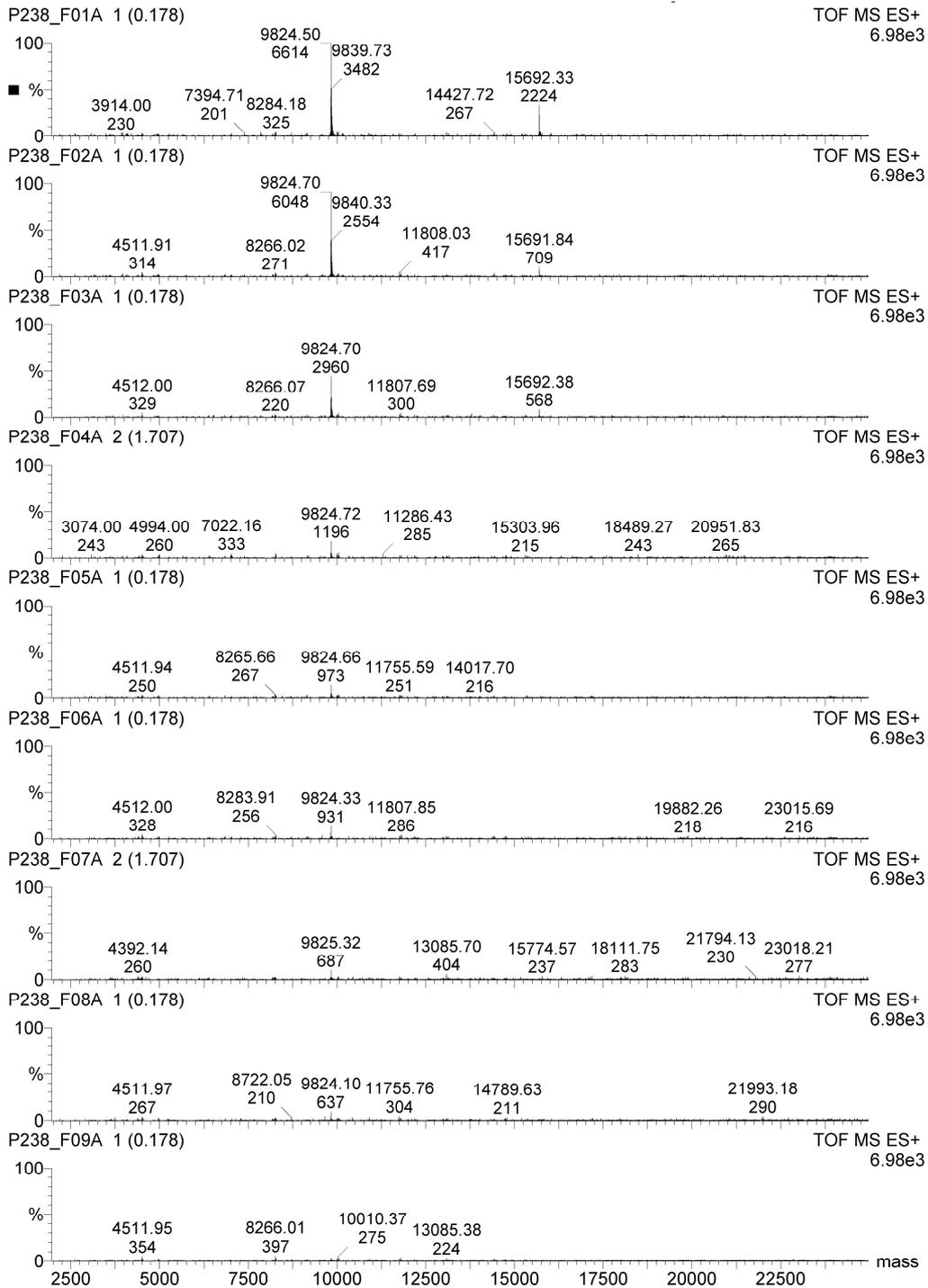
Abb. 11 Weibliche adulte *L. sigmodontis* Würmer. S. Korten, Abteilung für Immunologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

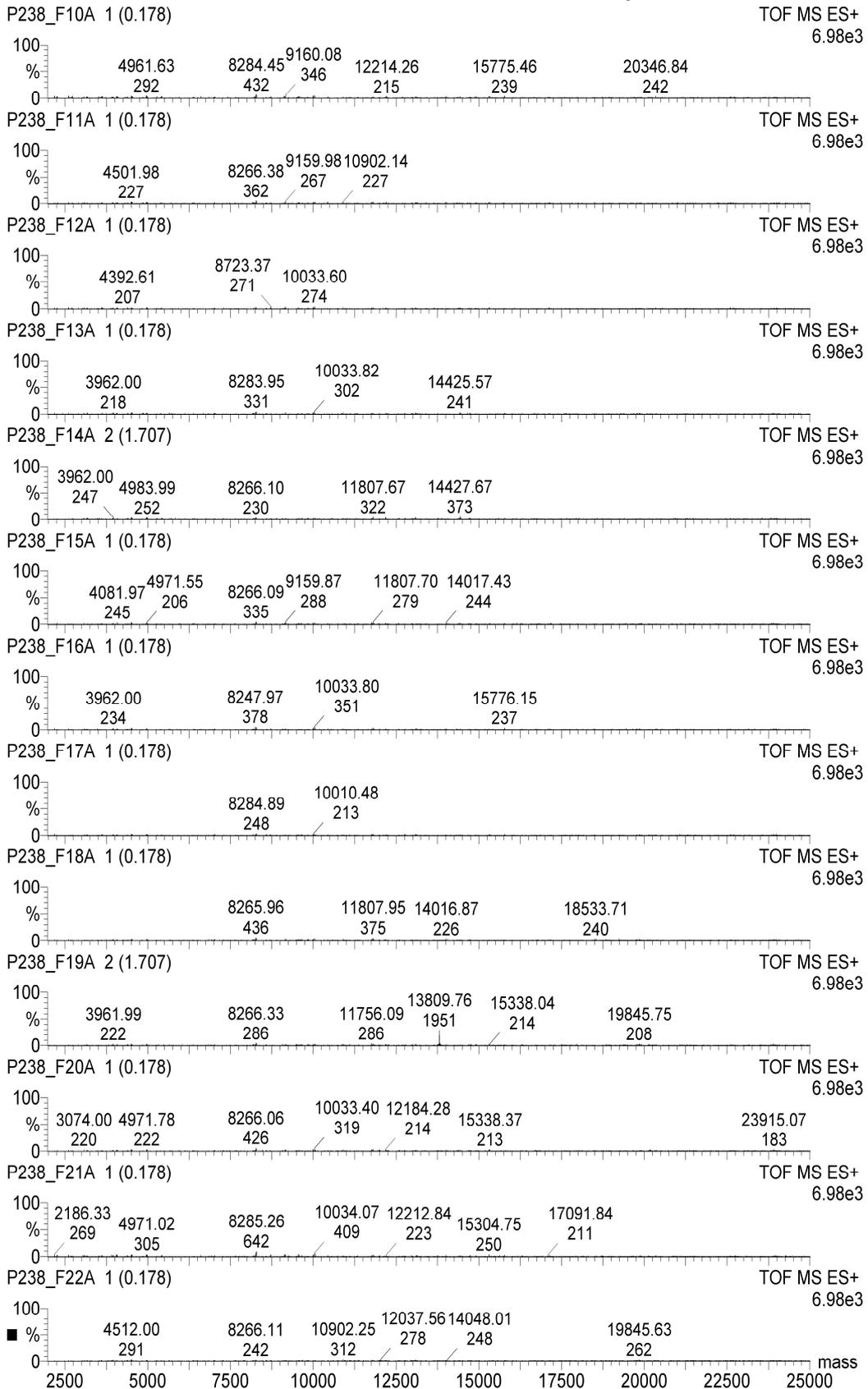
Abb. 12 Lebenszyklus der Filarie *L. sigmodontis*. W. Hartmann, Abteilung für Immunologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

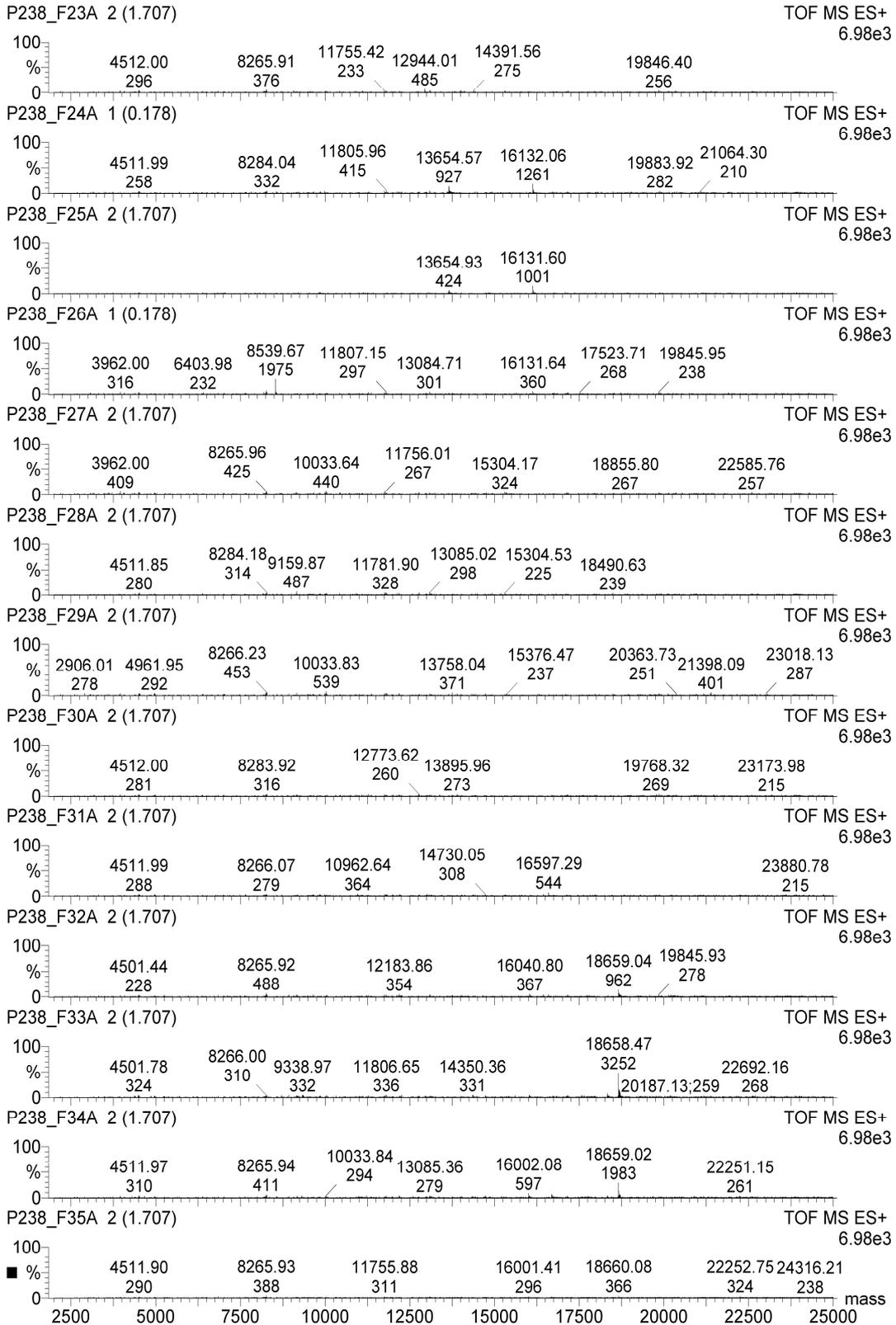
## 9. Anhang

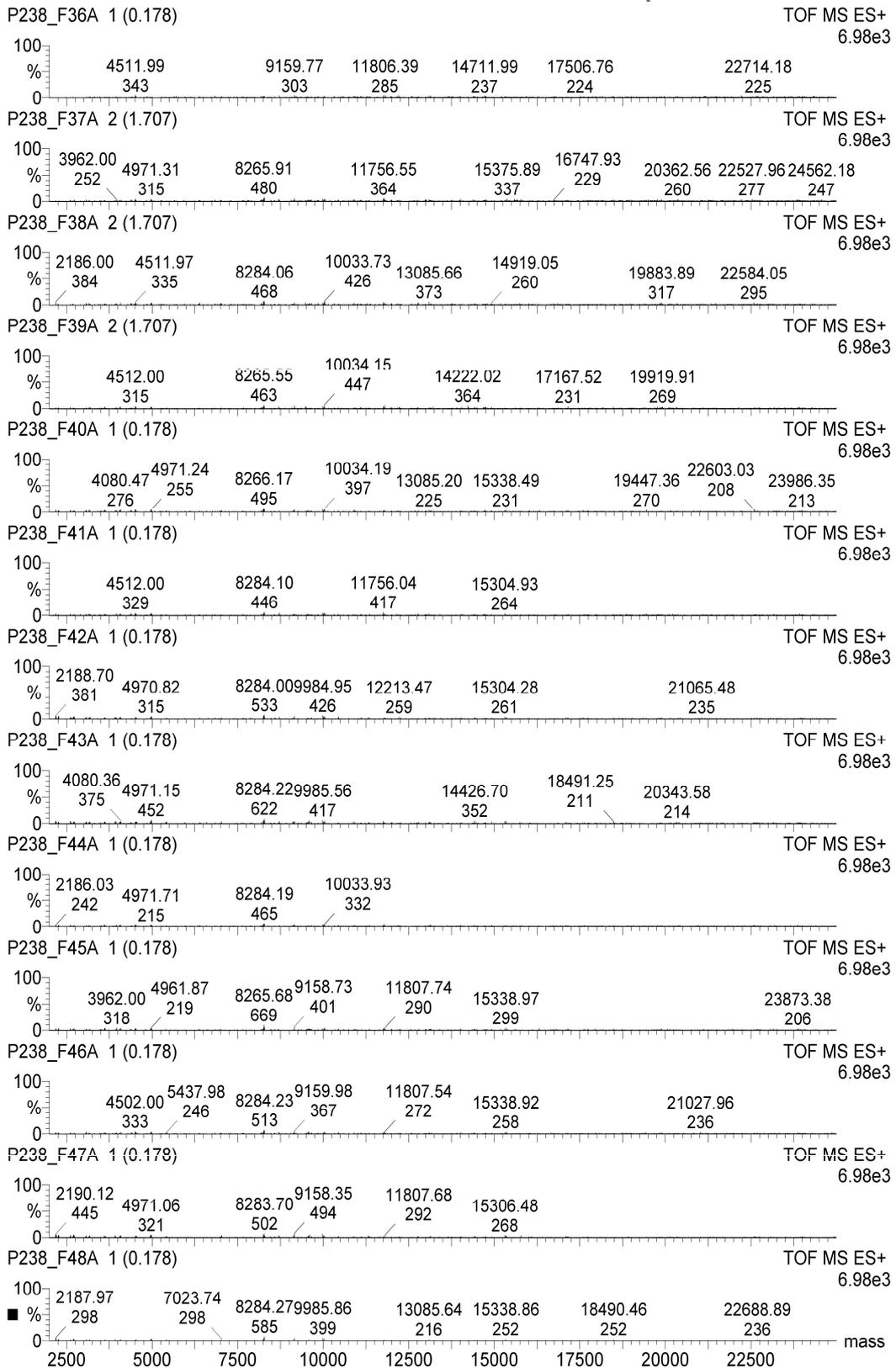
Abb. 44 Fraktionen von Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt. nach FPLC.Abb. 45 RP-HPLC- Chromatogramm von Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt.

Massenspektrometrische Übersicht über Weibchen *L. sigmodontis* Extrakt nach RP-HPLC-Auftrennung mittels Quadropol-Time-of-Flight-Hybrid-Mass-spectrometer (Q-Tof II, Waters/Micromass, Milford, USA)









## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Bernhard Fleischer für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe und die kompetente Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Simone Korten für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen konstruktiven Anregungen.

Herrn Prof. Jens-M. Schröder danke ich für die Bereitstellung der mittels (RP-HPLC)-Säule generierten Fraktionen und der AP48 Mikrokammer.

Bei Herrn Dr. Kai Lüersen bedanke ich mich für die Herstellung der Fraktion mittels (FPLC)-Säule.

Des Weiteren danke ich Herrrn PD Dr. Norbert Brattig für die Überlassung der Boyden-Kammern und die hilfreichen Anmerkungen und Kommentare zu dieser Arbeit.

Frau Claudia Sander-Jülch danke ich für die Unterstützung bei dem Zellsorten.

Vielen Dank an Marlis Badusche, Vera Steißlinger und Wiebke Hartmann für das nette Arbeitsklima im Labor, die hilfreichen Tipps und Anregungen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Immunologie möchte ich mich für die Unterstützung bedanken.

## Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....