

Untersuchungen zur Infektionsbiologie in der murinen und humanen Filariose - Einfluß von Th2- und Th1-vermittelten Effektorantworten und von *Wolbachia sp.* (Hertig & Wolbach, 1924) auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Filarien

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Lars Volkmann
aus Remscheid

Hamburg, 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. A. HÖRAUF

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. Renwantz

Tag der Disputation: 21. Juni 2002

Hamburg, den 07. Juni 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunoabsorbent assay
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
Fc	Fragment crystallizable
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO Synthase
kb	Kilobase
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharid
NO	Stickstoffmonoxyd
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
Th	T-Helfer
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Danksagung

Zunächst danke ich Gott für seine Kraft und seine Güte.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Fleischer und bei Herrn PD Dr. Hörauf für ihr beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre fachlichen Ratschläge.

Auch Herrn Prof. Dr. Renwranz gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates an der Universität Hamburg.

Ich bedanke mich bei Frau Kerstin Fischer, Frau Sabine Specht, Frau Marlis Badusche, Frau Dr. Judith Satuguina, Frau Ulrike Heider, Herrn Dr. Ken Pfarr und Herrn Dr. Michael Saefel für das beständig gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich besonders bei Frau Christiane Steeg für ihre wertvollen Tipps und ihre tatkräftige Hilfe bei vielen Fragen.

Ein Dankeschön gilt auch dem Team im Tierhaus unter der Leitung von Herrn Dr. Schüler.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meiner Frau Christine, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei der Gemeinde „Wort des Glaubens“, besonders bei allen Leuten aus dem Hauskreis von Anja und Frank Wetzels und bei Gabi und Gebhardt Weigel für die zahlreichen Gebete.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt haben.

*Denn also hat Gott die Welt geliebt, daß er seinen eingeborenen Sohn gab,
damit alle, die an ihn glauben, nicht verloren werden,
sondern das ewige Leben haben.*

Johannes 3,16

Der Weisheit Anfang ist die Furcht des HERRN.

Sprüche 9, 10

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Nematoden	1
1.1.1.	Nematoden	1
1.1.2.	Nematoden als Krankheitserreger	1
1.2.	Filarioidea	1
1.2.1.	Pathologie von Filarienerkrankungen	3
1.2.2.	Behandlung von Filarienerkrankungen	3
1.2.3.	Bedeutung von Tiermodellen für die Untersuchung immunologischer Zusammenhänge	3
1.2.3.1.	Die Nagetierfilarie <i>Litomosoides sigmodontis</i> (Chandler, 1932) im Mausmodell	4
1.2.3.2.	Bedeutung der Lymphozyten in der Immunantwort in semipermissiven und permissiven Modellen	5
1.2.3.2.1.	Bedeutung der T-Zellen	5
1.2.3.2.2.	B-Zellen	6
1.2.3.3.	Die Rolle der Zytokine in der Immunantwort	7
1.2.3.3.1.	Bedeutung der Th2-Zytokine	7
1.2.3.3.2.	Bedeutung der Th1-Zytokine	9
1.2.3.4	Die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten als wichtiger Bestandteil der Immunantwort	10
1.2.3.4.1.	Bedeutung der Eosinophilen	10
1.2.3.4.2.	Bedeutung der Neutrophilen	11
1.3.	Bedeutung der Wolbachien für die Neutrophilenakkumulation	11
1.4.	Wolbachien	12
1.4.1.	Phylogenie der Wolbachien	12
1.4.2.	Biologie der Wolbachien und mutualistische Assoziationen in Filarien	13
1.4.3.	Rolle der Wolbachien in der Pathogenese der Filariose	14
1.4.4.	Depletion der Wolbachien als Konzept zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden	16
1.5.	Wissenschaftliche Fragestellung der Dissertation	17

Inhaltsverzeichnis

2.	Material und Methoden	
2.1.	Chemikalien	19
2.2.	Methodik zur Untersuchung der Filarieninfektionen	19
2.2.1.	Tierzucht und Infektion	19
2.2.2.	Untersuchung der Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	20
2.2.2.1.	Bestimmung der Wurmanzahl in der Pleurahöhle	20
2.2.2.2.	Aufbewahrung der adulten Würmer	21
2.2.2.3.	Bestimmung der Mikrofilarien in der Pleurahöhle und im Blut	21
2.2.3.	Aufreinigung von peripheren Blutmikrofilarien	22
2.2.4.	Zellkultur	22
2.2.4.1.	Herstellung von <i>L. sigmodontis</i> -Antigen	22
2.2.4.2.	Pleuraexsudatzellkultur	23
2.2.4.3.	Makrophagenkultur	23
2.2.5.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus dem Klon NIMP-R14	24
2.2.6.	Behandlung von Mäusen: Neutralisation von TNF- α	24
2.2.7.	Messung der Phagozytosekapazität von Neutrophilen Granulozyten	25
2.2.8.	Durchführung der Zytospins	26
2.2.9.	FACS-Analyse	26
2.2.10.	Durchführung der Zytokin ELISAs	27
2.2.11.	Detektion des Gesamt-IgEs	28
2.2.12.	Detektion des PC-spezifischen IgMs	28
2.2.13.	Messung der NO Konzentration	29
2.3.	Molekularbiologie	29
2.3.1.	DNA-Isolation	29
2.3.1.1.	DNA-Isolation aus Ethanol-preserviertem <i>O. volvulus</i> -haltigem Knotenmaterial	29
2.3.1.2.	DNA-Isolation aus Filarien der Spezies <i>L. sigmodontis</i> und <i>A. viteae</i>	31
2.3.2.	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.3.3.	Oligonukleotidsynthese	31
2.3.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.3.4.1.	Amplifikation der 16S rDNA	33
2.3.4.2.	Amplifikation der 5S rDNA	34
2.3.5.	DNA-Gelelektrophorese	34
2.3.6.	Gelreinigung von DNA-Fragmenten	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.7.	Klonierung von DNA-Fragmenten	36
2.3.8.	Automatische DNA-Sequenzierung	36
2.3.9.	Herstellung kompetenter Bakterien	37
2.3.10.	Transformation von Bakterien	38
2.3.11.	PCR zur Verifizierung positiver Kolonien	39
2.3.12.	Miniplasmidpräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	39
2.3.13.	Kompetitoren für die semiquantitative PCR	40
2.3.13.1.	Herstellung der Kompetitoren für die 16S rDNA-, bzw. 5S rDNA-PCR	40
2.3.13.2.	Amplifikation eines 101bp-DNA-Fragments	40
2.3.13.3.	Insertion des 101 bp-DNA-Fragments	41
2.3.13.3.1.	Insertion des 101 bp-DNA-Fragments in die 16S rDNA- und 5S rDNA	41
2.3.14.	Durchführung der semiquantitativen PCR	42
2.4.	Statistische Analyse	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Molekularbiologische Detektion der Wolbachien-DNA in Filarien	44
3.1.1.	Spezifischer Nachweis der Wolbachien-DNA in den Filarienspezies <i>L. sigmodontis</i> und <i>O. volvulus</i> mit 16S rDNA-bindenden Oligonukleotiden	44
3.1.2.	Untersuchungen in Filarien der Spezies <i>O. volvulus</i>	45
3.1.2.1.	Die Behandlung mit Ivermectin beeinflusst nicht die Viabilität der Wolbachien in den <i>O. volvulus</i> Filarien	45
3.1.2.2.	Die Behandlung mit Doxycyclin führt zu einer deutlichen Reduktion der Wolbachien in der humanen Onchozerkose	47
3.1.3.	Untersuchungen in Filarien der Spezies <i>L. sigmodontis</i>	50
3.1.3.1.	Die Tetracyclin-Behandlung von <i>L. sigmodontis</i> -infizierten BALB/c Mäusen führt zu einer Reduktion der Wolbachien	51
3.1.3.2.	Depletion der Wolbachien bei <i>L. sigmodontis</i> -infizierten BALB/c Mäusen nach Behandlung mit Rifampicin und Doxycyclin	52
3.2.	Deutliche Einschränkung der Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle von Antibiotika-behandelten Mäusen	56
3.3.	Abhängigkeit der Neutrophilenantwort in <i>L. sigmodontis</i> -infizierten	58

	BALB/c Mäusen von den Zytokinen IL-5 und IFN- γ	
3.3.1.	Reduktion der Neutrophilen- und Eosinophilenakkumulation in der Pleurahöhle von IL-5 KO Mäusen	59
3.3.1.1.	Neutrophilenaktivierende Zytokine sind reduziert in IL-5-defizienten Mäusen	61
3.3.2.	IL-5 KO Mäuse haben eine deutlich erhöhte Suszeptibilität für <i>L. sigmodontis</i> -Infektionen	63
3.3.3.	IFN- γ , aber nicht IL-5-Defizienz, führt zu einer reduzierten Phagozytoseaktivität der Neutrophilen	65
3.4.	TNF- α allein kontrolliert nicht die Immunantwort bei <i>L. sigmodontis</i> Infektionen	66
3.5.	Die Rolle von IL-5 im Vergleich zu IL-4 und dem IL-4 Rezeptor α für die Immunantwort	67
3.5.1.	IL-4 KO Mäuse haben eine reduzierte Eosinophilenakkumulation und eine erhöhte Neutrophilenakkumulation	68
3.5.2.	IL-4- oder IL-4 Rezeptor α -Defizienz führt nicht zu einer erhöhten Adultwurmlast	70
3.5.3.	IL-5 KO Mäuse zeigen eine reduzierte Akkumulation der B1- und B2-Zellen in der Pleurahöhle und eine reduzierte Konzentration Phosphorylcholin (PC)-spezifischer IgM Antikörper im Serum	72
3.5.4.	IL-5- und IL-4-Defizienz führen zu deutlich erhöhten Mikrofilarienlasten	73
3.5.4.1.	IL-4- und IL-4 Rezeptor α -Defizienz haben einen vergleichbaren Einfluß auf die Mikrofilariämie	77
3.5.4.2.	Die Mikrofilariämie ist erhöht in IL-5 KO Mäusen, aber nicht in BALB/c-IL-4 KO, BALB/c-IL-4R α KO und BALB/c Mäusen nach der intraperitonealen Injektion von Mikrofilarien	78
3.5.6.	Eine erhöhte NO-Produktion der Makrophagen aus IL-4 KO Mäusen hat keinen Einfluß die Viabilität der Mikrofilarien	81
3.5.7.	IL-4-Defizienz führt zur Inhibition der IgE Produktion	81
4.	Diskussion	83
4.1.	Wolbachien	83

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.	Wolbachien als Zielstruktur einer innovativen Chemotherapie bei der Onchozerkose	83
4.1.2.	Elimination der Wolbachien in tierexperimentellen Untersuchungen	84
4.1.3.	Anwendung der Doxycyclin-Therapie in der humanen Onchozerkose	86
4.2.	Bedeutung der Wolbachien für die Neutrophilenakkumulation	90
4.3.	Untersuchung muriner Abwehrmechanismen bei <i>L. sigmodontis</i> -Infektionen	92
4.3.1.	Bedeutung der Th2-Zytokine für die Immunantwort während der Wurmentwicklung	92
4.3.2.	Einfluß der IL-4-, IL-4 R α - und IL-5-Defizienz auf die Persistenz der adulten Würmer	95
4.3.3.	Die Mikrofilariämie wird von IL-4- und IL-5-abhängigen Prozessen kontrolliert	98
5.	Zusammenfassung	103
6.	Literaturverzeichnis	107
7.	Anhang	

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Nematoden

1.1.1. Nematoden

Der Stamm der Nematoden besteht aus etwa 16000 bekannten Arten, die Biotope im Salz- und Süßwasser und im Boden besiedeln. Ein Teil der Nematoden lebt parasitisch in Pflanzen, Tieren und Menschen. Die Nematoden sind zylindrisch bis fadenartig gestaltet. Die Morphologie der Nematoden ist gekennzeichnet durch einen Hautmuskelschlauch, der aus der Kutikula, der Hypodermis und der Längsmuskulatur besteht. Die Kutikula kleidet den ektodermalen Vorder- und Enddarm und die Vagina und den Exkretionsporus aus. Eine Besonderheit der Nematoden ist, dass die nicht zur Kontraktion befähigten Ausläufer der Längsmuskulatur zu den in der dorsalen und ventralen Leiste gelegenen Nervenstängen ziehen. Als Exkretionssysteme lassen sich morphologisch verschiedene Organe unterscheiden. Die Renette bezeichnet ein Drüsensystem, welches das Exkretionssystem freilebender Nematoden darstellt. Die H-Zelle ist ein Kanalsystem, das eine Weiterentwicklung der Renette darstellt und besonders bei parasitierenden Nematoden vorkommt (Mehlhorn & Piekarski, Grundriss der Parasitenkunde).

1.1.2. Nematoden als Krankheitserreger

138 der bekannten Nematodenarten sind humanpathogen und parasitieren in weiten Teilen Afrikas, Asien und Südamerikas (Thomas & Lawrence, 1995). Diese humanpathogenen Arten haben eine bedeutende Rolle, weil die infizierten Menschen oft nicht mehr leistungsfähig sind und somit keinen oder nur einen geringen Teil ihrer Arbeitsfähigkeit bereitstellen können.

1.2. Filarioidea

Die Superfamilie der Filarioidea, die zum Stamm der Nematoden gehört, umfaßt die beiden Familien Filariidae und Onchocercidae, zu denen die wichtigsten humanpathogenen Arten *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* und *Loa loa* gehören. Die nach der Infektion entstehende Erkrankung wird als Filariose bezeichnet. Die Übertragung der Filarien auf den Endwirt ist obligat an blutsaugende Arthropodenvektoren

1. Einleitung

gebunden, wie z. B. Fliegen, Mücken, Milben und Zecken. Die als Flußblindheit bezeichnete Erkrankung wird durch *O. volvulus* hervorgerufen. Die Erkrankung, von der etwa 18 Millionen Menschen betroffen sind, ist eine reine Anthroponose, bei der es kein tierisches Erregerreservoir gibt (Weekly Epidemiological Record, 1999). Eine Infektion kann durch die Detektion von Mikrofilarien diagnostiziert werden. Die Mikrofilarien werden von den weiblichen Filarien produziert und befinden sich in der Haut. Bei einer Blutmahlzeit nimmt der Zwischenwirt, bei *O. volvulus* sind es Kriebelmücken der Gattung *Simulium*, Mikrofilarien aus den infizierten Personen auf. Im Insektenvektor wandern die Mikrofilarien vom Mitteldarm in die Thoraxmuskulatur ein, in der sie nach zweimaliger Häutung innerhalb von 2 Wochen zu der für den Menschen infektiösen L3 Larve heranreifen. Nach der Infektion eines Menschen während einer nachfolgenden Blutmahlzeit wandern die Larven in das Unterhautbindegewebe ein, wo sie sich innerhalb weniger Monate nach 2 weiteren Häutungen in adulte weibliche und männliche Filarien entwickeln (Thomas & Lawrence, 1995). Mehrere Männchen und Weibchen können in einer bindegewebsartigen Kapsel eingeschlossen sein, die als Knoten oder Onchozerkom bezeichnet wird. Die Abkapselung schützt die Würmer weitgehend vor immunologischen Reaktionen des Wirts, ohne dass dabei die Versorgung mit Nährstoffen unterbrochen wird. Die Würmer haben eine Lebenserwartung von etwa 15 Jahren (Roberts et al., 1967), und die Weibchen können in dieser Zeit bis zu 50.000 Mikrofilarien täglich produzieren (Duke, 1993).

Die Loiasis wird durch die Wanderfilarie *L. loa* ausschließlich in Primaten hervorgerufen. Als Überträger fungieren Bremsen der Gattung *Chrysops*. Anders als bei *O. volvulus* wandert die adulte Filarie von *L. loa* im Unterhautbindegewebe umher und kann bei diesen Wanderungen Schwellungen hervorrufen (sogenannte Kalabar Schwellung). Von einer Infektion sind etwa 33 Millionen Menschen betroffen.

Von der lymphatischen Filariose, die durch die Infektion mit Filarien der Spezies *W. bancrofti* und *B. malayi* ausgelöst wird, sind weltweit etwa 120 Millionen Menschen betroffen. Eine Besonderheit ist, dass die Mikrofilaren von *W. bancrofti* und *B. malayi* nur nachts im peripheren Blut auftauchen und dabei von den nachts saugenden Mücken der Gattung *Culex*, *Aedes* und *Anopheles* aufgenommen werden.

Die Verbreitung der humanen Filariosen ist assoziiert mit der Verbreitung der spezifischen Vektoren.

1. Einleitung

1.2.1. Pathologie von Filarienerkrankungen

Das Spektrum der klinischen Symptome bei der Filariose reicht von vollkommen asymptomatischen Verläufen bis zu lebensbedrohlichen Zuständen. Charakteristisch für das pathologische Bild bei der lymphatischen Filariose ist die Blockade der Lymphgefäße durch adulte Würmer der Spezies *W. bancrofti* und *B. malayi*, die zur Bildung von großflächigen Lymphödemen und Elefantiasis führen können. Außerdem kann es zu einer Schädigung der Nieren und der Lymphgefäße kommen (WHO, 1997). Bei der Onchozerkose können Mikrofilarien ins Auge einwandern und durch die Auslösung immunologischer Prozesse zur Erblindung der infizierten Personen führen (Nelson, 1970 & Burchard et al., 1979). Außerdem kann es zu juckenden Hautausschlägen, Faltenbildung und Depigmentierung der Haut und zur Lymphadenitis kommen (WHO, 1995).

1.2.2. Behandlung von Filarienerkrankungen

Eines der wichtigsten Medikamente, das zur Behandlung der lymphatischen Filariose eingesetzt wird, ist DEC (Diethylcarbamazin) (Dreyer et al., 1994). Ivermectin wird zur Behandlung der Onchozerkose verwendet (Richards et al., 1989). Beide Medikamente führen zu einer drastischen Reduktion der Mikrofilarien im Menschen und die Behandlung mit DEC wirkt zum Teil makrofilarizid. Die Medikamente müssen mindestens einmal pro Jahr über einen Zeitraum von 20 Jahren gegeben werden, um die Transmissionsrate signifikant zu reduzieren (Ottesen & Ramachandran, 1995).

Eine Studie, bei der in Ghana Onchozerkose-Patienten mit Doxycyclin behandelt wurden, könnte dabei mithelfen neue Strategien im Kampf gegen die Onchozerkose und die lymphatische Filariose zu entwickeln (Hoerauf et al., 2000b). Die Bedeutung und die Anwendungsmöglichkeiten der Doxycyclin-Behandlung als neues Therapiekonzept wird in den Ergebnissen und in der Diskussion dieser Dissertation dargestellt.

1.2.3. Bedeutung von Tiermodellen für die Untersuchung immunologischer Zusammenhänge bei Filarieninfektionen

Bedingt durch die Wirtsspezifität der pathogenen Filarien und die Komplexität der Lebenszyklen, wurde die Etablierung von geeigneten Tiermodellen zur Untersuchung der humanen Onchozerkose und der lymphatischen Filariose erschwert. In den bestehenden

1. Einleitung

semipermissiven Tiermodellen konnte nur die Immunantwort gegen einzelne Entwicklungsstadien der Filarien experimentell analysiert werden. Das ideale Tiermodell mit humanpathogenen Parasiten würde es ermöglichen, die gesamte Krankheit mit allen pathologischen und immunologischen Aspekten von Beginn der Infektion über Präpatenz- und Patenzphase in einer geeignet großen Anzahl von Labortieren zu untersuchen (Vanamail et al., 1989).

1.2.3.1. Die Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* (Chandler, 1932) im Mausmodell

Die Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* ist die einzige Filarie, die sich in immunkompetenten BALB/c-Mäusen von infektiösen L3 Larven in mikrofilarienproduzierende Adultwürmer entwickelt (Petit et al., 1992) und somit können alle Entwicklungsstadien des Parasiten während einer Infektion untersucht werden. Der Vorteil gegenüber den semipermissiven Filarienmodellen ist außerdem, dass nicht nur die Immunantwort gegen L3 Larven analysiert werden kann, wie z. B. bei Modellen mit *O. volvulus* (Lawrence et al., 1994 & Johnson et al., 1998), sondern auch gegen die sich aus den L3 Larven entwickelnden Adultwürmer. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass in dem permissiven Modell sowohl die Immunantwort gegen die Mikrofilarien als auch gegen die Adultwürmer untersucht werden kann, die die Mikrofilarien „gebären“. Somit können auch immunsuppressive Mechanismen seitens der adulten Wurmweibchen analysiert werden, die die Viabilität der Mikrofilarien im Endwirt erhöhen und somit auch die Chancen der Transmission verbessern.

L. sigmodontis gehört zu der Familie der Onchocercidae und weist viele Gemeinsamkeiten mit den humanpathogenen Filarien auf, wie z. B. Larvenmigration, die Genomstruktur und immunologische Kreuzreaktionen (Xie et al., 1994).

Der natürliche Endwirt von *L. sigmodontis* ist die Baumwollratte (*Sigmodon hispidis*). In der Baumwollratte können bis zu 10.000 Mikrofilarien/ μ l Blut detektiert werden. Während einer Blutmahlzeit an infizierten Ratten nimmt die Milbe (*Ornithonyssus bacoti*), die als Zwischenwirt dient, Mikrofilarien auf. Die Mikrofilarie durchbricht die Darmwand der Milbe und wandert in die Thoraxmuskulatur ein, in der sie sich innerhalb von etwa 10 Tagen nach 2 Häutungen in die L3 Larve entwickelt. Die für den Endwirt infektiöse L3 Larve wandert beim nächsten Saugakt aktiv über die Mundwerkzeuge in den Stichkanal ein. Im Endwirt wandert die L3 Larve über die lymphatischen Gefäße zum Herzen und gelangt von dort über das Blutgefäßsystem in die Lunge und dann in die Pleurahöhle

1. Einleitung

(Maréchal et al., 1996). Nach etwa 10 Tagen befinden sich hier 90 % aller Larven, die sich zu der intermediären L4 Larve weiterentwickelt haben. Nach 25 bis 33 Tagen erreichen die Würmer das Adultstadium. Die Weibchen produzieren Mikrofilarien, die vom Tag 50 bis Tag 80 nach Beginn der Infektion im Blut detektiert werden können. Die Infektion endet mit der Einkapselung der adulten Würmer durch inflammatorische Zellen.

1.2.3.2. Bedeutung der Lymphozyten in der Immunantwort in semipermissiven und permissiven Modellen der Filariose

Lymphozyten, insbesondere T- und B-Zellen übernehmen bei der Abwehr von Filarienerkrankungen eine wichtige Funktion. Die Bedeutung der zellvermittelten Immunität konnte in Mäusen nachgewiesen werden, die resistent gegen verschiedene Filarieninfektionen sind. Im folgenden soll die Rolle der Lymphozyten in der Immunantwort in semi- und nichtpermissiven Modellen der Filariose und im permissiven Modell mit *L. sigmodontis* dargestellt werden

1.2.3.2.1. Bedeutung der T-Zellen

Die Bedeutung von T-Zellen für die Abwehr von Filarieninfektionen konnte durch die Verwendung von Mäusen gezeigt werden, denen diese Zellen fehlten. In Transplantationsexperimenten mit *B. malayi* und *B. pahangi* zeigte sich, dass Nacktmäuse, denen T-Zellen fehlen (Suswillo et al., 1980; Vincent et al., 1980) und SCID-Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen (Nelson et al., 1991), im Gegensatz zu Wildtypmäusen permissiv waren für diese Parasiten. Die Depletion der B-Zellen allein reichte nicht aus, um die Resistenz gegen *B. malayi*-Infektionen aufzuheben. In dem *B. malayi*-BALB/c Mausmodell konnte Immunität mit Th1.2⁺ Zellen, aber nicht mit B-Zellen transferriert werden (Hayashi et al., 1984). Das Fehlen von CD8⁺-Zellen führte in Versuchen mit β 2-Microglobulinen-defizienten Mäusen nicht zu einem Verlust der Resistenz bei Infektionen mit *B. malayi* (Rajan et al., 1992). Die Depletion von CD8⁺-Zellen in BALB/c Mäusen hatte auch bei einer Reinfektion mit Mikrofilarien von *O. lienalis* keinen Verlust der Resistenz zur Folge (Folkard et al., 1995). Bei BALB/c Mäusen, die mit *L. sigmodontis* infiziert wurden, konnte nach der Depletion der CD8⁺-Zellen keine erhöhte Wurmlast festgestellt werden (Korten et al., 2002).

1. Einleitung

CD4⁺-Zellen waren dagegen essentiell für die Immunantwort gegen Filarien. Dies konnte bei Infektionen mit *B. malayi* gezeigt werden (Babu et al., 1999). In Experimenten mit *B. pahangi* führte die Depletion der CD4⁺-Zellen zu einer verlängerten Persistenz der Parasiten (Bancroft et al., 1994). Die Depletion der CD4⁺-Zellen durch Antikörper führte in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen zu einer deutlich erhöhten Adultwurmlast und zu einer erhöhten und längeranhaltenden Mikrofilariämie (Al-Qaoud et al., 1997).

Versuche mit ursprünglich resistenten C57BL/6-Mäusen zeigten, dass MHC II-defiziente Mäuse nach der intravenösen Injektion von *L. sigmodontis* Mikrofilarien eine deutlich erhöhte und verlängerte Mikrofilariämie hatten, die mehr als 140 Tage anhielt. C57BL/6 Wildtypmäuse waren dagegen schon nach 2 Tagen nicht mehr mikrofilariämisch (Hoffmann et al., 2001). MHC II KO Mäuse, die nahezu keine CD4⁺-Zellen haben, waren auch nicht resistent gegen die Entwicklung von *L. sigmodontis* L3 Larven zu patenten Adultwürmern (Hoffmann et al., 2001).

Zusammenfassend läßt sich über die dargestellten Ergebnisse sagen, dass CD8⁺-Zellen im Gegensatz zu CD4⁺-Zellen nur eine untergeordnete Rolle in der Immunität gegen verschiedene Filarien hatten.

1.2.3.2.2. B-Zellen

Bei den B-Zellen wird in B1- und B2-Zellen unterschieden. Besonders die B1-Zellen übernehmen eine wichtige Funktion in der Resistenz gegen viele Filarienerkrankungen. Studien mit CBA/N Mäusen, die defizient für B1-Zellen sind, waren im Gegensatz zu CBA/H, die über eine normale B1-Zellpopulation verfügen, nicht in der Lage eine Infektion mit Mikrofilarien von *B. malayi* oder adulten Würmern von *A. viteae* zu beseitigen (Thompson et al., 1979). Ebenso persistierten auch L3 Larven von *B. pahangi* deutlich länger in CBA/N Mäusen als in CBA/H Mäusen (Paciorkowski et al., 2000). BALB/c Mäuse waren in der Lage *B. pahangi* L3 Larven innerhalb von 6 Tagen nach der Infektion abzutöten (Bancroft et al., 1993a). Es zeigte sich, dass dafür Phosphorycholin-spezifische Antikörper verantwortlich waren. Dabei handelte es sich um IgM-Antikörper. Die Phosphorycholin-spezifischen Antikörper wurden in naiven Mäusen nachgewiesen und nahmen in den ersten Wochen der Infektion zu, bevor antigenspezifische IgG-Antikörper detektiert werden konnten (Al-Qaoud et al., 1998). Phosphorycholin ist ein Phospholipid, das auf der Oberfläche von Filarien vorhanden ist (Maizels et al., 1989). In BALB.Xid

1. Einleitung

Mäuse, die keine IgM-Antikörper-produzierenden B1-Zellen haben, entwickelten sich deutlich mehr L3 Larven von *L. sigmodontis* zu adulten Würmern. Außerdem waren BALB.Xid Mäuse durch eine deutlich erhöhte und verlängerte Mikrofilariämie gekennzeichnet (Al-Qaoud et al., 1998). B-Zell KO Mäuse, die defizient sind für B1 und B2-Zellen, entwickelten dagegen nach der Infektion mit *L. sigmodontis* eine Immunantwort, die vergleichbar war mit der in BALB/c Mäusen (Martin et al., 2001 & Saftel, 2001).

Diese Daten zeigen, dass B1-, aber nicht B2-Zellen eine wichtige Funktion in der Immunantwort bei primären Infektionen übernehmen.

1.2.3.3. Die Rolle der Zytokine in der Immunantwort

Die Untersuchung von Würminfektionen in verschiedenen Mausmodellen zeigte, dass entweder Th1- (Rajan et al., 1996) oder Th2-vermittelte (Bancroft et al., 1994; Johnson et al., 1998 & Lange et al., 1994) Mechanismen protektiv waren.

Experimente mit L3 Larven von *B. malayi* in IL-4- und auch IFN- γ -defizienten BALB/c Mäusen zeigten, dass beide Zytokine eine wichtige Funktion in der Immunantwort übernehmen (Babu et al., 2000).

Untersuchungen mit *L. sigmodontis* in BALB/c Mäusen wiesen darauf hin, dass sowohl Th1- als auch die Th2-generierten Zytokine an der Immunantwort und der Kontrolle der Parasiten beteiligt sind. Im folgenden wird die Bedeutung der Zytokine im permissiven Mausmodell mit *L. sigmodontis* und in semi- und nichtpermissiven Modellen dargestellt.

1.2.3.3.1. Bedeutung der Th2-Zytokine

In Untersuchungen mit Würmern konnte gezeigt werden, dass Th2-vermittelte Mechanismen mit einer protektiven Immunantwort assoziiert sind. Bei Untersuchungen mit *B. malayi* lösten L3 Larven und adulte Würmer eine starke Th2-Antwort aus (Osborne et al., 1996). Diese Th2-Antwort konnte eine gegen Mikrofilarien aufkommende Th1-Antwort überlagern (Lawrence et al., 1994). Bei Infektionen mit *B. malayi* führte die IL-4-Defizienz zu einem verlängerten Überleben der Würmer (Babu et al., 2000).

Sowohl IL-4 als auch IL-5 waren in eine protektive Immunantwort gegen L3 Larven von *O. volvulus* in immunisierten Mäusen involviert (Lange et al., 1994). In Experimenten mit Mikrofilarien von *O. lienalis* war die Immunität dagegen nur IL-5-vermittelt (Hogarth et

1. Einleitung

al., 1999). IL-4 KO Mäuse waren sogar in der Lage Mikrofilarien von *O. lienalis* schneller abzutöten als Wildtypmäuse (Hogarth et al., 1995). IL-4 KO Mäuse, die zusätzlich mit anti-IL-5 Antikörpern behandelt wurden, verloren dagegen ihre Resistenz in dem gleichen Filarienmodell (Hogarth et al., 1998).

Die Infektion mit *L. sigmodontis* führte in der frühen Phase der Infektion zunächst zu einer Th2-Antwort. Bei Infektionen mit *L. sigmodontis* zeigte sich, dass nach der Depletion von CD4⁺-Zellen die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 deutlich reduziert waren und dadurch die Immunantwort gegen alle Entwicklungsstadien des Parasiten supprimiert war (Al-Qaoud et al., 1997). BALB.Xid-Mäuse waren in der frühen Phase der Infektion ebenfalls durch eine deutlich reduzierte IL-10 Konzentration gekennzeichnet (Al-Qaoud et al., 1998). In Versuchen mit IL-10 KO Mäusen wurde allerdings nach der Injektion von Mikrofilarien eine deutlich kürzere Mikrofilariämie als in den Wildtypmäusen beobachtet (Hoffmann et al., 2001).

In weiteren Experimenten mit *L. sigmontis* in verschiedenen Mausstämmen wurde die Bedeutung von IL-5 für die Immunantwort während der Wurmentwicklung und der Patenzphase deutlich. Die Neutralisation von IL-5 in BALB/c Mäusen durch Antikörper führte zu einer deutlich höheren Adultwurmlast und Mikrofilariämie in der Patenzphase der Infektion (Al-Qaoud et al., 2000). In der frühen Phase der Infektion war IL-5 nur in immunisierten, aber nicht in naiven BALB/c und C57BL/6 Mäusen an der Bildung einer protektiven Immunantwort beteiligt. Wildtypmäuse waren dabei im Gegensatz zu IL-5 KO Mäusen, bzw. anti-IL-5-behandelten BALB/c Mäusen in den ersten 2 Tagen der Infektion durch eine deutlich stärkere Abtötung der L3 Larven gekennzeichnet (Le Goff et al., 2000a & Martin et al., 2000a), während die Neutralisation von IL-5 in den darauffolgenden 2 Monaten keinen weiteren Einfluß auf die Wurmviabilität hatte (Al-Qaoud et al., 2000 & Martin et al., 2000a). Bei IL-5-Transgenen Mäusen kam es dagegen schon bei der primären Infektion in der präpatenten Phase nach 4 Wochen Infektionsdauer zu einer deutlich stärkeren Einkapselung und nachfolgenden Abtötung der Würmer als bei den Wildtypmäusen (Martin et al., 2000b).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass IL-5 bei den meisten Filarieninfektionen eine essentielle Rolle in der Immunantwort übernahm, und dass IL-4 in semi- und nichtpermissiven Systemen an einer protektiven Immunantwort gegen einige Entwicklungsstadien der Parasiten beteiligt war (Babu et al., 2000; Lange et al., 1994 & Johnson et al., 1998).

1. Einleitung

Die Verwendung von IL-4 Rezeptor α -Ketten KO Mäusen ermöglicht die Untersuchung von IL-4- und IL-13-abhängigen Effektorfunktionen (Brombacher, 2000 & Zurawski et al., 1994), weil die rezeptorvermittelte Funktion beider Zytokine inhibiert ist (Hilton et al., 1996; Mohrs et al., 1999 & Nelms et al., 1999). In Versuchen mit der Trematodenart *Schistosoma mansoni* war die Resistenz von infizierten Mäusen nicht aufgehoben, wenn IL-4 fehlte (Hoffmann et al., 1999 & King et al., 1996). Dagegen konnte in IL-4 Rezeptor α -Ketten KO Mäusen gezeigt werden, dass IL-13 wichtig war für die Kontrolle der Infektion (Mountford et al., 2001).

1.2.3.3.2. Bedeutung der Th1-Zytokine

In diesem Abschnitt soll die Bedeutung der Th1-Zytokine für die Immunantwort bei einigen Filarieninfektionen dargestellt werden. Die Gabe von IL-12 führte bei Versuchen mit Mikrofilarien von *O. lienalis* zu einer deutlichen Reduktion der IL-4 Produktion, aber es hatte keinen Einfluß auf die IL-5-vermittelte Immunität in diesem Modell (Hogarth et al., 1999). Wie bereits im Abschnitt 1.2.3.3. angedeutet, war IFN- γ wichtig für die Kontrolle der Entwicklung von *B. malayi* L3 Larven zu adulten Würmern (Babu et al., 2000).

In Experimenten mit *L. sigmodontis* hatte IFN- γ keine Bedeutung für die Immunantwort während der Etablierung der Infektion in BALB/c Mäusen (Al-Qaoud et al., 1997 & Saefel et al., 2001). Dagegen war IFN- γ essentiell für die Abkapselung der adulten Würmer und die Abtötung der Mikrofilarien während der Patenzphase (Saefel et al., 2001). Experimente mit IL-12 KO Mäusen, die nach der Infektion mit *L. sigmodontis* keine erhöhte Suszeptibilität hatten, wiesen darauf hin, dass schon geringe IFN- γ -Konzentrationen ausreichten, um die protektive Immunantwort wiederherzustellen (Saefel et al., 2001). IFN- γ hatte bei der Immunantwort gegen *L. sigmodontis*-Infektionen eine ähnlich wichtige Bedeutung wie IL-5, weil beide Zytokine die Produktion von TNF- α und G-CSF, bzw. GM-CSF kontrollierten (Al-Qaoud et al. & 2000; Saefel et al., 2001). TNF- α und G-CSF übernahmen dabei eine wichtige Funktion in der Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die essentiell für die Abtötung der adulten Filarien waren. Diese Daten zeigen, dass an der Kontrolle von *L. sigmodontis*- und *B. malayi*-Infektionen nicht nur Th2-, sondern auch Th1-Zytokine beteiligt waren.

1. Einleitung

1.2.3.4 Die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten als wichtige Bestandteile der Immunantwort

An den zellulären inflammatorischen Prozessen gegen adulte Filarien, die bei Infektionen mit *L. sigmodontis* durch Th1- und Th2-Zytokine induziert wurden, waren Eosinophile und Neutrophile entscheidend beteiligt (Al-Qaoud et al., 2000, Martin et al., 2000a & 2000b; Saeftel et al., 2001). Im folgenden wird die Bedeutung der Granulozyten in diesem permissiven und in semi- und nichtpermissiven Modellen dargestellt.

1.2.3.4.1. Bedeutung der Eosinophilen

Die Lebensspanne der Eosinophilen im Blut beträgt etwa 18 Stunden (Teixera et al., 1995) und im gesunden Gewebe mehrere Tage (Weller et al., 1991 & Iversen et al., 1997). IL-5 ist dabei ein stabilisierender Faktor, ohne den Eosinophile nach 72 Stunden apoptotisch werden (Stern et al., 1992).

Helmintheninfektionen sind häufig durch eine Eosinophilie charakterisiert (Coffman et al., 1989). Es zeigte sich, dass die Reifung und die Gewebeeinfiltration der Eosinophilen abhängig war von IL-5. Eine IL-5-abhängige Abtötung durch Eosinophile konnte in Versuchen mit Mikrofilarien von *O. lienalis* festgestellt werden (Lange et al., 1994 & Folkard et al., 1996).

Die Depletion von CD4⁺-Zellen durch Antikörper führte in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der Eosinophilen, sowohl im Blut als auch in der Pleurahöhle, dem Aufenthaltsort der adulten Filarien (Al-Qaoud et al., 1997). Im Gegensatz dazu waren unbehandelte Mäuse schon 2 bis 3 Tage nach der Infektion durch eine starke Akkumulation von Eosinophilen in der Pleurahöhle gekennzeichnet, die während der gesamten Infektionsdauer anhielt (Al-Qaoud et al., 2000).

Nach der Neutralisation von IL-5 durch die Injektion von Antikörpern zeigten *L. sigmodontis*-infizierte BALB/c Mäuse während der Wurmentwicklung und der Adultwurmpersistenz eine deutlich reduzierte Eosinophilenakkumulation in der Pleurahöhle (Al-Qaoud et al., 2000). Allerdings führte die reduzierte Eosinophilenakkumulation in der frühen Phase der Infektion zu keiner Beeinträchtigung der Immunantwort gegen die Filarien. Die Bedeutung von IL-5 und der Eosinophilen in der Immunabwehr gegen L3 Larven in diesem Modell konnte in immunisierten Mäusen gezeigt werden, wobei die ins subkutane Gewebe eingewanderten L3 Larven durch die

1. Einleitung

Adhärenz von Eosinophilen immobilisiert und innerhalb von 2 Tagen durch die Freisetzung toxischer Produkte abgetötet wurden (Le Goff et al., 1997, 2000a & 2000b; Martin et al., 2000a). Bei diesen Prozessen war die Degranulation der Eosinophilen und die Abtötung der Larven abhängig von der Präsenz spezifischer Antikörper (Martin et al., 2001).

1.2.3.4.2. Bedeutung der Neutrophilen

In *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen zeigte sich, dass Neutrophile essentiell an der Abkapselung und Abtötung der adulten Würmer beteiligt waren (Al-Qaoud et al., 2000 & Saeftel et al. 2001). Anti-IL-5-behandelte BALB/c (Al-Qaoud et al., 2000) und IFN- γ KO Mäuse (Saeftel et al., 2001), die eine deutliche Einschränkung in der Produktion von Zytokinen zeigten, die chemotaktisch auf Neutrophile wirken, waren durch eine stark verringerte Knotenbildung und Wurmabtötung gekennzeichnet.

1.3. Bedeutung der Wolbachien für die Neutrophilenakkumulation

Im Gegensatz zu vielen anderen Helmintheninfektionen waren Neutrophile bei der humanen Filariose (Greene et al., 1981 & Johnson et al., 1994) und bei der murinen Filariose (Al-Qaoud et al., 2000 & Saeftel et al., 2001) an der Immunantwort beteiligt. Immunhistologische Untersuchungen der Knotenstruktur zeigten, dass die Neutrophilen sowohl bei der Onchozerkose (Rubio de Krömer et al., 1998 & Wildenburg et al., 1997) als auch bei Infektionen mit *L. sigmodontis* (Al-Qaoud et al., 2000) die innere Lage des Knoten in der Kontaktzone zum Wurm bildeten. An dieser Neutrophilenakkumulation bei Onchozerkose-Patienten waren die Wolbachien, Endosymbionten in den Filarien (Hoerauf et al., 2000b), entscheidend beteiligt (Brattig et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Aktivierung der Monozyten mit bakteriellen Bestandteilen aus den Filarien (Agarwal et al., 1995; Brattig et al., 2000 & Brattig et al., 2001; Taylor et al., 2000b) wie z. B. LPS, und ihre Produktion chemotaktischer Faktoren für die Akkumulation der Neutrophilen essentiell waren (Brattig et al., 2001). Die Chemotaxis der Neutrophilen wurde nicht durch LPS (Brattig et al., 2001), aber neben den chemotaktischen Zytokinen wie TNF- α und IL-8 (Brattig et al., 2001) durch andere bakterielle Strukturen, wie z. B. N-formyl-Methionyl Peptide (Rubio de Krömer et al., 1998; Schiffmann et al., 1975 & Schröder, 2000) ausgelöst. Die Freisetzung von

1. Einleitung

bakteriellen Bestandteilen aus Wolbachien bei der Geburt von Mikrofilarien aus dem Uterus der adulten Filarien, könnte dabei ein besonderer Stimulus sein (Taylor & Hoerauf, 1999 & Taylor et al., 2000b).

Im folgenden soll die Struktur und die Relevanz der Wolbachien für die Filarien und die Filarienerkrankungen näher dargestellt werden.

1.4. Wolbachien

1924 wurden Wolbachien zum ersten Mal beschrieben (Hertig & Wolbach, 1924) und in verschiedenen Ordnungen der Arthropoden nachgewiesen, wie z. B. in Insekten, Isopoden und Milben. In Insekten konnten sie in 15 bis 20 % der untersuchten Arten diagnostiziert werden (Werren, 1997). Wolbachien gehören zur Ordnung der Rickettsiales (Werren & O'Neill, 1997). Die Gruppe der Wolbachien ist polyphyletisch, und sie sind phylogenetisch verwandt mit den Gattungen *Anaplasma*, *Cowdria* und *Ehrlichia*. Bisher wurden 2 Wolbachienarten näher untersucht, die zu verschiedenen Cladus gezählt werden. Dies sind *Wolbachia pipientis*, die zu der α -2-Subklasse der Proteobakterien gehört, und die γ -Proteobakterienspezies *W. persica*. (O'Neill et al., 1992).

Seit 1975 Jahren wurden diese Bakterien, die auch in Arthropoden intrazellulär leben, in verschiedenen Filarien entdeckt (Casiraghi et al., 2001; Franz & Andrews, 1986; Franz & Büttner, 1983; Henkle-Dührsen et al., 1998; Kozek, 1977; Kozek & Figueroa, 1977; McLaren et al., 1975; Taylor & Hoerauf, 2001; Vincent et al., 1975).

1.4.1. Phylogenie der Wolbachien

Die phylogenetischen Studien der Wolbachien lassen vermuten, dass sich die Entwicklungswege der Arthropoden und Filarien vor mehr als 600 Millionen Jahren voneinander getrennt haben. Die Untersuchungen, die bisher durchgeführt wurden, um die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zu analysieren, beruhen auf einer molekularbiologischen Methodik. Für diese Untersuchung wurden Sequenzen des Gens der kleinen ribosomalen Untereinheit 16s rDNA (Bandi et al., 1998 & Sironi et al., 1995) oder des *ftsZ*-Gens (Werren et al., 1995) miteinander verglichen. Das *ftsZ* -Gen kodiert für ein Protein, das an der Zellteilung beteiligt ist. Vor kurzem wurden diese Analysen durch eine weitere ergänzt, die auf der Untersuchung des *wsp* (wolbachia surface protein)-Gens basiert, das für ein Membranprotein kodiert und somit auf der Oberfläche der Bakterien

1. Einleitung

angesiedelt ist (Bazzocchi et al., 2000 & Casiraghi et al., 2001). Die Sequenzvergleiche ergaben, dass die Wolbachien der Arthropoden zu den Cladus A und B gehören (Masui et al., 1997; Van Meer et al., 1999 & Zhou et al., 1998), während die Wolbachien der Filarien in die Cladus C und D eingeordnet wurden (Bandi et al., 1998; Bazzocchi et al., 2000; Casiraghi et al., 2001). Die Wolbachien der Filarienspezies aus den Gattungen *Dirofilaria*, *Onchocerca* wurden in den Cladus C und die der Gattungen *Brugia* und der Arten *W. bancrofti* und *L. sigmodontis* in Cladus D geordnet, deren phylogenetische Trennung vor etwa 100 Millionen Jahren stattgefunden haben muß (Bandi et al., 1998). Eine weitere Supergruppe von Wolbachien wurde in Termiten entdeckt und wurde in den Cladus E eingeordnet (Lo et al., 2002).

1.4.2. Biologie der Wolbachien und mutualistische Assoziationen in Filarien

Sowohl in Arthropoden als auch bei Nematoden werden die Wolbachien mit dem Zytoplasma der Eizellen vertikal von den Weibchen auf die Nachkommen weitergegeben, und dies führte somit zu einer Vielzahl verschiedener Invertebraten-Prokaryonten-Beziehungen (Bandi et al., 2001 & Werren & O'Neill, 1997).

Nach der Detektion der Wolbachien in den ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bakterien mutualistisch mit den Filarien assoziiert sein könnten (Kozek et al., 1977; Kozek & Figueroa, 1977 & McLaren et al., 1975). Hinweise auf eine Endosymbiontentheorie sind gegeben durch die vertikale Transmission der Bakterien, die in Jahrillionen der Koevolution etabliert wurde (Yamamura et al., 1993). Jüngere elektronenmikroskopische Studien in den Filarien *O. volvulus* und *D. immitis* zeigten, dass die Bakterien einzeln oder in Clustern in doppelmembranumgrenzten Kompartimenten im Zytoplasma der Wirtszellen lokalisiert sind. Die Wolbachien sind ovalförmige 3 bis 6 µm große Organismen. Mithilfe von immunhistologischen Färbungen, in der Antikörper gegen die bakteriellen Proteine Katalase (Henkle-Dührsen et al., 1998), Hitzeschockprotein 60 (HSP 60) von *Yersinia enterocolitica* (Noll et al., 1994) oder von *Wolbachia* aus *O. volvulus* (Koszarski, 1999) oder *Wolbachia*-Oberflächenprotein (wsp, Bazzocchi et al., 2000) verwendet wurden, konnten Bakterien dabei in den Median- und Basalzonen der Lateralleisten der synzytialen Hypodermis in adulten Würmern, in den Oogonien, Oocyten und in allen embryonalen Stadien inklusive der intauterinen Mikrofilarien und der Mikrofilarien im Gewebe nachgewiesen werden (Bazzocchi et al., 2000; Brattig et al., 2001; Büttner et al., 2001;

1. Einleitung

Henkle-Dührsen et al., 1998; Hoerauf et al., 1999; 2000a & 2000b & Koszarski, 1999). In anderen weiblichen Gewebeabschnitte und in den Fortpflanzungsorganen der Männchen wurden bisher keine Bakterien gefunden (Hoerauf, 2000). Es gibt aber auch Filarienspezies, in denen keine Wolbachien nachgewiesen werden konnten. Es handelt sich dabei um die Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae* und die Filarie *Onchocerca flexuosa*, die im Rotwild parasitiert (Brattig et al., 2001; Hoerauf et al., 1999 & Taylor & Hoerauf, 1999).

Bisher ist bekannt, dass die Wolbachien eine wichtige Funktion in der Embryogenese und der Entwicklung der Filarien übernehmen (Hoerauf et al., 1999; 2000a; 2000b & 2001a). Es könnte ihnen aber auch eine Funktion bei der Ernährung und im Stoffwechsel zugeschrieben werden, zumal die Nahrungsaufnahme durch transkutikuläre Prozesse stattfindet und die Bakterien, die in der Hypodermis lokalisiert sind, daran essentiell beteiligt sein könnten (Howells & Chen, 1981). Die in den Bakterien nachgewiesene Katalasefunktion könnte darüber hinaus an enzymatischen Abbauprozessen von Wasserstoffperoxiden des Filarienwirts beteiligt sein, die ansonsten möglicherweise zu einer Schädigung des Wurmtegmentes und somit zu einer Abtötung der Filarien führen könnten (Henkle-Dührsen et al., 1998). Diese Hypothesen könnten durch eine weitere Beobachtung unterstützt werden. Im Rotwild wurden in einzelnen Tieren sowohl die wolbachienpositive Filarienart *Onchocerca jakutensis* als auch die wolbachiennegative *O. flexuosa* nachgewiesen, die durch unterschiedliche Wirt-Parasit-Interaktionen charakterisiert sind. Während *O. flexuosa* schon ein Jahr nach der Infektion vom Wirt eliminiert wurde (Plenge-Bönig et al., 1995), überlebte *O. jakutensis* etwa 20 Jahre. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen in der human-, bzw. tierpathogenen Filarie *O. volvulus*, bzw. *O. ochengi* (WHO, 1997 & Langworthy et al., 2000), die wolbachienpositiv sind. Bei infizierten Rindern, bei denen durch eine Oxytetracyclinbehandlung die Bakterien depletiert wurden, konnten die Filarien innerhalb eines Jahres eliminiert werden (Langworthy et al., 2000).

1.4.3. Rolle der Wolbachien in der Pathogenese der Filariose

In kürzlich publizierten Studien wurde gezeigt, dass Wolbachien wahrscheinlich an der Pathogenese in der lymphatischen Filariose und der Onchozerkose beteiligt sind (Brattig et al., 2000; Cross et al., 2001 & Taylor et al., 2000b; Taylor & Hoerauf, 1999 & 2001).

1. Einleitung

Stimulationsexperimente im Tiermodell mit löslichen Extrakten der humanpathogenen Filarie *B. malayi* führten zur Produktion von TNF- α , IL-1 β und NO aus Makrophagen (Nelson et al., 1991 & Vincent et al., 1984). Als verantwortliche Substanz konnte LPS ausgemacht werden (Brattig et al., 2001 & Taylor et al., 2000b). In *in vitro* Studien konnte dieser Befund in Kulturen mit humanen Monozyten bestätigt werden, indem LPS durch die Bindung an CD14 aktivierend wirkte (Brattig et al., 2000). Dagegen konnte in Versuchen mit Extrakten der wolbachiennegativen Nagetierfilarie *A. viteae* diese aktivierende Wirkung auf Monozyten nicht nachgewiesen werden (Taylor & Hoerauf, 1999; Taylor et al., 2000b). In *in vitro* Versuchen mit lebenden wolbachienpositiven Filarien konnte ebenfalls keine aktivierende Wirkung beobachtet werden (Taylor et al., 2000b), was darauf schließen läßt, dass inflammatorische Reaktionen erst nach dem Tod der Parasiten, insbesondere dem Tod der Mikrofilarien im Blut und im lymphatischen System des infizierten Wirts auftreten, bzw. nach der Geburt der Mikrofilarien aus den weiblichen Filarien (Taylor & Hoerauf, 1999 & 2001). Bei mit *B. malayi* infizierten Patienten wurde festgestellt, dass nach einer Chemotherapie mit DEC schwerwiegende inflammatorische Reaktionen auftraten (Cross et al., 2001), und besonders in Patienten mit hohen Mikrofilarienkonzentrationen im peripheren Blut kam es nach einer chemotherapeutischen Behandlung zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und inflammatorischen Mediatoren (Haarbrink et al., 2000 & Zheng et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die Wolbachien wahrscheinlich für diese inflammatorischen Prozesse verantwortlich waren (Cross et al., 2001).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass LPS eine aktivierende Funktion übernimmt, konnte in mit *B. malayi* Mikrofilarien infizierten TLR4-Rezeptor-negativen C3H/HeJ Mäusen und in TLR4-Rezeptor-positiven C3H/HeN Mäusen nachgewiesen werden. Nachdem die Mikrofilarien durch eine Ivermectingabe abgetötet wurden, kam es nur in den C3H/HeN-Mäusen zu einer TNF- α -Produktion (Taylor et al., 2000b & Vincent et al., 1984). Durch die Sekretion von chemotaktischen Zytokinen, kam es zur Aktivierung und Rekrutierung von Eosinophilen und Neutrophilen zum Entzündungsort und zu einer lokalen Gewebeschädigung (Karima et al., 1999). Neutrophile konnten auch in den Onchozerkomen nachgewiesen werden und dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Wolbachien hier eine wichtige Funktion übernehmen könnten (Brattig et al., 2001 & Rubio de Krömer et al., 1998), weil die Akkumulation der Neutrophilen in Experimenten mit bakteriennegativen Filarien und bakteriendepletierten Filarienextrakten deutlich reduziert war (Brattig et al., 2001; Kaifi et al., 2001 & Saint-André et al., 2002).

1. Einleitung

Die chronische Freisetzung von bakteriellen Produkten könnte außerdem zu einer Desensibilisierung des angeborenen Immunsystems führen und somit die verstärkte Infektion mit opportunistischen Erregern ermöglichen (Taylor & Hoerauf, 1999).

1.4.4. Depletion der Wolbachien als Konzept zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden

Die Pathogenese der Filariose und eine weitere Ausbreitung kann durch eine Chemotherapie mit Ivermectin oder DEC nicht oder kaum beschränkt werden, zumal durch die Behandlung mit Ivermectin nur die entwickelten bereits gestreckten Mikrofilarien abgetötet werden können (Albiez et al., 1988a), und die Behandlung mit DEC mikrofilarizid und nur zum Teil makrofilarizid wirkt. Außerdem muß die Therapie mit mindestens einer jährlichen Gabe eines der beiden Medikamente über einen langen Zeitraum hinweg durchgeführt werden (Plaisier et al., 1997).

In den letzten Jahren wurde deswegen die Suche nach neuen Therapieansätzen intensiviert, die eine langandauernde Sterilität der weiblichen Würmer bewirken oder eine makrofilarizide Wirkung entfalten.

Schon nachdem in elektronenmikroskopischen Untersuchungen intrazelluläre Bakterien in den Filarien detektiert worden waren, wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Bakterien ein neues Ziel für die Chemotherapie darstellen könnten (Kozek, 1977; Kozek & Figueroa, 1977; McLaren et al., 1975).

Erst zu Beginn der 90er Jahre, nachdem Filarien in Tiermodellen etabliert worden waren, stellte sich heraus, dass die Behandlung infizierter Wirtstiere mit Tetracyclin zu einer deutlichen Reduktion der Wurmlast führte (Bosshardt et al., 1993). Allerdings wurde nicht die Assoziation gezogen, dass dieser Effekt durch die Depletion der Bakterien erreicht wurde. Hinweise darauf, dass die Vitalität der Filarien von der Präsenz der Prokaryonten abhängt, wurde erst durch deren Identifikation als Wolbachien (Sironi et al., 1995) und durch die Klonierung und Sequenzierung einzelner bakterieller Gene erhalten (Bandi et al., 1998 & Henkle-Dührsen et al., 1998). Durch eine kontinuierliche Gabe von Antibiotika wurden die Wolbachien in den hunde- und nagetierpathogenen Wurmern *D. immitis* und *B. pahangi* depletiert (Bandi et al., 1999). Als Folge der Wolbachienelimination konnte gezeigt werden, dass die Wurmentwicklung von infektiösen Larven zu adulten Würmern der Spezies *L. sigmodontis* in Nagetieren inhibiert und die Fertilität adulter Filarien und deren Mikrofilarienproduktion aufgehoben wurde (Hoerauf et al., 1999 & 2000a).

1.5. Wissenschaftliche Fragestellung der Dissertation

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei inhaltlich aufeinander aufbauende Fragenkomplexe wissenschaftlich untersucht.

Zunächst wurde die Frage gestellt, ob die Wolbachien in den Filarien der Spezies *O. volvulus* und *L. sigmodontis* durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika depletiert werden können. Um die Reduktion der Wolbachien in den behandelten Onchozerkose-Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten und auch in den tierexperimentellen Studien mit *L. sigmodontis* dokumentieren zu können, sollte eine molekularbiologische Methode zur Detektion der Bakterien etabliert werden. Der Nachweis der Wolbachien in den Onchozerkomen der Patienten und in den *L. sigmodontis* Filarien aus infizierten BALB/c Mäusen sollte durch die Amplifikation einer Teilsequenz der wolbachienspezifischen 16S rDNA in einer semiquantitativen PCR bestimmt und durch die semiquantitative Amplifikation einer Teilsequenz der filarienspezifischen 5S rDNA normiert werden.

In dem ersten Projekt sollte analysiert werden, ob die 6-wöchige Behandlung von Onchozerkose-Patienten mit 100 mg Doxycyclin pro Tag zu einer Reduktion, bzw. zu einer langfristigen Eliminierung der Wolbachien in den *O. volvulus*-haltigen Knoten führt.

Bei tierexperimentellen Untersuchungen wurden bezüglich der Behandlung mit Antibiotika die folgenden Fragen adressiert: Führt die Behandlung von *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen mit den gegen Rickettsien wirksamen Antibiotika Tetracyclin, Chloramphenicol, Erythromycin oder Ciprofloxacin während der gesamten Infektionsdauer zu einer Depletion der Wolbachien? Ist die verkürzte Behandlung von 21 Tagen in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen mit Rifampicin, Doxycyclin oder einer Kombination aus beiden Antibiotika von Beginn der Infektion an ausreichend, um eine Eliminierung der Wolbachien zu erreichen?

In einem mit dem ersten Fragenkomplex verknüpften Projekt sollte analysiert werden, ob die Depletion der Wolbachien einen Einfluß auf die Akkumulation der Neutrophilen in der Pleurahöhle der infizierten BALB/c Mäuse hat. Die Beantwortung dieser Frage ist insofern interessant, weil die Wolbachien ein wichtiger Stimulus für die Produktion chemotaktischer Zytokine und die Akkumulation der Neutrophilen in den Onchozerkomen von Onchozerkose-Patienten sind (Brattig et al., 2001).

Bei Experimenten mit *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen konnte gezeigt werden, dass Neutrophile eine wichtige Funktion bei der Abkapselung und Abtötung der Filarien

1. Einleitung

übernehmen und dass Th1- und Th-2-Zytokine an der Regulation der Neutrophilenakkumulation und der Etablierung einer protektiven Immunantwort gegen die Filarien beteiligt sind (Al-Qauod et al., 2000 & Saeftel et al., 2001).

In diesem Zusammenhang sollten in einem dritten Themenschwerpunkt folgende Fragen zu immunologischen Prozessen beantwortet werden: Wird durch die Neutralisation von TNF- α mit löslichem TNF- α -Rezeptorprotein die Akkumulation der Neutrophilen reduziert? Führt die Neutralisation von TNF- α zu einer reduzierten Abkapselung der Filarien und somit zu einer reduzierten Abtötung der adulten Würmer und zu einer erhöhten Mikrofilariämie? Welchen Einfluss hat die IL-4- oder IL-5-Defizienz auf die Etablierung der *L. sigmodontis*-Infektion und auf die Immunantwort, insbesondere auf die Aktivierung und die Akkumulation der Neutrophilen, und Kontrolle der Würmer während der späten Phase der Infektion? Hat bei der Untersuchung des Infektionsverlaufs in BALB/c-IL-4 KO und BALB/c-IL-4 Rezeptor α -Ketten KO Mäusen das Zytokin IL-13 einen zusätzlichen Effekt in der Immunabwehr gegen die Filarien?

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle nicht näher aufgeführten Chemikalien stammen von Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland).

2.2. Methodik zur Untersuchung der Filarieninfektionen

2.2.1. Tierzucht und Infektion

Die BALB/c Mäuse stammen von Charles River, Sulzfeld, Deutschland. Die BALB/c-IL-4^{tm2NT} Mäuse (Bezeichnung IL-4 KO Mäuse; zurückgekreuzt zum BALB/c Hintergrund) wurden von den Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Die BALB/c-IL-4 KO Mäuse (Noben-Trauth et al., 1996) und BALB/c-IL-4 Rezeptor α -Ketten KO Mäuse (Bezeichnung IL-4 R α KO Mäuse) (Mohrs et al., 1999), die aus embryonalen Stammzellen von BALB/c-Mäusen erzeugt wurden, wurden freundlicherweise von F. Brombacher (Immunology, Health Faculty, Groote Schuur Hospital, University of Cape Town, Cape Town, South Africa) bereitgestellt. Die IL-5 KO Mäuse, die zum BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt wurden (Kopf et al., 1996), wurden freundlicherweise von K.I. Matthaei (Division of Biochemistry and Molecular Biology, John Curtin School of Medical Research, Australian National University Canberra, Australia) bereitgestellt. Die Baumwollratten (*Sigmodontis hispidus*) wurden im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Instituts gezüchtet. Für die Zucht und Erhaltung des Parasiten *L. sigmodontis* dienten Baumwollratten als Endwirt und als Zwischenwirt im Infektionszyklus wurden Milben der Spezies *Ornithonyssus bacoti* als Zwischenwirt verwendet (Zahner et al., 1986). Die Milben wurden in mit Streu gefüllten Glasstutzen bei 30 °C Raumtemperatur und 70 bis 90 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Um Mäuse infizieren zu können, mußten die Milben erst bei einer etwa 4-stündigen Blutmahlzeit an infizierten Baumwollratten (mindestens 1000 Mikrofilarien/ μ l Blut) Mikrofilarien aufnehmen. Innerhalb von 10 Tagen entwickelten sich die Mikrofilarien in das für Mäuse und Baumwollratten infektiöse dritte Larvenstadium (L3). Bei einer darauffolgenden etwa 4-stündigen Blutmahlzeit wurden die Mäuse infiziert. Um die Auswirkung der *L. sigmodontis*-Infektion in den unterschiedlichen Mausstämmen untersuchen zu können,

2. Material und Methoden

wurden nur Mäuse miteinander verglichen, die von einer Milbenpopulation in demselben Glasstutzen infiziert wurden.

2.2.2. Untersuchung der Infektion mit *L. sigmodontis*

2.2.2.1. Bestimmung der Wurmanzahl in der Pleurahöhle

20 x PBS-Lösung: 160 g NaCl
 23,2 g Na₂HPO₄
 4,0 g KH₂PO₄
 4,0 g KCl
 mit Aqua bidest. ad 1000 ml, pH 7,0 mit HCl

Die Anzahl der adulten Würmer in der Pleurahöhle wurde in den Mäusen 28 Tage, 60 Tage, 80 Tage, 111 Tage, 130 Tage und 200 Tage nach Infektionsbeginn bestimmt. Zunächst wurden die Mäuse durch die Inhalation von Ether getötet und anschließend dekapitiert. Das Blut wurde in 1,5 ml Gefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gesammelt, abzentrifugiert und das Serum für die Zytokinbestimmung im ELISA (siehe 2.2.10.) verwendet. Die Pleurahöhlen der dekapitierten Mäuse wurde mit 10 ml PBS gespült. Die Spülflüssigkeit, die danach die inflammatorischen Exsudatzellen und die Würmer enthielt, wurde in 15 ml-Falcon-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gefüllt und auf Eis gestellt, um die Bewegungsaktivität der Würmer einzuschränken. Nachdem sich die Würmer am Boden der Röhrchen abgesetzt hatten, wurde der zellhaltige Überstand abgenommen, in ein neues Röhrchen gefüllt und auf Eis aufbewahrt, um die Viabilität der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurde der Überstand 5 min. lang bei 1800 U/min und 4 °C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde in 2 ml Gefäße (Eppendorf) gefüllt, bei -20 °C eingefroren und für die Zytokinbestimmung im ELISA verwendet (siehe 2.2.10.). Das Zellsediment wurde behandelt wie in Abschnitt 2.2.4. dargestellt und für die Zellkultur verwendet. Die Anzahl der vitalen Würmer und der in inflammatorischen Material eingekapselten Würmer, die als Knoten bezeichnet werden, wurde in Petrischalen bestimmt.

2. Material und Methoden

2.2.2.2. Aufbewahrung der adulten Würmer

4 %-ige Formalinlösung: 115 ml 35 %iges Formalin

4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

8,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

mit Aqua bidest. ad 1000 ml

Für anschließende Untersuchungen der Wurmfruchtbarkeit wurden die Würmer in einer 4 %-igen Formalinlösung aufbewahrt. Die Untersuchung der Wurmfruchtbarkeit wurde freundlicherweise von O. Bain (Institut de Systématique CNRS FR 1541, Biologie Parasitaire, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) durchgeführt.

2.2.2.3. Bestimmung der Mikrofilarien in der Pleurahöhle und im Blut

Hinkelmans-Lösung: 0,5 % (w/v) Eosin

0,5 % (w/v) Phenol

0,185 % (w/v) Formaldehyd in Aqua bidest.

Die Mikrofilarien in der Pleurahöhle wurden ab Tag 60 nach Infektionsbeginn untersucht. Hierzu wurden 100 μl der Spülflüssigkeit (siehe 2.2.2.), in denen sich 10 % aller Pleuramikrofilarien befanden, mit 400 μl Hinkelmans-Lösung (Korenaga et al., 1991) vermischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden die Ansätze 5 min. lang bei 2500 U/min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Anzahl der Mikrofilarien im Sediment unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bestimmt.

Die Mikrofilarien wurden im Blut von infizierten Mäusen ab dem Tag 50 nach Infektionsbeginn bestimmt. Die Untersuchung erfolgte im weiteren Verlauf der Infektion alle 7 bis 14 Tage bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Mäuse seziert und die Infektion analysiert wurde. Hierzu wurden die Mäuse durch die Inhalation von Metofane (Janssen, Neuss, Deutschland) narkotisiert und anschließend Blut aus dem Orbitalsinus mit Hilfe von Blutkapillaren (Merck) abgenommen und in EDTA-haltigen Gefäßen (Kabe, Numbrecht-Elsenroth, Deutschland) gesammelt. Die Bestimmung der Mikrofilarienzahl erfolgte wie für die Pleuramikrofilarien. Das verbleibende Blut wurde abzentrifugiert und das Serum für die Zytokinbestimmung im ELISA verwendet (siehe 2.2.10.).

2. Material und Methoden

2.2.3. Aufreinigung von peripheren Blutmikrofilarien

Um die murine Immunantwort nur gegen Mikrofilarien untersuchen zu können, wurden Mäuse verschiedener Stämme mit aufgereinigten Mikrofilarien intraperitoneal injiziert. Hierzu wurde infizierten Baumwollratten Blut abgenommen wie in 2.2.2.3. dargestellt und 1:2 mit PBS verdünnt. Die Mikrofilarien wurden dann aus dem Blut über einen Percoll-Gradienten isoliert (Chandrashekar et al., 1984). Iso-osmotisches Percoll (IOP) wurde hergestellt, indem 9 Teile Percoll (Dichte 1,130 g/ml) mit einem Teil 2,5 M Saccharoselösung vermischt wurden. Das IOP wurde anschließend so mit einer 0,25 M Saccharoselösung verdünnt, dass 25, 30 und 35 %ige Lösungen hergestellt wurden. Je 2 ml dieser Gradientenverdünnungen wurden in einem 15 ml Röhrchen (Greiner) übereinander gelagert. Anschließend wurde das Blut auf den Gradienten pipettiert. Die gefüllten Röhrchen wurden 30 min. bei Raumtemperatur mit 1300 U/min. zentrifugiert. Die Mikrofilarien, die zwischen dem 25 % und 30 % Gradienten als weißer Ring sichtbar waren, wurden abpipettiert und in RPMI-1460-1 % FCS gewaschen. Die Anzahl und die Viabilität wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops (Zeiss) in der Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Die Mikrofilarien wurden in PBS verdünnt und 150.000 Mikrofilarien wurden intraperitoneal in Mäuse injiziert.

2.2.4. Zellkultur

Zellkulturmedium: RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

50 µg/ml Gentamycin

2 mM L-Glutamin

5 % FCS

Tris-Ammonium-Chlorid:

Lösung 1: 0,1 M NH₄Cl in Aqua bidest.

Lösung 2: 0,17 M Tris in Aqua bidest., pH 6,65 mit HCl

90 ml Lösung 1 und 10 ml Lösung 2, pH 7,2 mit HCl

2.2.4.1. Herstellung von *L. sigmodontis*-Antigen

Für die Herstellung des *L. sigmodontis*-Antigens wurden Würmer aus Baumwollratten verwendet, die mindestens 4 Monate lang infiziert waren. Die Würmer wurden zweimal

2. Material und Methoden

mit PBS gewaschen und mit einem Homogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) homogenisiert. Danach wurde diese Suspension für 30 min. bei 80.000 g abzentrifugiert und von dem Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Diese Lösung wurde mit RPMI-1640-5 % FCS auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,22 µm Filter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.2. Pleuraexsudatzellkultur

Die Pleuraexsudatzellen (siehe 2.2.4.2.) wurden zunächst mit einer Tris-Ammonium-Chlorid-Lösung behandelt, um die Erythrozyten zu lysieren. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml Tris-Ammonium-Chlorid-Lösung aufgenommen und 5 min. lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in Zellkulturmedium gewaschen. Die Zellen wurden danach unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) ausgezählt, in Zellkulturmedium aufgenommen und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden in drei Vierfach-Ansätzen pro Maus je 100 µl der Zellsuspension pro Loch in eine 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert. Zu jeweils 4 Ansätzen wurden je 100 µl Zellkulturmedium, 100 µl *L. sigmodontis*-Antigen oder 100 µl Con A (2,5 µg/ml, Mitogen) (Sigma) hinzupipettiert. Die Zellen wurden 96 Stunden lang im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden abpipettiert und in 1,5 ml Gefäßen (Eppendorf) bei -20 °C eingefroren und später für die Zytokinmessung im ELISA verwendet (siehe 2.2.10.).

2.2.4.3. Makrophagenkultur

Für die Makrophagenkultur wurden die Pleuraexsudatzellen (siehe 2.2.4.2) in eine 96-Loch-Flachbodenplatte (Greiner) pipettiert. Bei einer einstündigen Inkubation im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C konnten die Makrophagen an der Platte adhären. Die nichtadhärierten Zellen wurden anschließend durch 2-maliges Waschen mit 37 °C warmem PBS entfernt. Auf alle Makrophagenansätze wurden 100 µl Zellkulturmedium und danach je 100 µl Zellkulturmedium, *L. sigmodontis*-Antigen oder 20 ng/ml IFN-γ (Bacton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und 20 ng/ml LPS (*E. coli* O55, Sigma)

2. Material und Methoden

pipettiert. Die Makrophagen wurden 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert und anschließend behandelt wie beschrieben (siehe 2.2.4.2.)

2.2.5. Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus dem Klon NIMP-R14

Lösung 1: 0,02 M K₂PO₄ in Aqua bidest., pH 7,0 mit HCl

Lösung 2: 0,1 M Glycin in Aqua bidest., pH 2,7 mit HCl

Lösung 3: 1 M Tris in Aqua bidest., pH 8,0 mit HCl

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und entgast. Der monoklonale Antikörper produzierende (mAB) Klon NIMP-R14 (anti-Maus Neutrophile; IgG 2b) wurde in ISCOVES Medium (Invitrogen) mit 10 % FCS im Brutschrank bei 37 °C und 9 % CO₂ kultiviert. Die in den Kulturüberstand sezernierten Antikörper und andere Proteine wurden durch die Zugabe von 313 g NH₄SO₄/l Überstand über Nacht bei 4 °C gefällt und 30 min. mit 10.000 g in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (Beckmann-Coulter, California, USA) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in Lösung 1 bei Raumtemperatur resuspendiert und über Nacht in Lösung 1 bei 4°C dialysiert. Die Isolation und Aufreinigung der Antikörper erfolgte mit einer in Lösung 1 äquilibrierten Protein G Sepharaose 3 Fast Flow Säule (Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Nach dem Auftragen des dialysierten Kulturüberstands wurde die Säule mit Lösung 1 gewaschen und die an die Säule gebundenen Antikörper mit Lösung 2 eluiert. Der niedrige pH-Wert wurde durch sofortige Zugabe von Lösung 3 neutralisiert, um die Denaturierung der eluierten Antikörper zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der gereinigten Antikörper (Bradford, 1976). Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.6. Behandlung von Mäusen: Neutralisation von TNF- α

Zur Neutralisation von TNF- α wurden infizierte BALB/c Mäuse mit einem löslichen TNF- α -Rezeptorprotein behandelt (TNF-Rezeptor-Dimer mit einem Polyethylenglycol-Linker), das uns freundlicherweise von T. Hartung (Institut für Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Die Behandlung der Mäuse wurde nach 42 Tagen Infektionsdauer begonnen (bevor die Neutrophilen in der Pleurahöhle akkumulieren). Dazu wurden den Mäusen zweimal pro Woche 25 μ g TNF- α -

2. Material und Methoden

Rezeptorprotein/1 ml PBS bis zum Ende des Experiments (80 Tage nach Beginn der Infektion) intraperitoneal injiziert.

2.2.7. Messung der Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten

Die Phagozytosekapazität von neutrophilen Granulozyten wurde durchgeführt wie beschrieben (MacIvor et al., 1999). Pleurazellen (siehe 2.2.4.2.), die aus Mäusen 80 Tage nach Beginn der Infektion gewonnen wurden, wurden auf $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ eingestellt und in die Löcher von 96-Loch-Rundbodenplatten pipettiert. Anschließend wurden $0,9\text{-}\mu\text{m}$ große Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Latex-Partikel (Sigma) in einer Konzentration von $4,5 \times 10^7$ Partikel/Loch hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 , wurden die Zellen in 10 ml RPMI-1640 aufgenommen, unterlagert mit kaltem FCS und bei 1300 U/min 5 min lang bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, um die nichtphagozytierten Partikel zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit 1% igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. $200 \mu\text{l}$ der beschriebenen Zellsuspension mit etwa 2×10^4 Zellen wurden 5 min. bei 800 U/min (Shandon, Pittsburgh, USA). auf Glasobjektträger zentrifugiert, die mit absorbierenden Papierfiltern (Schleicher und Schuell) bedeckt wurden. Die Papierfilter nahmen die Flüssigkeit auf, und die Zellen blieben auf den Objektträgern haften. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln 10 min. bei RT getrocknet. Die folgenden Färbeschritte wurden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt. Alle verwendeten Antikörper wurden in PBS-1%BSA (Bovines Serum-Albumin, Sigma) verdünnt. Zunächst wurden freie $\text{Fc}\gamma\text{RII\&III}$ durch eine 60 minütige Inkubation mit anti-CD16/CD32 mAB ($5 \mu\text{g/ml}$, Becton-Dickinson) bei RT blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Objektträger wurden dann in PBS gewaschen und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit $100 \mu\text{l}$ des anti-Maus Neutrophilen mAB NIMP-R14 (rat IgG 2b; $100 \mu\text{g/ml}$ Protein) (Al-Qaoud et al., 2000) als primärem Antikörper inkubiert (siehe 2.2.5.). Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und 1 Stunde mit Phycoerythrin (PE)-gekoppelten anti-Ratte- κ Antikörpern ($1 \mu\text{g/ml}$, Becton-Dickinson) inkubiert. Die Objektträger wurden danach erneut gewaschen und getrocknet. Die Doppelfärbung der phagozytierten FITC-gekoppelten Latex-Partikel und der mit anti-Maus Neutrophilen mAB NIMP-R14/PE-gekoppelten anti-Ratte- κ Antikörpern gefärbten Neutrophilen wurde unter einem Doppel-Filter-Fluoreszenzmikroskop analysiert (Zeiss).

2. Material und Methoden

2.2.8. Durchführung der Zytospins

Für die Durchführung des Zytospins wurden die Zellen mit Zellkulturmedium auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. 200 μ l der beschriebenen Zellsuspension wurden 5 min. bei 800 U/min (Shandon) auf Glasobjektträger zentrifugiert, die mit absorbierenden Papierfiltern (Schleicher und Schuell) bedeckt wurden. Die Papierfilter nahmen die Flüssigkeit auf, und die Zellen blieben auf den Objektträgern haften.

Die Zytospins wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, mit Aceton 10 min. lang fixiert und erneut über Nacht getrocknet. Die Zellen wurden anschließend 5 min. mit Wright's stain (Sigma) gefärbt und 5 min. in Aqua bidest. gewaschen. Die Anzahl der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) differentiell bestimmt.

2.2.9. FACS-Analyse

Lösung 1: 10 g Paraformaldehyd

mit PBS auf 1000 ml auffüllen

Die Zellen aus der Pleurahöhle wurden mit den folgenden Antikörpern der Firma Medac gefärbt: Ratte anti-Maus Mac-1 (Makrophagen, und zu einem schwächeren Grad eosinophile, neutrophile Granulozyten – Klon M1/170.15 FITC) und Ratte anti-Maus CD45R (B-Zellen, Makrophagen - B220, Klon RA3-6B2 PE). Von den auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellten Pleuraexsudatzellen (siehe 2.2.4.2.) wurden 100 μ l in 5 ml FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingefüllt und mit je 1 μ l eines FITC- und eines PE-gekoppelten Antikörpers vermischt und 20 min. lang auf Eis inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Ansätze mit je 4 ml PBS gewaschen, 5 min. bei Raumtemperatur mit 1800 U/min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 250 μ l Lösung 1 resuspendiert. Die FACS Analyse wurde an einem FACScan Gerät mit Hilfe des Programms Cell Quest durchgeführt (Becton-Dickinson).

2. Material und Methoden

2.2.10. Durchführung der Zytokin ELISAs

Lösung 1: 0,1 M Na₂HPO₄ in Aqua bidest., pH 9,0 mit HCl

Lösung 2: PBS mit 0,05 % Tween 20 (Sigma)

Lösung 3: PBS mit 1 % (w/v) BSA

Lösung 4: 0,1 M NaH₂PO₄ in Aqua bidest., pH 5,5 mit NaOH

Lösung 5: 60 mg 3,3',5,5'-Tetramethylenbenzidine (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 10 ml DMSO (Sigma)

Lösung 6: 10 ml Lösung 4
200 µl Lösung 5 und 2 µl H₂O₂

Lösung 7: 2 M H₂SO₄

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration in der Pleuraflüssigkeit, in den Zellkulturüberständen und im Serum wurde im Sandwich-ELISA in Nunc Maxisorp ELISA-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Die verwendeten Antikörperpaare und die eingesetzten Konzentrationen sind in **Tab. 1** aufgeführt. Für das Beschichten der Platten mit dem monoklonalen Erstantikörper, der in Lösung 1 verdünnt wurde, wurden 50 µl pro Loch pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Schütteltisch (Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Lösung 2, erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungskapazitäten in jedem Loch durch das Pipettieren von 200 µl Lösung 3 und das anschließende Inkubieren für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben der Standardreihe und der zu messenden Proben aufgetragen und über Nacht bei 4 °C auf dem Schütteltisch inkubiert. Die Proben wurden entfernt und die Platten fünfmal mit Lösung 2 gewaschen. Es wurden 100 µl der entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Die Platten wurden fünfmal mit Lösung 2 gewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit 100 µl Streptavidin Peroxidase (500 Einheiten, 1:5000 verdünnt (Roche, Mannheim, Deutschland)). Nach einem weiteren fünfmaligem Waschvorgang mit Lösung 2 wurden zur Farbentwicklung 100 µl von Lösung 6 pipettiert. Die Reaktion wurde durch das Hinzupipettieren von 100 µl Lösung 7 abgestoppt. Die ELISA-Platten wurden bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm am ELISA Photometer (Dynatech Lab. Inc.) gemessen. Die Detektionsgrenze der ELISAs lag bei einer Konzentration von 10 pg/ml.

2. Material und Methoden

Tab. 1. Nachweis der benutzten Antikörper und deren verwendete Konzentration.

Zytokine	Erst-Antikörper (Klon)	Zweit-Antikörper (Klon)	Standare (Best. Nr.)
IFN- γ	R-46A2, 2 μ g/ml	XMG1.2, 1 μ g/ml	19301T (Becton-Dickinson)
IL-5	TRFK5, 2 μ g/ml	TRFK4, 0,5 μ g/ml	19241V (Becton-Dickinson)
IL-10	JES5-2A5, 2 μ g/ml	SXC-1, 1 μ g/ml	19281V (Becton-Dickinson)
IL-12	Red-T/G297-289, 8 μ g/ml	C17.8, 1 μ g/ml	19361V (Becton-Dickinson)
Kc (IL-8)	MAB453, 2 μ g/ml	BAF453, 200 ng/ml	453-KC-010 (R&D)
TNF- α	G281-2626, 8 μ g/ml	MP6-X-T3, 1 μ g/ml	410-MT-010 (Becton-Dickinson)

2.2.11. Detektion des Gesamt-IgEs

Die gleiche ELISA-Standard-Prozedur wurde durchgeführt (siehe 2.2.10.), um das Gesamt-IgE zu bestimmen. Der Erst- und der biotinylierte Zweit-Antikörper (R53-72 und R53-92) (Becton-Dickinson) wurden in einer Konzentration von 2 μ g/ml, bzw. 1 μ g/ml eingesetzt.

Murines IgE Protein (SPE-7, anti-DNP, Sigma) wurde als Standard verwendet und konnte bis zu einer Konzentration von 0,05 μ g/ml nachgewiesen werden.

2.2.12. Detektion des Phosphorylcholin (PC)-spezifischen IgMs

Die gleiche ELISA-Standard-Prozedur wurde durchgeführt (siehe 2.2.10.), um PC-spezifische Antikörper zu bestimmen. Dazu wurden in Polysorb-Microtiter Platten (Nunc) 50 μ l/Loch von 10 μ g/ml PC-BSA (Biosearch Technologies, Novato, USA) in Lösung 3 (siehe 2.2.10.) pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Platten mit Serum einer seriellen Verdünnungsreihe beginnend bei einer 1:100- bis zu einer 1:200.000-Verdünnung pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Zweitantikörper wurden 2 μ g/ml von dem biotinylierten monoklonalen Anti-Maus IgM (clone II/41; Becton-

2. Material und Methoden

Dickinson) aufgetragen. Als Standard wurde Serum einer BALB/c Maus nach 80 Tagen Infektionsdauer verwendet. Anschließend wurde wie beschrieben verfahren (siehe 2.2.10).

2.2.13. Messung der NO Konzentration

Zur Messung der NO-Konzentration im Makrophagenkulturüberstand (Rockett et al., 1994) wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1: Nitrat-Reduktase (Roche, 5 Einheiten/ml)

Lösung 2: NADPH (Roche, 1250 µg/ml)

Griess Reagenzien:

Lösung 3: 1 % (w/v) Sulfonamid und 2,5 % (v/v) Phosphorsäure

Lösung 4: 0,1 % (w/v) Naphtylenthylendiamin Dihydrochlorid und 2,5 % (v/v)
Phosphorsäure

30 µl Makrophagenkulturüberstand wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit 5 µl Lösung 1 und 15 µl Lösung 2 inkubiert. Anschließend wurden zu der Probe 100 µl einer 10 %-igen (w/v) Trichloressigsäure hinzugefügt und bei 13.800 g für 5 min. zentrifugiert. Von 100 µl des Überstandes wurde mit Hilfe der Griess Reaktion durch das Hinzufügen von 50 µl Lösung 3 und 50 µl Lösung 4 die NO-Konzentration bei eine Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von NaNO₃, das in Aqua bidest. in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst wurde.

2.3. Molekularbiologie

2.3.1. DNA-Isolation

2.3.1.1. DNA-Isolation aus Ethanol-preserviertem *O. volvulus*-haltigem Knotenmaterial

NET-Puffer: 50 mM NaCl
 50 mM Tris
 10 mM EDTA, pH 8,0 mit NaOH

2. Material und Methoden

10 %ige SDS-Lösung: 10 g SDS
mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen

Natriumacetat-Lösung: 3M Natriumacetat
mit Aqua bidest. ad 100 ml, pH 4,6

Für die Isolation der DNA wurde eine Hälfte der Knoten verwendet, die während einer Studie in Ghana aus Onchozerkose-Patienten extirpiert wurden (Hoerauf et al., 2000 & Mand, Dissertation eingereicht 2002). Nur aus den Knoten, die 2,5 Monaten nach Beginn der Studie aus den Doxycyclin-behandelten Patienten extirpiert wurden, wurden für die Isolation der DNA Wurmfragmente aus dem Knoten verwendet und nicht das gesamte mir zur Verfügung gestellte Knotenmaterial. Bei allen anderen Zeitpunkten (6, 12 und 19 Monate nach Beginn der Studie) wurde das gesamte Knotenmaterial für die die DNA-Isolation verwendet. Das Knotenmaterial wurde zunächst in Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurde es mit einem Skalpell in etwa 3 mm^3 große Stücke zerteilt und erneut in Aqua bidest. und danach in NET-Puffer gewaschen. Das Knotenmaterial wurde dann in 500 μl NET-Puffer in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgenommen. Für den Proteinverdau wurden 10 μl Proteinkinase K (20 mg/ml, Qiagen, Hilden, Deutschland) und 50 μl 10 %-iges SDS hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und über Nacht bei 56 °C im Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert. Für die DNA-Extraktion wurde zu dem Verdauansatz die gleiche Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Biomol, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt, 5 min. gemischt und 10 min. mit 13.000 U/min. in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere wäßrige Phase abgenommen und ein zweiter Extraktionsschritt mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in Phase-Lock-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt. Zum Fällen der DNA wurde die wäßrige Phase in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,1 Volumenanteilen Natriumacetat-Lösung und 2 Volumenanteilen eiskaltem absoluten Ethanol vermischt und 1 Stunde bei -70 °C aufbewahrt. Die Ansätze wurden anschließend 20 min. bei 13.000 U/min. abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 1 ml eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 100 μl Aqua bidest. aufgenommen und 3 Stunden lang bei 37 °C im Schüttler gelöst.

2. Material und Methoden

2.3.1.2. DNA-Isolation aus Filarien der Spezies *L. sigmodontis* und *A. viteae*

Die Würmer wurden in Aqua bidest. gewaschen. Die DNA wurde mit Hilfe eines DNA Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und in 100 µl Aqua bidest aufgenommen.

2.3.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Der DNA-Gehalt einer Lösung wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm ungefähr einer Plasmid- DNA - oder doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 µg/ml, bzw. einer Oligonukleotidkonzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der DNA wurde durch Messen der Absorption bei einer Referenzwellenlänge von 280 nm ermittelt. Reine DNA hat einen Quotienten der optischen Dichte 260 nm/ 280 nm zwischen 1,8 und 1,95. Ein weiterer Reinigungsschritt war nicht notwendig.

2.3.3. Oligonukleotidsynthese

Die für die PCR und die automatische DNA-Sequenzierung benötigten Oligonukleotide wurden entweder in der Abteilung für Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin oder von der Firma Invitrogen bezogen.

Die Konzentration der Oligonukleotide (bei nichtlyophylierten Oligonukleotiden) wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe 2.3.2.). Die Oligonukleotide wurden mit autoklaviertem Aqua bidest. auf eine Standardkonzentration von 10 pmol/µl eingestellt.

2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki et al., 1988). Die bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerasen verwenden einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges. Als Matrize eignen sich Oligonukleotide und doppelsträngige DNA, z. B. aus eukaryontischen und prokaryontischen Organismen und in Plasmide ligierte DNA-Fragmente.

2. Material und Methoden

Zu Beginn der PCR wird die zu amplifizierende DNA bei 95 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA zu denaturieren. Beim anschließenden Abkühlen des PCR-Ansatzes wird es 2 sequenz-spezifischen Oligonukleotiden ermöglicht, komplementär an das zu amplifizierende DNA-Segment zu hybridisieren. Die für die Hybridisierung notwendige Temperatur, die zwischen 50 und 60 °C liegt, ist hauptsächlich abhängig von der Sequenz, der etwa 20 bp langen Oligonukleotide. Die für die Amplifikation verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen besitzen Temperaturoptima zwischen 70 und 75 °C. Bei einer Temperatur von 72 °C wird das durch die hybridisierten Oligonukleotide definierte komplementäre DNA-Segment synthetisiert. Für die Durchführung der Amplifikation wurde die HotStar-Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die Substanzen zur Durchführung der PCR wurden alle von der Firma Qiagen bezogen, außer der Desoxyribonukleotide (Roche) und der Oligonukleotide (siehe 2.3.3.).

Die 4 verschiedenen Desoxyribonukleotide wurden nach folgendem Schema gemischt:

Desoxyribonukleotid-Gemisch

100 µl 2mM dATP

100 µl 2mM dTTP

100 µl 2mM dCTP

100 µl 2mM dGTP

Zu dem Gemisch wurden 600 µl autoklaviertes Aqua bidest. hinzupipettiert.

Ein PCR-Ansatz wurde nach dem folgenden Schema bei Raumtemperatur pipettiert:

<u>Komponente</u>	<u>Volumen in µl/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10-fach PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂	14	5 mM
dNTPs	1	200 µM
Oligonukleotid 1	1	10 pMol
Oligonukleotid 2	23,75	10 pMol
HotStar Taq-DNA-Polymerase	0,25	
Proben-DNA (Matrize)	4	
Gesamtvolumen	50	

2. Material und Methoden

Die Amplifikation der PCR-Proben wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die Amplifikation wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

<u>Phase der Amplifikation</u>	<u>Temperatur in °C</u>	<u>Zeit in min.</u>
1 Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase	95	15
2 Denaturierung der Matrizen-DNA	95	1
3 Hybridisierung der Oligonukleotide	50 bis 60	1
4 DNA-Synthese	72	1,5
5 Zurück zu Phase 2 bis Zyklus 35		
6 Finale Extension der amplifizierten Segmente	72	8

2.3.4.1. Amplifikation der 16S rDNA

Um Oligonukleotide zu erstellen, mit denen sowohl ein Fragment des 16S rDNA-Gens aus *L. sigmodontis* und *O. volvulus* amplifiziert werden kann, wurde ein Vergleich von partiellen Sequenzen durchgeführt, die in der Genbank auf der Internetseite des NCBI (National Center for Biotechnology Information) zugänglich sind. Dazu wurden die partiellen Sequenzen der 16S rDNA von *L. sigmodontis* (Accession-No. AF069068) und *O. volvulus* (Accession No. AF069069) mit Hilfe eines dort frei zugänglichen Programms („Pairwise Blast 2 Seqences“) miteinander verglichen

Für die Amplifikation der 16S rDNA aus den Wolbachien von *L. sigmodontis* und *O. volvulus* wurden folgende Oligonukleotidsequenzen ausgewählt:

Oligonukleotid 1: 5'-CTA CCT GGT AGT ACG GAA TAA TT-3'

Oligonukleotid 2: 5'-TCA CCT CTA CAC TAG CAA TTC CT-3'

Bei der PCR, die bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C durchgeführt wurde, wurde ein 524 bp-Produkt amplifiziert. Das Amplifikat wurde auf ein Gel aufgetragen

2. Material und Methoden

(siehe 2.3.5), aufgereinigt (siehe 2.3.6.), in einen Klonierungsvektor ligiert (siehe 2.3.7.) und sequenziert (siehe 2.3.8.). Das in den Klonierungsvektor ligierte Fragment der 16S rDNA wurde dann anschließend zur Herstellung eines Kompetitors verwendet (siehe 2.3.13.).

2.3.4.2. Amplifikation der 5S rDNA

Für die Amplifikation des 5S rDNA-Gens aus den Filarien *L. sigmodontis* und *O. volvulus* wurden folgende Oligonukleotidsequenzen verwendet (Fischer et al., 1998):

Oligonukleotid 1: 5'-GTT AAG CAA CGT TGG GCC TGG-3'

Oligonukleotid 2: 5'-TTG ACA GAT CGG ACG AGA TG-3'

Bei der PCR, die bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C durchgeführt wurde, wurde ein 409 bp-Produkt amplifiziert. Das Amplifikat wurde auf ein Gel aufgetragen (siehe 2.3.5.), aufgereinigt (siehe 2.3.6.), in einen Klonierungsvektor ligiert (siehe 2.3.7.) und sequenziert (siehe 2.3.8.). Das in den Klonierungsvektor ligierte 5S rDNA-Fragment wurde dann anschließend zur Herstellung eines Kompetitors verwendet (siehe 2.3.13.).

2.3.5. DNA-Gelelektrophorese

50-fach TAE-Puffer: 2 M Tris-Acetat

50 mM EDTA

Die Substanzen wurden in Aqua bidest. aufgenommen und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Vor der Verwendung wurde der Puffer im Verhältnis 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt.

10-fach TBE-Puffer: 0,89 M Tris

0,89 M Borsäure

20 mM EDTA

Die Substanzen wurden in Aqua bidest. aufgenommen und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

vor der Verwendung wurde der Puffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt

2. Material und Methoden

6-fach DNA-Beladungspuffer: 0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol FF
15 % Ficoll
in Aqua bidest.

Mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld voneinander getrennt werden. Die Trennung erfolgt in einem Agarosegel, dessen Konzentration nach der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle ausgewählt wird. Bei präparativen Gelen wurde Agarose (Biomol) in TAE-Puffer verwendet und bei analytischen Gelen TBE-Puffer. Die Visualisierung der DNA-Moleküle erfolgte durch die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Edthidiumbromid (Sigma), der den Agarose-Gelen zugesetzt wurde (Endkonzentration 0,2 µg/ml). Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit DNA-Beladungspuffer im Verhältnis 1:6 vermischt. Nach der Elektrophorese bei 40 Volt für TAE-Gele und 80 Volt für TBE-Gele (Gelelektrophoresekammer, BioRAD, München, Deutschland) wurden die Gele im UV-Durchlicht (UV-Flächenstrahler; Roth) mit Rotfilter fotografiert (Mitsubishi, Japan). Als Größenstandards wurden die DNA-Molekulargewichtsmarker „100 bp-ladder“ und „1 kbp-ladder“ (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet“.

2.3.6. Gelreinigung von DNA-Fragmenten

Um 80 bis 1000 bp-Fragmente aus einer PCR-Reaktion zu reinigen, wurde die DNA in einem präparativen Agarosegel mit TAE-Puffer aufgetrennt (siehe 2.3.5.). Das DNA-Fragment wurde anschließend in UV-Licht (UV-Flächenstrahler) visualisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion und Reinigung der DNA aus der Agarose wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bindung der DNA-Moleküle an die Glasmilchpartikel erfolgte durch die Inkubation mit einem Hochsalzpuffer. Überschüssige Salze wurden durch einen ethanolhaltigen Waschpuffer entfernt. Die DNA wurde mit autoklaviertem Aqua bidest eluiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde wie beschrieben ermittelt (siehe Punkt 2.3.2.).

2. Material und Methoden

2.3.7. Klonierung von DNA-Fragmenten

Die PCR-Produkte wurden nach den Angaben des Herstellers mit der T4-Ligase (MBI Fermentas) in den TA-Klonierungsvektor pUC57/T (MBI Fermentas) ligiert. Das Enzym aus dem Bakteriophagen T4 katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe in doppelsträngiger DNA. Die Klonierungsvektoren, die das inserierte PCR-Produkt enthalten, wurden zur Aufreinigung und Vermehrung in kompetente Bakterien geschleust (siehe 2.3.10). Die transformierten Bakterien wurden anschließend durch eine PCR verifiziert (siehe 2.3.11.)

2.3.8. Automatische DNA-Sequenzierung

Lösung 1: 3 M Natriumacetat in Aqua bidest.,
pH 4,6 wurde mit HCl einstellt

Die in die Zwischenklonierungsvektoren klonierten PCR-Produkte wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1975 & 1977) mit einem Sequenzierungskit (BigDye, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequenziert. In einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde 1 µg DNA und 10 pmol der Sequenzierungsoligonukleotide mit autoklaviertem Aqua bidest. auf 16 µl aufgefüllt und 4 µl des BigDye-Ansatzes hinzugegeben. Im T3-Termocycler (Biometra) wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen:

<u>Temperatur in °C</u>	<u>Zeit in Sekunden</u>
96	10
50	5
60	240

Der Sequenzierungsansatz wurde anschließend durch die Zugabe von 80 µl Aqua bidest. verdünnt, und die DNA durch die Zugabe von 10 µl von Lösung 1 und 250 µl Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde sofort bei Raumtemperatur abzentrifugiert (13.000 U/min., 15 min.). Der Überstand wurde abgesaugt und das Präzipitat durch die Zugabe von 250 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 U/min., 5 min.)

2. Material und Methoden

wurde der Überstand abgesaugt und das Präzipitat für 10 min. bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Die Detektion und Analyse der Proben erfolgte auf dem Applied Biosystems DNA-Sequenzer HD377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.3.9. Herstellung kompetenter Bakterien

MES-Stammlösung: 1 M KOH in Aqua bidest.

pH 6,2 wurde mit HCl eingestellt und die Lösung sterilfiltriert

MOPS-Stammlösung: 1 M MOPS in Aqua bidest.

die Lösung wurde sterilfiltriert

TFB1-Lösung: 5 ml MES Stammlösung

6,045 g RbCl₂

0,735 g CaCl₂·2H₂O

4,94 g Mn Cl₂·4H₂O

TFB2-Lösung: 1 ml MOPS-Stammlösung

1,102 g CaCl₂·2H₂O

0,120 g RbCl₂

15 ml Glycerin

mit Aqua bidest. ad 100 ml

pH 6,5 wurde mit KOH eingestellt und die Lösung sterilfiltriert

Da Bakterien von sich aus lediglich in geringem Umfang DNA-Moleküle aufnehmen, müssen sie vor einer Transformation mit Plasmiden entsprechend kompetent gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden *E.coli*-Bakterien vom Stamm DhαFⁱⁿ in 200 ml LB-Medium bis zur exponentiellen Phase herangezogen (OD_{550nm} 0,45). Danach wurde die Suspension 15 min. auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (15 min., 2500 U/min., 4 °C, Biofuge 2.0R) und das erhaltene Sediment vorsichtig in 20 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, das Sediment vorsichtig in 2 ml TFB2-Lösung resuspendiert und 15 min. lang auf Eis aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Verteilung der Suspension kompetenter Bakterien in Form von 100 µl-Aliquots auf vorgekühlte 1,5 Reaktionsgefäße, die bis zur Verwendung der Bakterien bei -70 °C gelagert wurden.

2. Material und Methoden

2.3.10. Transformation von Bakterien

LB-Medium: 10 g Bactrotrypton
5 g Hefeextrakt
10 NaCl
mit Aqua bidest. ad 1000 ml
pH 7,5 wurde mit NaOH eingestellt und das Medium autoklaviert

LB-AMP-Medium: LB-Medium
50 µg/ml Ampicillin

LB-AMP-Platten: 15 g Bacto-Agar
mit LB-AMP-Medium wurde ad 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert,
anschließend wurden 50 µg/ml Ampicillin hinzugefügt

Durch die Verwendung kompetenter Bakterien konnten die mit den Fragmenten der 16S rDNA, bzw. 5S rDNA klonierten pUC57/T-Vektoren in die Bakterien geschleust und vermehrt werden. Die Einschleusung von DNA-Molekülen in kompetente Bakterien wurde als Transformation bezeichnet. Für die Transformation wurde die Methode von Hanahan (1983) angewandt. Dazu wurden jeweils 5 µl eines Vektor-Ligationsansatzes mit dem Vektor pUC57/T (siehe 2.3.7.) zu 100 µl zuvor auf Eis aufgetauten kompetenten DH5aF'-Bakterien gegeben und 45 min. auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden 90-sekündigem Hitzeschock bei 42 °C, wurden die Bakterien für 2 min. auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und eine Stunde lang bei 37 °C und 180 U/min. (Schüttler, Infors AG, Bottmingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde unter der Sterilbank getrocknet und dann über Nacht bei 37 °C in einem Bruschrack inkubiert. Der hier für die Transformation der Bakterien verwendete Vektor pUC57/T enthält das *lacZ'*-Gen in der Klonierungseinheit und verfügt über eine Ampicillinresistenz. Somit ist die Selektion der transformierten Bakterien auf LB-Amp-Platten gewährleistet. Vor dem Ausstreichen der Bakterien auf der LB-Amp-Platte wurden 60 µl einer X-Gal-Stammlösung flächendeckend verteilt, um die Detektion von transformierten Kolonien mittels einer „Blau-Weiß“-Selektion durchführen zu können. So sind Bakterien, die ein pUC57T-Plasmid mit inkloniertem PCR-Produkt enthalten, im Gegensatz zu einem religierten pUC57T-Vektor, nicht in der Lage einen blauen Indigofarbstoff zu oxidieren,

2. Material und Methoden

weil das dafür erforderliche *lacZ'*-Gen durch das in den Vektor inserierte DNA-Fragment zerstört ist.

2.3.11. PCR zur Verifizierung positiver Kolonien

Eine effiziente Methode, um eine große Anzahl aus einer Transformation hervorgegangenen Kolonien auf die Anwesenheit des inklonierten DNA-Fragments zu untersuchen, ist die Amplifikation des DNA-Fragments mit den entsprechenden Oligonukleotiden. Diese Methode wurde verwendet, um die Vektoren zu detektieren, in die das Amplifikat der 16S rDNA, bzw. der 5S rDNA inseriert wurde. Dabei wurde eine weiße Bakterien-Kolonie, die über ein inseriertes DNA-Fragment verfügt, mit einer autoklavierten 10 µl-Pipettenspitze aufgenommen, ein kleiner Teil der Bakterienkolonie auf eine frische LB-Amp-Platte übertragen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und die sich entwickelnde Kolonie zum Animpfen von LB-AMP-Flüssigkulturen verwendet. Die Pipettenspitze mit dem sich daran befindenden Rest der Bakterien-Kolonie wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl autoklaviertem Aqua bidest. überführt. Die so präparierten Reaktionsgefäße wurden 10 min. lang bei 95 °C erhitzt, um die Bakterien zu denaturieren und die Plasmid-DNA freizusetzen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur abgekühlt, kurz anzentrifugiert und 2 µl der Suspension für einen PCR-Ansatz verwendet.

2.3.12. Miniplasmidpräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Bakterien-Kolonien, in denen nach der PCR das gewünschte DNA-Fragment detektiert wurde, wurden bei 37 °C und 200 U/min. in 5 ml LB-AMP-Flüssigmedium über Nacht kultiviert. 880 µl dieser Flüssigkultur wurden in 120 µl Glycerin resuspendiert und bei -70 °C aufbewahrt. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden für eine Schnellpräparation von Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Bakterien wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und in einer Eppendorf-Zentrifuge 30 Sekunden bei 14.000 U/min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Dabei wurde die Plasmid-DNA durch die alkalische Lyse der Bakterien freigesetzt. Die Bakterienmembran mit der chromosomalen DNA und die bakteriellen Proteine wurden durch eine

2. Material und Methoden

Acetatpräzitation aus dem Lysat entfernt. Die verbliebene Plasmid-DNA wurde durch Bindung an Glasmilchpartikel aufgereinigt und anschließend eluiert.

2.3.13. Kompetitoren für die semiquantitative PCR

Um eine semiquantitative PCR durchführen zu können, ist es notwendig bei der PCR neben der DNA-Probe, die amplifiziert werden soll, auch einen Kompetitor einzusetzen. Bei diesem Kompetitor handelt es sich um einen Vektor, in den zunächst die gleiche Sequenz inseriert wurde, die auch in der DNA-Probe amplifiziert wird. Damit das PCR-Produkt der inserierten Vektorsequenz von dem PCR-Produkt der DNA-Probe nach der Gelelektrophorese auf dem Gel unterschieden werden kann, muß das Amplifikat des Kompetitors in der Länge des DNA-Fragments von dem Amplifikat der DNA-Probe unterschieden werden können. Für die verwendeten Kompetitoren wurde durch die Insertion eines weiteren DNA-Fragments eine längere Sequenz erstellt. Die Kompetitoren, die für die semiquantitative Untersuchungen verwendet wurden, wurden nach dem folgenden Schema hergestellt.

2.3.13.1. Herstellung der Kompetitoren für die 16S rDNA-, bzw. 5S rDNA-PCR

Zunächst wurde die aus einer Filarie der Spezies *O. volvulus* isolierte DNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden für die Amplifikation der wolbachienspezifischen 16S rDNA, bzw. der filarienspezifischen 5S rDNA in der PCR eingesetzt (siehe 2.3.4.1. und 2.3.4.2.). Das 524 bp-Amplifikat der 16S rDNA-PCR, bzw. das 409 bp-Amplifikat der 5S rDNA-PCR, wurden wie beschrieben aufgereinigt (siehe 2.3.6.) und in den Vektor pUC57/T ligiert (siehe 2.3.7.).

2.3.13.2. Amplifikation eines 101 bp-DNA-Fragments

Mit den folgenden Oligonukleotiden wurde ein 101 bp-DNA-Fragment aus der 16S rDNA von *L. sigmodontis* amplifiziert:

Oligonukleotide 1: 5'-GGA TTG TAC TCT GCA ACT CGA-3'

Oligonukleotide 2: 5'-GGC AGT GTG TAC AAG ACC GA-3'

2. Material und Methoden

Das DNA-Fragment wurde wie beschrieben aufgereinigt, kloniert und sequenziert.

2.3.13.3. Insertion des 101 bp-DNA-Fragments

Das 101 bp-DNA-Fragment wurde nun in die bereits in die Vektoren ligierten 16S rDNA und 5S rDNA-Fragmente inseriert.

2.3.13.3.1. Insertion des 101 bp-DNA-Fragments in die 16S rDNA- und 5S rDNA-Kompetitoren

Für die Insertion des 101 bp-DNA-Fragments mußte zunächst das in den pUC57/T-Vektor ligierte 16S rDNA-, bzw. 5S rDNA-Fragment mit einem Enzym restringiert und somit der Vektor linearisiert werden. Dazu mußte jeweils eine Endonuklease verwendet werden, die nur eine Schnittstelle in dem einklonierten 16S rDNA-Fragment, bzw. 5S rDNA-Fragment hat, aber keine zusätzliche Schnittstelle in der Sequenz des pUC57/T-Vektors.

Der Vektor mit der 16S rDNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco* 72 I (MBI Fermentas) nach den Angaben des Herstellers linearisiert. Danach wurde die 101 bp-Sequenz in die 524 bp lange 16S rDNA-Sequenz des Vektors ligiert (Ligation siehe 2.3.7.), so dass die Länge des Produkts nun 625 bp betrug.

Der Vektor mit der 5S rDNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Nco* I (MBI Fermentas) nach den Angaben des Herstellers linearisiert. Da bei der Restriktion 5'-überhängende Enden entstanden, mußte an der Restriktionstelle mit dNTPs zu glatten Enden aufgefüllt werden. Die Polymerisation mit der T4-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde das 101 bp-DNA-Fragment in die 409 bp-lange 5S rDNA-Sequenz des Vektors ligiert, so dass die Länge des Produkts nun 510 bp betrug.

Nach der Insertion wurden die Sequenzen der hergestellten 16S rDNA und 5S rDNA-Kompetitoren sequenziert (siehe 2.3.8.).

Molekulargewicht der Kompetitoren:

16S rDNA-Kompetitor	2221775 g/mol
5S rDNA-Kompetitor	2183147 g/mol

2. Material und Methoden

2.3.14. Durchführung der semiquantitativen PCR

Zur Bestimmung der 16S rDNA-, bzw. der 5S rDNA-Konzentration in den zu untersuchenden Proben wurde die semiquantitative PCR (Reiner et al., 1993) durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Serie von PCR-Reaktionen mit einer einheitlichen DNA-Menge der zu untersuchenden Probe angesetzt. Zu den Ansätzen wurde dann eine serielle Verdünnung des entsprechenden Kompetitors (1:4-Verdünnungsschritte) hinzupipettiert und die Proben wurden kompetitiv amplifiziert. Für die semiquantitative Bestimmung der 16S rDNA wurde die Proben mit einer seriellen Verdünnung des 16S-rDNA-Kompetitors mit den entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert (siehe 2.3.4.1.). Für die semiquantitative Bestimmung der 5S spacer rDNA wurden die Proben mit einer seriellen Verdünnung des 5S rDNA-Kompetitors mit den entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert (siehe 2.3.4.2.):

<u>Komponente</u>	<u>Volumen in μl/Reaktion</u>	<u>Endkonzentration</u>
10-fach PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂	14	5 mM
dNTPs	1	200 μ M
Oligonukleotid 1	1	10 pmol
Oligonukleotid 2	23,75	10 pmol
HotStar Taq-DNA-Polymerase	0,25	
Proben-DNA (Matrize)	2	
Verdünnungsreihe des 16S rDNA-Kompetitor, bzw. 5S rDNA-Kompetitors	2	4500 bis 0 mol \times 10 ⁻¹⁵ für den 16S rDNA-Kompetitor 72000 bis 0 mol \times 10 ⁻¹⁵ für den 5S rDNA-Kompetitor;
<hr/> Gesamtvolumen	50	

Nach der PCR wurde die Proben geelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.5.) und der Äquivalenzpunkt der kompetitiven PCR optisch bestimmt. Die Konzentrationsangaben erfolgten in [mol \times 10⁻¹⁵]. Aus Konzentrationen der 16S rDNA und 5S rDNA, die aus der Äquivalenzpunktbestimmung ermittelt worden ist, wurde der [16S rDNA]/[5S rDNA]-Quotient gebildet, der im folgenden als Index bezeichnet wurde. Die semiquantitative PCR wurde durchgeführt, um die 16S rDNA- und die 5S rDNA-Konzentration in *O. volvulus*-

2. Material und Methoden

haltigen Knoten aus Onchozerkose-Patienten und in *L. sigmodontis* Filarien aus infizierten BALB/c Mäusen zu ermitteln.

2.4. Statistische Analyse

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede wurde der Student's t-Test für normal verteilte und der Mann-Whitney U Test für nicht normal verteilte Parameter verwendet. Ein Unterschied galt als signifikant bei $P < 0,05$.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Molekularbiologische Detektion der Wolbachien-DNA in Filarien

Viele human- und tierpathogene Filarien sind durch den Gehalt von endosymbiontischen Bakterien, den Wolbachien, gekennzeichnet. Dieser Abschnitt meiner wissenschaftlichen Arbeit beschäftigt sich mit der spezifischen Detektion und der Quantifizierung von Wolbachien- und Nematoden-DNA in den Filarien der Spezies *O. volvulus* und *L. sigmodontis*.

3.1.1. Spezifischer Nachweis der Wolbachien-DNA in den Filarienspezies *L. sigmodontis* und *O. volvulus* mit 16S rDNA-bindenden Oligonukleotiden

Da die DNA für die 16S ribosomale Untereinheit nicht nur in den Wolbachien von Filarien nachgewiesen werden, sondern auch in anderen Prokaryonten, war es entscheidend, eine PCR mit spezifisch bindenden Oligonukleotiden für die Amplifikation der Wolbachien-DNA aus *L. sigmodontis* und *O. volvulus* zu etablieren. Die Verwendung dieser spezifisch bindenden Oligonukleotide zeigte, dass nur die 16S rDNA aus den wolbachienpositiven Filarien amplifiziert werden konnte, aber nicht die 16S rDNA aus verschiedenen ubiquitären Bakterien und anderem wolbachiennegativen Material (**Abb. 1**). Als wolbachiennegative Kontrollen dienten die Bakterien *Escherichia coli* DhaF', die für die Transformationsexperimente verwendet wurden (siehe Abschnitt 2.3.10), sowie Bakterien eines Handflächenabstrichs und einer Hustenplatte, die auf Blutagarplatten kultiviert wurden. Bei den Bakterien handelte es sich hauptsächlich um *Staphylococcus epidermidis*. Außerdem wurde ein Abstrich der Laborbank zur DNA-Isolation und anschließenden Amplifikation verwendet. In keiner der wolbachiennegativen Proben konnte nach der PCR mit den spezifisch bindenden Oligonukleotiden ein Amplifikat nachgewiesen werden (**Abb. 1**).

3. Ergebnisse

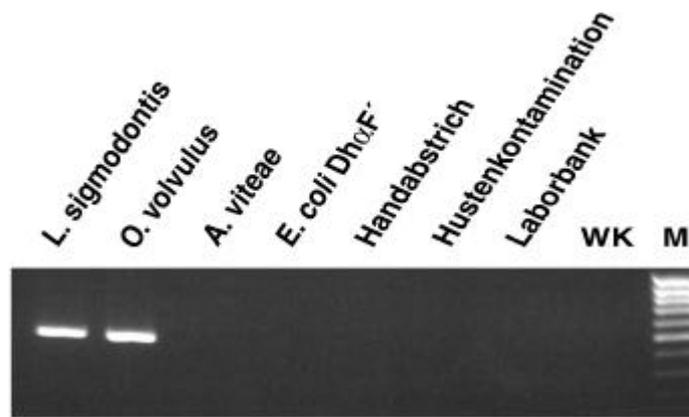


Abb. 1 Darstellung der wolbachienspezifischen 16S rDNA-Amplifikation aus verschiedenen DNA-Proben. Für die Durchführung der PCR wurden von jeder Probe jeweils 10 ng DNA eingesetzt. Die wolbachienspezifische 16S rDNA konnte nur in den beiden wolbachienpositiven Filarien *L. sigmodontis* und *O. volvulus*, aber nicht in der wolbachiennegativen Filarie *A. viteae* amplifiziert werden. Die Durchführung der PCR mit der DNA von *E. coli* DhaF', von Bakterien eines Handabstrichs und einer Tröpfchenkontamination, die auf Blutagarplatten kultiviert wurden, und mit einem Laborbankabstrich führte nicht zur Amplifikation des 16S rDNA-Fragments. WK: Wasserkontrolle; M: Molekulargewichtsmarker.

3.1.2. Untersuchungen in Filarien der Spezies *O. volvulus*

3.1.2.1. Die Behandlung mit Ivermectin beeinflusst nicht die Viabilität der Wolbachien in den *O. volvulus* Filarien

Während der Studie in Ghana wurden Onchozerkose-Patienten mit Doxycyclin, Ivermectin oder einer Kombination aus beiden Medikamenten behandelt (Hoerauf et al., 2000b & 2001a). Nach der Behandlung wurden die Onchozerkome zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Patienten extirpiert.

In diesem Abschnitt wird zunächst die Auswirkung einer Ivermectin-Behandlung auf die Wolbachien in den Knoten dargestellt. Dazu wurde aus den mir zur Verfügung gestellten Knotenhälften die DNA isoliert. Danach wurde die DNA für die Durchführung der kompetitiven Amplifikation eingesetzt und aus den erhaltenen Konzentrationen der wolbachienspezifischen 16S rDNA und der filarienspezifischen 5S rDNA die 16S rDNA/5S rDNA-Indizes ermittelt.

In diesem ersten Teil der Analyse wurden die 16S rDNA/5S rDNA-Indizes in Knoten ermittelt, die aus dem Unterhautfettgewebe von unbehandelten Onchozerkose-Patienten

3. Ergebnisse

extirpiert wurden. In einem weiteren Schritt wurde die DNA aus Knoten von Ivermectin-behandelten Patienten für die semiquantitative PCR verwendet. Die in Abb. 2 dargestellten Daten zeigen, dass die Behandlung mit Ivermectin im Vergleich zu den Knoten aus der Gruppe der unbehandelten Patienten („Unbehandelt“) nicht zu einer Reduktion der 16S rDNA/5S rDNA-Indizes führte.

In **Tab. 2** sind zusätzlich zu der grafischen Darstellung in **Abb. 2** die Anzahl der verwendeten Knoten und die Anzahl der Patienten aufgeführt. Außerdem sind die numerischen Minimal- und Maximal-16S rDNA/5S rDNA-Indizes und die Mediane der Gruppen angegeben.

Für die statistischen Untersuchungen im nun folgenden **Abschnitt 3.1.2.2.** dieser Doktorarbeit wurden Gruppen „Unbehandelt“ und „Ivermectin-behandelt“ zu einer Gruppe zusammengeführt, die im Weiteren als „Unbehandelt“ bezeichnet wurde.

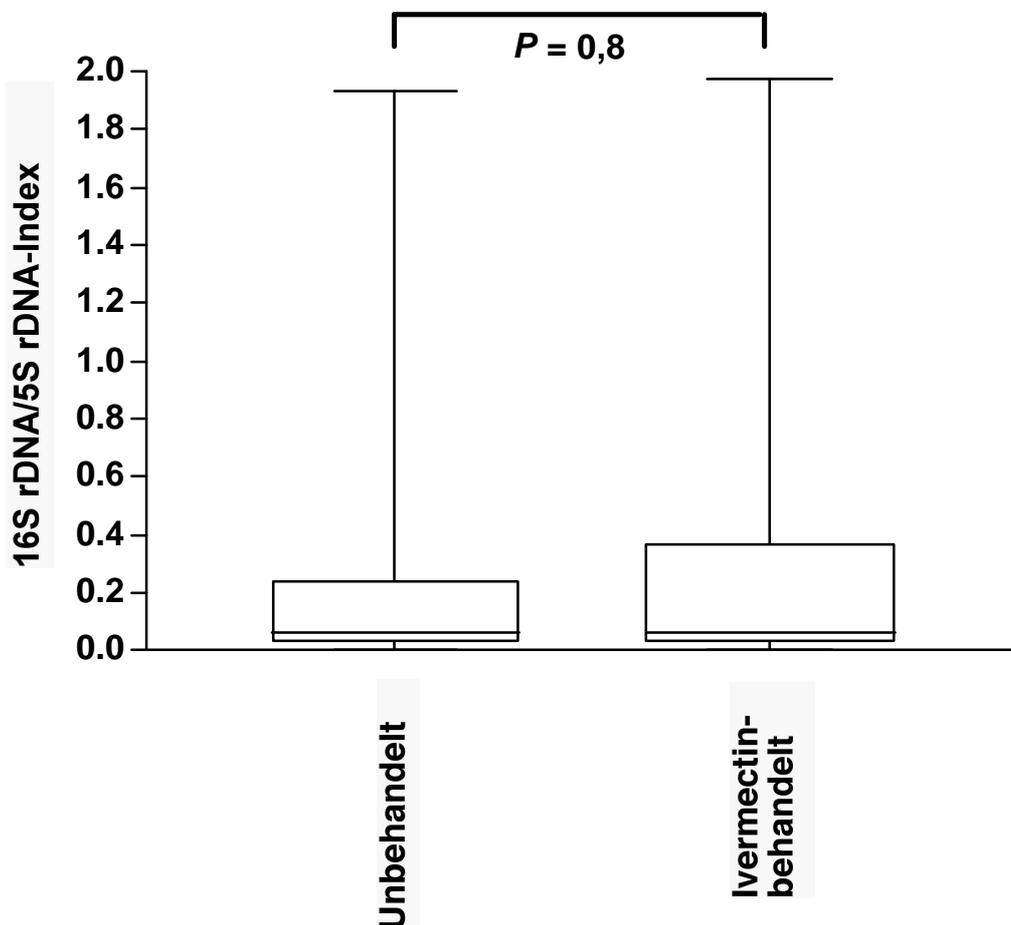


Abb. 2 16S rDNA/5S rDNA-Indizes der Knoten aus unbehandelten Patienten (Unbehandelt) und einer Knotengruppe aus Ivermectin-behandelten Patienten. Die horizontale Linie in der Box zeigt den Median an, die untere, bzw. obere Begrenzung der Box zeigen die 25%, bzw. 75% Perzentilen an. Die Balken zeigen den Wertebereich an. Die ermittelten *P*-Werte zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney U Test).

3. Ergebnisse

Tab. 2 Darstellung der minimalen, medianen und maximalen 16S rDNA/5S rDNA-Indexwerte der Knoten aus unbehandelten und Ivermectin-behandelten Patienten.

	Unbehandelt	Ivermectin-behandelt
Anzahl der Patienten/Knoten	13/9	13/18
Minimum	0,0001	0,004
Median	0,063	0,062
Maximum	1,93	1,97

Das Knotenmaterial von den unbehandelten und Ivermectin-behandelten Patienten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten extirpiert. Die DNA-Isolation aus den Knoten und die semiquantitative PCR wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Die 2 aufgeführten Knotengruppen wurden zu einer Gruppe zusammengeführt und als Gruppe „Unbehandelt“ für die statistischen Untersuchungen im **Abschnitt 3.1.2.2** verwendet.

3.1.2.2. Die Behandlung mit Doxycyclin führt zu einer deutlichen Reduktion der Wolbachien in der humanen Onchozerkose

Die Onchozerkome wurden in einem Zeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach dem Beginn der 6-wöchigen Doxycyclin-Behandlung aus den behandelten Patienten extirpiert. Wie bereits im **Abschnitt 3.1.2.1.** dargestellt, wurden mir zur Durchführung der DNA-Isolation und der semiquantitativen PCR Knotenhälften zur Verfügung gestellt.

Bereits 2,5 Monate nach Behandlungsbeginn waren die Index-Werte der Knoten der behandelten Patienten im Vergleich zu der Knotengruppe der unbehandelten Patienten um mehr als 90 % reduziert (grafische und numerische Darstellung in **Abb. 3B** und **Tab. 3**). Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 19 Monaten blieben die Indexwerte der Knotengruppen aus den Antibiotika-behandelten Patienten konstant reduziert (**Abb. 3B & Tab. 3**) und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen festgestellt werden (**Abb. 3B**). Allerdings gab es nur wenige Knoten, in den Gruppen der Antibiotika-behandelten Patienten, in denen keine bakterielle DNA nachgewiesen werden konnte. In allen Knoten der unbehandelten Patienten konnte bakterielle DNA detektiert werden (**Tab. 3 & Tab. 4**).

In **Tab. 4** und **Tab. 5** sind die minimalen, medianen und maximalen 16S rDNA-, bzw. die 5S rDNA-Konzentrationen angegeben, die bei der Durchführung der semiquantitativen PCR ermittelt wurden.

3. Ergebnisse

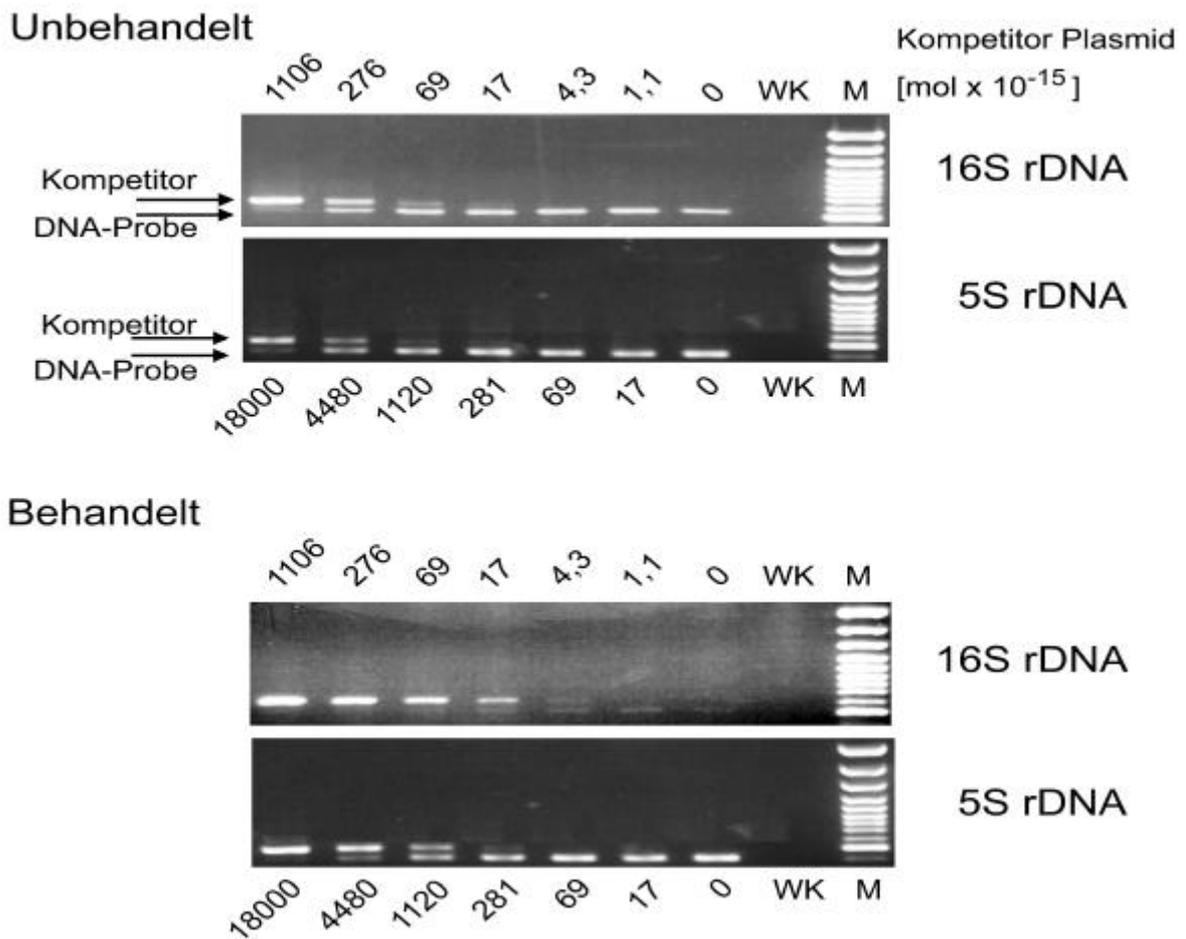


Abb. 3A Repräsentatives Beispiel der semiquantitativen PCR zur Bestimmung der 16S rDNA- und 5S rDNA-Konzentration aus jeweils einem Onchozerkom aus einem unbehandelten und einem mit Doxycyclin behandelten Patienten. Die Kompetitor-Konzentrationen sind in 10^{-15} mol/ μ l angegeben. Bei der Betrachtung der Äquivalenzpunkte ergibt sich für das Onchozerkom aus dem unbehandelten Patienten eine 16S rDNA-Konzentration von 276×10^{-15} mol/ μ l, eine 5S rDNA-Konzentration von 4480×10^{-15} mol/ μ l und ein errechneter Index-Wert von 0,061. Bei dem Onchozerkom des Doxycyclin-behandelten Patienten wurde eine 16S rDNA-Konzentration von $4,3 \times 10^{-15}$ mol/ μ l und eine 5S rDNA-Konzentration von 1120×10^{-15} mol/ μ l nachgewiesen. Daraus konnte ein Index-Wert von 0,0038 ermittelt werden.

WK: Wasserkontrolle; M: Molekulargewichtsstandard.

3. Ergebnisse

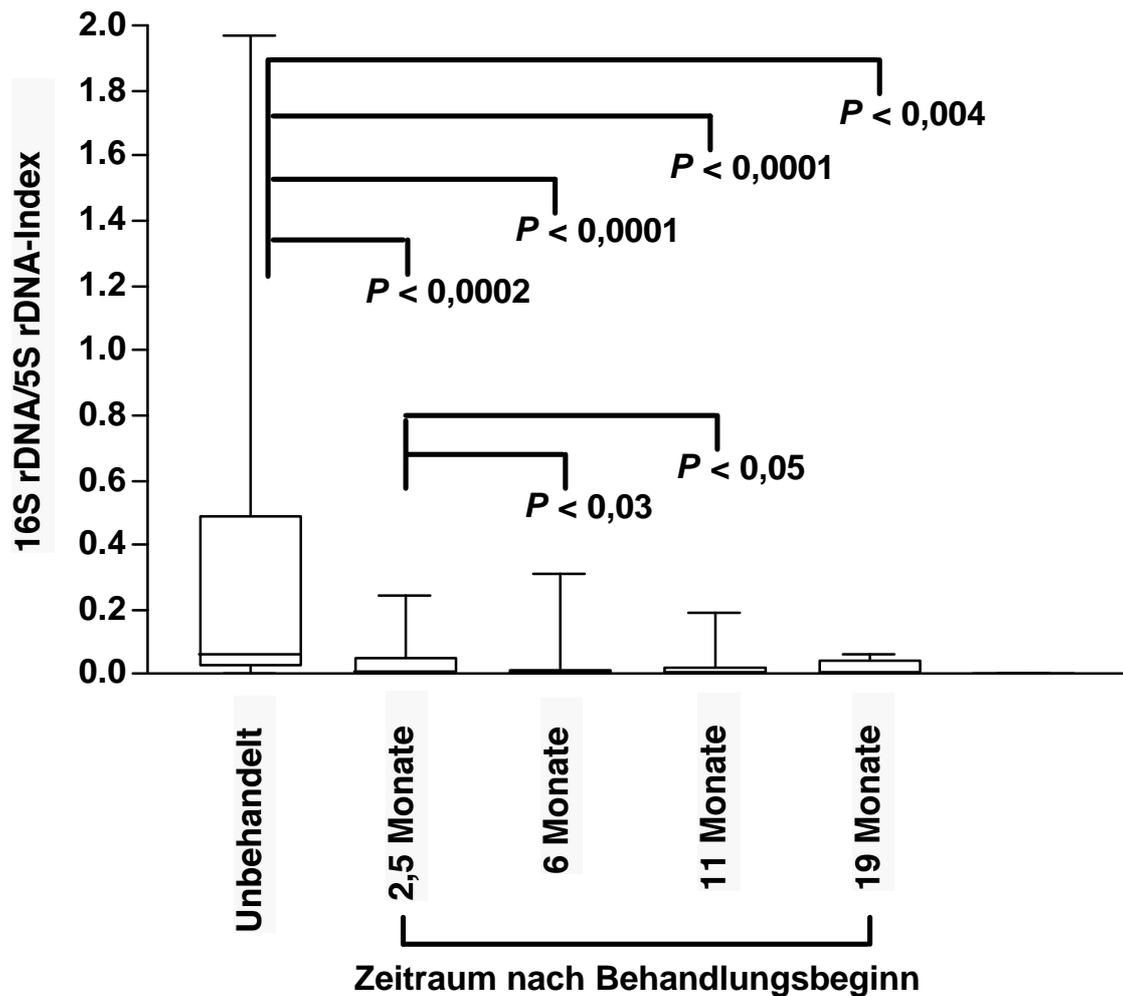


Abb. 3B 16S rDNA/5S rDNA-Indizes der Knoten aus unbehandelten und behandelten Patienten, die im Zeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach Behandlungsbeginn mit Doxycyclin aus den Patienten extirpiert wurden. Die Knoten, die 12 und 19 Monate nach Behandlungsbeginn extirpiert wurden, stammen aus Patienten, die mit Doxycyclin und Ivermectin behandelt wurden. Die horizontale Linie in der Box zeigt soweit sichtbar den Median an, die untere, bzw. obere Begrenzung der Box zeigen die 25%, bzw. 75% Perzentilen an. Die Balken zeigen den Wertebereich an. Die ermittelten P -Werte zeigen die statistischen Signifikanzen an (Mann-Whitney U Test).

3. Ergebnisse

Tab. 3 Darstellung der minimalen, medianen und maximalen 16S rDNA/5S rDNA-Indexwerte der Knoten aus unbehandelten und behandelten Patienten im Zeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach Behandlungsbeginn mit Doxycyclin. Die Knoten, die 12 und 19 Monate nach Behandlungsbeginn extirpiert wurden, stammen aus Patienten, die mit Doxycyclin und Ivermectin behandelt wurden.

	Unbehandelt	Zeitraum nach Behandlungsbeginn			
		2,5 Monate	6 Monate	12 Monate	19 Monate
Anzahl der Patienten/ Knoten	21/27	17/28	22/56	11/30	18/41
Minimum	0,0038	0	0	0	0
Median	0,12	0,008	0,004	0,006	0,006
Maximum	1,97	0,242	0,3	0,05	0,196

Tab. 4 Darstellung der minimalen, medianen und maximalen 16S rDNA-Konzentrationen in 10^{-15} mol/ μ l der Knoten aus unbehandelten und behandelten Patienten im Zeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach Behandlungsbeginn.

	Unbehandelt	Zeitraum nach Behandlungsbeginn			
		2,5 Monate	6 Monate	12 Monate	19 Monate
Anzahl der Patienten/ Knoten	21/27	17/28	22/56	11/30	18/41
Minimum	8,6	0	0	0	0
Median	138	17	1,1	7	7,8
Maximum	540	540	69	138	340

Tab. 5 Darstellung der minimalen, medianen und maximalen 5S rDNA-Konzentrationen in 10^{-15} mol/ μ l der Knoten aus unbehandelten und behandelten Patienten im Zeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach Behandlungsbeginn.

	Unbehandelt	Zeitraum nach Behandlungsbeginn			
		2,5 Monate	6 Monate	12 Monate	19 Monate
Anzahl der Patienten/ Knoten	21/27	17/28	22/56	11/30	18/41
Minimum	18	70	18	70	35
Median	560	3400	420	1130	1130
Maximum	36000	36000	9000	72000	18000

3.1.3. Untersuchungen in Filarien der Spezies *L. sigmodontis*

In diesen Experimenten wurde die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika auf die Wolbachien in den Filarien der Spezies *L. sigmodontis* in infizierten BALB/c Mäusen untersucht (Hoerauf et al., 2000 & Hoerauf et al., nicht publiziert). Das Tiermodell bot den Vorteil, dass die Antibiotikabehandlung der BALB/c Mäuse von Beginn der Infektion an

3. Ergebnisse

durchgeführt und somit auch der Einfluß der Antibiotika auf die Wurmentwicklung untersucht werden konnte (Hoerauf et al., 1999 & 2000a). Für die Untersuchung des Therapieerfolges wurde die gleiche semiquantitative Bestimmung der wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentration und der filarienspezifischen 5S rDNA-Konzentration durchgeführt, die bereits vorher für die *O. volvulus*-haltigen Knoten verwendet worden ist.

3.1.3.1. Die Tetracyclin-Behandlung von *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen führt zu einer Reduktion der Wolbachien

In diesem Experiment wurden *L. sigmodontis*-infizierte BALB/c Mäuse mit den Antibiotika Tetracyclin, Erythromycin, Chloramphenicol oder Ciprofloxacin über die gesamte Infektionsdauer von 49 bzw. 63 Tagen behandelt (Hoerauf et al., 2000a). Ein Teil der aus den infizierten BALB/c Mäusen entnommenen weiblichen Filarien wurde mir zur Durchführung der DNA-Isolation und der semiquantitativen PCR zur Verfügung gestellt. Die kompetitive Amplifikation der 16S rDNA und der 5S rDNA zeigte, dass nur in den Filarien aus den Tetracyclin-behandelten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen deutlich reduzierte 16S rDNA-Konzentrationen und 16S rDNA/5S rDNA-Indizes nachgewiesen werden konnten (**Tab. 6**). Die Behandlung mit Tetracyclin führte nicht nur zu einer Reduktion der Wolbachienkonzentration, sondern auch zu einer Einschränkung der Filarienentwicklung und des Längenwachstums (Hoerauf et al., 2000). Dadurch konnte erklärt werden, dass die 5S rDNA-Konzentration in den Filarien der behandelten Mäuse reduziert waren (**Tab. 6**). Allerdings konnte bei dem Vergleich der Index-Werte festgestellt werden, dass die reduzierte 16S rDNA-Konzentration nach der Tetracyclin-Behandlung nicht mit der geringen Menge an Wurmmaterial pro Filarie assoziiert war, sondern eine Folge der Behandlung mit dem Antibiotikum war. Die Behandlung von BALB/c Mäusen mit Erythromycin, Chloramphenicol oder Ciprofloxacin führte dagegen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen weder nach 49 noch nach 63 Tagen Infektionsdauer zu einer Reduktion der Wolbachien-DNA in den Filarien (**Tab. 6**).

3. Ergebnisse

Tab. 6 Darstellung der wolbachienspezifischen 16S rDNA-, der 5S rDNA-Konzentrationen und der 16S rDNA/5S rDNA-Indizes der Filarien aus unbehandelten und behandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer^a.

Antibiotikum	Konzentration in x 10 ⁻¹⁵ mol/μl		
49 Tage Behandlungsdauer	16S rDNA- Konzentration	5S rDNA- Konzentration	16S rDNA/5S rDNA- Indizes
Unbehandelt	481,5 (277 - 550)	1400 (1130 - 1670)	0,35 (0,17 - 0,48)
Tetracyclin	0,5 (0,25 - 1) ^b	242 (208 - 277) ^b	0,002(0,001 - 0,005) ^b
Erythromycin	345 (138 - 550)	1400 (550 - 1670)	0,25 (0,25 - 0,33)
Chloramphenicol	481,5 (277 - 845)	1400 (860 - 2260)	0,35 (0,001 - 0,005)
Ciprofloxacin	481,5 (277 - 550)	1400 (860 - 1670)	0,33 (0,32 - 0,38)
63 Tage Behandlungsdauer			
Unbehandelt	987,5 (550 - 1130)	2550 (2270 - 2260)	0,36 (0,24 - 0,39)
Tetracyclin	0,4 (0,25 - 0,5) ^b	242 (208 - 277) ^b	0,002(0,001 - 0,002) ^b
Erythromycin	775 (550 - 845)	2550 (1130 - 2270)	0,43 (0,31 - 0,51)
Chloramphenicol	628 (550 - 845)	1970 (1130 - 2270)	0,35 (0,31 - 0,48)
Ciprofloxacin	698 (550 - 1130)	1970 (1130 - 2270)	0,39 (0,23 - 0,48)

^a Pro Behandlungsgruppe wurden für die Durchführung der semiquantitativen PCR 4 Filarien verwendet.

Für die Untersuchungen wurden je 4 BALB/c Mäuse pro Gruppe verwendet.

Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet als (Mann-Whitney U Test):

^bSignifikant niedriger ($P < 0,03$) als in Filarien aus unbehandelten BALB/c Mäusen oder BALB/c Mäusen, die mit Erythromycin, Chloramphenicol oder Ciprofloxacin behandelt wurden

3.1.3.2. Depletion der Wolbachien bei *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach Behandlung mit Rifampicin und Doxycyclin

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung der Antibiotika Doxycyclin und Rifampicin auf die Viabilität der Wolbachien bei einer verkürzten Behandlungszeit untersucht. *L. sigmodontis*- infizierte BALB/c Mäuse wurden von Beginn der Infektion an bis zu einer Dauer von 21 Tagen oral mit 1 mg Doxycyclin, Rifampicin oder mit einer Kombination aus beiden Antibiotika behandelt (Hoerauf et al., nicht publiziert). Nach 49, bzw. nach 63 Tagen Infektionsdauer wurden die Würmer aus den Mäusen entnommen, von denen ein Teil für die DNA-Isolation und die PCR verwendet wurde.

Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR, die in **Tab. 7a** dargestellt sind, zeigen, dass die Behandlung mit Doxycyclin zu einer Reduktion der wolbachienspezifischen 16s rDNA in den Filarien führte. Durch die Behandlung mit Rifampicin wurde die 16S rDNA-Konzentration

3. Ergebnisse

um mehr als 99 % reduziert. In den Filarien, die aus Rifampicin-/Doxycyclin-behandelten Mäusen stammten, konnte nach 49 Tagen Infektionsdauer in 4 von 5 Filarien ein 16S rDNA-Signal und nach 63 Tagen Infektionsdauer nur in 2 von 8 Filarien ein 16S rDNA-Signal detektiert werden. Die 16S rDNA-Konzentration war nach der Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung noch stärker reduziert als nach der Rifampicin-Behandlung allein (**Tab. 7a**). Durch die behandlungsbedingte Einschränkung des Längenwachstum der Filarien war zu erklären, dass die 5S rDNA-Konzentration der Filarien aus den Rifampicin-behandelten und Rifampicin-/Doxycyclin-behandelten BALB/c Mäusen im Vergleich zu den Filarien aus den unbehandelten BALB/c Mäusen um etwa 80 % reduziert waren (**Tab. 7b**). Bei der Betrachtung der 16S rDNA/5S rDNA-Indizes in **Tab. 7c** zeigte sich, dass die Indizes der Filarien aus den behandelten BALB/c Mäusen im Vergleich zu den Indizes der Filarien aus den unbehandelten BALB/c Mäusen niedriger waren. Dabei führte die Rifampicin- und die Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer zu einer Reduktion um mehr als 99 %. Diese Daten zeigen, dass die 21-tägige Behandlung mit Rifampicin oder der Kombination aus Rifampicin und Doxycyclin ausreichte, so dass auch nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer kein Anstieg der wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentration festgestellt werden konnte.

3. Ergebnisse

Tab. 7a Darstellung der wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentrationen der Filarien aus unbehandelten und behandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer.

Antibiotikum	Konzentration in $\times 10^{-15}$ mol/ μ l	
	<u>49 Tage Infektionsdauer^a</u>	<u>63 Tage Infektionsdauer^b</u>
Unbehandelt	560 (560 – 1106) ^c	828 (550 – 1106) ^f
Doxycyclin	207,5 (69 – 560) ^d	413,5 (4,3 – 1106) ^g
Rifampicin	0,5 (0,25 – 1,1) ^e	0,5 (0,3 – 1,1) ^h
Doxycyclin/ Rifampicin	0,3 (0 – 0,5)	0 (0 – 0,25)

Die Zahlen vor den Klammern sind die Mediane. Die Zahlen in den Klammern stellen den Wertebereich dar.

^aVon den unbehandelten BALB/c Mäusen wurden 4 Filarien verwendet, von den Doxycyclin-behandelten BALB/c Mäusen 6 Filarien, von den Rifampicin-behandelten und den Rifampicin-/Doxycyclin-behandelten jeweils 5 Filarien. Für die Untersuchungen wurden 1 unbehandelte, 4 Doxycyclin-, 4 Rifampicin- und 6 Rifampicin-/Doxycyclin-behandelte BALB/c Mäuse verwendet.

^bVon den unbehandelten BALB/c Mäusen wurden 8 Filarien verwendet, von den Doxycyclin-behandelten BALB/c Mäusen 21 Filarien, von den Rifampicin-behandelten 4 Filarien und den Rifampicin-/Doxycyclin-behandelten jeweils 8 Filarien. Für die Untersuchungen wurden 2 unbehandelte, 8 Doxycyclin-, 8 Rifampicin- und 12 Rifampicin-/Doxycyclin-behandelte BALB/c Mäuse verwendet.

Die Angaben bezüglich der Anzahl der Filarien und der BALB/c Mäuse gelten auch für die Daten, die in Tabelle 7b und 7c dargestellt sind.

Signifikante Unterschiede zwischen den wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentrationen waren nach 49 Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^cSignifikant höher als nach der Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,009$), Rifampicin-Behandlung ($P < 0,008$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,005$).

^dSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,003$).

^eSignifikant höher als nach Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,04$).

Signifikante Unterschiede zwischen den wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentrationen waren nach 63 Tagen Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^fSignifikant höher als nach der Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,03$), Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0003$).

^gSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,002$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0001$).

^hSignifikant höher als nach Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,009$).

3. Ergebnisse

Tab. 7b Darstellung der filarienspezifischen 5S rDNA-Konzentrationen der Filarien aus unbehandelten und behandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer.

Antibiotikum	Konzentration in $\times 10^{-15}$ mol/ μ l	
	<u>49 Tage Infektionsdauer</u>	<u>63 Tage Infektionsdauer</u>
Unbehandelt	1140 (560 – 2250) ^a	1140 (1140 – 2250) ^d
Doxycyclin	1123 (560 – 2250) ^b	1140 (1140 – 4500) ^e
Rifampicin	280 (138 – 280) ^c	280 (138 – 280)
Rifampicin/ Doxycyclin	280 (138 – 280)	209 (138 – 280)

Die Zahlen vor den Klammern sind die Mediane. Die Zahlen in den Klammern stellen den Wertebereich dar.

Signifikante Unterschiede zwischen den wolbachienspezifischen 5S rDNA-Konzentrationen waren nach 49 Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^a Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,003$).

^b Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,003$).

^c Signifikant höher als nach Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,003$).

Signifikante Unterschiede zwischen den wolbachienspezifischen 5S rDNA-Konzentrationen waren nach 63 Tagen Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^d Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,004$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0002$).

^e Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0001$).

3. Ergebnisse

Tab. 7c Darstellung der 16S rDNA/5S rDNA-Indizes der Filarien aus unbehandelten und behandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer.

Antibiotikum	16S rDNA/5S rDNA-Index	
	<u>49 Tage Infektionsdauer</u>	<u>63 Tage Infektionsdauer</u>
unbehandelt	0,49 (0,24 – 0,97) ^a	0,79 (0,002 – 0,99) ^d
Doxycyclin	0,2 (0,06 – 0,25) ^b	0,24 (0,24 – 0,98) ^e
Rifampicin	0,003 (0,001 – 0,008) ^c	0,004 (0,0009 – 0,007) ^f
Rifampicin/ Doxycyclin	0,0009 (0 – 0,002)	0 (0 – 0,001)

Die Zahlen vor den Klammern sind die Mediane. Die Zahlen in den Klammern stellen den Wertebereich dar.

Signifikante Unterschiede zwischen den 16S rDNA-/5S rDNA-Indizes waren nach 49 Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^a Signifikant höher als nach Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,04$), Rifampicin-Behandlung ($P < 0,02$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,02$).

^b Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,005$).

^c Signifikant höher als nach Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,05$).

Signifikante Unterschiede zwischen den 16S rDNA-/5S rDNA-Indizes waren nach 63 Tagen Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^d Signifikant höher als nach Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,04$), Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0003$).

^e Signifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,005$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0001$).

^f Signifikant höher als nach Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,009$).

3.2. Deutliche Einschränkung der Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle von Antibiotika-behandelten BALB/c Mäusen

In den **Abschnitten 3.1.2.** und **3.1.3.** wurde dargestellt, dass die Antibiotika-Behandlung von Onchozerkose-Patienten und von *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentration in den Filarien führte. Untersuchungen in Onchozerkosen von unbehandelten und Doxycyclin-behandelten Patienten zeigten, dass es nur in Knoten mit wolbachienhaltigen Filarien zu einer Akkumulation von Neutrophilen in der Umgebung des Wurms kam (Brattig et al., 2001).

Bei der Analyse der immunologischen Prozesse in den *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen sollte nun die Bedeutung der Wolbachien für die Akkumulation der Neutrophilen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer in der Pleurahöhle der Mäuse untersucht werden. Dazu

3. Ergebnisse

wurde in den behandelten und unbehandelten Mäusen die Anzahl der Neutrophilen in den Pleuraexsudatzellen bestimmt.

Die Akkumulation der Neutrophilen in der Pleurahöhle war bei den Doxycyclin-behandelten BALB/c Mäusen nur leicht reduziert im Vergleich zu den unbehandelten BALB/c Mäusen. In den Rifampicin- und Rifampicin-/Doxycyclin-behandelten BALB/c Mäusen, bei denen kaum oder keine wolbachienspezifischen 16S rDNA-Konzentrationen in den Filarien detektiert werden konnten (**Tab. 7a**), kam es zu einer um mehr als 90 % reduzierten Akkumulation der Neutrophilen (**Tab. 8**). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass auch die Wolbachien in den Filarien der Spezies *L. sigmodontis* eine Funktion in der Akkumulation der Neutrophilen haben könnten.

3. Ergebnisse

Tab. 8 Darstellung der Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle von unbehandelten und behandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen nach 49 Tagen und 63 Tagen Infektionsdauer.

Antibiotikum	Zellzahlen in $\times 10^6$ Zellen			
	<u>49 Tage Infektionsdauer</u>		<u>63 Tage Infektionsdauer</u>	
	<u>Neutrophile</u>	<u>Gesamtzellen</u>	<u>Neutrophile</u>	<u>Gesamtzellen</u>
unbehandelt	1,5*	21*	4,5; 7,6*	20; 32*
Doxycyclin [§]	$1,2 \pm 0,3^a$	$20,0 \pm 4,4^b$	$2,6 \pm 1,2^c$	$19,4 \pm 5,5^d$
Rifampicin [§]	$0,1 \pm 0,1$	$7,7 \pm 2,7$	$0,1 \pm 0,1$	$7,1 \pm 3,2$
Rifampicin/ Doxycyclin [§]	$0,1 \pm 0,1$	$5,6 \pm 2,6$	$0,1 \pm 0,1$	$8,5 \pm 2,8$

Die Zahlenwerte geben Mittelwert \pm Standardabweichung an.

*Die Daten bei unbehandelten BALB/c Mäusen nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer sind Einzelwerte. Wegen der geringen Anzahl an Einzelwerten konnte die Neutrophilenakkumulation in den unbehandelten BALB/c Mäusen nicht für die Berechnung signifikanter Unterschiede verwendet werden.

[§]Pro Gruppe wurde die Anzahl der Neutrophilen und Gesamtzellen in Der Pleurahöhle von mindestens 4 BALB/c Mäusen bestimmt

Signifikante Unterschiede zwischen den Zellzahlen waren nach 49 und 63 Tagen Infektionsdauer (Mann-Whitney U Test):

^aSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,03$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,02$).

^bSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,0003$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0004$).

^cSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,03$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,01$).

^dSignifikant höher als nach Rifampicin-Behandlung ($P < 0,0003$) oder Rifampicin-/Doxycyclin-Behandlung ($P < 0,0004$).

3.3. Abhängigkeit der Neutrophilenantwort in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen von den Zytokinen IL-5 und IFN-g

Im vorigen Abschnitt wurden Hinweise dafür gegeben, dass die Wolbachien der Filarien an der Akkumulation der Neutrophilen in der Pleurahöhle der *L. sigmodontis*-BALB/c Mäusen beteiligt sein könnten.

Die Bedeutung der Neutrophilen in der Abkapselung adulter Würmer und somit in der Beseitigung der *L. sigmodontis*-Infektionen in BALB/c Mäusen wurde in früheren Untersuchungen dokumentiert (Al-Qaoud et al., 2001 & Saefel et al., 2001). In den folgenden Experimenten wurde die Auswirkung der IL-5-Defizienz für die Neutrophilenakkumulation

3. Ergebnisse

und die Kontrolle der *L. sigmodontis*-Infektion untersucht. Außerdem wurde die Funktion der Zytokine IL-5 und IFN- γ auf die Aktivierung der Neutrophilen analysiert.

3.3.1. Reduktion der Neutrophilen- und Eosinophilenakkumulation in der Pleurahöhle von IL-5 KO Mäusen

Die Infektion von BALB/c-Mäusen ist charakterisiert durch eine stetig anwachsende Zellakkumulation in der Pleurahöhle. Die Zellzahlen sinken erst wieder, wenn die Wurminfektion durch die Abkapselung der adulten Würmer beseitigt worden ist.

Die Immunantwort bei IL-5 KO Mäusen war im Vergleich zu BALB/c Mäusen durch eine deutlich reduzierte Zellakkumulation in der Pleurahöhle nach 28, 60 und 80 Tagen Infektionsdauer gekennzeichnet (**Abb. 4**).

IL-5 KO Mäuse zeigten dabei während der frühen und späten Phase der Infektion eine deutlich reduzierte Eosinophilenakkumulation (**Abb. 4A**). Die Neutrophilenakkumulation war nach einer Infektionsdauer von 80 Tagen im Vergleich zu BALB/c Mäusen reduziert (**Abb. 4B**). Bei der Betrachtung der Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle von BALB/c Mäusen zeigte sich, dass die Neutrophilenzahlen bis 80 Tage nach Beginn der Infektion tendenziell anstiegen und nach 130 Tagen Infektionsdauer deutlich reduziert waren. Dagegen zeigten die IL-5 KO Mäuse zwischen 60, 80 und 130 Tagen Infektionsdauer eine vergleichbare Neutrophilenakkumulation.

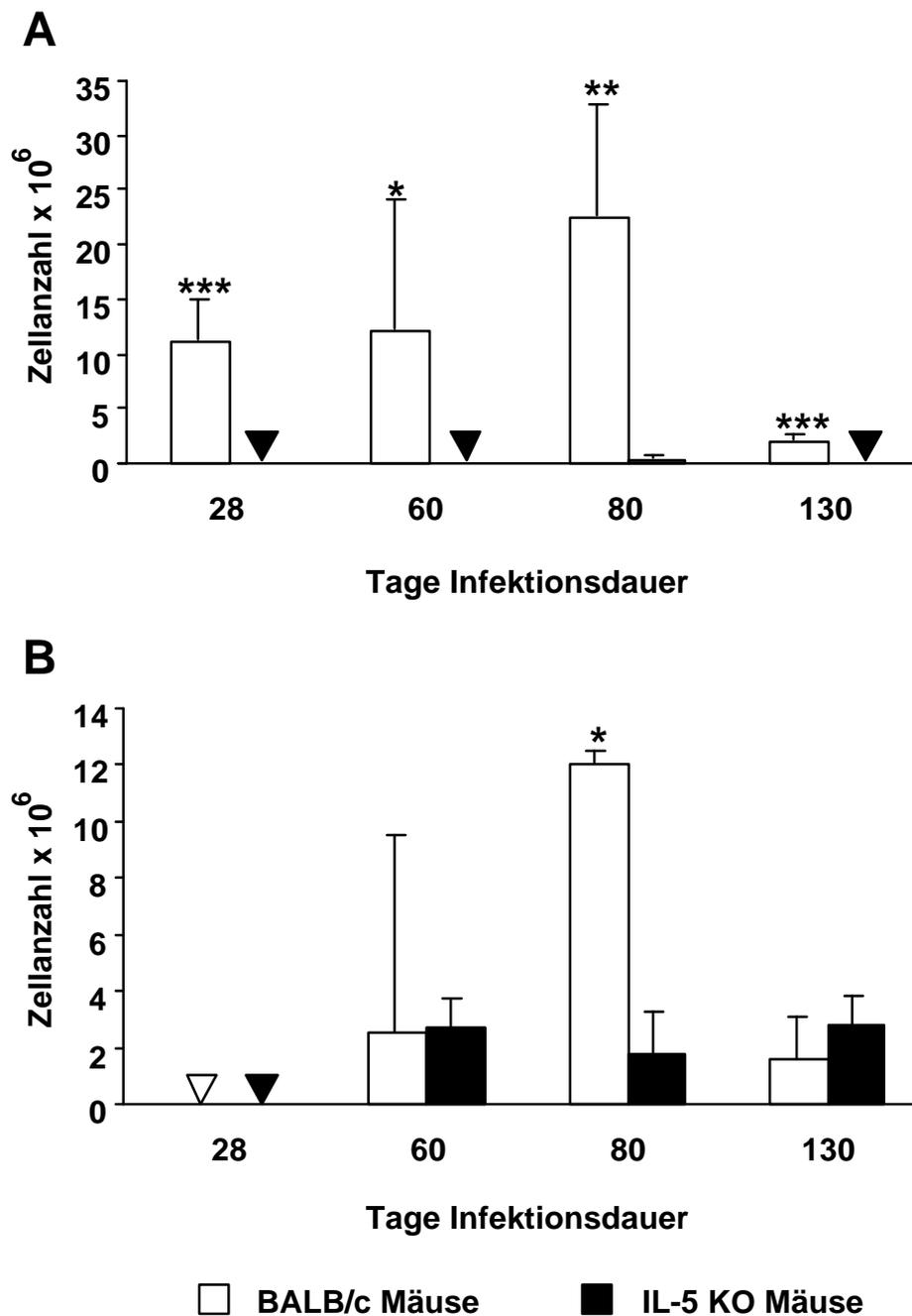


Abb. 4 Die Zellzahlen der akkumulierten (A) Eosinophilen und (B) Neutrophilen in der Pleurahöhle von BALB/c und IL-5 KO Mäusen sind für die Zeitpunkte 28, 60, 80 und 130 Tage nach Beginn der Infektion gezeigt. Für die Untersuchungen nach 28 Tagen Infektionsdauer wurden 5 Mäuse pro Gruppe und für alle anderen Zeitpunkte wurden 4 Mäuse pro Gruppe verwendet.

Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-5 KO Mäusen sind gekennzeichnet als:

* $P < 0,05$; ** $P < 0,04$; *** $P < 0,03$ (Mann-Whitney U Test).

Die Gesamtzellzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Pleurahöhle in $\times 10^6$ Zellen waren für BALB/c und IL-5 KO Mäuse $31,3 \pm 7,1$ und $9,0 \pm 3,5$ ($P < 0,03$; Mann-Whitney U Test) nach 28 Tagen Infektionsdauer; $39,3 \pm 24,6$ und $24,5 \pm 6,2$ ($P < 0,03$) nach 60 Tagen Infektionsdauer; $60,7 \pm 26,6$ und $18,3 \pm 2,1$ ($P < 0,04$) nach 80 Tagen Infektionsdauer; $6,5 \pm 5,0$ und $17,3 \pm 2,3$ nach 130 Tagen Infektionsdauer.

3.3.1.1. Neutrophilenaktivierende Zytokine sind reduziert in IL-5 defizienten Mäusen

Übereinstimmend mit der reduzierten Neutrophilenakkumulation hatten die IL-5 KO Mäuse nach 80 Tagen Infektionsdauer deutlich reduzierte Konzentrationen der chemotaktischen Zytokine KC (murines IL-8) und TNF- α in der Pleurahöhle (**Abb. 5A**).

Außerdem wurde *in vitro* die Produktion dieser Zytokine in den Zellen der Pleurahöhle untersucht. Dazu wurden Pleuraexsudatzellen oder Makrophagen aus der Pleurahöhle in Mikrotiterplatten mit *L. sigmodontis*-Antigen stimuliert. Nur die Makrophagen von BALB/c-Mäusen produzierten TNF- α nach der Antigenstimulation. In den Makrophagenkulturüberständen von BALB/c und IL-5 KO Mäusen konnte dagegen kein IL-10 nachgewiesen werden (**Abb.5B**). Die Pleuraexsudatzellen von IL-5 KO Mäusen zeigten im Vergleich zu BALB/c Mäusen eine deutlich reduzierte KC-Produktion (**Abb. 5C**).

3. Ergebnisse

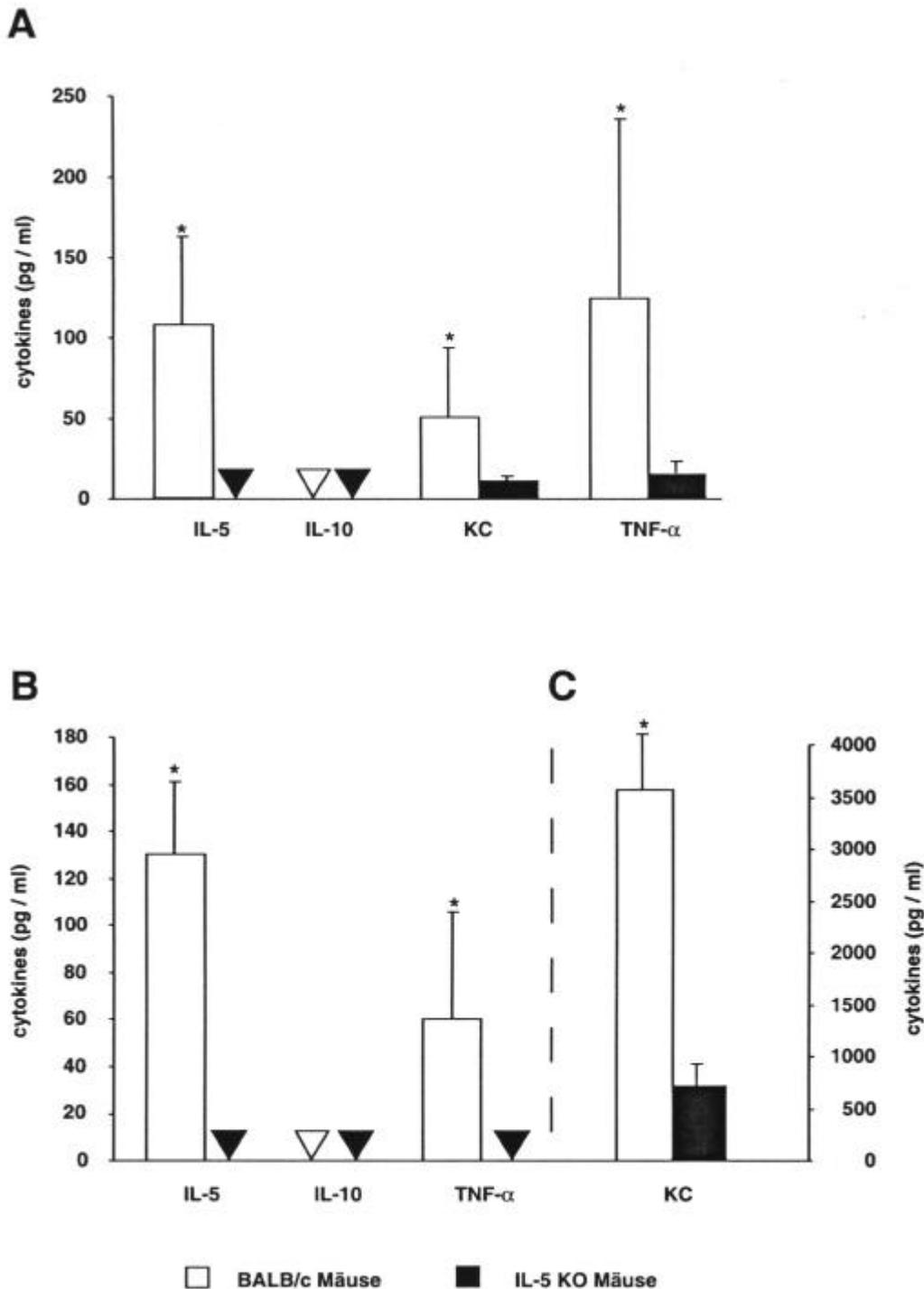


Abb. 5 Zytokine in BALB/c und IL-5 KO Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer. (A) Die Konzentrationen der chemotaktischen Zytokine KC und TNF- α waren in der Pleurahöhle von IL-5 KO Mäusen reduziert. IL-10 konnte nicht detektiert werden. (B) IL-5, IL-10 und TNF- α Produktion von Makrophagen aus der Pleurahöhle nach der Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen (100 μ g/ml). (C) KC Produktion von Zellen aus der Pleurahöhle nach der Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen (100 μ g/ml). Für die Untersuchungen wurden 4 Mäuse pro Gruppe verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-5 KO Mäusen sind gekennzeichnet als: * $P < 0,04$ (Mann-Whitney U Test).

3.3.2. IL-5 KO Mäuse haben eine deutlich erhöhte Suszeptibilität für *L. sigmodontis*-Infektionen

Die parasitologische Untersuchung zeigte, dass IL-5 KO Mäuse nach 28 Tagen Infektionsdauer deutlich mehr adulte Würmer in der Pleurahöhle hatten als die BALB/c Mäuse (**Abb. 6B**). Dies ist ein Hinweis darauf, dass IL-5 eine wichtige Funktion in der Immunantwort während der frühen Phase der Infektion hat, in der sich Würmer von infektiösen Larven (L3-Stadium) zu adulten Filarien entwickeln. Ab 60 Tagen Infektionsdauer zeigten BALB/c Mäuse eine stetige Reduktion der Wurmlast, die durch zelluläre Abkapselungsprozesse und Knotenbildung gekennzeichnet war. 130 Tage nach Beginn der Infektion konnten nur noch vereinzelt adulte Filarien nachgewiesen werden. IL-5 KO Mäuse zeigten dagegen während der gesamten Infektionsdauer eine konstant hohe Wurmlast (**Abb. 6B**) und nur eine geringe Abkapselung adulter Würmer. In IL-5 KO Mäusen kam es nach 60 Tagen Infektionsdauer zu keiner Knotenbildung, während BALB/c Mäuse einen Median von 2 Knoten (Knotenanzahl von 1 bis 2) hatten. Nach 80 Tagen Infektionsdauer hatten IL-5 KO Mäuse einen Median von 1,5 Knoten (Knotenanzahl von 0 bis 4) im Vergleich zu BALB/c Mäusen mit einem Median von 5 (Knotenanzahl von 4 bis 7) ($P < 0,05$, Mann-Whitney U test). Nach 200 Tagen Infektionsdauer war die Knotenzahl in IL-5 KO Mäusen mit einem Median von 2,5 Knoten (Knotenanzahl von 2 bis 9) im Vergleich zu BALB/c Mäusen mit einem Median von 4,5 Knoten (Knotenanzahl von 2 bis 9) nicht reduziert. IL-5 KO Mäuse hatten an allen untersuchten Zeitpunkten der Infektion deutlich kleinere Knoten als die BALB/c Mäuse (siehe **Abb. 6A** nach 200 Tagen Infektionsdauer).

3. Ergebnisse

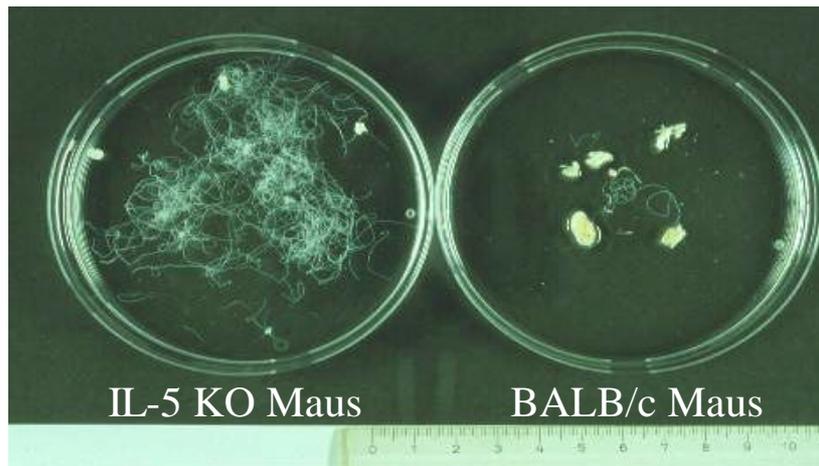


Abb. 6A Darstellung von Würmern und Knoten, die aus der Pleurahöhle je einer IL-5 KO und einer BALB/c Maus nach 200 Tagen Infektionsdauer entnommen worden sind.

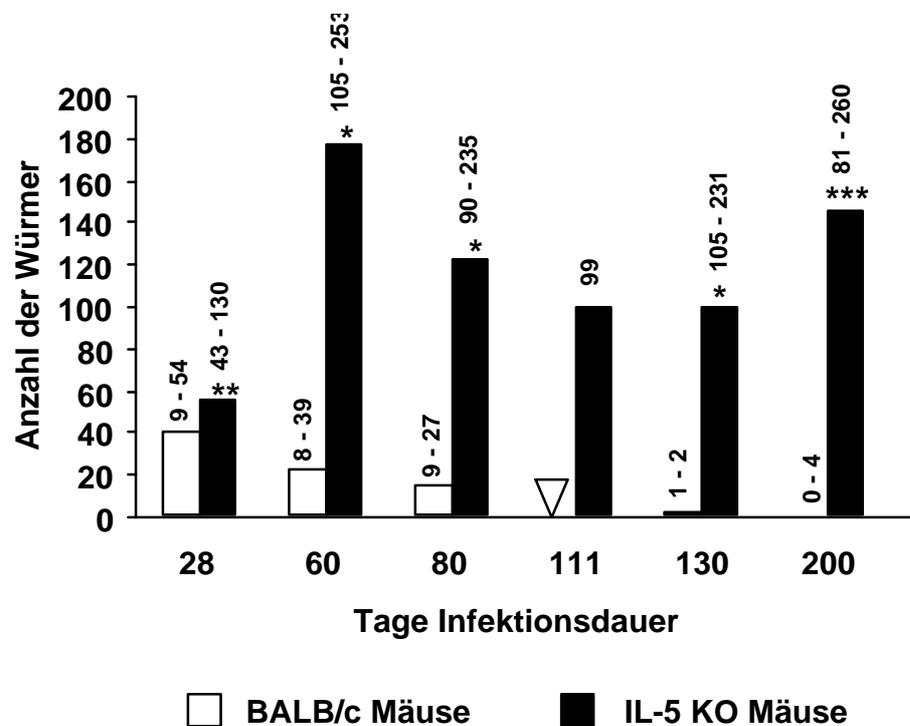


Abb. 6B Anzahl adulter Würmer in BALB/c und IL-5 KO Mäusen nach 28, 60, 80, 111, 130 und 200 Tagen Infektionsdauer. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Wurmanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. Die Anzahl der adulten Würmer war in IL-5 KO Mäusen bis zu 150-fach höher als in BALB/c Mäusen. 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt. Nach 111 Tagen Infektionsdauer wurde die Wurmanzahl jeweils nur in einer BALB/c und IL-5 KO Maus bestimmt. Nach 28 und 200 Tagen Infektionsdauer wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet. An allen anderen Zeitpunkten wurden 4 Mäuse pro Gruppe verwendet.

Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-5 KO Mäusen sind gekennzeichnet als:

* $P < 0,04$; ** $P < 0,03$; *** $P < 0,02$ (Mann-Whitney U Test).

3. Ergebnisse

3.3.3. IFN- γ -, aber nicht IL-5-Defizienz, führt zu einer reduzierten Phagozytoseaktivität der Neutrophilen

In Experimenten mit IFN- γ KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Neutrophilenakkumulation und die Immunabwehr gegen Adultwürmer deutlich reduziert waren (Saefel et al., 2001). In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die reduzierte Akkumulation der Neutrophilen in den IFN- γ KO und IL-5 KO Mäusen (**Abb. 4B**) mit einer supprimierten Neutrophilenfunktion assoziiert war. Dazu wurde die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen aus den zytokindefizienten Mäusen und aus BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer ermittelt. Außerdem wurde die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen aus nichtinfizierten Mäusen nach intraperitonealer Caseininjektion ermittelt. Die Neutrophilen aus nichtinfizierten und infizierten IFN- γ KO Mäusen zeigten eine signifikant niedrigere Phagozytose von fluoreszierenden Latexpartikel als die Neutrophilen aus nichtinfizierten und infizierten BALB/c Mäusen (**Tab. 9A**). Die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen war dagegen im Vergleich zu BALB/c Mäusen weder in nichtinfizierten noch in infizierten IL-5 KO Mäusen reduziert (**Tab. 9B**). Diese Daten zeigen, dass infizierte IL-5 KO Mäuse zwar durch eine reduzierte Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle gekennzeichnet waren (**Abb. 4B**), aber nicht durch eine reduzierte Neutrophilenaktivierung.

Tabelle 9a Phagozytosekapazität der Neutrophilen aus der Pleurahöhle von *L. sigmodontis*-infizierten IFN- γ KO und BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer und der Neutrophilen aus der Peritonealhöhle Casein-induzierter naiver IFN- γ KO und BALB/c Mäuse.

Experiment	Mausstamm	Eingesetzte Zellzahl	Anteil der NP in %	Anteil der NP mit phagozytierten Partikeln in %
<i>L. sigmodontis</i> -Infektion	IFN- γ KO	2×10^5	27 ^b	$23,7 \pm 1,8^b$
	BALB/c	2×10^5	42	$40,3 \pm 0,8$
Casein-Induktion ^a	IFN- γ KO	2×10^5	90	$18,4 \pm 5,1^b$
	BALB/c	2×10^5	93	$42,5 \pm 9,7$

Pro Gruppe wurden 3 Mäuse verwendet.

^aDaten sind repräsentativ für 2 Experimente

^bSignifikant niedriger in IFN- γ KO Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen ($P < 0,05$; Student's t Test)

3. Ergebnisse

Tabelle 9b Phagozytosekapazität der Neutrophilen aus der Pleurahöhle von *L. sigmodontis*-infizierten IL-5 KO und BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer und der Neutrophilen aus der Peritonealhöhle Casein-induzierter naiver IL-5 KO und BALB/c Mäuse.

Experiment	Mausstamm	Eingesetzte Zellzahl	Anteil der NP in %	Anteil der NP mit phagozytierten Partikeln in %
<i>L. sigmodontis</i> -Infektion	IL-5 KO	2×10^5	8,5	$39,5 \pm 4,1$
	BALB/c	2×10^5	20,5	$37,8 \pm 2,5$
Casein-Induktion ^a	IL-5 KO	2×10^5	80	$33,5 \pm 4,2$
	BALB/c	2×10^5	85	$36,8 \pm 2,8$

Pro Gruppe wurden 4 Mäuse verwendet.

^aDaten sind repräsentativ für 2 Experimente

3.4. TNF- α allein kontrolliert nicht die Immunantwort bei *L. sigmodontis* Infektionen

In **Abb. 5** konnte gezeigt werden, dass IL-5 KO Mäusen weniger TNF- α produzierten. Die Neutralisation von TNF- α in BALB/c Mäusen, die nach 42 Tagen Infektionsdauer mit löslichem TNF- α -Rezeptorprotein begonnen und bis zum Ende des Experiments durchgeführt wurde, gab einen Hinweis darauf, dass die Funktion dieses Zytokins allein nicht für den Aufbau einer schützenden Immunantwort und der Induktion der Neutrophilenakkumulation verantwortlich zu sein schien (**Abb. 7A**). Die Analyse der parasitologischen Daten nach 80 Tagen Infektionsdauer zeigte, dass die Adultwurmlast (**Abb. 7B**) und die Mikrofilariämie (**Abb. 7C**) in den behandelten BALB/c Mäusen genau so hoch war wie in den unbehandelten BALB/c Mäusen.

3. Ergebnisse

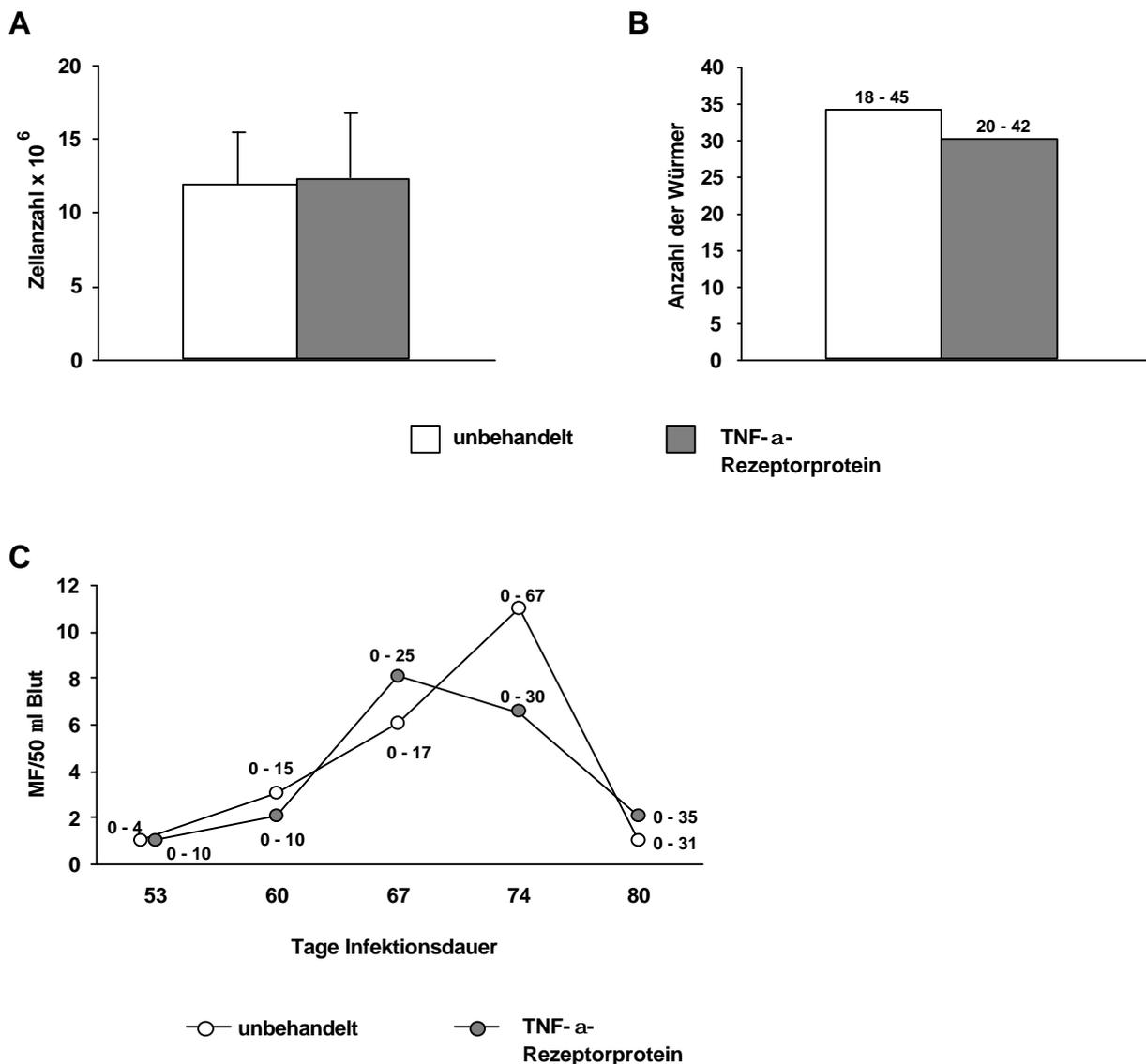


Abb. 7 (A) Neutrophilenakkumulation in der Pleurahöhle von TNF- α -Rezeptorprotein-behandelten und unbehandelten BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer. Die Gesamtzellzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Pleurahöhle waren für TNF- α -Rezeptorprotein-behandelte BALB/c Mäuse $38,6 \pm 15,4 \times 10^6$ Zellen und für unbehandelte BALB/c Mäuse $35,1 \pm 13,6 \times 10^6$ Zellen. (B) Die Anzahl der adulten Würmer nach 80 Tagen Infektionsdauer und (C) die Mikrofilariämie waren in TNF- α -Rezeptorprotein-behandelten und unbehandelten BALB/c Mäusen unverändert. Für die Untersuchungen wurden 6 Mäuse pro Gruppe verwendet.

3.5. Die Rolle von IL-5 im Vergleich zu IL-4 und IL-4 Rezeptor a für die Immunantwort

Nachdem die Auswirkung der IL-5-Defizienz auf den Verlauf der *L.sigmodontis*-Infektion und auf begleitende immunologische Prozesse analysiert worden ist, sollte die Bedeutung eines weiteren Th2-Zytokins, des IL-4, bei der Kontrolle der Wurminfektion und der Immunantwort analysiert werden. In vergleichenden Experimenten mit IL-4 KO und IL-5 KO Mäusen wurde die Mikrofilarienproduktion und die Mikrofilariämie untersucht. In diesen

3. Ergebnisse

Experimenten wurden IL-4 KO Mäuse verwendet, die vom C57BL/6- auf den BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt wurden.

Für die vergleichenden Experimente mit BALB/c-IL-4 R α KO Mäusen wurden BALB/c-IL-4 KO Mäuse verwendet.

3.5.1. IL-4 KO Mäuse haben eine reduzierte Eosinophilenakkumulation und eine erhöhte Neutrophilenakkumulation

Die Eosinophilenakkumulation in der Pleurahöhle der IL-4 KO Mäuse war nach 28, 60 und 80 Tagen nach Beginn der Infektion reduziert, die Neutrophilenakkumulation dagegen nach 80 Tagen Infektionsdauer erhöht im Vergleich zu BALB/c Mäusen (**Abb. 8**) In der Phagozytoseaktivität zeigten die Neutrophilen der IL-4 KO und BALB/c Mäuse keine Unterschiede (**Tab. 10**). Übereinstimmend mit der höheren Neutrophilenakkumulation hatten die IL-4 KO eine höhere Konzentration des chemotaktischen Zytokins KC ($532,5 \pm 221,9$ pg/ml) als die BALB/c Mäuse ($199,5 \pm 81,6$ pg/ml) ($P < 0,04$, Mann-Whitney U Test). Bei der Untersuchung der IL-5-, IFN- γ - und TNF- α -Konzentrationen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die IL-5 Konzentration in der Pleurahöhle war in IL-4 KO Mäusen ($367,5 \pm 135$ pg/ml) vergleichbar mit der in BALB/c Mäusen ($138,8 + 241,3$ pg/ml). Die IFN- γ - und die TNF- α -Konzentrationen waren in der Pleurahöhle von IL-4 KO Mäusen nur tendenziell höher (IFN- γ : $282,4 \pm 319,2$ pg/ml; TNF- α : $170,9 \pm 208,1$ pg/ml) als in BALB/c-Mäusen (IFN- γ : $126,7 \pm 306,5$; TNF- α : $112,1 \pm 187,9$ pg/ml).

Tabelle 10 Phagozytosekapazität der Neutrophilen aus der Pleurahöhle von *L. sigmodontis*-infizierten IL-4 KO und BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer.

Experiment	Mausstamm	Eingesetzte Zellzahl	Anteil der NP in %	Anteil der NP mit phagozytierten Partikeln in %
<i>L. sigmodontis</i> -Infektion	IL-4 KO	2×10^5	40	$31,9 \pm 2,8$
	BALB/c	2×10^5	18,5	$34,1 \pm 1,4$

Pro Gruppe wurden 5 Mäuse verwendet.

3. Ergebnisse

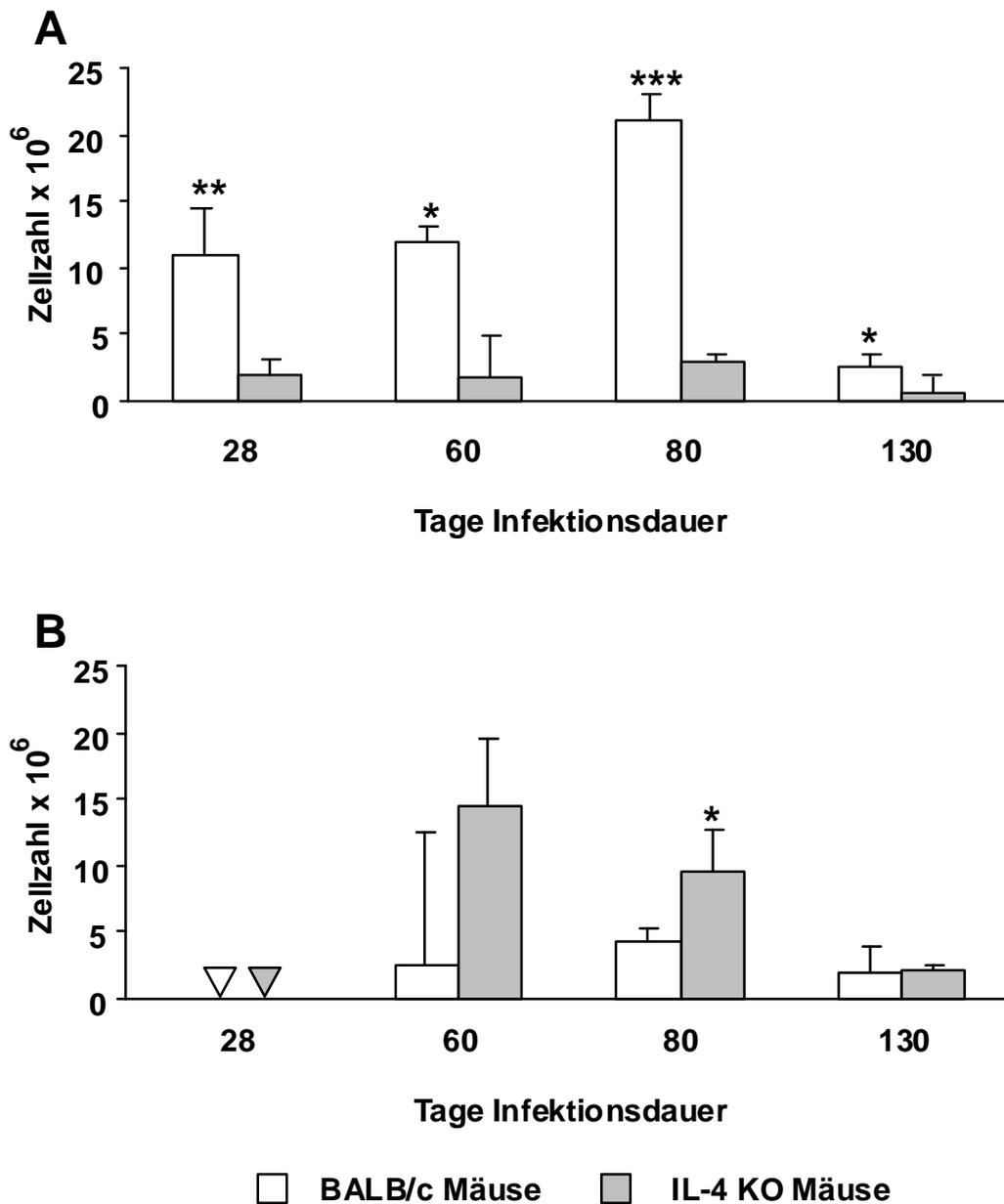


Abb. 8 Die Zellzahlen der akkumulierten (A) Eosinophilen und (B) Neutrophilen in der Pleurahöhle von BALB/c und IL-4 KO Mäusen sind für die Zeitpunkte 28, 60, 80 und 130 Tage nach Beginn der Infektion gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-4 KO Mäusen sind gekennzeichnet als: * $P < 0,05$; ** $P < 0,04$; *** $P < 0,03$ (Mann-Whitney U Test).

Die Gesamtzellzahlen (Mittelwert \pm Standardabweichung) in der Pleurahöhle in $\times 10^6$ Zellen waren für BALB/c und IL-4 KO Mäuse $31,3 \pm 7,1$ und $19,0 \pm 4,8$ nach 28 Tagen Infektionsdauer; $39,3 \pm 24,6$ und $44,5 \pm 15,9$ nach 60 Tagen Infektionsdauer; $23,9 \pm 17,8$ und $22,3 \pm 14,0$ nach 80 Tagen Infektionsdauer; $6,5 \pm 5,0$ und $21,5 \pm 26,2$ nach 130 Tagen Infektionsdauer.

Für die Untersuchungen wurden nach 28 Tagen Infektionsdauer 5 Mäuse pro Gruppe und zu allen anderen Zeitpunkten 4 Mäuse pro Gruppe verwendet.

3.5.2. IL-4- oder IL-4 Rezeptor α -Defizienz führt nicht zu einer erhöhten Adultwurmlast

Die Adultwurmlast in der Pleurahöhle der IL-4 KO Mäuse und BALB/c Mäuse wurde im Zeitraum von 28 bis 130 Tagen Infektionsdauer analysiert. Die Auswertung der Experimente zeigte, dass die IL-4 KO Mäuse im Vergleich zu BALB/c Mäusen sowohl nach der Wurmentwicklung von L3 Larven zu Adulten nach den ersten 28 Tagen der Infektion als auch in der Persistenzphase der adulten Würmer unveränderte Wurmlasten (**Abb. 9**) und eine äquivalente Knotenbildung hatten. IL-4 KO Mäusen hatten nach 60 Tagen Infektionsdauer einen Median von 1,5 Knoten (Knotenanzahl von 0 bis 6) und BALB/c Mäuse einen Median von 2 Knoten (Knotenanzahl von 1 bis 2). Nach 80 Tagen Infektionsdauer hatten IL-4 KO Mäuse einen Median von 4 Knoten (Knotenanzahl von 3 bis 7) im Vergleich zu BALB/c Mäusen mit einem Median von 5 (Knotenanzahl von 4 bis 7).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Immunabwehr gegen die adulten Würmer in BALB/c-IL-4 KO und BALB/c-IL-4R α KO Mäusen in der späten Phase der Infektion untersucht. Die Auswertung nach 80 und 111 Tagen Infektionsdauer im Vergleich zu BALB/c Mäusen ergab, dass weder IL-4 selbst noch die rezeptorvermittelte Wirkung des Zytokins wichtig waren, um die adulten Würmer abzutöten (**Abb. 10**).

3. Ergebnisse

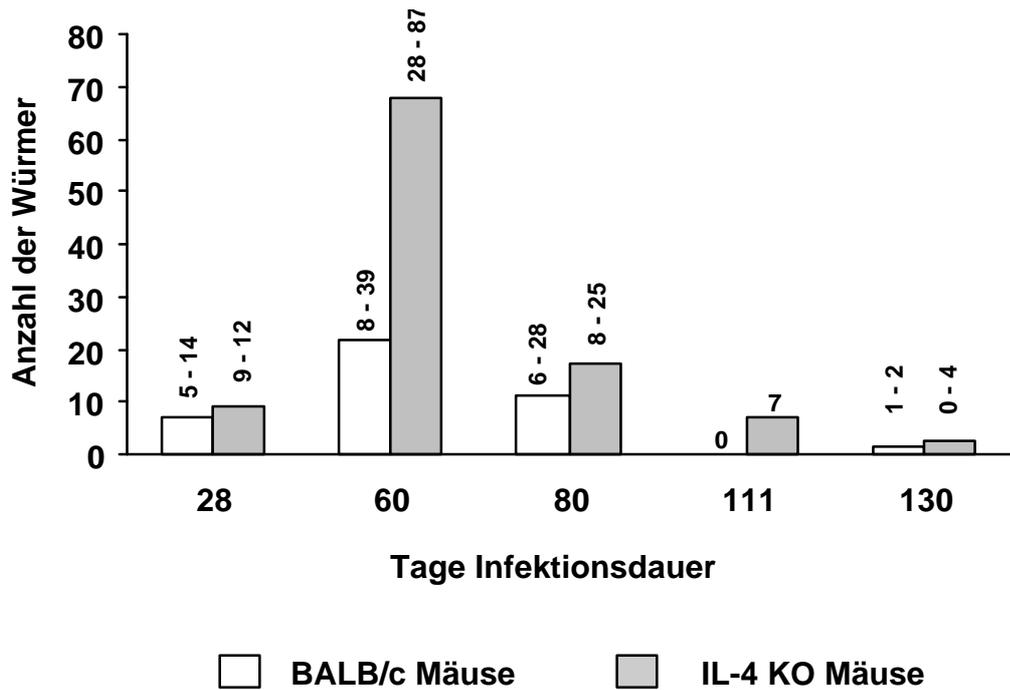


Abb. 9 Anzahl adulter Würmer in BALB/c und IL-4 KO Mäusen nach 28, 60, 80, 111, 130 und 200 Tagen Infektionsdauer. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Wurmanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. Nach 111 Tagen Infektionsdauer wurde die Wurmanzahl jeweils nur in einer BALB/c und IL-4 KO Maus bestimmt. Für die Untersuchungen wurden nach 28 Tagen Infektionsdauer 5 Mäuse und zu allen anderen Zeitpunkten 4 Mäuse pro Gruppe verwendet. 3 weitere Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt.

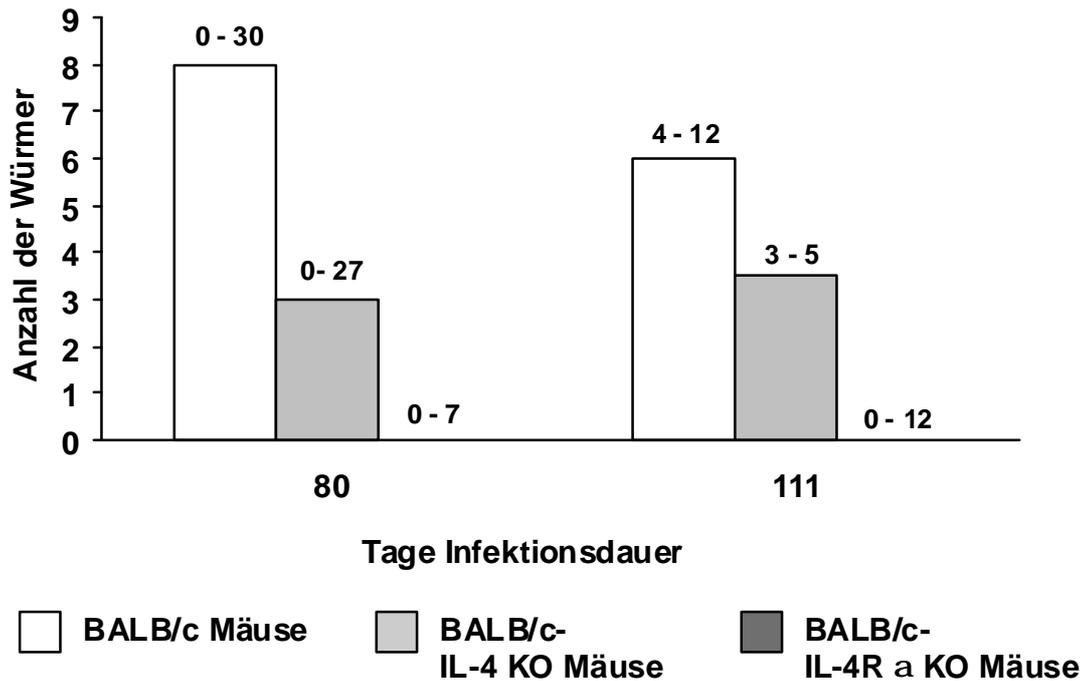


Abb. 10 Anzahl adulter Würmer in BALB/c, BALB/c-IL-4 KO und BALB/c-IL-4R α KO nach 80 und 111 Tagen Infektionsdauer. 2 weitere Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Wurmanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. Für die Untersuchungen wurden 6 Mäuse pro Gruppe verwendet.

3.5.3. IL-5 KO Mäuse zeigen eine reduzierte Akkumulation der B1- und B2-Zellen in der Pleurahöhle und eine reduzierte Konzentration Phosphorylcholin (PC)-spezifischer IgM-Antikörper im Serum

Die parasitologische Untersuchung nach 28 Tagen Infektionsdauer zeigte, dass die IL-5- (Abb. 6B), aber nicht die IL-4-Defizienz (Abb. 9), zu einer erhöhten Suszeptibilität führten.

In wissenschaftlichen Untersuchungen mit *L. sigmodontis*-infizierten BALB.Xid Mäusen wurde dokumentiert, dass B1-Zellen und PC-spezifische IgM-Antikörper in der frühen Phase der Infektion wichtig sind für die Abtötung der Filarien (Al-Qaoud et al., 1998).

IL-5 KO Mäuse zeigten nach 28 Tagen Infektionsdauer eine reduzierte Akkumulation der B1 und B2-Zellen in der Pleurahöhle (Tab. 11). Um zu untersuchen, ob die verringerte Zahl der B1-Zellen mit einer supprimierten Abwehr gegen die L3 und L4 Larven assoziiert sein könnte, wurde die humorale Immunantwort in nichtinfizierten Mäusen und in Mäusen 28 Tage nach Infektionsbeginn bestimmt. Die Analyse zeigte, dass IL-5 KO Mäuse vor und auch nach der Infektion reduzierte PC-spezifische IgM-Titer hatten. In IL-4 KO Mäusen war die Produktion der PC-spezifischen IgM-Antikörper nicht reduziert (Tab. 11).

3. Ergebnisse

Tab. 11 Akkumulation der B1 und B2 Zellen (Zellen x 10⁶) in der Pleurahöhle und PC-spezifische IgM-Konzentrationen im Serum von BALB/c, IL-4 KO und IL-5 KO Mäusen nach 0 und 28 Tagen Infektionsdauer.

	BALB/c Mäuse	IL-4 KO Mäuse	IL-5 KO Mäuse
<u>0 Tage Infektionsdauer</u>			
B1-Zellen	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01
B2-Zellen	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,13 ± 0,05
IgM OD _{450nm} ^a	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,01 ± 0,01 ^c
<u>28 Tage Infektionsdauer</u>			
B1-Zellen	3,2 ± 0,8	1,7 ± 0,8	0,4 ± 0,2 ^d
B2-Zellen	1,2 ± 0,1	2,3 ± 1,0	0,8 ± 0,4 ^e
IgM OD _{450nm} ^b	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0

OD: Optische Dichte

Die Zahlen geben die Mittelwerte ± Standardabweichung an.

Die Gesamtzellzahl in der Pleurahöhle in x 10⁶ Zellen war in BALB/c, IL-4 KO und IL-5 KO Mäusen 1,6 ± 0,2; 1,3 ± 0,8 und 1,2 ± 0,5 nach 0 Tagen Infektionsdauer, bzw. 31,3 ± 7,1; 19,0 ± 4,8 und 9,0 ± 3,5 nach 28 Tagen Infektionsdauer ($P < 0,03$; signifikant niedriger in IL-5 KO Mäusen im Vergleich zu IL-4 KO oder BALB/c Mäusen; Mann-Whitney U Test). Für die Untersuchungen wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet.

^a Serum-Proben wurden 1:1.600 verdünnt

^b Serum-Proben wurden 1:64.000 verdünnt

Signifikante Unterschiede waren (Mann-Whitney U Test):

^c $P < 0,01$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c oder IL-4 KO Mäusen.

^d $P < 0,03$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c oder IL-4 KO Mäusen.

^e $P < 0,05$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c oder IL-4 KO Mäusen.

3.5.4. IL-5- und IL-4-Defizienz führen zu deutlich erhöhten Mikrofilarienlasten

Übereinstimmend mit der signifikant höheren Adultwurmlast (**Abb. 6**) führte die IL-5-Defizienz zu einer drastisch erhöhten Mikrofilariämie. Die Mikrofilariämie, die über die gesamte Patenzphase hinweg untersucht worden ist, war in IL-5 KO Mäusen bis zu 160-fach höher und hielt 15 Wochen länger an als in BALB/c Mäusen (**Abb. 11A**). In einem vergleichenden Experiment mit IL-5 KO und IL-4 KO Mäusen, in dem die Mikrofilariämie vom Tag 60 bis Tag 130 nach Infektionsbeginn untersucht wurde, konnte festgestellt werden,

3. Ergebnisse

dass sowohl die IL-5- als auch die IL-4-Defizienz zu hohen Mikrofilarienlasten führte, die untereinander zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung signifikant unterschiedlich waren (**Abb. 12**). Die hohe Mikrofilariämie in IL-4 KO Mäusen 130 Tage nach der Infektion war insofern ein interessanter Befund, weil in den Pleurahöhlen der Mäuse zu diesem Zeitpunkt keine vitalen Adultwürmer mehr nachgewiesen werden konnten (**Abb. 9**). Die Untersuchung der IL-4 KO Mäuse während der gesamten Patenzphase bis zu 160 Tagen Infektionsdauer zeigte, dass die Mikrofilariämie bis zu 100-fach höher war und 14 Wochen länger dauerte als in BALB/c Mäusen (**Abb. 11B**).

In den Experimenten wurde auch die Mikrofilarienlast in der Pleurahöhle der Mäuse untersucht. IL-4 KO Mäuse hatten nach 80 und 130 Tagen Infektionsdauer im Vergleich zu BALB/c Mäusen und IL-5 KO Mäusen höhere Mikrofilarienkonzentrationen (**Tab. 12**). IL-5 KO Mäuse hatten überraschenderweise im Untersuchungszeitraum von 60 bis 130 Tagen Infektionsdauer keine erhöhten Mikrofilarienzahlen im Vergleich zu BALB/c Mäusen. In einem weiteren Experiment, das bis 200 Tage Infektionsdauer durchgeführt wurde, zeigten IL-5 KO Mäuse höhere Mikrofilarienlasten in der Pleurahöhle als BALB/c Mäuse (**Tab. 12**).

3. Ergebnisse

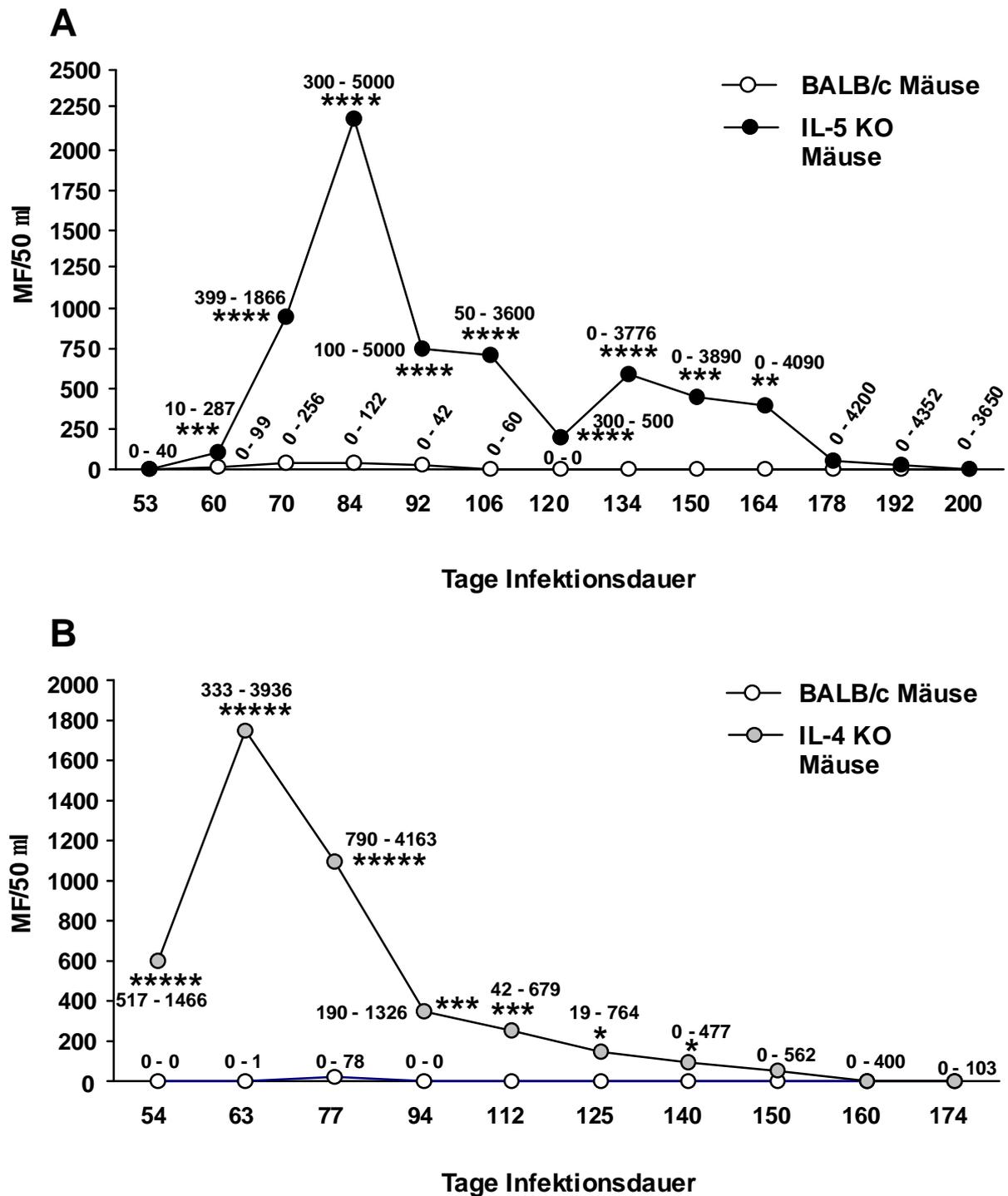


Abb. 11 Mikrofilariämie (MF) in BALB/c und (A) IL-5 oder (B) IL-4 KO Mäusen während der gesamten Patenzphase in 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Mikrofilarienanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. Für die Untersuchungen wurden in beiden Experimenten 6 Mäuse pro Gruppe verwendet.

Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-5 KO Mäusen sind gekennzeichnet als:

* $P < 0,05$; ** $P < 0,04$; *** $P < 0,03$; **** $P < 0,02$; ***** $P < 0,01$ (Mann-Whitney U Test).

3. Ergebnisse

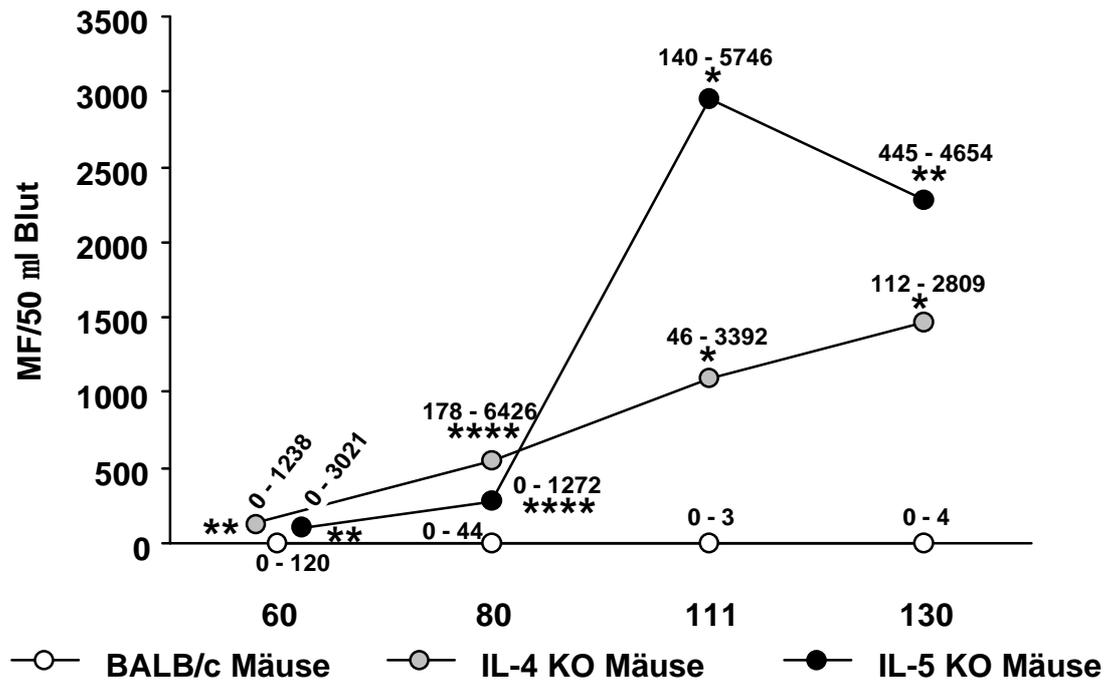


Abb. 12 Mikrofilariämie (MF) in BALB/c, IL-4 KO und IL-5 KO Mäusen nach 60, 80, 111 und 130 Tagen Infektionsdauer. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Mikrofilarienanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt.

Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und IL-4 KO oder IL-5 KO Mäusen sind gekennzeichnet als:
 $*P < 0,05$; $**P < 0,04$; $***P < 0,03$; $****P < 0,01$ (Mann-Whitney U Test).

Nach 60 Tagen Infektionsdauer wurde die Mikrofilariämie in 8 BALB/c, 9 IL-4 KO und 11 IL-5 KO Mäusen bestimmt. Nach 80 Tagen Infektionsdauer wurde die Mikrofilariämie in 7 BALB/c, 8 IL-4 KO und 10 IL-5 KO Mäusen bestimmt. Nach 111 und 130 Tagen Infektionsdauer wurde die Mikrofilariämie in jeweils 4 Mäusen pro Gruppe ermittelt.

3. Ergebnisse

Tab. 12 Mikrofilarienkonzentrationen in der Pleurahöhle von BALB/c, IL-4 KO und IL-5 KO Mäusen.

Infektionsdauer	BALB/c Mäuse	IL-4 KO Mäuse	IL-5 KO Mäuse
60 Tage	6831 (3311 – 7111)	77750 ^a (3411 – 273315)	150 (0 – 1014)
80 Tage	2521 (1102 – 4213)	285052 ^b (140321 – 870055)	101 (0 – 789)
111 Tage*	1185	895	1211
130 Tage	50 (0 – 100)	2845 ^c (1102 – 4213)	1423 (105 – 2421)
200 Tage	0	Nicht detektiert	830 ^d (0 – 5212)

3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt.

Die Zahlen über den Klammern zeigen den Median an und die Zahlen in den Klammern zeigen die niedrigste und höchste Mikrofilarienkonzentration an.

*Nach 111 Tagen Infektionsdauer wurden die Mikrofilarienkonzentrationen in jeweils nur einer BALB/c, IL-4 KO und IL-5 KO Maus bestimmt. Nach 200 Tagen Infektionsdauer wurden 5 Mäuse pro Gruppe und an allen anderen Zeitpunkten 4 Mäuse pro Gruppe verwendet.

Signifikante Unterschiede waren (Mann-Whitney U Test):

^a $P < 0,04$; signifikant höher im Vergleich zu IL-5 KO Mäusen.

^b $P < 0,04$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c und IL-5 KO Mäusen.

^c $P < 0,04$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c Mäusen.

^d $P < 0,03$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c Mäusen.

3.5.4.1. IL-4- und IL-4 Rezeptor α -Defizienz haben einen vergleichbaren Einfluß auf die Mikrofilariämie

In diesem Teil der Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob IL-4 einen direkten Einfluß auf die Viabilität der Mikrofilarien hat. Der Vergleich von BALB/c-IL-4 R α KO und BALB/c-IL-4 KO Mäusen bis 103 Tage nach Infektionsbeginn zeigte, dass die Mikrofilariämie in den beiden KO-Stämmen nicht unterschiedlich, aber deutlich höher als in BALB/c Mäusen war (**Abb. 13**).

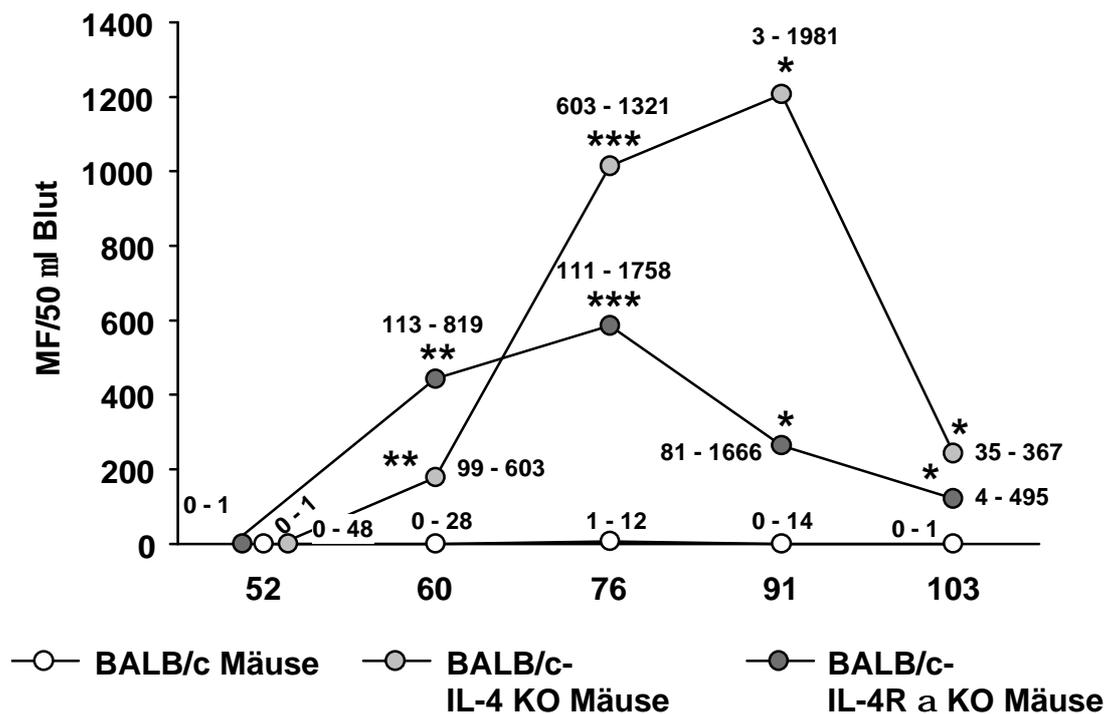


Abb. 13 Mikrofilariämie (MF) in BALB/c, BALB/c-IL-4 KO und BALB/c-IL-4 R α KO Mäusen bis 103 Tage nach Beginn der Infektion. Die Zahlen in der Abbildung zeigen die niedrigste und höchste Mikrofilarienanzahl pro Mausgruppe und Zeitpunkt an. 2 weitere Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen wurden bis 80 Tage Infektionsdauer durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden 6 Mäuse pro Mausgruppe verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen BALB/c und BALB/c-IL-4 KO oder BALB-IL-4R α KO Mäusen sind gekennzeichnet als:

* $P < 0,03$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$ (Mann-Whitney U Test).

3.5.4.2. Die Mikrofilariämie ist erhöht in IL-5 KO Mäusen, aber nicht in BALB/c-IL-4 KO , BALB/c-IL-4R α KO und BALB/c Mäusen nach der intraperitonealen Injektion von Mikrofilarien

In diesem Abschnitt soll die Frage beantwortet werden, ob die erhöhte Viabilität der Mikrofilarien in den KO Mäusen von der Präsenz der adulten Filarien abhängig war. In diesem Versuch sollte deshalb die Mikrofilariämie in BALB/c, BALB/c-IL-4 KO, BALB/c-IL-4R α KO und IL-5 KO Mäusen in der Abwesenheit von adulten Würmern untersucht werden. Dazu wurden naive Mäuse intraperitoneal mit 150.000 aufgereinigten Mikrofilarien injiziert. Die Mikrofilariämie wurde nach der Injektion im 7-tägigen Abstand bis 3 Wochen nach Beginn des Experiments bestimmt. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die IL-5 KO Mäuse signifikant mehr Mikrofilarien im Blut als die Mäuse der anderen Gruppen (**Tab.**

3. Ergebnisse

13). Allerdings waren die ermittelten Mikrofilarienkonzentrationen deutlich niedriger als die, die in einer natürlichen Infektion mit adulten Würmern festgestellt wurden. Die Mikrofilariämie in BALB/c-IL-4 KO und BALB/c-IL-4R α KO Mäusen war im Vergleich zu BALB/c Mäusen nicht erhöht (**Tab. 13**). Im Blut der BALB/c-IL-4 R α KO Mäuse konnten sogar während der gesamten Versuchsdauer keine Mikrofilarien ermittelt werden. Die Untersuchung der Mikrofilarienkonzentration in der Peritonealhöhle zeigte aber, dass die BALB/c-IL-4 R α KO Mäuse dennoch infiziert waren (**Tab. 13**).

3. Ergebnisse

Tab. 13 Mikrofilarien in 50 µl Blut von BALB/c, BALB/c-IL-4 KO, BALB/c-IL-4 R α KO und IL-5 KO Mäusen 7, 14 und 21 Tage nach der intraperitonealen Injektion von 150.000 Mikrofilarien in naive Mäuse.

Infektionsdauer	BALB/c Mäuse	BALB/c- IL-4 KO Mäuse	BALB/c- IL-4R α KO Mäuse	IL-5 KO Mäuse
<u>MF/ Peritonealhöhle</u>				
7 Tage	74500 (65800 – 83200)	59400 (39050 – 79750)	74500 (32800 – 119300)	64800 (58500 – 71100)
14 Tage	48900 (45650 – 77300)	86925 ^a (78400 – 95450)	8575 ^b (4500 – 12650)	67450 (58350 – 80550)
21 Tage	140 (40 – 26800)	19400 (2090 – 32450)	2590 (105 – 5075)	23200 (705 – 42150)
<u>MF/50 µl Blut</u>				
7 Tage	1 (0 – 5)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	14,5 (10 – 80) ^c
14 Tage	9 (6 – 9)	0 (0 – 2) ^d	0 (0 – 0) ^e	24,5 (18 – 60) ^f
21 Tage	5 (0 – 5)	0 (0 – 2)	0 (0 – 0)	39 (34 – 45) ^f

Eins von drei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen ist gezeigt. Die Zahlen vor oder über den Klammern zeigen den Median an und die Zahlen in den Klammern zeigen die niedrigste und höchste Mikrofilarienkonzentration an.

Signifikante Unterschiede waren (Mann-Whitney U Test):

^a $P < 0,05$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c oder BALB/c-IL-4 R α KO Mäusen.

^b $P < 0,02$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c, BALB/c-IL-4 KO oder IL-5 KO Mäusen.

^c $P < 0,04$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c, BALB/c IL-4 KO oder BALB/c-IL-4 R α KO Mäusen.

^d $P < 0,03$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c Mäusen.

^e $P < 0,02$; signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c Mäusen.

^f $P < 0,02$; signifikant höher im Vergleich zu BALB/c, BALB/c-IL-4 KO oder BALB/c-IL-4 R α KO Mäusen.

3. Ergebnisse

3.5.6. Eine erhöhte NO-Produktion der Makrophagen aus IL-4 KO Mäusen hat keinen Einfluß auf die Viabilität der Mikrofilarien

Um die NO-Produktion zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Makrophagen aus infizierten Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer in Mikrotiterplatten mit *L. sigmodontis*-Antigen oder IFN- γ und Lipopolysaccharid stimuliert. Die Makrophagen der IL-4 KO Mäuse zeigten nach der Inkubation in den beiden Stimulationsansätzen eine deutlich höhere NO-Sekretion als die Makrophagen der BALB/c Mäuse (**Abb. 14**). Im Serum der Mäuse konnte kein detektierbares NO nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass eine erhöhte NO-Produktion in Makrophagen aus der Pleurahöhle infizierter Mäuse nicht zu einer verstärkten Kontrolle der Mikrofilarien in diesem Infektionssystem führte (**Abb. 11B, Abb. 12, Tab. 12**).

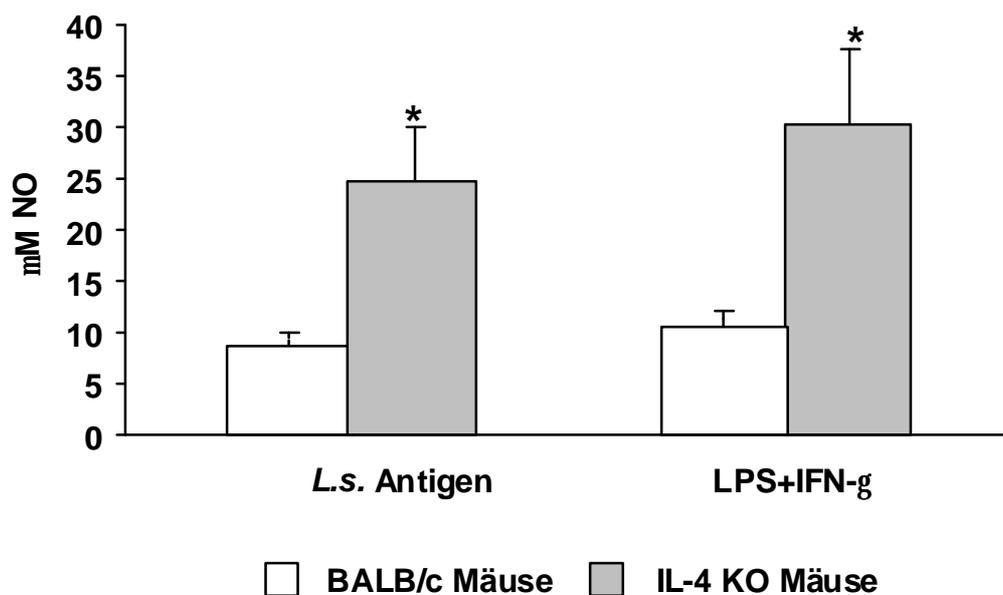


Abb. 14 NO Produktion von Makrophagen nach der Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigen (*L.s.* Antigen) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder IFN- γ und LPS (jeweils 20 ng/ml). Die Makrophagen stammten aus der Pleurahöhle von IL-4 KO und BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer. Signifikante Unterschiede zwischen IL-4 KO und BALB/c Mäusen sind gekennzeichnet als: * $P < 0,05$ (Mann-Whitney U Test).

3.5.7. IL-4-Defizienz führt zur Inhibition der IgE-Produktion

IgE konnte weder im Serum noch in der Pleurahöhle der IL-4 KO Mäuse detektiert werden. In BALB/c Mäusen konnten dagegen nach 80 Tagen Infektionsdauer $13.247 \pm 2.362,9$ ng/ml im Serum und $1.062,5 \pm 1.027,4$ ng in der Pleurahöhle nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

Ob die IgE-Defizienz eine Bedeutung in der hohen und langanhaltende Mikrofilariämie in den IL-4 KO Mäusen hat, ist Gegenstand der Diskussion.

5. Zusammenfassung

Fragestellung der Dissertation

Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen Filarienerkrankungen mit Hilfe von konventionellen Therapiekonzepten zu beseitigen. Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 200 Millionen Menschen von Filarieninfektionen betroffen. Zu den häufigsten Erkrankungen zählen die Lymphatische Filariose und die Onchozerkose.

Wolbachien, die mit vielen Filarien mutualistisch assoziiert sind, wurden als mögliche Zielstrukturen für die Entwicklung innovativer Chemotherapien identifiziert.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Frage beantwortet werden, ob die Wolbachien der Spezies *Onchocerca volvulus* und der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis* durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika depletiert werden können. Der Nachweis der Bakterien sollte mittels einer semiquantitativen PCR-Methode durchgeführt.

Frühere Studien in der humanen Onchozerkose gaben Hinweise darauf, dass die Wolbachien eine wichtige Bedeutung in der Akkumulation der Neutrophilen übernehmen (Brattig et al., 2001). Es sollte deswegen in einem zweiten Fragenkomplex in Experimenten mit Antibiotika behandelten und unbehandelten *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen überprüft werden, ob die Wolbachien auch in der murinen Filariose eine chemotaktische Wirkung auf die Neutrophilen haben.

Die Neutrophilen wurden als essentielle Bestandteile bei der Abkapselung und Abtötung adulter Würmer beschrieben. Frühere Studien zeigten, dass sowohl IFN- γ als auch IL-5 an der Regulation der Neutrophilenakkumulation und der Kontrolle der Filarieninfektion beteiligt sind (Al-Qaoud et al., 2000 & Saefel et al., 2001). Deswegen sollte in einem dritten Fragenkomplex die Auswirkung einer IL-5 Defizienz auf die Akkumulation der Neutrophilen in der Pleurahöhle und deren Funktion bei der Abkapselung der Filarien überprüft und mit Mechanismen in IFN- γ KO Mäusen verglichen werden. In diesem Zusammenhang sollte in weiteren Experimenten die Rolle von TNF- α und IL-4 bei den inflammatorischen Prozessen untersucht werden.

Ergebnisse

Wirksamkeit der Doxycyclin-Behandlung in der humanen Onchozerkose

In einer Studie wurden Männer über einen Zeitraum von 6 Wochen mit 100 mg Doxycyclin pro Tag behandelt (Hoerauf et al., 2000b). Anschließend wurden die Onchozerkome zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Patienten extirpiert und die Bakterienkonzentration mittels einer von mir etablierten semiquantitativen PCR-Methode bestimmt. Diese PCR-

5. Zusammenfassung

Methode erlaubte die Quantifizierung einer Teilsequenz der wolbachienspezifischen 16S rDNA versus einer Teilsequenz der filarienspezifischen 5S rDNA. Die Behandlung mit Doxycyclin führte im gesamten Untersuchungszeitraum von 2,5 bis 19 Monaten nach Beginn der Studie zu einer mehr als 90 %-igen Reduktion der 16S/5S rDNA-Indizes.

Einfluß von Antibiotika auf die Wolbachien in der murinen Filariose

In diesen Experimenten wurde die Wirksamkeit von Antibiotika auf die Wolbachien der Filarie *L. sigmodontis* in infizierten BALB/c Mäusen analysiert. Die 49-, bzw. 63-tägige Behandlung mit Tetracyclin bewirkte eine Abnahme der 16S/5S rDNA-Indizes um mehr als 99 %. Bei einer verkürzten Behandlungsdauer von 21 Tagen mit Doxycyclin wurde nur eine geringe Reduktion der 16S/5S rDNA-Indizes erreicht. Dagegen führte die Gabe von Rifampicin, bzw. die Kombinationsbehandlung aus Rifampicin und Doxycyclin nach 63 Tagen Infektionsdauer zu einer weitgehenden Elimination der Bakterien.

Bedeutung der Wolbachien für die Akkumulation der Neutrophilen

Die Analyse der Pleuraexsudatzellen in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen, die mit Rifampicin oder der Kombination aus Rifampicin und Doxycyclin behandelt wurden, zeigte, dass die Akkumulation der Neutrophilen nach 49 und 63 Tagen weitgehend inhibiert war.

Regulation der Neutrophilenakkumulation in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen

Nach 80 Tagen Infektionsdauer hatten IL-5 KO eine 5-fach geringere Neutrophilenanzahl in der Pleurahöhle als BALB/c Mäuse. Bei IFN- γ KO Mäusen, in denen auch eine eingeschränkte Neutrophilenakkumulation festgestellt wurde (Saefel et al., 2001), war außerdem die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen aus naiven und 80 Tage infizierten Mäusen um mehr als 40 % eingeschränkt. Dagegen war die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen aus IL-5 KO Mäusen nicht reduziert. Frühere Untersuchungen zeigten, dass TNF- α wahrscheinlich eine essentielle Funktion in der Aktivierung der Neutrophilen übernimmt (Al-Qaoud et al., 2000; Saefel et al., 2001 & Brattig et al., 2001). Nach 80 Tagen Infektionsdauer konnte in IL-5 KO Mäusen im Gegensatz zu BALB/c Mäusen nur eine geringe TNF- α -Produktion festgestellt werden. Allerdings schien das TNF- α allein nicht für die Aktivierung und Akkumulation der Neutrophilen verantwortlich zu sein, denn nach der Neutralisation des Zytokins durch lösliches TNF- α Rezeptorprotein wurden im Vergleich zu unbehandelten BALB/c Mäusen keine Unterschiede in der Anzahl der Neutrophilen und der Abtötung der adulten Filarien festgestellt. In Experimenten mit IL-4 KO Mäusen zeigte sich,

5. Zusammenfassung

dass die Neutrophilenakkumulation im Vergleich zu BALB/c Mäusen nach 80 Tagen Infektionsdauer erhöht und die Phagozytoseaktivität äquivalent war. Vermutlich war die erhöhte Neutrophilenakkumulation auf eine erhöhte KC (murines IL-8)-Produktion zurückzuführen. Bei den Zytokinen TNF- α , IFN- γ und IL-5 wurden dagegen keine Unterschiede festgestellt.

Einfluß von Th2-Zytokinen auf die Immunabwehr bei *L. sigmodontis*-Infektionen

Neben der geringeren Neutrophilenzahl 80 Tage nach Beginn der Infektion, war die zelluläre Immunantwort in der Pleurahöhle der IL-5 KO Mäuse durch das Fehlen der Eosinophilen charakterisiert. Da die Abkapselung der adulten Würmer in IL-5 KO Mäusen deutlich eingeschränkt war, insbesondere bedingt durch die reduzierte Neutrophilenzahl, war die Wurmlast im Vergleich zu BALB/c Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten der Infektion höher. Nach 200 Tagen Infektionsdauer wurde eine 150-fach höhere Adultwurmlast in den IL-5 KO Mäusen festgestellt. Die supprimierte Abtötung der Filarien in den IL-5 KO Mäusen während der Wurmentwicklung, kann möglicherweise auf reduzierte Konzentrationen Phosphorylcholin-spezifischer IgM-Antikörper zurückgeführt werden.

IL-4 KO Mäuse hatten im Vergleich zu BALB/c Mäusen während der Infektionsdauer von 130 Tagen keine unterschiedlichen Wurmanzahlen.

Im Gegensatz zu der unveränderten Adultwurmlast, hatten IL-4 KO und auch IL-5 KO Mäuse eine bis zu 160-fach höhere und 15 Wochen länger anhaltende Mikrofilariämie.

In vergleichenden Experimenten mit IL-4 KO und IL-4 Rezeptor α KO Mäusen konnte eine direkte Einwirkung des IL-4 auf die Mikrofilarien ausgeschlossen werden. Außerdem zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass IL-13 keine zusätzliche Funktion in der Kontrolle der Filarien hatte.

Schlußfolgerung

Bei Onchozerkose-Patienten führte die 6-wöchige Gabe von Doxycyclin zu einer deutlichen Reduktion der Wolbachien in den untersuchten Onchozerkomen. Da in parallelen Studien der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass die Depletion der Wolbachien zu einer Sterilität der Würmer führt, eröffnet die Behandlung mit Antibiotika somit Möglichkeiten für innovative Behandlungsstrategien in der humanen Onchozerkose. Das wichtigste Ergebnis der tierexperimentellen Untersuchungen war, dass eine 21-tägige Behandlung mit Doxycyclin nicht ausreichend war, um eine Depletion der Bakterien zu bewirken. Dagegen hatte die

5. Zusammenfassung

Kombinationsbehandlung mit Rifampicin und Doxycyclin eine Eliminierung der Wolbachien zur Folge.

Die zelluläre Immunantwort in der Pleurahöhle von infizierten BALB/c Mäusen mit Wolbachien depletierten Filarien war durch eine Inhibition der Neutrophilenakkumulation charakterisiert. Die Untersuchung von IL-5 KO und IL-4 KO Mäusen zeigte, dass die Neutrophilen eine essentielle Bedeutung in der Abkapselung und Abtötung der adulten Filarien hatten. IL-5 KO Mäuse waren durch eine reduzierte Produktion von neutrophilenaktivierenden und chemotaktischen Zytokine gekennzeichnet. Aufgrund der Inhibition der Neutrophilenakkumulation in Mäusen mit wolbachiendepletierten Filarien, liegt die Vermutung nahe, dass die Wolbachien die Produktion dieser neutrophilenaktivierenden Zytokine induzieren.

Zusammengefaßt zeigen die Daten bezüglich der murinen Filariose, dass IL-4- und IL-5-abhängige Abwehrmechanismen gegen unterschiedliche Stadien der Filarien gerichtet waren, und dass IL-5 eine größere Bedeutung in der Generierung einer protektiven Immunantwort während der gesamten Infektionsdauer hatte.

6. Literaturverzeichnis

Abiose, A., M. Homeida, B. Liese, D. Molyneux, and H. Remme. 2000. Onchocerciasis control strategies. *Lancet*. **356**:1523-1524.

Agarwal, S., N. P. Piesco, L. P. Johns, and A. E. Riccelli. 1995. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* **74**:1057-1065.

Al-Qaoud, K. M., B. Fleischer, and A. Hoerauf. 1998. The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis - association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. *Int. Immunol.* **10**:17-25.

Al-Qaoud, K. M., E. Pearlman, J. Klukowski, T. Hartung, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2000. A new mechanism for IL-5 dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. *Int. Immunol.* **12**:899-908.

Al-Qaoud, K. M., A. Taubert, H. Zahner, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 1997. Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* : role of CD4⁺ T cells in controlling larval development. *Infect. Immun.* **65**:2457-2461.

Albiez, E. J., A. Kaiser, H. S. Newland, A. T. White, B. M. Greene, H. R. Taylor, and D. W. Büttner. 1988a. Chemotherapy of onchocerciasis with high doses of diethylcarbamazine or a single dose of ivermectin: microfilaria levels and side effects. *Trop. Med. Parasitol.* **39**:19-24.

Albiez, E. J., G. Walter, A. Kaiser, P. Ranque, H. S. Newland, A. T. White, B. M. Greene, H. R. Taylor, and D. W. Büttner. 1988b. Histological examination of onchocercosmata after therapy with ivermectin. *Trop. Med. Parasitol.* **39**:93-99.

Alley, W. S., G. G. van Oortmarsen, B. B. Boatman, N. N. Nagelkerke, A. A. Plaisier, H. J. Remme, J. Lazdins, G. J. Borsboom, and J. D. Habbema. 2001. Macrophilicidal and onchocerciasis control, mathematical modelling of the prospects for elimination. *BMC Public Health.* **1**:12.

Awadzi, K., N. O. Opoku, E. T. Addy, and B. T. Quartey. 1995. The chemotherapy of onchocerciasis. XIX: The clinical and laboratory tolerance of high dose ivermectin. *Trop. Med. Parasitol.* **46**:131-137.

Babu, S., L. D. Shultz, T. R. Klei, and T. V. Rajan. 1999. Immunity in experimental murine filariasis: roles of T and B cells revisited. *Infect Immun.* **67**:3166-3167.

6. Literaturverzeichnis

Babu, S., L. M. Ganley, T. R. Klei, L. D. Shultz, and T. V. Rajan. 2000. Role of gamma interferon and IL-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*. *Infect. Immun.* **68**:3034-3035.

Bain, O., S. Wanji, P. N. Vuong, P. Maréchal, L. Le Goff, and G. Petit. 1994. Larval biology of six filariae of the sub-family Onchocercinae in a vertebrate host. *Parasite.* **1**:241-254.

Bancroft, A., and E. Devaney. 1993a. The analysis of the humoral response of the BALB/c mouse immunized with radiation third stage larvae of *Brugia pahangi*. *Parasite Immunol.* **15**:153-162.

Bancroft, A. J., R. K. Grencis, K. J. Else, and E. Devaney. 1993b. Cytokine production in BALB/c mice immunized with radiation attenuated third stage larvae of the filarial nematode, *Brugia pahangi*. *J. Immunol.* **150**:1395-1402.

Bancroft, A. J., R. K. Grencis, K. J. Else, and E. Devaney. 1994. The role of CD4+ cells in protective immunity to *Brugia pahangi*. *Parasite Immunol.* **16**:385-387.

Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **265**:2407-2413.

Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco, and L. Sacchi. 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int. J. Parasitol.* **29**:357-364.

Bandi, C., A. M. Dunn, G. D. D. Hurst, and T. Rigaud. 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends Parasitol.* **17**:88-94.

Bazzocchi, C., W. Jamnongluk, S. L. O'Neill, T. J. Anderson, C. Genchi, and C. Bandi. 2000. wsp gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr. Microbiol.* **41**:96-100.

Birch, L., C. E. Dawson, J. H. Cornett, and J. T. Keer. 2001. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**:296-301.

Bosshardt, S. C., J. W. McCall, S. U. Coleman, K. L. Jones, T. A. Petit, and T. R. Klei. 1993. Prophylactic activity of tetracycline against *Brugia pahangi* infection in jirds (*Meriones unguiculatus*). *J. Parasitol.* **79**:775-777.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

6. Literaturverzeichnis

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

Brattig, N., D. W. Büttner, and A. Hoerauf. 2001. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect.* **3**:439-446.

Brombacher, F. 2000. The role of IL-13 in infectious diseases and allergy. *Bioessays.* **22**:646-656.

Brown, K. R., F. M. Ricci, and E. A. Ottesen. 2000. Ivermectin: effectiveness in lymphatic filariasis. *Parasitology.* **121 Suppl**:S133-146.

Burchard, G. D., D. W. Buttner, and M. Bierther. 1979. Electron microscopical studies on onchocerciasis. III. The *onchocerca*-nodule. *Tropenmed. Parasitol.* **30**:103-112.

Büttner, D. W., S. Mand, L. Volkmann, K. Fischer, M. Büttner, A. Debrah, J. Larbi, Y. Marfo, D. Adjei, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2001. *Wolbachia* endobacteria as targets for a novel chemotherapy of onchocerciasis by antibiotics. *Abstracts EuCID. Leipzid. Infection;* **29**:38.

Casiraghi, M., G. Favia, G. Cancrini, A. Bartoloni, and C. Bandi. 2001. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. *Parasitol. Res.* **87**:417-420.

Chandrashekar, R., U. R. Rao, R. G. Rajasekariaf, and D. Subrahmanyam. 1984. Separation of viable microfilariae free of blood cells on percol gradient. *J. Helminthol.* **58**: 69-70

Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:232-260 ; second page, table of contents.

Coffman, R. L., B. W. P. Seymour, S. Hudak, J. Jackson, and D. Rennick. 1989. Antibody to IL-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* **245**:308-310.

Cross, H. F., M. Haarbrink, G. Egerton, M. Yazdanbakhsh, and M. J. Taylor. 2001. Severe reactions to filarial chemotherapy are associated with the release of *Wolbachia* endosymbionts into the blood. *Lancet.* **358**:1873-1875.

de Wit, D., M. Wootton, J. Dhillon, and D. A. Mitchison. 1995. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* **76**:555-562.

Doetze, A., J. Satoguina, G. Burchard, T. Rau, C. Löliger, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in generalized onchocerciasis is mediated by Th3/Tr1- type cytokines IL-10 and TGF-beta but not by a Th1 to Th2 shift. *Int. Immunol.* **12**:623-630.

Dreses-Werringloer, U., I. Padubrin, H. Zeidler, and L. Köhler. 2001. Effects of Azithromycin and Rifampin on *Chlamydia trachomatis* Infection *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3001-3008.

Dreyer, G., M. L. Pires, L. D. de Andrade, E. Lopes, Z. Medeiros, J. Tenorio, A. Coutinho, J. Noroes, and J. Figueredo-Silva. 1994. Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and amicrofilaraemic individuals in an endemic area of Bancroftian filariasis, Recife, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**:232-236.

Duke, B. O. L. 1993. The population of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.* **44**: 61-68.

Finkelman, F. D., E. J. Pearce, J. F. J. Urban, and A. Sher. 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol. Today.* **12**:A62 - 66.

Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause, and J. F. Urban, Jr. 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:505-533.

Fischer, P., D. W. Büttner, J. Bamuhiiga, and S. A. Williams. 1998. Detection of the filarial parasite *Mansonella streptocerca* in skin biopsies by a nested polymerase chain reaction-based assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:816-820.

Folkard, S. G., and E. A. Bianco. 1995. Roles for both CD4+ and CD8+ T cells in protective immunity against *Onchocerca lienalis* microfilariae in the mouse. *Parasite Immunol.* **17**:541-553.

Folkard, S. G., P. J. Hogarth, M. J. Taylor, and A. E. Bianco. 1996. Eosinophils are the major effector cells of immunity to microfilariae in a mouse model of onchocerciasis. *Parasitology.* **112**:323-329.

Francis, H., K. Awadzi, and E. A. Ottesen. 1985. The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine: clinical severity as a function of infection intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**:529-536.

Franz, M., and P. Andrews. 1986. Fine structure of adult *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea). *Z. Parasitenkd.* **72**:537-547.

6. Literaturverzeichnis

Franz, M., and D. W. Buttner. 1983. The fine structure of adult *Onchocerca volvulus* IV. The hypodermal chords of the female worm. Tropenmed. Parasitol. **34**:122-128.

Girard, D., R. Paquin, and A. D. Beaulieu. 1997. Responsiveness of human neutrophils to IL-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. Biochem. J. **325**:147-153.

Grant, W. 2000. What is the real target for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*? Parasitol. Today. **16**:458-459.

Greene, B. M., H. R. Taylor, and M. Aikawa. 1981. Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil mediated immune serum dependent destruction. J. Immunol. **127**:1611-1618.

Gualzata, M., N. Weiss, and C. H. Heusser. 1986. *Dipetalonema viteae*: phosphorylcholine and non-phosphorylcholine antigenic determinants in infective larvae and adult worms. Exp. Parasitol. **61**:95-102.

Haarbrink, M., G. K. Abadi, W. A. Buurman, M. A. Dentener, A. J. Terhell, and M. Yazdanbakhsh. 2000. Strong association of interleukin-6 and lipopolysaccharide-binding protein with severity of adverse reactions after diethylcarbamazine treatment of microfilaremic patients. J. Infect. Dis. **182**:564-569.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580.

Haque, A., M. Joseph, M. A. Ouaiissi, M. Capron, and A. Capron. 1980. IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* *in vitro*. Clin. Exp. Immunol. **40**:487.

Hayashi, Y., S. Nogami, M. Nakamura, A. Shirasaka, and K. Noda. 1984. Passive transfer of protective immunity against *Brugia malayi* in BALB/c mice. Jpn. J. Exp. Med. **54**:183-187.

Henkle-Dührsen, K., V. Eckelt, G. Wildenburg, M. Blaxter, and R. D. Walter. 1998. Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. Mol. Biochem. Parasitol. **96**:69-81.

Herbert, D. R., J. J. Lee, N. A. Lee, T. J. Nolan, G. A. Schad, and D. Abraham. 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. J. Immunol. **165**:4544-4551.

Hermans, P. G., C. A. Hart, and A. J. Trees. 2001. In vitro activity of antimicrobial agents against the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Antimicrob Chemother. **47**:659-663.

6. Literaturverzeichnis

Hertig, M., and S. B. Wolbach. 1924. Studies on rickettsia-like organisms in insects. *J. Med. Res.* **44**:329-374.

Hilton, D. J., J. G. Zhang, D. Metcalf, W. S. Alexander, N. A. Nicola, and T. A. Willson. 1996. Cloning and characterization of a binding subunit of the IL-13 that is also a component of the IL-4 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:497 - 501.

Hoerauf, A., and B. Fleischer. 1997. Immune responses to filarial infection in laboratory mice. *Med. Microbiol. Immunol.* **185**:207-215.

Hoerauf, A., K. Nissen-Pähle, C. Schmetz, K. Henkle-Dührsen, M. L. Blaxter, D. W. Büttner, M. Y. Gallin, K. M. Al-Qaoud, R. Lucius, and B. Fleischer. 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. 2000. Intrazelluläre Bakterien der Gattung *Wolbachia* in Würmern - Ziel therapeutischer Intervention? *Nova Acta Leopold. NF* **83**:263-274.

Hoerauf, A., L. Volkmann, C. Hamelmann, O. Adjei, I. B. Autenrieth, B. Fleischer, and D. W. Büttner. 2000a. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet.* **355**:1242-1243.

Hoerauf, A., L. Volkmann, K. Paehle, C. Schmetz, I. Autenrieth, D. W. Büttner, and B. Fleischer. 2000b. Targeting of *Wolbachia* in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracycline with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Trop. Med. Int. Hlth.* **5**:275-279.

Hoerauf, A., S. Mand, O. Adjei, B. Fleischer, and D. W. Büttner. 2001a. Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet.* **357**:1415-1416.

Hoerauf, A., R. Walter, H. Remme, J. Lazdins, and B. Fleischer. 2001b. Call to consolidate achievements for onchocerciasis and lymphatic filariasis control. *Trends Parasitol.* **17**:566-567.

Hoerauf, A. 2002. Wolbachien, Zielstrukturen für eine neue Chemotherapie von Filariosen. *Hygiene und Mikrobiologie.* In press.

Hoffmann, K. F., S. L. James, A. W. Cheever, and T. A. Wynn. 1999. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **163**:927-938.

6. Literaturverzeichnis

- Hoffmann, W. H., A. W. Pfaff, H. Schulz-Key, and P. T. Soboslay.** 2001. Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmodontis* filariasis. *Parasitology*. **122**:641-649.
- Hogarth, P. G., S. G. Folkard, M. Taylor, and A. E. Bianco.** 1995. Accelerated clearance of *Onchocerca* microfilariae and resistance to reinfection in IL-4 gene knockout mice. *Parasite Immunol.* **17**:653-657.
- Hogarth, P. J., M. J. Taylor, and A. E. Bianco.** 1998. IL-5-dependent immunity to microfilariae is independent of IL-4 in a mouse model of onchocerciasis. *J. Immunol.* **160**:5436-5440.
- Hogarth, P. J., and A. E. Bianco.** 1999. IL-5 dominates cytokine responses during expression of protective immunity to *Onchocerca lienalis* microfilariae in mice. *Parasite Immunol.* **21**:81-88.
- Howells, R. E., and S. N. Chen.** 1981. *Brugia pahangi*: feeding and nutrient uptake *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol.* **51**:42-58.
- Iversen, P. O., D. Robinson, S. Ying, Q. Meng, A. B. Kay, I. Clark-Lewis, and A. F. Lopez.** 1997. The GM-CSF analogue E21R induces apoptosis of normal and activated eosinophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**:1628-1632.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, N. Noben-Trauth, J. M. Cacpar, J. M. Ward, A. W. Cheever, W. E. Pal, and A. Sher.** 1999. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J. Immunol.* **163**:337-342.
- Johnson, E. H., M. Irvine, P. H. Kass, J. Browne, M. Abdullai, A. M. Prince, and S. Lustigman.** 1994. *Onchocerca volvulus*: *in vitro* cytotoxic effects of human neutrophils and serum on third-stage larvae. *Trop. Med. Parasitol.* **45**:331-335.
- Johnson, E. H., S. Schynder-Candrian, T. V. Rajan, F. K. Nelson, S. Lustigman, and D. Abraham.** 1998. Immune responses to third stage larvae of *Onchocerca volvulus* in interferon-gamma and IL-4 knockout mice. *Parasite Immunol.* **20**:319-324.
- Jones, R. E., F. D. Finkelman, R. B. Hester, and S. G. Kayes.** 1994. *Toxocara canis*: failure to find IgE receptors (Fc epsilon R) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an IgE-dependent mechanism. *Exp. Parasitol.* **78**:64-75.
- Kaifi, J. T., E. Diaconu, and E. Pearlman.** 2001. Distinct roles for PECAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 in recruitment of neutrophils and eosinophils to the cornea in ocular onchocerciasis (river blindness). *J. Immunol.* **166**:6795-6801.

6. Literaturverzeichnis

Karima, R., S. Matsumoto, H. Higashi, and K. Matsushima. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol. Med. Today.* **5**:123-132.

King, C. L., I. Malhotra, and X. Jia. 1996. *Schistosoma mansoni*: protective immunity in IL-4-deficient mice. *Exp. Parasitol.* **84**:245 - 252.

Korenaga, M., Y. Hitoshi, N. Yumaguchi, Y. Sato, K. Takatsu, and I. Tada. 1991. The role of IL-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology.* **72**:502-507.

Korten, S., M. Saefel, L. Volkmann, K. Fischer, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2002. Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49C and Ly-49G2 expressing subsets in a murine helminthic infection: contribution to parasite control. *J. Immunol.* **168**:0000-0000.

Koszarski, A. 1999. Klonierung und Charakterisierung eines potentiellen Endobakterien- Hitzeschockproteins aus *Onchocerca volvulus* LEUCKART. Dissertation. Universität Hamburg.

Kozek, W. J. 1977. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J. Parasitol.* **63**:992-1000.

Kozek, W. J., and H. Figueroa-M. 1977. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**:663-678.

Lange, A. M., W. Yutanawiboonchai, P. Scott, and D. Abraham. 1994. IL-4 and IL-5-dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. *J. Immunol.* **153**:205-211.

Langworthy, S., A. Renz, U. Mackenstedt, K. Henkle-Dührsen, M. Bronsvort, V. Tanya, M. Donnelly, and A. Trees. 2000. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode, *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* preceeds worm death and suggests a dependent relationship. *Proc. Royal Soc. London Ser. B.* **267**:1063-1069.

Lawrence, R. A., J. E. Allen, J. Osborne, and R. A. Maizels. 1994. Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice. *J. Immunol.* **153**:1216-1224.

Lawrence, R. A., J. E. Allen, , W. F. Gregory, M. Kopf, and R. M. Maizels. 1995. Infection of IL-4-deficient mice with the parasite nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *J. Immunol.* **154**:205-211.

Lawrence, R. A. 1996. Lymphatic filariasis: what mice can tell us. *Parasitol. Today.* **12**:267-271.

Lawrence, R. A., J. E. Allen, and C. A. Gray. 2000. Requirements for in vivo IFN-gamma induction by live microfilariae of the parasitic nematode, *Brugia malayi*. *Parasitology*. **120**:631-640.

Le Goff, L., P. Marechal, G. Petit, D. W. Taylor, W. Hoffmann, and O. Bain. 1997. Early reduction of the challenge recovery rate following immunization with irradiated infective larvae in a filaria mouse system. *Trop. Med. Int. Health*. **2**:1170-1174.

Le Goff, L., P. N. Loke, H. F. Ali, D. W. Taylor, and J. E. Allen. 2000a. IL-5 is essential for vaccine-mediated immunity but not innate resistance to a filarial parasite. *Infect. Immun.* **68**:2513-2517.

Le Goff, L., C. Martin, I. P. Oswald, P. N. Vuong, G. Petit, M. N. Ungeheuer, and O. Bain. 2000b. Parasitology and immunology of mice vaccinated with irradiated *Litomosoides sigmodontis* larvae. *Parasitology*. **120**:271-280.

Lo, N., M. Casiraghi, E. Salati, C. Bazzocchi, and C. Bandi. 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol.* **19**:341-346.

Lopez, A. F., M. J. Elliott, J. Woodcock, and M. A. Vadas. 1992. GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today*. **13**:495-500.

Lutwick, L. I. 2001. Brill-Zinsser disease. *Lancet*. **357**:1198-1200.

MacIvor, D. M., S. D. Shapiro, C. T. Pham, A. Belaouaj, S N. Abraham, and T. J. Ley. 1999. Normal neutrophil function in cathepsin G-deficient mice. *Blood*. **94**:4282-4293.

Maizels, R. M., W. F. Gregory, G. E. Kwan-Lim, and M. E. Selkirk. 1989. Filarial surface antigens: the major 29 kilodalton glycoprotein and a novel 17-200 kilodalton complex from adult *Brugia malayi* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**:213-227.

Manabe, Y. C., and W. R. Bishai. 2000. Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience, and winning by waiting. *Nat. Med.* **6**:1327-1329.

Mand, S. 2002. Wirksamkeit von Doxycyclin in der Therapie der Onchozerkose in Ghana. Dissertation eingereicht an der Fakultät für Medizin. Universität Hamburg.

Maréchal, P., L. Goff, G. Petit, M. Diagne, D. W. Taylor, and O. Bain. 1996. The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice. *Parasite*. **3**:25-31.

Martin, C., K. M. Al-Qaoud; O. Bain, K. Paehle, B. Fleischer, A. Hoerauf. 2000a. IL-5 is essential for protection after immunization against murine filariasis but not during primary infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **189**: 67-74

6. Literaturverzeichnis

Martin, C., L. LeGoff, M. N. Ungeheuer, P. N. Vuong, O. Bain. 2000b. Drastic reduction of a filarial infection in eosinophilic IL-5 transgenic mice. *Infect. Immun.* **68**: 3651-3656.

Martin, C., M. Saeftel, P. N. Vuong, S. Babayan, K. Fischer, O. Bain, and A. Hoerauf. 2001. B-cell deficiency suppresses vaccine-induced protection against murine filariasis but does not increase the recovery rate for primary infection. *Infect. Immun.* **69**:7067-7073.

Masui, S., T. Sasaki, and H. Ishikawa. 1997. groE-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool. Sci.* **14**:701-706.

McLaren, D. J., M. J. Worms, B. R. Laurence, and M. G. Simpson. 1975. Microorganisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **69**:509-514.

Mehlhorn, H. & G. Piekarski.1998. Grundriß der Parasitenkunde. Gustav Fischer Verlag.

Mehta, K., R. K. Sindhu, D. Subrahmanyam, and D. S. Nelson. 1980. IgE-dependent adherence and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to *Litomosoides carinii* microfilariae. *Clin. Exp. Immunol.* **41**:107.

Mencacci, A., G. Del Sero, E. Cenci, C. F. d'Ostiani, A. Bacci, C. Montagnoli, M. Kopf, and L. Romani. 1998. Endogenous IL-4 is required for development of protective CD4⁺ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* **187**:307-317.

Mohrs, M., B. Ledermann, G. Kohler, A. Dorfmueller, A. Gessner, and F. Brombacher. 1999. Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J. Immunol.* **162**:7302-7308.

Moser, R., P. Groscurth, J. M. Carballido, P. L. Bruijnzeel, K. Blaser, C. H. Heusser, and J. Fehr. 1993. IL-4 induces tissue eosinophilia in mice: correlation with its in vitro capacity to stimulate the endothelial cell-dependent selective transmigration of human eosinophils. *J. Lab. Clin. Med.* **122**:567-575.

Mountford, A. P., K. G. Hogg, P. S. Coulson, and F. Brombacher. 2001. Signaling via IL-4 receptor alpha-chain is required for successful vaccination against schistosomiasis in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **69**:228-236.

Nelms, K., A. D. Keegan, J. Zamorano, J. Ryan, and W. E. Paul. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Ann. Rev. Immunol.* **17**:701-738.

6. Literaturverzeichnis

Nelson, F. K., D. L. Greiner, L. D. Shultz, and T. V. Rajan. 1991. The immunodeficient scid mouse as a model for human lymphatic filariasis. *J. Exp. Med.* **173**:659-663.

Nelson, G. S. 1970. Onchocerciasis. *Adv. Parasitol.* **8**:173-224.

Njoo, F. L., C. E. Hack, J. Oosting, J. S. Stilma, and A. Kijlstra. 1993. Neutrophil activation in ivermectin-treated onchocerciasis patients. *Clin. Exp. Immunol.* **94**:330-333.

Noben-Trauth, N., G. Kohler, K. Burki, and B. Ledermann. 1996. Efficient targeting of the IL-4 gene in a BALB/c embryonic stem cell line. *Transgenic Res.* **5**:487-497.

Nocton, J. J., F. Dressler, B. J. Rutledge, P. N. Rys, D. H. Persing, and A. C. Steere. 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* **330**:229-234.

Noll, A., A. Roggenkamp, J. Heesemann; I. B. Autenrieth. 1994. Protective role for heat shock protein-reactive alpha beta T cells in murine yersiniosis. *Infect. Immunol.* **62**:2784-2791.

O'Neill, S. L., R. Giordano, A. M. Colbert, T. L. Karr, and H. M. Robertson. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:2699-2702.

Osborne, J., S. J. Hunter, and E. Devaney. 1996. Anti-IL-4 modulation of the Th2 polarized response to the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *Infect. Immun.* **64**:3461-3466.

Ottesen, E. A. 1994. The human filariasis: new understandings, new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Inf. Dis.* **7**:550-558.

Ottesen, E. A., and C. D. Ramachandran. 1995. Lymphatic filariasis. Infection and disease: Control strategies. *Parasitol. Today.* **11**:129-131.

Paciorkowski, N., P. Porte, L. D. Shultz, and T. V. Rajan. 2000. B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *J. Exp. Med.* **191**:731-736.

Pearlman, E., F. P. Heinzl, F. E. Hazlett, and J. W. Kazura. 1995. IL-12 modulation of T helper responses to the filarial helminth *Brugia malayi*. *J. Immunol.* **154**:4658-4664.

Petit, G., M. Diagne, P. Marechal, D. Owen, D. Taylor, and O. Bain. 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.

6. Literaturverzeichnis

Pfaff, A. W., H. Schulz-Key, P. T. Soboslay, S. M. Geiger, and W. H. Hoffmann. 2000. The role of nitric oxide in the innate resistance to microfilariae of *Litomosoides sigmodontis* in mice. *Parasite Immunol.* **22**:397-405.

Plaisier, A. P., E. S. Alley, G. J. van Oortmarsen, B. A. Boatin, and J. D. Habbema. 1997. Required duration of combined annual ivermectin treatment and vector control in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **75**:237-245.

Plenge-Bonig, A., M. Kromer, and D. W. Buttner. 1995. Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions. *Parasitol. Res.* **81**:66-73.

Rajan, T. V., F. K. Nelson, L. D. Shultz, B. H. Koller, and D. L. Greiner. 1992. CD8⁺ T lymphocytes are not required for murine resistance to human filarial parasites. *J. Parasitol.* **78**:744-746.

Rajan, T. V., P. Porte, J. A. Yates, L. Keefer, and L. D. Shultz. 1996. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect. Immun.* **64**:3351-3353.

Reiner, S. L., S. Zheng, D. B. Corry, and R. M. Locksley. 1993. Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. *J. Immunol. Meth.* **165**: 37-46

Remme, J. H. F. 1995. The African programme for onchocerciasis control: preparing to launch. *Parasitol. Today.* **11**:403-406.

Richards, F., D. Hopkins, and E. Cupp. 2000. Programmatic goals and approaches to onchocerciasis. *Lancet.* **355**:1663-1664.

Richards, F. O., Jr., R. Zea Flores, and B. O. Duke. 1989. Dynamics of microfilariae of *Onchocerca volvulus* over the first 72 hours after treatment with ivermectin. *Trop. Med. Parasitol.* **40**:299-303.

Rockett, K. A., M. M. Awburn, E. J. Rockett, W. B. Cowden, and I. A. Clark. 1994. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunol.* **16**: 243-249

Rot, A. 1992. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today.* **13**:291-294.

Rubio de Krömer, M. T., M. Krömer, K. Luersen, and N. W. Brattig. 1998. Detection of a chemotactic factor for neutrophils in extracts of female *Onchocerca volvulus*. *Acta Trop.* **71**:45-56.

6. Literaturverzeichnis

Sabin, E. A., M. A. Kopf, and E. J. Pearce. 1996. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J. Exp. Med.* **184**:1871-1878.

Saeftel, M. 2001. Untersuchungen der immunologischen Effektormechanismen der Abwehr von Filariennematoden bei der Infektion von BALB/c Mäusen mit *Litomosoides sigmodontis*. Dissertation. Universität Hamburg.

Saeftel, M., L. Volkmann, S. Korten, N. Brattig, K. M. Al-Qaoud, B. Fleischer, and A. Hoerauf. 2001. Lack of IFN- γ confers impaired neutrophil granulocyte function and imparts prolonged survival of adult filarial worms in murine filariasis. *Microbes Infect.* **3**:203-213.

Saint Andre, A., N. M. Blackwell, L. R. Hall, A. Hoerauf, N. W. Brattig, L. Volkmann, M. J. Taylor, L. Ford, A. G. Hise, J. H. Lass, E. Diaconu, and E. Pearlman. 2002. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science.* **295**:1892-1895.

Sartono, E., Y. C. Kruize, A. Kurniawan, R. M. Maizels, and M. Yazdanbakhsh. 1997. Depression of antigen-specific interleukin-5 and interferon-gamma responses in human lymphatic filariasis as a function of clinical status and age. *J. Infect. Dis.* **175**:1276-1280.

Sasaki, O., H. Sugaya, K. Ishida, and K. Yoshimura. 1993. Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol.* **15**:349-354.

Schiffmann, E., H. V. Showell, B. A. Corcoran, P. A. Ward, E. Smith, and E. L. Becker. 1975. The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **114**:1831-1837.

Schröder, J. M. 2000. Chemoattractants as mediators of neutrophilic tissue recruitment. *Clin. Dermatol.* **18**:245-263.

Seidenfaden, R., A. Fischer, I. Bonow, D. Ekale, V. Tanya, and A. Renz. 2001. Combined benefits of annual mass treatment with ivermectin and cattle zooprophylaxis on the severity of human onchocerciasis in northern Cameroon. *Trop. Med. Int. Health.* **6**:715-725.

Sironi, M., C. Bandi, L. Sacchi, B. Di Sacco, G. Damiani, and C. Genchi. 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**:223-227.

Smith, H. L., and T. V. Rajan. 2000. Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **95**:265-270.

Soboslay, P. T., C. G. Lüder, W. H. Hoffmann, I. Michaelis, G. Helling, C. Heuschkel, C. M. Dreweck, C. H. Blanke, S. Pritze, M. Banla, and H. Schulz-Key. 1994.

6. Literaturverzeichnis

Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis; activation of parasite-specific Th1-type responses with subclinical *Onchocerca volvulus* infection. Clin. Exp. Immunol. **96**:238-244.

Stern, M., L. Meagher, J. Savill, and C. Haslett. 1992. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. J. Immunol. **148**:3543-3549.

Straubinger, R. K., B. A. Summers, Y. F. Chang, and M. J. Appel. 1997. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J. Clin. Microbiol. **35**:111-116.

Suswillo, R. R., D. G. Owen, and D. A. Denham. 1980. Infections of *Brugia pahangi* in conventional and nude (athymic) mice. Acta Trop. **37**:327-335.

Taylor, M., and A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol. Today. **15**:437-442.

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

Taylor, M. J., H. F. Cross, and K. Bilo. 2000b. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. J. Exp. Med. **191**:1429-1436.

Taylor, M. J., and A. Hoerauf. 2001. A new approach to the treatment of filariasis. Curr. Opin. Infect. Dis. **7**:727-731.

Teixeira, M. M. et al. 1995. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation *in vivo*. Trends Pharmacol. Sci. **16**: 418-423

Thomas, O. C., and R. Lawrence. 1995. Parasites in human tissues. 1st Edition (Hong Kong: American Society for Clinical Pathologists).

Thompson, J. P., R. B. Crandall, C. A. Crandall, and J. T. Neilson. 1979. Clearance of microfilariae of *Dipetalonema viteae* in CBA/N and CBA/H mice. J. Parasitol. **65**:966-968.

Tominaga, A., S. Takaki, Y. Hitoshi, and K. Takatsu. 1992. Role of the IL-5 receptor system in hematopoiesis: molecular basis for overlapping function of cytokines. Bioassays. **14**:527-533.

Townson, S., D. Hutton, J. Siemienka, L. Hollick, T. Scanlon, S. K. Tagboto, and M. J. Taylor. 2000. Antibiotics and *Wolbachia* in filarial nematodes: antifilarial activity of rifampicin, oxytetracycline and chloramphenicol against *Onchocerca gutturosa*, *O. lienalis* and *Brugia pahangi*. Ann. Trop. Med. Parasitol. **94**:801-816.

6. Literaturverzeichnis

- Turner, P. F., K. A. Rockett, E. A. Ottesen, H. Francis, K. Awadzi, and I. A. Clark.** 1994. IL-6 and tumor necrosis factor in the pathogenesis of adverse reactions after treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **169**:1071-1075.
- Ulrichs, T., and S. H. Kaufmann.** 2002. Mycobacterial persistence and immunity. *Front Biosci.* **7**:D458-469.
- Van Meer, M. M., J. Witteveldt, and R. Stouthamer.** 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect. Mol. Biol.* **8**:399-408.
- Vanamail, P., S. Subramanian, P. K. Das, S. P. Pani, P. K. Rajagopalan, D. A. Bundy, and B. T. Grenfell.** 1989. Estimation of age-specific rates of acquisition and loss of *Wuchereria bancrofti* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:689-693.
- Velupillai, P., W. E. Secor, A. Hoerauf, and D. A. Harn.** 1997. B1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. *J. Immunol.* **158**:338-344.
- Vincent, A. L., J. K. Portaro, and L. R. Ash.** 1975. A comparison of the body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *B. malayi*. *J. Parasitol.* **63**:567-570.
- Vincent, A. L., W. A. Soderman, and A. Winters.** 1980. Development of *Brugia pahangi* in normal and nude mice. *J. Parasitol.* **66**:648.
- Vincent, A. L., A. C. Vickery, M. J. Lotz, and U. Desai.** 1984. The lymphatic pathology of *Brugia pahangi* in nude (athymic) and thymic mice C3H/HeN. *J. Parasitol.* **70**:48-56.
- Weekly Epidemiological Record.** 1999. Onchocerciasis No. **45**: 377-384.
- Weller, P. F.** 1991. The immunobiology of eosinophils. *N. Engl. J. Med.* **324**:1110-1118.
- Werren, J. H., and J. Jaenike.** 1995. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity.* **75**:320-326.
- Werren, J. H.** 1997a. Biology of *Wolbachia*. *Ann. Rev. Entomol.* **42**:587-609.
- Werren, J. H., and S. L. O'Neill.** 1997b. The evolution of heritable symbionts. In: O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A., Werren, J. H. (Eds.) *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford 1-41.
- Weyer, F.** 1978. Progresses in ecology and epidemiology of rickettsioses. *Acta Trop.* **35**:5-21.
- WHO.** 1987. WHO Expert Committee on Onchocerciasis. WHO Tech. Rep. Ser. **752**:1-167.

6. Literaturverzeichnis

- WHO.** 1992. Lymphatic filariasis: The disease and its control. WHO Tech. Rep. Ser. **821C:44**.
- WHO.** 1995. Onchocerciasis and its control. WHO Tech. Rep. Ser. **852:1-103**.
- WHO.** 1997. Lymphatic filariasis: reasons for hope. WHO/CTD/FIL/97.4. World Health Organization.
- Wicher, K., F. Abbruscato, V. Wicher, D. N. Collins, I. Auger, and H. W. Horowitz.** 1998. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun.* **66:2509-2513**.
- Wildenburg, G., A. Plenge-Bönig, A. Renz, P. Fischer, and D. W. Büttner.** 1997. Distribution of mast cells and their correlation with inflammatory cells around *Onchocerca gutturosa*, *O. tarsicola*, *O. ochengi*, and *O. flexuosa*. *Parasitol. Res.* **83:109-120**.
- Wolowczuk, I., S. Nutten, O. Roye, M. Delacre, M. Capron, R. M. Murray, F. Trottein, and C. Auriault.** 1999. Infection of mice lacking IL-7 reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **67:4183-190**.
- Xie, H., O. Bain, and S. A. Williams.** 1994. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite.* **1:141-151**.
- Yamamura, N.** 1993. Vertical transmission and evolution of mutualism from parasitism. *Theoret. Pop. Biol.* **44:95-109**.
- Zahner, H., and P. H. Wegerhof.** 1986. Immunity to *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*. II. Effects of chemotherapeutically abbreviated and postpatent primary infections on challenges with various stages of the parasite. *Parasitol. Res.* **72:789-804**.
- Zheng, H. J., Z. H. Tao, W. F. Cheng, S. H. Wang, S. H. Cheng, Y. M. Ye, L. F. Luo, X. R. Chen, G. B. Gan, and W. F. Piessens.** 1991. Efficacy of ivermectin for control of microfilaremia recurring after treatment with diethylcarbamazine. II. Immunologic changes following treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45:175-181**.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil.** 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **265:509-515**.
- Zurawski, G., and J. E. de Vries.** 1994. IL-13, an IL-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today.* **15:19-26**.

7. Anhang

7. Anhang

Sequenz des 16S rDNA-Kompetitors (625 Basenpaare)

CTACCTGGTA	GTACGGAATA	ATTGCTGGAA	ACGACAATA	40
ATACCGTAGG	ATTGTACTGT	GCAACTCGAG	TGCATGAAGT	80
TGGAATCGCT	AGTAATCGTG	GATCAGCATG	GATCAGCATG	120
CCACGGTGAA	TACGTTCTCG	ACACTGCCTA	CGCCCTACGG	160
GGGAAAGATT	TATTGCTATT	GGATGAGCCT	ATATTAGATT	200
AGCTAGTTGG	TAGGGTAATG	GCCTGCCAAG	GCTATGATCT	240
ATAGCTGATC	TGAGAGGATG	GTCAGCCACA	CTGGAACTGA	280
GATACGGTCC	AGACT CCTAC	GGGAGGCAGC	AGTGGGGAAT	320
ATTGGACAAT	GGGCGAAAGC	TTGATCCAGC	CATGCCGCGT	360
GAGTGAAGAA	GGCCTTTGGG	TTGTAAAGCT	CTTTCAGTGA	400
GGAAGATAAT	GACGGTACTC	ACAGAAGAAG	TCCTGGCTAA	440
CTCCGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGGAG	AGGGCTAGCG	480
TTATTCGGAA	TTATTGGGCG	TAAAGAGCAC	GTAGGCTGGT	520
TAGTAAGTTA	AAAGTGAAAT	TCCAAAGCTT	AACTTTGGAA	560
TTGCTTTTAA	AACTGCTGAT	CTAGAGGTTG	AAAGAGTGAT	600
AGAGGAATTG	CTAGTGTAGA	GGTGA		625

7. Anhang

Sequenz des 5S rDNA-Kompetitors (510 Basenpaare)

GTAAAGCAAC	GTTGGGCCTG	GGCTTGCCCG	GAGACTGCCT	40
GGGAACCCCA	GGTGTTGTAG	ACATGTTTTG	TTTTTTTCGG	80
GAACTTTTTG	AGTAGCAATC	TAATTATTTT	TGAATGTACA	120
ACAGTCATAT	GAGAATGAAG	TAGTTACAAA	CATTGGTTTA	160
ATTACCCAAG	TTTGAGGTAA	TTGAATGTTT	CTGCCCAGAG	200
TTTCGACTGC	TGTGGCTTGA	AGGGATTGTA	CTGTGCAACT	240
CGAGTGCATG	AAGTTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGTGGATCAG	280
CATGCCACGG	TGAATACGTT	CTCGGGTCTT	GTACACACTG	320
CCCGAAATTT	TGGAACGTCC	TGCATGAGCG	GGACAACAAA	360
AAATGAAATA	TTGGTGATAC	AAAGAAGGAG	CTATAGCTGT	400
TGAAATTTGA	TGATTTTCAG	TTTCAGACAG	AATTTGATGT	440
ACATTCTCCC	TTTTGATTAT	GTCCACGACC	ATACCACGTT	480
GAAAGCACGA	CATCTCGTCC	GATCTGTCAA		510

LEBENS LAUF

Lars Volkmann

Geburtsdatum: 23.05.1969

Geburtsort: Remscheid

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

05/1989 Abitur am Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium in Remscheid

Praktika

08/1990 – 07/1991 Einjähriges Landwirtschaftspraktikum auf einem Mischbetrieb in Zülpich-Sinzenich (Kreis Euskirchen)

05/1997 – 08/1997 Forschungsaufenthalt in Sambia mit dem Thema: Untersuchung der Ätiologie, Diagnose und Therapie der Tropischen Pyomyositis am University Teaching Hospital (UTH) Lusaka in Sambia

Studium

11/1991 – 10/1992 2 Semester Studium der Agrarwissenschaften an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel

10/1992 – 06/1996 Studium der Biologie an der Ruhruniversität Bochum

07/1996 – 12/1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie mit dem Thema: Pathogenitätsfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa* (Phospholipase C, Lipase) und ihre Regulation durch humane Entzündungsmediatoren

06/1998 – 04/2002 Anfertigung der Dissertation am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg mit dem Thema: Untersuchungen zur Infektionsbiologie in der murinen und humanen Filariose - Einfluß von Th2- und Th1-vermittelten Effektorantworten und von Wolbachien auf die verschiedenen Entwicklungsstadien der Filarien.