

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.