

**Der Einfluss einer Nematodeninfektion auf die
Immunantwort der Maus
(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758)
gegen pathogene Protozoen während
Koinfektionen und Vakzinierungen**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Kolbaum

aus Hamburg

Hamburg, 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Prof. Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 08. März 2011

Hamburg, den 01. April 2011



A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das Th1/Th2-Konzept der adaptiven Immunantwort	3
2.2	Die <i>S. ratti</i> -Infektion der Maus als Modell für eine humane Strongyloidiasis.....	5
2.3	Die <i>L. sigmodontis</i> -Infektion der BALB/c Maus als Modell für die humane	
	Filariose	7
2.4	Das experimentelle Modell der Leishmaniose	9
2.5	Malaria: die humane Infektion und Studien im Mausmodell.....	11
2.6	Vakzinierung gegen Malaria	14
2.6.1	Die experimentelle anti-Malaria Vakzinierung: ACT-CSP und die heterologe <i>prime/boost</i> -Immunsierung	15
2.7	Helmintheninfektionen und das Immunsystem des Wirtes: Immunantwort und Immunomodulation.....	16
2.8	Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
3	MATERIAL.....	19
3.1	Laborgeräte.....	19
3.2	Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikware).....	20
3.3	Chemikalien und Reagenzien	22
3.4	Enzyme.....	23
3.5	Antikörper.....	24
3.6	Peptide, Proteine und Proteinkomplexe	25
3.7	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	25
3.8	Tiere und Parasiten.....	28
3.9	Bakterienstämme.....	29
3.10	Oligonukleotidprimer	29
3.11	Software.....	29
4	METHODEN.....	30
4.1	Zellbiologische Methoden.....	30
4.1.1	Wichtige Grundsätze der Zellkultur.....	30
4.1.2	<i>Leishmania</i> -Kultur	30
4.1.3	Präparation muriner Milz- und Lymphknotenzellen.....	31
4.1.4	Präparation muriner Leberzellen.....	31
4.1.5	Präparation muriner peripherer Blutzellen	31

4.1.6	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau	31
4.1.7	<i>In vitro</i> Stimulationsexperimente.....	32
4.1.8	Messung der Zellproliferation	32
4.1.9	Beladung von Milzzellen mit CSP ₂₄₅₋₂₅₃ -Peptid	33
4.1.10	Markierung von Zellen mit CFSE.....	33
4.1.11	Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)	34
4.2	Biochemische Methoden	35
4.2.1	ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-10, IL-13, IFN- γ) im Zellkulturüberstand	35
4.2.2	ELISA zum Nachweis von <i>S. ratti</i> -spezifischen Ig im Serum	36
4.2.3	ELISA zum Nachweis von Leishmanien-spezifischem Ig im Serum.....	36
4.2.4	Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)	36
4.3	Molekularbiologische Methoden	37
4.3.1	Gewinnung von DNA aus Gewebe	37
4.3.2	Gewinnung von DNA aus Stuhlproben.....	38
4.3.3	Gewinnung von RNA aus der Leber mit TRIzol [®] Reagenz	38
4.3.4	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	38
4.3.5	Reverse Transkription	38
4.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
4.3.7	Agarosegelelektrophorese	41
4.3.8	Quantitative <i>real-time</i> PCR	41
4.4	Mikrobiologische Methoden.....	45
4.4.1	Kultur von Bakterien.....	45
4.4.2	Einfrieren von Bakterien	45
4.5	Tierversuche, Parasitenstammerhaltung und Herstellung von Parasiten-Antigen ...	45
4.5.1	Gewinnung von Serum.....	45
4.5.2	Infektion mit <i>S. ratti</i> und Stammerhaltung	46
4.5.3	Nachweis der <i>S. ratti</i> -Infektion.....	46
4.5.4	Herstellung von <i>Strongyloides</i> -Antigen	46
4.5.5	Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	47
4.5.6	Stammerhaltung von <i>L. sigmodontis</i>	47
4.5.7	Nachweis der <i>L. sigmodontis</i> -Infektion.....	47
4.5.8	Infektion mit <i>Plasmodium</i> spp.	47
4.5.9	Nachweis von <i>Plasmodium</i> spp.-Infektionen	48

4.5.10	Infektion mit <i>L. major</i>	48
4.5.11	Nachweis der <i>L. major</i> -Infektion	48
4.5.12	Herstellung von Leishmanien-Antigen	49
4.5.13	Immunisierung mit <i>S. typhimurium</i> SB824 und Persistenzanalyse	49
4.5.14	Immunisierung mit ACT-CSP	49
4.5.15	Bestimmung der CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität <i>in vivo</i>	50
4.5.16	Statistik	50
5	ERGEBNISSE	51
5.1	Die Immunantwort der Maus auf eine <i>S. ratti</i> -Infektion.....	51
5.2	Untersuchung einer Koinfektion mit <i>S. ratti</i> und <i>L. major</i>	55
5.2.1	Einfluss der <i>S. ratti</i> -Infektion auf die Koinfektion mit <i>L. major</i>	55
5.2.2	Einfluss der <i>L. major</i> -Infektion auf die Koinfektion mit <i>S. ratti</i>	61
5.3	Untersuchung einer Koinfektion mit <i>S. ratti</i> und <i>P. yoelii</i>	64
5.3.1	Einfluss der <i>S. ratti</i> -Infektion auf die Koinfektion mit <i>P. yoelii</i> in C57BL/6 Mäusen	64
5.3.2	Einfluss der <i>S. ratti</i> -Infektion auf die Koinfektion mit <i>P. yoelii</i> in BALB/c Mäusen	68
5.4	Einfluss einer vorliegenden Nematodeninfektion auf die Effizienz einer experimentellen anti-Malaria Vakzine	73
5.4.1	Einfluss von zwei verschiedenen Nematodeninfektionen auf die Effizienz einer Immunisierung mit ACT-CSP	73
5.4.2	Einfluss einer vorliegenden <i>L. sigmodontis</i> -Infektion auf die Effizienz einer heterologen <i>prime/boost</i> -Immunisierung	82
6	Diskussion	89
6.1	Die Infektion von Mäusen mit <i>S. ratti</i> als natürlicher Th2-Stimulus für das Immunsystem.....	89
6.2	Der Einfluss einer <i>S. ratti</i> -Infektion auf die Immunantwort der Maus gegenüber Koinfektionen mit pathogenen Protozoen.....	91
6.2.1	Infektionsverlauf und Immunantwort bei einer <i>S. ratti</i> -/ <i>L. major</i> -Koinfektion ..	92
6.2.2	Infektionsverlauf und Immunantwort bei einer <i>S. ratti</i> -/ <i>P. yoelii</i> -Koinfektion....	94
6.2.3	Die <i>S. ratti</i> -Infektion interferiert nicht mit der Abwehr einer Protozoen- Koinfektion.....	96
6.3	Der Einfluss von Nematodeninfektionen auf die Effizienz einer Vakzinierung	98
6.3.1	<i>L. sigmodontis</i> beeinträchtigt die Effizienz der ACT-CSP Immunisierung	98

6.3.2	<i>L. sigmodontis</i> hat keinen negativen Effekt auf die Effizienz der heterologen <i>prime/boost</i> -Immunisierung	100
6.4	Ausblick.....	102
7	LITERATUR	105

Abkürzungsverzeichnis

AAMΦ	alternativ aktivierte Makrophagen
ACT	<i>Bordetella pertussis</i> Adenylatcyclase
APC	Allophycocyanin
AK	Antikörper
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
<i>boost</i>	Zweit-Immunsierung
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CFSE	Carboxy-Fluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CSP	Circumsporozoiten-Protein
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ec	Endkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
L1	erstes Larvenstadium
iL3	infektiöses drittes Larvenstadium von <i>Strongyloides ratti</i>
IL-4Rα	IL-4 Rezeptor α-Kette
L3	infektiöses drittes Larvenstadium von <i>Litomosoides sigmodontis</i>

L4	viertes Larvenstadium
LK	Lymphknoten
mesLK	mesenteriale Lymphknoten
Mf	Mikrofilarien
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>) Klasse I
NL	nicht-letal
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen (<i>potentia hygrogenii</i>)
p.i.	nach der Infektion (<i>post infectionem</i>)
popLK	popliteale Lymphknoten
pRBCs	parasitierte rote Blutkörperchen (<i>parasitized red blood cells</i>)
<i>prime</i>	primäre Immunisierung
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
REU	relative ELISA Einheit (<i>relative ELISA unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (<i>standard error of the mean</i>)
sfu	<i>spot forming unit</i>
SLA	lösliches Leishmanien-Antigen (<i>soluble Leishmania antigen</i>)
SYIPSAEKI	synthetisches Peptid aus CSP mit der Sequenz Ser-Try-Iso-Pro-Ser-Ala-Glu-Lys-Iso
Th-Zelle	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
XL	letal
YopE	<i>Yersinia outer protein E</i>

Ich danke Gabriele und Howard Kroch für die Finanzierung meiner Promotion, für die freundliche, persönliche Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Fleischer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die freundliche Unterstützung bei allen Fragen.

Frau Dr. Minka Breloer danke ich für das interessante Arbeitsthema, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die vielen konstruktiven Anregungen.

Frau Professor Iris Bruchhaus möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Breloer für die Unterstützung und die vielen konstruktiven Anregungen. Mein ganz besonderer Dank gilt Marie-Luise Eschbach für die Hilfe bei akuter Unterzuckerung und in jeder anderen Notlage. Dr. Wiebke Hartmann danke ich für die freundschaftliche, hilfsbereite und kompetente Unterstützung.

Ich danke der ganzen Abteilung für Immunologie für die schöne, hilfsbereite und unterstützende Atmosphäre. Am liebsten würde ich für jeden einen eigenen Absatz schreiben, aber dann wird die Danksagung zu lang. Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Jacobs, Dr. Susanne Tartz, Dr. Birte Kretschmer, Iris Gaworski und Christiane Steeg, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Birte Blankenhaus gebührt ein eigener Absatz, denn ohne sie hätte ich nicht in der AG Breloer promoviert. Liebste Bibi, ich danke Dir für Deine Freundschaft, Deinen Optimismus, für die vielen schönen, lustigen und absurden Momente und dafür, dass Du als Freundin und als Kollegin immer für mich da bist.

Ich danke außerdem allen Doktoranden des Bernhard-Nocht-Instituts für den Zusammenhalt, die Unterstützung und die fachlichen Anregungen. Hier möchte ich besonders Susanne Helm und Andreas Nagel für ihre Unterstützung danken.

Schließlich danke ich meiner Familie, der Familie Hummel und der Familie Pratsch für ihre Liebe und Unterstützung.

Mein innigster Dank gilt Philipp Hummel für seine Liebe, seine Unterstützung und vor allem für seine Geduld.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Über ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit Helminthen infiziert, davon sind ca. 1,5 Milliarden von einer Infektion mit pathogenen Nematoden betroffen. Wurminfektionen führen häufig zu einer Modulation oder sogar Suppression des Immunsystems. Dieses kann die erfolgreiche Immunantwort des Wirtes gegenüber einer gleichzeitigen Infektion mit anderen Parasiten (Koinfektion) oder die Effizienz einer Vakzine beeinträchtigen. Die Folgen und Mechanismen einer solchen Modulation oder Suppression des Immunsystems sind vielfältig, von der infizierenden Helminthen-Spezies abhängig und noch nicht vollständig verstanden.

Die Auswirkungen einer vorliegenden Wurminfektion auf die Immunantwort des Wirtes gegen einen intrazellulären Parasiten sind von besonderem Interesse, da die erfolgreiche Abwehr von Würmern und pathogenen Protozoen sehr unterschiedliche und z. T. sogar gegensätzliche Anforderungen an das Immunsystem stellt. Während Wurminfektionen in der Regel durch eine Th2-Immunantwort bekämpft werden, ist für die Kontrolle von intrazellulären Parasiten die Ausbildung einer Th1-Immunantwort zentral. Auch viele Vakzinierungen basieren zudem auf der Etablierung einer parasitenspezifischen Th1-Immunantwort. Da Th1- und Th2-Immunantworten antagonistisch zueinander wirken können, wurde in dieser Arbeit die Auswirkung einer Nematodeninfektion auf das Immunsystem von Mäusen während Koinfektionen und Vakzinierungen untersucht.

Für die Studie von Koinfektionen wurden zwei verschiedene Mausmodelle etabliert: Die Koinfektion von Mäusen mit *Strongyloides ratti* und *Leishmania major* sowie die Koinfektion mit *S. ratti* und *Plasmodium yoelii*. Die humanpathogenen Spezies der hier verwendeten Parasiten haben überlappende Verbreitungsgebiete in den Tropen und Subtropen, so dass Koinfektionen häufig auftreten können. Die *S. ratti*-Infektion der Maus ist ein Modell für die humane Infektion mit einem intestinalen Nematoden. Die Infektion von Mäusen mit *L. major* wird als experimentelles Modell für die humane Leishmaniose verwendet und die Infektion von Mäusen mit *P. yoelii* wird als ein Modell für die humane Malaria genutzt.

Die Koinfektionsstudien zeigten, dass eine vorliegende Infektion mit *S. ratti* keinen Einfluss auf die erfolgreiche Bekämpfung der Protozoen-Infektionen hatte. Obwohl sich die antagonistischen Immunantworten in koinfizierten Mäusen beeinflussten, konnten die Mäuse eine ausreichend starke Immunantwort zur Kontrolle beider Parasiten generieren.

Um den Einfluss von Wurminfektionen auf die Effizienz von Vakzinierungen zu untersuchen, wurden Mäuse entweder mit *S. ratti* oder mit *Litomosoides sigmodontis* infiziert. Während *S. ratti* als Modell für eine patente aber transiente Infektion diente, die von der Maus innerhalb von 3-4 Wochen erfolgreich bekämpft wird, war die Infektion mit *L. sigmodontis* ein Modell für die humane Filariose und damit für eine langlebige, fast chronische Wurminfektion. Als Modell für eine Vakzine wurde die experimentelle Immunisierung von Mäusen gegen das Circumsporozoiten-Protein (CSP) von *Plasmodium berghei* Sporozoiten, einem Erreger der Maus-Malaria, verwendet. Außerdem standen zwei verschiedene Vakzinierungsprotokolle zur Verfügung. Die einmalige Immunisierung mit einer rekombinanten Adenylatcyclase (ACT-CSP) sowie eine erweiterte, heterologe *prime/boost*-Immunisierung.

Während die *S. ratti*-Infektion keinen Einfluss auf die Immunisierung mit ACT-CSP hatte, reduzierte eine vorliegende *L. sigmodontis*-Infektion die Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen signifikant und führte zu einem verminderten Schutz der Mäuse gegenüber einer nachfolgenden *P. berghei*-Infektion. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Infektion mit *L. sigmodontis* die Effizienz der erweiterten und effektiveren *prime/boost*-Immunisierung nicht.

Zusammenfassend lassen sich aus den Befunden dieser Arbeit folgende Schlüsse ziehen: Während die artifizielle Manipulation von Th1- und Th2- Immunantworten z. B. in zytokindefizienten Mäusen dramatische Folgen für die Parasitenabwehr hat, kann die „natürliche“ Modulation durch Koinfektionen kompensiert werden. Diese Befunde unterstreichen die Fähigkeit des Immunsystems zur gleichen Zeit grundlegend unterschiedliche und effiziente Immunantworten auszubilden. Ferner wird deutlich, dass der Einfluss von chronischen und transienten Helmintheninfektionen unterschiedlich stark sein kann. Außerdem zeigt sich, dass gute Adjuvantien und Impfprotokolle auch bei einer vorliegenden Helminthen-Infektion effizient wirken können. Weitere Ergebnisse aus Human- und Tier-Studien werden benötigt, um eine optimale medizinische Versorgung von Menschen zu gewährleisten, die in den Endemiegebieten von parasitären Helminthen leben.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Th1/Th2-Konzept der adaptiven Immunantwort

Das Immunsystem hat die Aufgabe, eine effektive Immunantwort gegen die unterschiedlichsten Pathogene zu entwickeln. Um dies zu erreichen, entwickelten sich verschiedene Vorgehensweisen. So werden intrazelluläre Erreger durch andere Mechanismen bekämpft als extrazelluläre. Mediatoren dieser adaptiven Immunantworten sind Effektor-T-Zellen [1].

Effektor-T-Zellen können anhand der Expression von unterschiedlichen Oberflächmolekülen (*cluster of differentiation*; CD) in verschiedenen T-Zellsubpopulationen eingeteilt werden [2]. Die Effektorfunktion von T-Zellen der CD4-Linie besteht darin andere Zelltypen, wie B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen oder CD8⁺ T-Zellen, zu aktivieren und Zytokine zu sekretieren, die in die Funktion dieser Zellen involviert sind. Weil sie für die Induktion und Unterstützung der jeweils benötigten Immunantworten sorgen, werden sie auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet. Eine aktivierte CD4⁺ Effektor-T-Zelle produziert ein charakteristisches Zytokinprofil in Abhängigkeit von dem Stimulus, mit dem sie aktiviert wurde. Dies sorgt für die Aktivierung der passenden Zellen und Effektormechanismen, um die verschiedenen Erregertypen mit der jeweils effektiven Immunantwort zu bekämpfen [1].

Anhand dieser Zytokinprofile und Effektorfunktionen unterscheidet man wiederum verschiedene CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen [3]. Der relative Anteil dieser Subpopulationen, die während einer Immunantwort induziert werden, ist entscheidend für den Schutz und die Pathologie bei Infektionen.

Die am besten charakterisierten CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen sind Th1- und Th2-Zellen, die zunächst in Mäusen [4] und später im Menschen [5] entdeckt wurden. Die Produktion des Zytokins Interferon- ($\text{IFN-}\gamma$) ist das Markenzeichen von Th1-Zellen, während Interleukin- (IL-) 4 und IL-5 von Th2-Zellen produziert werden.

Die Zytokine, die von den CD4⁺ T-Zellen produziert werden sind nicht nur entscheidend für ihre Effektorfunktion, sie sorgen auch für die Entwicklung und Expansion der jeweiligen CD4⁺ Subpopulation. So unterstützt $\text{IFN-}\gamma$, welches von Th1-Zellen sezerniert wird, die weitere Differenzierung von Th1-Zellen und inhibiert die Proliferation von Th2-Zellen. Umgekehrt unterstützt die IL-4-Produktion von Th2-Zellen die weitere Differenzierung von Th2-Zellen und supprimiert die Entwicklung von Th1-Zellen. Jede

Th-Immunantwort verstärkt sich auf diese Weise selbst und wirkt gleichzeitig der anderen entgegen [6]. Aus diesem Grund kommt es, wenn eine Th-Immunantwort sich entwickelt hat, zu einer Polarisierung des Immunsystems. Die extremsten Polarisierungen werden während chronischen Infektionen beobachtet [1, 7]. Allerdings ist die Unterscheidung in Th1 oder Th2 nicht immer eindeutig, oft ist eher ein tendenzieller Unterschied der Zytokinproduktion messbar. Besonders bei Menschen wird deshalb häufig der Begriff Th1- oder Th2-ähnlich verwendet. Zudem ist die Immunantwort gegenüber vielen Pathogenen auch eine Mischung aus Th1- und Th2-Immunantworten, die in einer charakteristischen zeitlichen Abfolge induziert werden, wie bei der Leishmaniose [8].

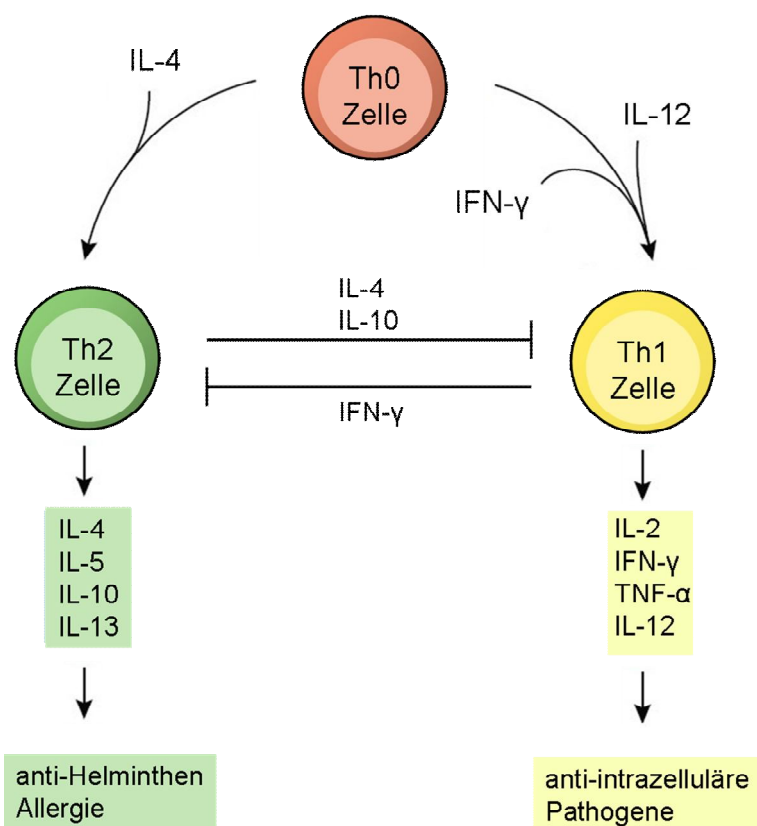


Abb. 2.1.1: Das Th1/Th2-Konzept der adaptiven Immunantwort

Gezeigt ist das Th1/Th2-Konzept der adaptiven Immunantwort. Naive $CD4^+$ T-Zellen (Th0) differenzieren entweder in Anwesenheit von IL-4 zu Th2-Effektor-T-Zellen (Th2-Zellen) oder in Anwesenheit von IL-12 und/oder IFN- γ zu Th1-Zellen. Th2-Zellen leiten durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 oder IL-13 eine anti-Helminthen Immunantwort ein. Th2-Zellen werden jedoch auch während Allergien induziert. Th1-Zellen unterstützen durch die Produktion von IL-2, IFN- γ , Tumornekrosefaktor- (TNF-) α oder IL-12 die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen. Th1- und Th2-Immunantworten wirken antagonistisch zueinander.

Th1- und Th2-Zellen entwickeln sich aus den gleichen Vorläuferzellen, den naiven $CD4^+$ T-Zellen (Th0). Zytokine spielen die entscheidende Rolle bei der Differenzierung

von Th0-Zellen. IL-12 und IFN- γ induzieren Th1-Zellen, während IL-4 Th2-Zellen aktiviert [9, 10].

Th1-Immunantworten werden durch intrazelluläre Erreger wie Viren, Bakterien, Leishmanien oder Plasmodien induziert [1]. Eine Gemeinsamkeit solcher Erreger besteht darin, dass sie Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen oder Dendritische Zellen, aktivieren, die daraufhin IL-12 und IFN- γ produzieren. Die Effektorfunktion von Th1-Immunantworten besteht hauptsächlich in der Aktivierung von Phagozyten, die für die Zerstörung der intrazellulären Erreger sorgen [11].

Th2-Immunantworten werden durch Helminthen und Allergene induziert. Sie lösen häufig eine chronische T-Zell Aktivierung aus, ohne zu einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu führen, dass für die Ausbildung von Th1-Immunantworten erforderlich ist. Th2-Immunantworten werden also gegenüber Pathogenen oder Antigenen ausgelöst, die zu einer wiederholten T-Zell Stimulation führen. Die Effektorfunktion von Th2-Immunantworten besteht in der Förderung der IgE- und IgG1-Synthese [12] sowie in der Aktivierung von Mast-Zellen und Eosinophilen, die Schutz vor Helmintheninfektionen vermitteln [11].

2.2 Die *S. ratti*-Infektion der Maus als Modell für eine humane Strongyloidiasis

Strongyloides spp. sind parasitäre Nematoden, die vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen vorkommen. Weltweit sind 30-100 Millionen Menschen mit Parasiten dieser Spezies infiziert [13]. Für die Infektion des Menschen spielen vor allem *Strongyloides fuelleborni* und, am häufigsten vorkommend, *Strongyloides stercoralis* eine Rolle [14, 15]. Der Parasit hat einen komplexen Lebenszyklus in dem sowohl freilebende, als auch parasitäre Stadien vorkommen (Abb. 2.2.1) [16]. Larven des infektiösen dritten Stadiums (iL3) bohren sich in die Haut des Säugetier-Wirtes ein und wandern anschließend über die Lunge in den Rachen, von wo aus sie durch Verschlucken zu ihrem eigentlichen Lebensraum, dem Darm gelangen. *Strongyloides* Larven entwickeln sich über das vierte Larvenstadium (L4) zu weiblichen Adulten, die in der Schleimhaut des Dünndarmes verbleiben. *Strongyloides* vermehren sich durch mitotische Parthenogenese und Eier sowie bereits geschlüpfte Larven im ersten Stadium (L1) werden von dem Wirt mit dem Stuhl ausgeschieden. Außerhalb des Wirtes entwickeln sich die Larven entweder direkt zu iL3 oder sie häuten sich zu freilebenden adulten Männchen und Weibchen, die sich geschlechtlich fortpflanzen [17].

S. stercoralis besitzt die Fähigkeit sich innerhalb des Wirtes zu vermehren (Autoinfektion), dieses kann zu persistierenden Infektionen führen, die schließlich chronisch werden. Die chronische Infektion verläuft meistens asymptomatisch, in manchen Fällen verursachen wandernde Larven jedoch Pathologien wie Haut- oder Lungenentzündungen [18]. Eine seltene, jedoch sehr ernste Komplikation ist die Hyperinfektion, die bei immunsupprimierten Patienten, zum Beispiel während einer Behandlung mit Kortikosteroiden, auftreten kann. iL3 reifen dann im Körper des Wirtes zu Adulten heran und wandern aus dem Darm in das umliegende Gewebe. Die Sterblichkeit bei einem Hyperinfektionssyndrom beträgt bis zu 87 % [19-21].

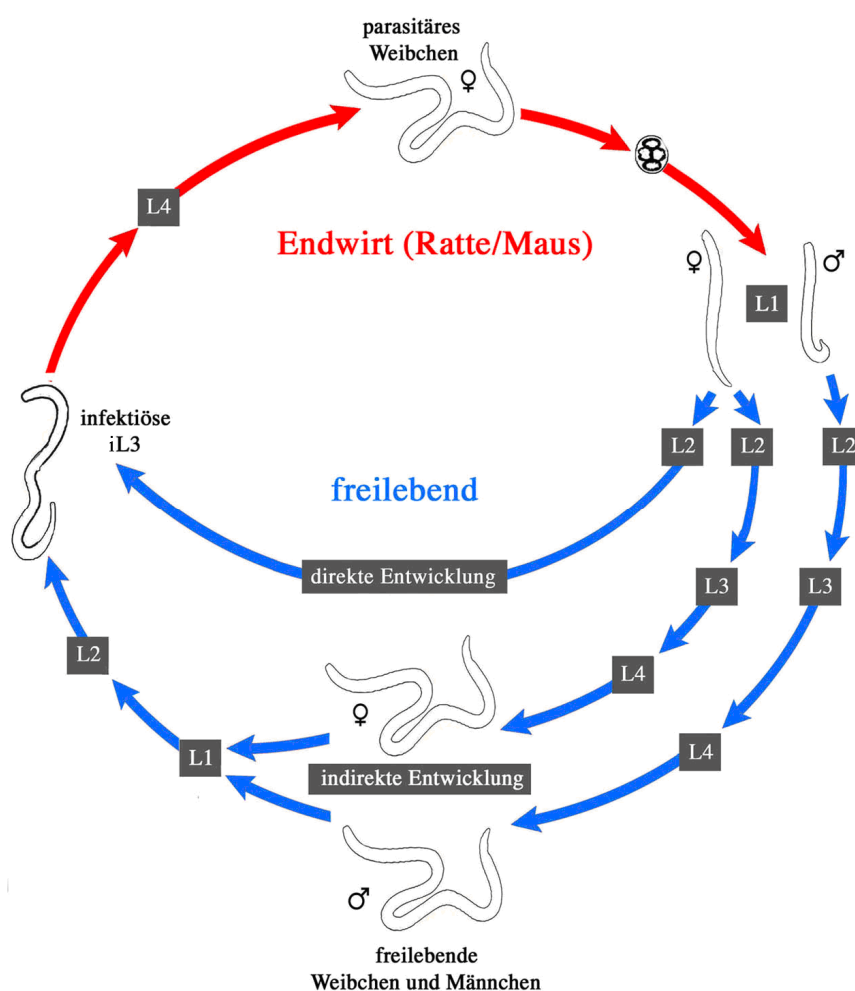


Abb. 2.2.1: Der Lebenszyklus von *Strongyloides* spp.

Das infektiöse dritte Larvenstadium (iL3) bohrt sich aktiv in die Haut des Säugetier-Wirtes ein. Die iL3 wandern anschließend über die Lunge in den Rachen, von wo aus sie durch Verschlucken zu ihrem Endziel, dem Darm gelangen. *Strongyloides* Larven entwickeln sich über L4 zu weiblichen Adulten, die in der Schleimhaut des Dünndarmes verbleiben. *Strongyloides* Adulte vermehren sich durch mitotische Parthenogenese. Eier sowie bereits geschlüpfte L1 werden von dem Wirt mit dem Stuhl ausgeschieden. Außerhalb des Wirtes entwickeln sich die Larven entweder direkt zu iL3 oder sie häuten sich zu freilebenden adulten Männchen und Weibchen, die sich geschlechtlich fortpflanzen [17].

Um die Immunantwort gegenüber *Strongyloides* spp. zu untersuchen, wurden verschiedene Nagetiermodelle verwendet [22-24]. Wohlgermerkt eignet sich kein Nagetiermodell dazu, die *Strongyloides* Autoinfektion oder das Hyperinfektionssyndrom des Menschen zu untersuchen, da diese Komplikationen weder in der Ratte, noch in der Maus, auftreten. Trotzdem konnten in beiden Tiermodellen wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Immunantwort gesammelt werden.

Eine *S. ratti*-Infektion wird sowohl von Mäusen, als auch von Ratten innerhalb von 20-40 Tagen erfolgreich bekämpft und verleiht eine Teil-Resistenz gegenüber einer Reinfektion [23, 25-27]. Während der erfolgreichen Immunantwort von *S. ratti*-infizierten Mäusen wird eine klassische Th2-Immunantwort induziert, bei welcher IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produziert werden. Gleichzeitig wird die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ supprimiert. Des Weiteren werden *Strongyloides*-spezifisches Immunglobulin (Ig), vor allem Th2-assoziiertes IgM und IgG1, und Mastzellen induziert [28].

2.3 Die *L. sigmodontis*-Infektion der BALB/c Maus als Modell für die humane Filariose

Unter Filariosen werden infektiöse Erkrankungen zusammengefasst, die durch Filarien verursacht werden. Weltweit sind mehr als 150 Millionen Menschen mit Filarien infiziert. Zu den wichtigsten humanpathogenen Filarien gehören *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* und *Loa loa* [29]. Die Pathologie ist abhängig von der Spezies, so führt die Infektion mit *O. volvulus* zu der so genannten Flussblindheit, während die Infektion mit *W. bancrofti* starke Lymphstauungen, die Elephantiasis, verursacht. Verantwortlich für die Pathologie sind vor allem die Mikrofilarien (Mf), die in infizierten Personen in großen Mengen auftreten können [30]. Beim Absterben der Mf kommt es zu starken inflammatorischen Immunreaktionen [31], die das lokale Gewebe nachhaltig schädigen.

Die Infektion von BALB/c Mäusen mit *L. sigmodontis* stellt das einzige Mausmodell für Filarieninfektionen dar, in dem der gesamte Lebenszyklus des Wurmes durchlaufen wird [32]. Die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) ist das natürliche Reservoir von *L. sigmodontis*. Als Vektor für die Übertragung des infektiösen dritten Larvenstadiums (L3) dient die Milbe *Ornithonyssus bacoti* [33]. In Abb. 2.1.1 ist der Infektionszyklus dargestellt. Bei einer Blutmahlzeit an infizierten Baumwollratten nimmt die Milbe Mf auf. Diese durchdringen die Darmwand und wandern in die Thoraxmuskulatur ein. Innerhalb von 12-14 Tagen reifen die Larven über das zweite Larvenstadium (L2) zur L3. Die L3

wandern in den Kopf der Milbe und können bei der nächsten Blutmahlzeit über die Mundwerkzeuge in den Endwirt gelangen. Innerhalb von 3-4 Tagen wandern die L3 über die Lymph- und Blutgefäße an ihren Zielort, die Pleurahöhle [34]. In der Pleurahöhle häuten sich die L3 nach 8-10 Tagen zum vierten Larvenstadium. Zwischen Tag 26-28 entwickeln sich schließlich die adulten Würmer, die zwischen Tag 55 und Tag 80 nach der Infektion (*post infectionem*; p.i.) Mf in die Pleurahöhle entlassen, die im Blut nachweisbar sind. Nach 120 Tagen kommt es durch die Bildung von Granulomen, einer Umkapselung der Würmer mit inflammatorischen Zellen, zur Beendigung der Infektion in BALB/c Mäusen [35]. Im Gegensatz zu den suszeptiblen BALB/c Mäusen kommt es in der resistenten C57BL/6 Maus nicht zur Entwicklung fertiler adulter Würmer und Mf im Blut und die Infektion wird 35-40 Tage p.i. erfolgreich bekämpft.

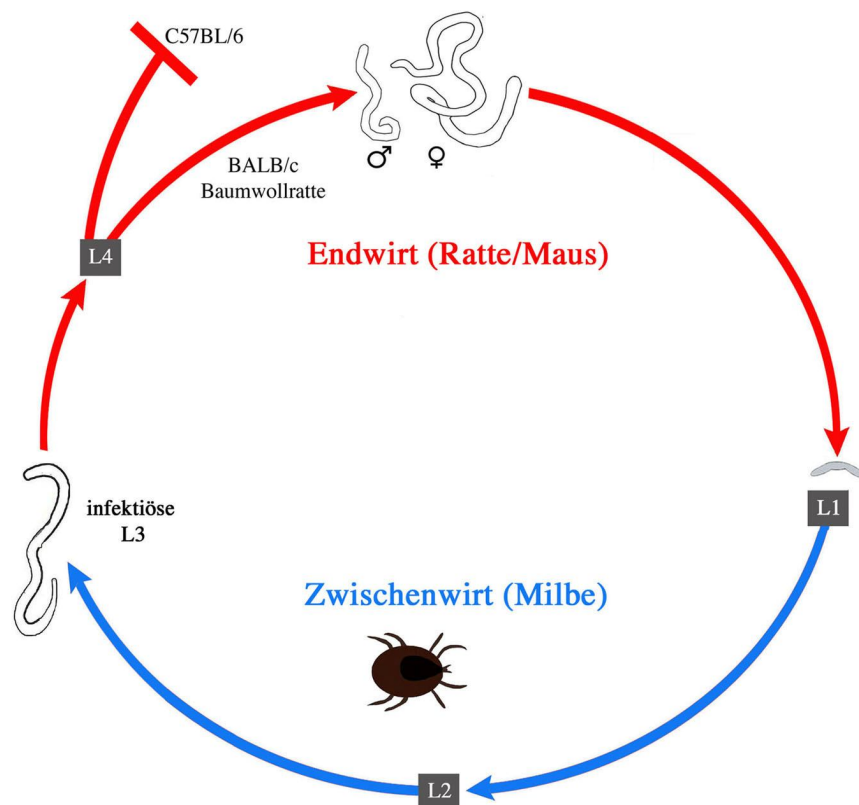


Abb. 2.3.1: Der Lebenszyklus von *L. sigmodontis*

Der natürliche Wirt von *L. sigmodontis* ist die Baumwollratte. Milben nehmen bei einer Blutmahlzeit auf der Baumwollratte L1 auf. In der Milbe entwickeln sich innerhalb von 14 Tagen L1 zur L3. Durch den Biss der infizierten Milbe werden L3 auf die Maus oder die Ratte übertragen. Diese erreichen über die Lymphgefäße die Pleurahöhle, häuten sich zweimal und entwickeln sich zu adulten weiblichen und männlichen Würmern. Die weiblichen Würmer entlassen ab Tag 55 p.i. Mf. Im Gegensatz zu den suszeptiblen BALB/c Mäusen kommt es in der resistenten C57BL/6 Maus nicht zur Entwicklung fertiler adulter Würmer und die Infektion wird 35-40 Tage nach der Infektion bekämpft.

Untersuchungen in BALB/c Mäusen haben gezeigt, dass neben NK- [36] und B1-Zellen [37] vor allem CD4⁺ T-Zellen essentiell für die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* sind [38]. Darüber hinaus basiert die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* auf einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort. Das Fehlen von IL-4 führt zu einer signifikant erhöhten und verlängerten Mikrofilariämie in BALB/c Mäusen [39] und Mäuse die sowohl für IL-5 als auch für IFN- γ defizient sind, zeigen eine signifikant erhöhte Wurmlast im Vergleich zu BALB/c Mäusen die nur für eines der beiden Zytokine defizient sind [40]. Neben der schützenden Immunantwort induziert *L. sigmodontis* in BALB/c Mäusen jedoch auch immunsupprimierende Zelltypen wie regulatorische T-Zellen (Treg) [41, 42], oder alternativ aktivierte Makrophagen (AAM Φ) [43], welche die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* hemmen.

2.4 Das experimentelle Modell der Leishmaniose

Die Leishmaniose des Menschen wird von Protozoen der Gattung *Leishmania* spp. ausgelöst. Sie zählt weltweit zu den wichtigsten Infektionskrankheiten. Schätzungen zufolge sind mehr als 12 Millionen Menschen in 88 verschiedenen Ländern infiziert und jährlich kommt es zu etwa 2 Millionen Neuerkrankungen [44]. Weltweit sind 30 Leishmanien-Spezies bekannt, die im Menschen verschiedene Formen der Leishmaniose verursachen können. Je nach Symptomatik unterscheidet man die viszerale, mukokutane und kutane Leishmaniose.

Leishmanien folgen einem zweiphasigen Lebenszyklus (Abb. 2.4.1) während dem sie in verschiedenen Formen vorkommen. In ihrem Vektor, der Sandmücke (u.a. *Phlebotomus* oder *Lutzomyia*), kommen sie als gestreckte, begeißelte, promastigote Leishmanien vor. Durch einen Stich der weiblichen Sandmücke werden 10-100 infektiöse, promastigote Leishmanien in den Wirt injiziert. In ihren Wirten, zu denen Hunde, Nager, Menschen, Katzen, Rinder und Pferde gehören, werden die Promastigoten von Makrophagen aufgenommen. In ihnen transformieren sie sich in rundliche, unbegeißelte Amastigote und es kommt zur massiven Vermehrung durch Teilung. Schließlich platzt die Wirtszelle und setzt Leishmanien in das umgebende Gewebe frei. Weitere Zellen werden infiziert, die auch in den Blutstrom gelangen und bei dem nächsten Stich von einer Sandmücke aufgenommen werden können [45].

Die Infektion verschiedener Mausstämme mit *L. major* hat in den letzten Jahren viel zum Verständnis der Mechanismen beigetragen, die mit Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber diesem Erreger verbunden sind. Der genetische Hintergrund der Mäuse spielt eine

entscheidende Rolle für den Verlauf der Leishmaniose. C57BL/6 Mäuse, die in der frühen Phase der Infektion eine IFN- γ -basierte Th1-Immunantwort gegen *L. major* entwickeln, können die Infektion vollständig ausheilen und bilden ein immunologisches Gedächtnis. Im Gegensatz dazu kommt es in BALB/c Mäusen, die als Reaktion auf die Infektion die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren, zu einem chronischen Verlauf [8]. Dies zeigt dass die Ausbildung einer Th1-Immunantwort für die Bekämpfung der Infektion essentiell ist.

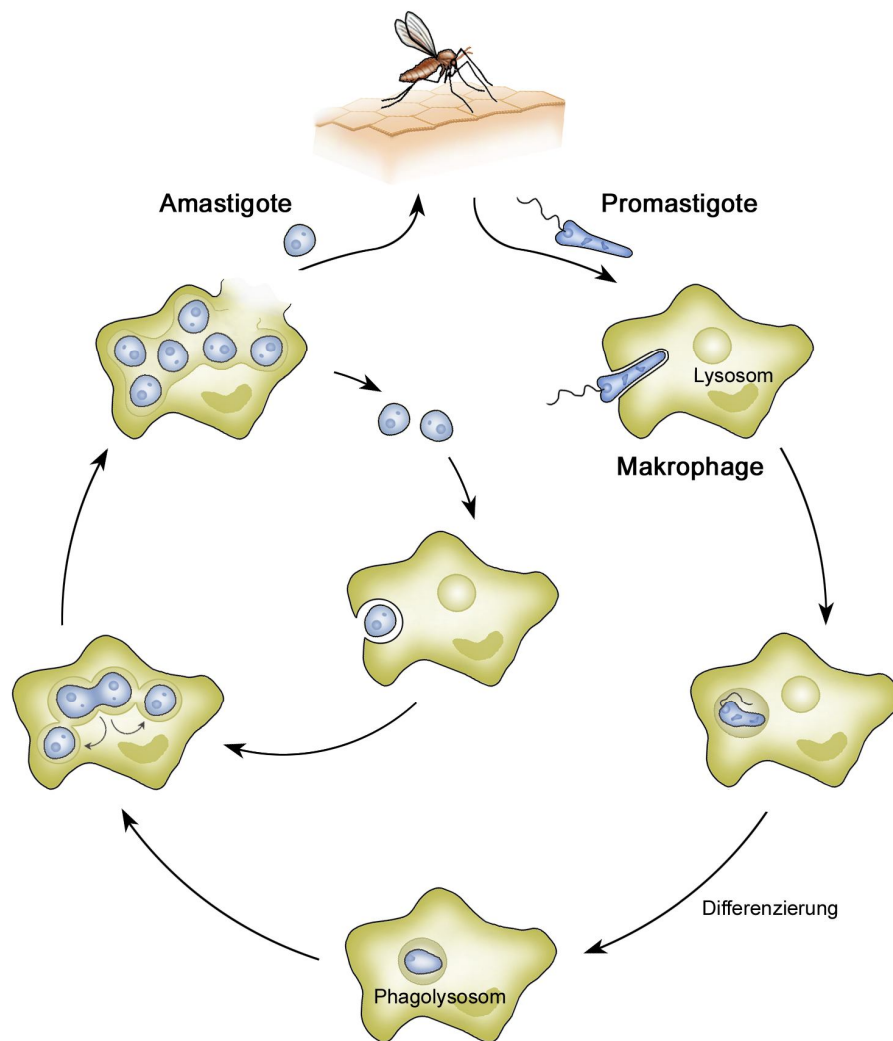


Abb. 2.4.1: Vereinfachter Lebenszyklus von Leishmanien

Infizierte Sandmücken injizieren metazyklische, promastigote Leishmanien in den Wirt. Die Parasiten werden von Makrophagen aufgenommen, wandeln sich in die amastigote Form um und replizieren im Phagolysosom. Dies führt schließlich zum Platzen der Wirtszelle. Die dabei freigesetzten Erreger infizieren umgebende Zellen. Bei einer erneuten Blutmahlzeit nimmt die Sandmücke amastigote Leishmanien auf, die sich in ihr zu infektiösen Promastigoten entwickeln [46].

Um die Immunantwort zu studieren wird häufig eine hoch dosierte Infektion (3×10^6 Promastigote) durchgeführt, da diese zu einer starken und gut messbaren Immunantwort führt. Um eine natürlichere Infektion zu modellieren, werden auch niedrig dosierte Infektionen (100-3000 Promastigote) genutzt [47].

2.5 Malaria: die humane Infektion und Studien im Mausmodell

Die Malaria wird von Protozoen der Gattung *Plasmodium* spp. verursacht. Sie kommt hauptsächlich in den Tropen und Subtropen vor und die natürliche Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch durch einen Stich der weiblichen Stechmücke (*Anopheles*). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) treten jährlich etwa 250 Millionen klinische Fälle auf, von denen fast 1 Million, hauptsächlich bei Kindern unter 5 Jahren, tödlich verlaufen [48].

Der Lebenszyklus der humanpathogenen Plasmodien verläuft als geschlechtlicher Zyklus (Sporogonie) in der *Anopheles*-Mücke und als asexueller Zyklus (Schizogonie) im Menschen [49] (Abb. 2.5.1). Bei dem Stich einer infizierten *Anopheles* kommt es mit dem Speichel zur Übertragung von Sporozoiten in das menschliche Blut. Die Sporozoiten dringen innerhalb weniger Minuten in die Leberzellen ein (Leberphase). Wahrscheinlich spielt das Haupt-Oberflächenproteinantigen der Sporozoiten, das Circumsporozoiten-Protein (CSP), eine entscheidende Rolle beim Befall der Hepatozyten [50, 51]. In den Hepatozyten entwickeln sich die Sporozoiten zu Schizonten, die schließlich bis zu 30000 Merozoiten pro parasitierte Zelle freisetzen (exoerythrozytäre Schizogonie). Diese gelangen in das periphere Blut und infizieren dort Erythrozyten. In den Erythrozyten vermehrt sich der Parasit weiter (erythrozytäre Schizogonie) und es kommt wieder zur Freisetzung von Merozoiten, die erneut Erythrozyten befallen (Blutphase). Eine geringe Anzahl von Merozoiten entwickelt sich zu Geschlechtsformen, den männlichen und weiblichen Gametozyten. Werden diese bei dem Stich einer *Anopheles* aufgenommen, beginnt in der Mücke der sexuelle Zyklus erneut. Für die Pathologie während einer *Plasmodium*-Erkrankung ist hauptsächlich die Blutphase verantwortlich.

Es gibt vier humanpathogene *Plasmodium* Arten, die sich morphologisch sowie im Verlauf der Malaria-Erkrankung unterscheiden [52]. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, ist die häufigste und gefährlichste *Plasmodium*-Spezies. Die Malaria tropica ist die einzige Plasmodium-Infektion, die zum Tode des Patienten führen kann.

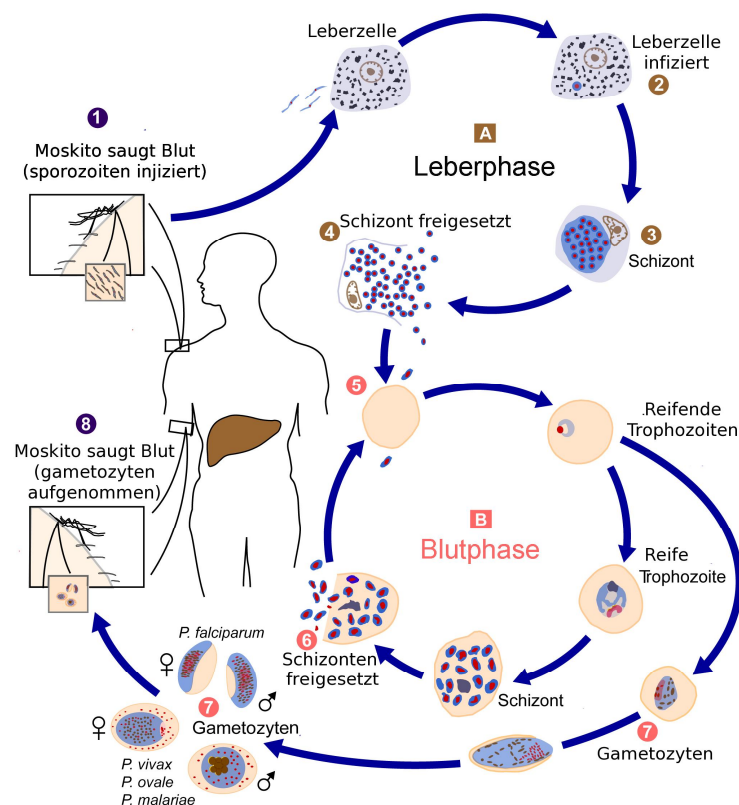


Abb. 2.5.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium* spp. (Modifiziert nach CDC, Public Health Image Library, 2006)

1. Bei einer Blutmahlzeit kommt es zur Übertragung von Sporozoiten durch die weibliche *Anopheles* Mücke in das Blut des Wirtes. **Leberphase (A):** 2. Sporozoiten werden mit dem Blutstrom in die Leber transportiert wo sie Hepatozyten infizieren. 3. In den Hepatozyten reifen sie zu Leberschizonten (exoerythrozytäre Schizogonie). 4. Die Schizonten bilden Merozoiten, welche nach dem Aufbrechen der Hepatozyten in die Blutbahn freigesetzt werden. **Blutphase (B):** 5. Die Merozoiten infizieren Erythrozyten. 6. In den Erythrozyten reifen die Merozoiten zu Schizonten, welche wiederum Merozoiten freisetzen, die Erythrozyten infizieren können (erythrozytäre Schizogonie). 7. Einige Parasiten entwickeln sich zu Gametozyten. 8. Bei einer Blutmahlzeit können sie wieder von *Anopheles* Mücken aufgenommen werden.

Das Hauptsymptom aller Malaria-Erkrankungen ist das periodische Auftreten von Fieberschüben. Die Fieberschübe entstehen durch die Synchronisierung der Parasitenvermehrung und des Zerfalls aller parasitierten Erythrozyten, wodurch es zu einer periodischen Freisetzung von Toxinen der Plasmodien, wie des *Merozoite surface antigen* (MSA1), kommt [53]. Bei der *P. falciparum*-Infektion ist die zerebrale Malaria einer der schwerwiegendsten pathologischen Prozesse. Durch die „knob“-Bildung in der Membran infizierter Erythrozyten wird die Adhärenz an die Endothelien der Kapillaren gefördert. Die Kapillargefäße verstopfen mit infizierten Erythrozyten, es kommt zu Ödembildung und Blutungen, vor allem in Gehirn, Herz, Lunge und Niere. Die parasitierten Erythrozyten setzen Malariatoxine und Antigene frei, die eine verstärkte Synthese proinflammatorischer

Zytokine, wie TNF- α , Lymphotoxin, IFN- γ und IL-1 auslösen. Dies kann zu Bewusstseinsstörungen und Koma des Patienten führen [53, 54].

Zur Untersuchung der Immunologie der Malaria-Infektion stehen verschiedene *Plasmodium* spp. zur Verfügung, die pathogen für Nagetiere sind. Diese Mausmodelle bieten eine gute Möglichkeit, um die Pathogenese oder die Immunantwort im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Einige Spezies, wie *P. chabaudi adami*, verursachen nicht-letale Infektionen, bei denen die Parasiten nach Abklingen der akuten Parasitämie, entweder vollständig eliminiert sind, oder schwächere Rückfälle verursachen. Diese Spezies eignen sich besonders zur Studie der Immunantwort gegen die Blutphase der Malaria, die Parasitämie. Andere Spezies, wie *P. berghei*, führen generell zu letalen Infektionen und eignen sich deshalb besonders für die Erprobung von Impfstoffen. Die *P. berghei*-Infektion von C57BL/6 Mäusen dient außerdem als Modell zur Untersuchung der zerebralen Malaria. Weitere *Plasmodium*-Spezies, wie *P. yoelii* oder *P. chabaudi* verursachen Malaria-Erkrankungen, die je nach *Plasmodium*- und verwendetem Mausstamm letal oder nicht-letal sind [55].

Für den Schutz gegenüber der Leberphase der *Plasmodium*-Infektion spielen zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen eine entscheidende Rolle. CD8⁺ T-Zellen erkennen CD8 T-Zell-Epitope der Plasmodien auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex*; MHC) der Klasse I, die sich auf der Oberfläche von befallenen Hepatozyten befinden [56]. Sie können Schutz vor der Leberphase der *Plasmodium*-Infektion bieten, indem sie infizierte Hepatozyten erkennen und zerstören [49, 57]. Außerdem ist die Produktion von IFN- γ durch CD8⁺ T-Zellen, und andere Zellen, ein wichtiger Faktor bei der Bekämpfung von *Plasmodium*-Parasiten, da es zu einer Freisetzung von NO und anderen, für die Parasiten toxischen, Substanzen führt. Außerdem können CSP-spezifische Antikörper *in vitro* die Invasion von Hepatozyten durch *P. falciparum* verhindern [50]. Da die Sporozoiten *in vivo* jedoch nur 30 min extrazellulär vorliegen, ist es unwahrscheinlich, dass Antikörper eine entscheidende Rolle für den Schutz gegen die Leberphase spielen. Auch CD4⁺ T-Zellen [58], NK-Zellen [59] und $\gamma\delta$ T-Zellen [60] können zum Schutz gegen die Leberphase beitragen.

Für den Schutz gegenüber der Blutphase ist die Kontrolle der Parasitämie essentiell. In Mäusen spielen Th1-Zellen und das Th1-Zytokin IFN- γ eine entscheidende Rolle, indem sie z. B. das Parasitenwachstum durch die Aktivierung klassisch aktivierter Makrophagen

begrenzen [55, 61-64]. Auch das proinflammatorische Th1-Zytokin IL-12 ist notwendig für eine effiziente Kontrolle der Parasitämie [64, 65]. In Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen kommt es zu einer verlängerten Parasitämie in Mäusen [66]. Die Infektion von Mäusen mit *P. chabaudi* zeigte, dass sowohl Th1- als auch Th2-Zellen notwendig sind, um eine Infektion erfolgreich zu bekämpfen [62, 67, 68]. Von entscheidender Bedeutung für den Verlauf der Infektion ist das Verhältnis von Th1- und Th2-Zellen und deren Regulation im zeitlichen Verlauf der Infektion [64, 69], um eine zu starke proinflammatorische Immunantwort zu verhindern, die den Wirt schädigen kann.

Des Weiteren werden Antikörper gegen diverse *Plasmodium*-Antigene produziert, die auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten oder auf freien Merozoiten exprimiert werden [70, 71], auch sie spielen eine gewisse Rolle in der Bekämpfung der *Plasmodium*-Infektion [72].

2.6 Vakzinierung gegen Malaria

Trotz jahrzehntelanger Forschung gibt es noch immer keine effektive anti-Malaria Vakzine. Innerhalb der Leber- und der Blutphase gibt es verschiedene Ziele für die Aktivierung von humoralen, also Antikörper-basierten, oder zellulären Immunabwehrmechanismen: freie Sporozoiten, infizierte Hepatozyten, freie Merozoiten und parasitierte Erythrozyten. Eine Vakzinierung gegen die Leberphase von *Plasmodium* ist das Ziel vieler Vakzinierungsstrategien, da auf diese Weise die Entstehung der Blutphase, und die damit assoziierte Pathologie, verhindert werden könnte [73]. In Mäusen [74], Affen und Menschen [75] führt die Immunisierung mit Sporozoiten, die durch Röntgen- oder γ -Strahlung attenuiert worden sind, zu einer sterilen Immunität gegen eine *Plasmodium*-Infektion. Der Schutz wird hauptsächlich von $CD8^+$ T-Zellen vermittelt, die spezifisch für das CSP der Sporozoiten sind. Ihre Depletion führt zu einem drastisch verminderten Schutz [76] und durch den Transfer von CSP-spezifischen $CD8^+$ T-Zellklonen kann der Schutz auf nicht immunisierte Mäuse übertragen werden [77]. Die CSP-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen vernichten die Parasiten mittels $IFN-\gamma$ und NO-vermittelter Mechanismen [76-78]. Ob auch ein Schutz durch zytotoxische Aktivität vermittelt wird, wird kontrovers diskutiert [79, 80].

Die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen anti-Malaria Vakzinierungen induzieren schützende $CD8^+$ T-Zellen, die $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ produzieren und Zellen lysieren, welche das CSP-Epitop auf ihrem MHC-I präsentieren [81, 82].

2.6.1 Die experimentelle anti-Malaria Vakzinierung: ACT-CSP und die heterologe *prime/boost*-Immunsisierung

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene experimentelle Vakzinierungen gegen Malaria verwendet.

Die *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase (ACT) ist ein bakterielles Toxin das seine katalytische Domäne in das Cytosol eukaryotischer Zellen, speziell CD11b/CD18 exprimierender antigenpräsentierender Zellen, translozieren kann [83]. Aus diesem Grund kann die Adenylatcyclase als Trägermolekül für Peptide genutzt werden, die in das MHC-I-Kompartiment eingeschleust werden sollen [84, 85]. In der Gruppe von Dr. Peter Sebo (Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Prag CZ) wurde eine rekombinante ACT kloniert, die das CD8-Epitop (CSP₂₄₅₋₂₅₃) mit seinen flankierenden Sequenzen enthält (ACT-CSP). Dr. S. Tartz (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg; BNI) zeigte, dass die Immunisierung mit ACT-CSP zur Induktion von CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen führt, die IFN- γ und TNF- α produzieren. Trotzdem vermitteln diese CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen keinen Schutz gegenüber einer *P. berghei* Infektion. Eine mögliche Ursache könnte die Aktivierung von wirtseigenen regulatorischen Mechanismen sein, denn die Effizienz der Vakzine wird durch die Blockade des *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), einem negativen Regulator der T-Zellantwort, der auf aktivierten T-Zellen und Tregs exprimiert wird [86], gesteigert [81].

Die verbesserte heterologe *prime/boost*-Immunsisierung wurde von Dr. S. Tartz und Dr. T. Jacobs (BNI) etabliert und basiert auf zwei verschiedenen (heterologen) Antigenträgern. Beide Antigenträger induzieren CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für das MHC-I Epitop CSP₂₄₅₋₂₅₃ sind und vermitteln damit eine Immunantwort gegen die Leberphase von *P. berghei*. Die oben beschriebene Immunisierung mit ACT-CSP wird in diesem Protokoll als Verstärker der Immunantwort (*boost*) verwendet. 5 Wochen vor dem *boost* werden die Mäuse durch die dreimalige orale Verabreichung eines rekombinanten Salmonellen-Stamms immunisiert (*prime*). Dieser Stamm, *Salmonella typhimurium* SB824, ist stabil mit dem Plasmid pST-TB transfiziert und kann so ein Fusionsprotein aus einem Antigenträger, dem N-terminalen Teil des *Yersinia outer protein E* (YopE), und einem Fragment des *P. berghei* CSP, das das MHC-I-Epitop CSP₂₄₅₋₂₅₃ enthält, exprimieren. Das Fusionsprotein kann über einen Virulenzfaktor der Salmonellen, das Typ III-Sekretionssystem, in das Zytosol eukaryotischer Zellen transloziert werden und so

MHC-I-restringierte T-Zellantworten induzieren [82]. Nach der oralen Verabreichung von *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) werden, wie nach der Injektion von ACT-CSP, CD8⁺ T-Zellen induziert, die spezifisch für das MHC-I-Epitop CSP₂₄₅₋₂₅₃ sind. Die heterologe *prime/boost*-Immunisierung von BALB/c Mäusen führt zu einem 80-100 %igen Schutz gegenüber dem Auftreten der Blutphase von *P. berghei* [82] und scheint demnach die wirtseigenen regulatorischen Mechanismen überwinden zu können.

2.7 Helmintheninfektionen und das Immunsystem des Wirtes:

Immunantwort und Immunomodulation

Schätzungen zufolge sind weltweit etwa 3 Milliarden Menschen mit parasitischen Helminthen infiziert, die unbehandelt oft zu mehrjährigen oder chronischen Infektionen führen [87]. Die klassische Reaktion eines Wirtes auf die Infektionen mit parasitären Helminthen ist eine Th2-Immunantwort, die zu den Charakteristika einer starken Th2-Zytokinproduktion führen: der Induktion von Eosinophilen, Mastzellen und einer hohen Konzentration von IgE Antikörpern [88]. In verschiedenen Modellen wurde gezeigt, dass diese Th2-Immunantwort essentiell für die Bekämpfung von Helminthen-Infektionen ist. Dennoch führt die Induktion einer Th2-Immunantwort in Menschen selten zu einer vollkommenen Bekämpfung des Parasiten [89]. Dieses zeigt, dass Helminthen Strategien entwickelt haben, die ihre Bekämpfung beeinträchtigen und es ihnen ermöglichen, lange im Wirt zu überleben. Dabei nutzen Helminthen wirtseigene Regelkreise zur Dämpfung von Immunantworten, die dem Wirt zur Erhaltung seines immunologischen Gleichgewichts und der Selbst-Toleranz dienen. Hierzu gehören Tregs [41] und AAMΦ [90]. Sie produzieren zum Beispiel immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 und/oder TGF-β und unterdrücken sowohl Th1- als auch Th2-Immunantworten. T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp wurden zum ersten Mal aus Patienten mit einer *O. volvulus* Infektion isoliert [91].

Die Helminthen-induzierten Veränderungen des Immunsystems können die Immunantwort des Wirtes gegenüber Allergenen, Koinfektionen und Vakzinierungen verändern. Da auch immunpathologische Prozesse gedämpft werden können, muss dies nicht immer nachteilig für den Wirt sein.

Bestimmte Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose oder entzündliche Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD) sind mit einer unkontrollierten Th1-Immunantwort assoziiert [92, 93]. Im Mausmodell für multiple Sklerose, der Experi-

mentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wurde gezeigt, dass die Injektion von *Schistosoma mansoni* Eiern [94] oder die Infektion mit *Trichinella pseudospiralis* [95] die Th2-Immunantwort verstärkt, und so die Th1-assozierte Pathologie und Inflammation im zentralen Nervensystem abschwächt. Im experimentellen Modell für Colitis führt die *Trichinella spiralis*-Infektion von Mäusen zu der Induktion einer Th2-Immunantwort, die ebenfalls zu einer abgeschwächten Th1-assozierten Inflammation und verminderten Pathologie im Darmgewebe führt [96].

Im Gegensatz dazu sind Allergien eine klassische Th2-vermittelte Entzündungsreaktion. Humane Studien zeigten, dass Allergiker niedrigere Treg-Frequenzen haben [97], und dass die Aktivierung von Tregs zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Allergenen führen kann [98]. Interessanterweise zeigten Helminthen-infizierte Patienten verminderte allergische Reaktionen [99, 100]. Diese Studien wurden von Ergebnissen im Mausmodell bestätigt. Die Infektion von Mäusen mit *L. sigmodontis* oder *H. polygyrus* induziert Tregs und vermindert die Produktion von Allergen-spezifischem Immunglobulin (Ig) sowie die Reizung der Atemwege im Asthma Modell [101, 102]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Helminthen, obwohl sie häufig eine Th2-Polarisierung auslösen, eine Th2-assozierte Allergie durch immunsuppressive Mechanismen kontrollieren können.

Zahlreiche Studien befassen sich mit der Auswirkung von Helminthen-Infektionen auf die Immunantwort gegenüber Koinfektionen. Viele davon untersuchen die Auswirkung auf den Verlauf der Malaria [103-105], die Leishmaniose [106-108] oder *Mycobacterium tuberculosis* [109, 110], da die Erreger in überlappenden Endemiegebieten vorkommen und Koinfektionen eher die Regel, als eine Ausnahme sind [13, 111]. Die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich, zeigen jedoch, dass Helminthen-Infektionen den Verlauf einer Koinfektion beeinflussen können.

Auch die Effizienz von Vakzinen kann durch Helminthen-Infektionen beeinträchtigt werden [112-115]. Dies ist von besonderer Relevanz, da endemisch vorkommende, oft asymptomatische, Helminthen-Infektionen den Erfolg von Schutzimpfungen vereiteln können.

Viele Faktoren scheinen das Wechselspiel zwischen Helminthen und dem Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen und die Frage, ob Helminthen „Freunde oder Feinde“ [116] sind, kann bis jetzt noch nicht klar beantwortet werden.

2.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Helminthen beeinflussen das Immunsystem auf vielschichtige Weise. Zum einen induzieren sie eine Th2-Immunantwort, zum anderen können sie auch wirtseigene immunsupprimierende Mechanismen aktivieren. Dies kann die Immunantwort des Wirtes gegenüber Koinfektionen und Vakzinierungen beeinflussen. Die Auswirkungen einer vorliegenden Helminthen-Infektion auf die Immunantwort des Wirtes gegenüber intrazellulären Parasiten sind von besonderem Interesse, da die erfolgreiche Abwehr von Würmern und pathogenen Protozoen sehr unterschiedliche und sogar gegensätzliche Anforderungen an das Immunsystem stellt.

Ziel dieser Arbeit war es die Folgen einer vorliegenden Nematodeninfektion auf die Immunantwort der Maus gegenüber pathogenen Protozoen während Koinfektionen und Vakzinierungen zu untersuchen. Folgende Fragen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

- Verändert eine vorliegende *S. ratti*-Infektion die Immunantwort der Maus gegenüber einer *L. major*- oder einer *P. yoelii*-Koinfektion?
- Hat die *S. ratti*-Infektion einen Einfluss auf die Pathologie der Protozoen-Infektionen?
- Verändert die *S. ratti*-Infektion die Effizienz einer experimentellen anti-Malaria Vakzine?
- Unterscheiden sich eine transiente *S. ratti*-Infektion und eine langlebige *L. sigmodontis*-Infektion bezüglich ihres Einflusses auf die Immunantwort der Maus während einer Vakzinierung?

3 MATERIAL

3.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller/Firma
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen
β-Szintillationszähler „1450 Microbeta“	PerkinElmer/Wallace, Freiburg
CO ₂ -Inkubator für die Leishmanienkultur (FunctionLine)	Heraeus Instruments, Hanau
CO ₂ -Inkubator für die Zellkultur (innova® co-170)	New Brunswick Scientific, Nijmegen, Niederlande
Digitalwaage	Kern & Söhne, Alberstadt
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Elektronisch programmierbare Pipette	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer (DNA-Gele)	BioRad, München
ELISA-Reader (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin
ELISPOT-Reader	BioSys, Karben-Frankfurt
Fotoanlage (Geldokumentation)	Mitsubishi, Japan
Fußdicken-Messgerät	Kroeplin GmbH, Schlüchtern
Heizblock (Thermomixer, Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Inversmikroskop (CK2)	Olympus Europa, Hamburg
Kühl-und Gefrieranlage	Liebherr-Hausgeräte, Rostock
Lichtmikroskop	Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop (Axiostar plus)	Zeiss, Jena
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic, Japan
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec, Wiesbaden
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer „NanoDrop 2000c“	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brandt, Wertheim
Real-time PCR Cyclyer (RotorGene 6000)	Corbett Life Science, Sydney, Australia

Gerät	Hersteller/Firma
Rührstrudler	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttelinkubator (TH30/SM30)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Spannungsquelle (Gelelektrophorese)	Edmund Bühler GmbH,
Sterilwerkbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler (P x 2)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Umkehrmikroskop (Axiovert 200)	Zeiss, Jena
UV-Transilluminator	International Biotechnologies, USA
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungsanlage	SG Clear, Barsbüttel
Zellerntegerät „Microcell Harvester“	Inotech, Reppischhof, Schweiz
Zentrifuge (Multifuge 1 L-R)	Heraeus-Sepatech, Hanau
Zentrifuge (Eppendorf 5415D)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (1-15 K)	Sigma, Osterode am Harz

3.2 Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikware)

Alle mit * gekennzeichneten Waren wurden steril bezogen

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Firma
Chirurgische Einmal-Skalpelle*	Braun, Melsungen
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Durchflusszytometrie-Röhrchen (5 mL Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Ethylendiamintetraacetat- (EDTA) Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
ELISA-Platten (Microlon, 96-Loch, Flachboden)	Greiner, Frickenhausen
ELISPOT-Filter-Platten (MultiScreen [®] HTS, 96-Loch)*	Millipore, Billerica, USA
Filterspitzen (Biosphere [®] , 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)*	Sarstedt, Nümbrecht
Glashomogenisator	Braun, Melsungen
Homogenisierer (Eppendorf [®] Micropestle für 1,5-2 mL Reaktionsgefäße)	Eppendorf, Hamburg
Kanülen*	Braun, Melsungen
Knopfkanüle (gebogen, 1,0 x 40 mm)	UMI Germany, Mönchengladbach
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 20 µm)	Hecht-Assistent, Sondheim

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Firma
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm)	Brandt, Wertheim
Objektträger, Mattrand	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Wisconsin, USA
Petrischalen (100 x 200 mm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Greiner bio-one, Frickenhausen
Plastikküvetten (UVette [®] , 50-2000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Plastikpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)*	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Safelock-Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Schottflaschen	Schütt Labortechnik, Göttingen
Spritzen (1, 5 und 10 mL)*	Braun, Melsungen
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfiltriergefäße „Stericup“**	Millipore, Bedford, USA
Tuberculin-Sicherheitsspritzen (Kendall Magellan TM)*	Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt (Donau)
Ultra-Zentrifugen-Filter (Amicon [®] , 10 kDa)	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturplatten (96-Loch, Rundboden)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6- und 96-Loch, Flachboden)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten für Blutagar „Greiner [®] <i>suspension culture plates</i> “ (96-Loch Flachboden)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe „Cell Strainer“ (70 µm)*	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)*	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen „BlueMax TM “ (50 mL)*	Becton Dickinson, Heidelberg

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Tab. 3.3-1: Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller/Firma
Agarose	Biomol, Hamburg
Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Desoxyribonukleosidtriphosphat	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Ladepuffer (x6)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Molekulargewichtsmarker (100bp-Leiter plus)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Stool Kit	Qiagen, Hilden
Random-Primer	Invitrogen, Darmstadt
SYBR [®] Green I	Invitrogen, Darmstadt
TRIzol [®] Reagenz	Invitrogen, Darmstadt

Tab. 3.3-2: Reagenzien für biochemische Arbeiten

Reagenz	Hersteller/Firma
Avidin-horseradish peroxidase (HRP)	BD Pharmingen, Heidelberg
BD [™] ELISPOT AEC Substrat-Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
<i>Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail</i>	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Tab. 3.3-3: Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller/Firma
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

Reagenz	Hersteller/Firma
Brain Heart Infusion Agar (BHI-Agar)	Fluka, Neu-Ulm
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Cytofix/Cytoperm- und Perm/Wash-Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
Dulbecco´s PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	PAN-Biotech, Frankfurt
Fc-Blocklösung	BNI, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
Glutaraldehyd	Plano GmbH, Wetzlar
GolgiStop	BD Pharmingen, Heidelberg
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat)	PAA, Linz, Österreich
³ H-Thymidin (1 mCi/mL)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Incidin Liquid	Ecolab, Düsseldorf
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
Kaninchenblut (defibriniert)	Charles River, Sulzfeld
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
PenicillinG-Streptomycin Lösung (100-fach)	Gibco/BRL GmbH, Eggenstein
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Szintillationsflüssigkeit für β -Counter	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller/Firma
Reverse Transkriptase (Revert Aid TM H Minus)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A (DNAse frei)	Roche, Penzberg
RT-PCR Mastermix (Maxima TM SYBR Green qPCR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (LC)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (Hotstar)	Qiagen, Hilden

3.5 Antikörper

Tab. 3.5-1: Antikörper für T-Zell-Stimulation, ELISA und ELISPOT

Antikörper/Spezifität	Hersteller/Firma
anti-IFN- γ ELISPOT Paar	BD Biosciences, San Diego, USA
ELISA Kits „DuoSet“ [®] (IL-10, IL-13, IFN- γ)	R&D Systems, Wiesbaden
Hamster anti-CD3 (145-2C11)	Hybridomüberstand, BNI
Ratte anti-Maus IgG1-HRP	Invitrogen, Darmstadt
Ratte anti-Maus IgG2b-HRP (LO-MG2b)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-Maus IgG3-HRP (LO-MG3)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-Maus IgM-HRP	Zymed, Karlsruhe

Alle für die FACS-Analyse verwendeten Antikörper wurden von BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Tab. 3.5-2: Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper/Spezifität	Klon	Verdünnung
Ratte anti-Maus CD8 α -PerCP-Cy5.5	53-6.7	1:400
Ratte anti-Maus CD62L-PE	MEL-14	1:200
Ratte anti-Maus IFN- γ -APC	XMG1.2	1:100
Ratte anti-Maus IFN- γ -PE	XMG1.2	1:100
Ratte anti-Maus TNF- α -APC	MP6-XT22	1:100
Ratte anti-Maus TNF- α -FITC	MP6-XT22	1:100
Ratte IgG1-FITC/-APC (Isotypkontrollen)	R3-34	1:100

3.6 Peptide, Proteine und Proteinkomplexe

Peptid/Protein/Proteinkomplex	Hersteller/Firma
ACT-CSP ₂₄₅₋₂₅₃	zur Verfügung gestellt von Dr. S. Tartz, BNI, Hamburg
CSP ₂₄₅₋₂₅₃ SYIPSAEKI	ProImmune, Oxford, UK
Pro5 [®] MHC Class 1 Pentamer-APC (CSP-spezifisch)	ProImmune, Oxford, UK

3.7 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Stammlösungen wurden mit deionisiertem Wasser (*Aqua dest.*) angesetzt. Zur Verwendung für die Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 min bei 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	50 mg/mL in dH ₂ O
Blutagar	50 mL Kaninchenblut (defibriniert) 50 mL NaCl (0,9 % in dH ₂ O) 1 x PenicillinG-Streptomycin 200 mL BHI-Agar (52 g/L in dH ₂ O)
CFSE-Stammlösung	5 mM in DMSO
dNTP-Mix (PCR)	2 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
dNTP-Mix (cDNA-Synthese)	10 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
ELISA-Beschichtungspuffer	Lösung A: 10 mM Na ₂ CO ₃ Lösung B: 20 mM NaHCO ₃ Lösungen mischen bis pH 9,6
ELISA- und ELISPOT Blockpuffer	1x PBS mit 1 % BSA (w/v)

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
ELISA-Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄
ELISA-Substratpuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,5
ELISA-Substratlösung	12 mL ELISA-Substratpuffer 200 µL ELISA-TMB-Lösung 1,2 µL 30 % H ₂ O ₂
ELISA-TMB-Lösung	30 mg Tetramethylbenzidin (TMB) in 5 mL DMSO
ELISA-Waschpuffer	1x PBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20
Erythrozytenlysepuffer	10 % 0,1 M Tris/HCL (pH 7,5) 90 % 0,16 M Ammoniumchlorid
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/mL
FACS-Puffer	1 % FCS 0,1 % Natriumazid in 1x PBS
Gewebelysepuffer	100 mM Tris pH 8,5 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl in dH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/mL in dH ₂ O
LB-Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Tryptophan 10 g NaCl ad 1 L dH ₂ O, pH 7,5

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Paraformaldehyd-Lösung	4 % Paraformaldehyd in PBS
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L dH ₂ O für 1x PBS ergibt sich pH 7,2
PBS/Pen-Strep	1x PBS 1-fach PenicillinG-Streptomycin
RPMI-Vollmedium	500 mL RPMI 1640-Medium ohne Glutamin 50 mL FCS 10 mL 1 M HEPES 10 mL 200 mM L- Glutamin 2,5 mL 10 mg/mL Gentamycin 500 µL β-Mercaptoethanol
RPMI/Pen-Strep (RPMI-Vollmedium für Leishmanien)	500 mL RPMI 1640-Medium ohne Glutamin 50 mL FCS 5 mL 200 mM L- Glutamin 1-fach PenicillinG-Streptomycin 1 mL β-Mercaptoethanol
SYBR [®] Green-Lösung	1:1000 in DMSO
TBE- Puffer (x 10)	0,89 M Tris Base 0,89 M Borsäure 20 mM Na ₂ EDTAx2H ₂ O

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Trypanblau-Lösung	2 mg Trypanblau in 100 mL 1x PBS
Wright's stain-Lösung	1 mg/mL in Methanol

3.8 Tiere und Parasiten

Tab. 3.8-1: Mausstämme für Infektionsstudien

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6J (H-2 ^b)	UKE, Hamburg
BALB/c (H-2 ^d)	UKE, Hamburg

Tab. 3.8-2: Parasiten für Infektionsstudien

Parasit	Herkunft
<i>Leishmania major</i> (MHOM/IL/81/FE/BNI)	BNI, Hamburg (Solbach, 1986)
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	BNI, Hamburg
<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	Sporozoitien zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heussler, BNI, Hamburg
<i>Plasmodium yoelii</i> 17XNL (nicht-letal)	Stabilat infizierter Erythrozyten zur Verfügung gestellt von J. Langhorne, National Institute for Medical Research, London, England
<i>Strongyloides ratti</i>	Lebenszyklus zur Verfügung gestellt von Dr. Utzinger, Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut, Basel, Schweiz

Tab. 3.8-3: Tiere für die Stammerhaltung

Tier	Herkunft
Baumwollratten (<i>Sigmodon hispidus</i>)	BNI, Hamburg
Tropische Rattenmilbe (<i>Ornithonyssus bacoti</i>)	zur Verfügung gestellt von Odile Bain, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Frankreich
Wistar Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Charles River, Sulzfeld

3.9 Bakterienstämme

S. typhimurium SB824 (pST-TB)
(Δ aroA; sptp::kan/amp)

zur Verfügung gestellt von
Dr. S. Tartz, BNI, Hamburg

3.10 Oligonukleotidprimer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
StroS2	5'-TTAGAGTCGTGTTGCTTGGAA-3'
StroAS1	5'-GTGCAACTGGCTCTGTATGC-3'
GAPDHmouse_F	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT GAPDH-3'
GAPDHmouse_R	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'
Pb18SrRNA_F	5'- GGATGTATTTCGCTTTATTTAATGCTT-3'
Pb18SrRNA_R	5'- CACGCGTGCAGCCTAGTAT-3'
Leishmania-18S rRNA-ISF	5'-GCTCCAAAAGCGTATATTAATGCTGT-3'
Leishmania-18S rRNA-ISR	5'-TCCTTCATTCCCTAGAGGCCGTGAGT-3'
Maus β -Actin Primer-F	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
Maus β -Actin Primer-R	5'-GGATGCCACAGGATTCACATACCCA-3'
TYPH-F	5'-TTGTTCACTTTTTACCCCTGAA-3'
TYPH-R	5'-CCCTGACAGCCGTTAGATATT-3'
s-YopE-SacII	5'-CACCCGCGGCAGACCATCAATTTG-3'
as-CSP-I-Xho/Sal	5'-CGCGTCGACCTCGAGGATCTGTTTAA CAAATTCTAG-3'

3.11 Software

Software	Hersteller
FACS-Software „Cell Quest Pro“ 3.0	Becton Dickinson, Heidelberg
NanoDrop 2000/2000c Software	Thermo Scientific, Wilmington, USA
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
RotorGene 6000 1.7	Corbett Life Science, Sydney, Australia

4 METHODEN

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Wichtige Grundsätze der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dabei wurden sterilisierte Glaswaren und Lösungen sowie sterile Einmalplastikwaren verwendet. Materialien und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min). Glasmaterial wurde für 3 h bei 180 °C sterilisiert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in CO₂-Brutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wasch- und Pelletierschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, für 10 min bei 300 x g und 4 °C.

4.1.2 *Leishmania*-Kultur

Die Kultivierung promastigoter *L. major*-Parasiten erfolgte in RPMI/Pen-Strep auf Blutagar bei 28 °C und 5 % CO₂. Für die Herstellung der Blutagarplatten wurden 50 µL Blutagar im 45 °-Winkel in eine unbeschichtete 96-Loch Zellkultur-Flachbodenplatte gegossen, so dass die Hälfte des Bodens frei von Agar blieb. Innerhalb von einer Woche wuchsen die Leishmanien in 150 µL RPMI/Pen-Strep zu einer dichten Kultur. Um die Leishmanien zu expandieren wurden Parasiten aus acht Vertiefungen einer Zellkulturplatte vereint und in 16 mL RPMI/Pen-Strep aufgenommen. Anschließend wurden diese auf eine neue Blutagarplatte verteilt (150 µL/Vertiefung). Um die Virulenz der Leishmanien zu erhalten, erfolgte alle 7-9 Wochen eine Mauspassage. Hierfür wurden BALB/c-Mäuse mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten in die rechte Hinterpfote infiziert. Nach etwa 4 Wochen wurden die Mäuse abgetötet und die Parasiten aus der Pfote isoliert. Hierfür wurde die Pfote steril mit einer Schere in einer Petrischale zerkleinert und mit 20 mL RPMI/Pen-Strep durch ein Zellsieb gedrückt. Das Leishmanien-Pellet wurde nach Zentrifugation (3000 x g und 4 °C für 10 min) in 16 mL RPMI/Pen-Strep resuspendiert und auf einer Blutagarplatte ausgesät.

4.1.3 Präparation muriner Milz- und Lymphknotenzellen

Zur Gewinnung muriner Milz- oder Lymphknotenzellen wurden die Organe steril präpariert, in einer Petrischale mit 10 mL Vollmedium zwischen zwei Objektträgern zerrieben und anschließend pelletiert. Lymphknotenzellen konnten direkt verwendet werden. Milzzellen wurden im Anschluss, zur Lyse der Erythrozyten, in 10 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mL RPMI-Vollmedium abgestoppt. Die Milzzellen wurden dreimal in RPMI-Vollmedium gewaschen, in RPMI-Vollmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

4.1.4 Präparation muriner Leberzellen

Murine Leberzellen wurden in dieser Arbeit präpariert, um RNA zu Isolieren. Für eine Leber wurden drei 2 mL Reaktionsgefäße mit je 500 μ L Trizol vorbereitet. Vor der Entnahme wurde die Leber mit etwa 5 mL PBS über die Pfortader gespült. Anschließend wurde die Leber herauspräpariert und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Das Gewebe wurde im Reaktionsgefäß mit einem Homogenisierer zerkleinert. Die Zellsuspension einer Leber wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vereinigt, unter Zugabe von 8,5 mL Trizol (Endvolumen 10 mL) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Das Homogenisat wurde bis zur weiteren Verwendung, jedoch nicht länger als 4 Wochen, bei -70°C gelagert.

4.1.5 Präparation muriner peripherer Blutzellen

Durch Punktion der Schwanzvene wurden ca. 200 μ L Blut entnommen und direkt in einem mit EDTA beschichteten Röhrchen gesammelt, um eine Agglutination zu verhindern. 50 mL Erythrozytenlysepuffer wurden in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und das Blut gut darin gemischt. Nach 8 min Inkubation bei RT wurden die Zellen pelletiert, dreimal in RPMI-Vollmedium gewaschen und in RPMI-Vollmedium resuspendiert.

4.1.6 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurde Trypanblau verwendet. Der Farbstoff dringt durch die poröse Zellwand abgestorbener Zellen ein und färbt diese blau. Lebende Zellen erscheinen dagegen unter dem Mikroskop farblos. 20 μ L der Zellsuspension wurden mit 80 μ L Trypanblau gemischt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (100 μ m Tiefe, Kammerfaktor 10^4) ausgezählt, und die Zellzahl unter

Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt. Die Zellzahl/mL ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor und Verdünnungsfaktor.

4.1.7 *In vitro* Stimulationsexperimente

In dieser Arbeit wurden Milz-, Lymphknoten- (LK-) und periphere Blutzellen von naiven und infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen *in vitro* stimuliert. Dazu wurden, soweit nicht anders angegeben, 2×10^5 Zellen in RPMI-Vollmedium in eine Vertiefung einer 96-Loch Zellkultur- oder ELISPOT-Filterplatte pipettiert. Für die intrazelluläre Zytokinbestimmung wurden 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Endvolumen von 200 µL mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert. Die durchgeführten *in vitro* Stimulationsexperimente und verwendeten Stimulanzen sind in Tab. 4.1-1 aufgelistet. Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen in RPMI-Vollmedium.

Tab. 4.1-1: In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Stimulationsexperimente

Assay	Zellherkunft	Stimulans	Inkubationszeit	Parameter
Zytokin-ELISA	Milz popliteale LK	anti-CD3 AK (1 µg/mL) <i>S. ratti</i> -Lysat (1 mg/mL) lösliches Leishmanien-Antigen (SLA) (lösliches Äquivalent von drei Parasiten/Lymphozyt)	72 h	IL-10 IL-13 IFN-γ Proliferation
ELISPOT	Milz	anti-CD3 AK (1 µg/mL) CSP ₂₄₅₋₂₅₃ (1 µg/mL)	20-24 h	IFN-γ
FACS-Färbung (intrazellulär)	Blut Milz	CSP ₂₄₅₋₂₅₃ (1 µg/mL)	5-6 h	TNF-α IFN-γ

4.1.8 Messung der Zellproliferation

Durch den Einbau von Tritium (³H)-markiertem Thymidin in neusynthetisierte DNA kann die Proliferationsrate von Zellen bestimmt werden. Die Einbaurate von ³H-Thymidin ist proportional zur Zellproliferation. Mit dieser Methode wird die ThymidinEinbaurate von allen Zellen gemessen, die sich in einem Ansatz befinden, so dass Aussagen auf Einzelzellniveau nicht möglich sind. 72 h nach *in vitro* Stimulation wurden 150 µL Kulturüberstand aus jeder Vertiefung einer 96-Loch Platte entnommen und durch 50 µL RPMI-Vollmedium mit 0,5 % ³H-Thymidin (0,25 µCi/mL) ersetzt. Für die Messung der eingebauten Radioaktivität wurden die Zellen nach 18 h Inkubation bei 37 °C mit Hilfe eines Zellerntegerätes aus der Vertiefung entnommen, mit *Aqua dest.* lysiert und auf einen

Glasfaserfilter übertragen. Die DNA bleibt im Filter hängen, während freies ^3H -Thymidin, das nicht in die DNA eingebaut wurde, ausgewaschen wird. Der getrocknete Filter wurde mit 5 mL β -Szintillationsflüssigkeit getränkt, und in eine Folie eingeschweißt. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines β -Szintillationszählers bestimmt und als Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) angegeben.

4.1.9 Beladung von Milzzellen mit CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid

Für die Beladung mit CSP₂₄₅₋₂₅₃ wurden Milzzellen von BALB/c Mäusen isoliert und die Zellsuspension in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte der Zellsuspension wurde mit CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid (Endkonzentration (ec) 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzt, die andere nicht. Beide Ansätze wurden 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in sterilem 1x PBS gewaschen und für die Markierung mit CFSE eingesetzt (4.1.10).

4.1.10 Markierung von Zellen mit CFSE

Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bindet kovalent an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine. Bei einer Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig an beide Tochterzellen weitergegeben, und die Zellen behalten die CFSE-vermittelte Fluoreszenz so lange die Zellwand intakt, die Zellen also vital sind. Mit einer CFSE-Färbung kann deshalb die Anzahl von Zellteilungen nachverfolgt und die Vitalität von Zellen untersucht werden. Es ist außerdem möglich Zellen mit verschiedenen Konzentrationen dieses Fluoreszenzfarbstoffes zu färben und diese Zellen später durchflusszytometrisch anhand ihrer Fluoreszenzintensität zu unterscheiden.

Für die CFSE-Markierung wurden Milzzellen aus naiven Spendermäusen verwendet. Die Zellen wurden pelletiert, in 1x PBS/0,1 % BSA resuspendiert und die Zellsuspension auf 37 °C vorgewärmt. Um die Zellen mit einer hohen Konzentration CFSE (CFSE^{high}) zu markieren wurden sie mit 10 μM CFSE in 1x PBS/0,1 % BSA inkubiert. Zur Markierung von Zellen mit einer niedrigen Konzentration von CFSE (CFSE^{low}) wurde zu den Zellen 1 μM CFSE in 1x PBS/0,1 % BSA zugegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit 10 mL 1x PBS/0,1 % BSA gewaschen. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen pelletiert, in 10 mL 1x PBS/0,1 % BSA resuspendiert und ausgezählt.

4.1.11 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (AK). Die zu analysierende Zellsuspension wird im Durchflusszytometer in Einzelzellsuspension gebracht und die vereinzelt Zellen in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen dabei die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärtsstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Streuung mit der Granularität. Die Zellen werden mit spezifischen AK gefärbt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die gebräuchlichen Fluorochrome sind Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Durch die Verwendung unterschiedlich markierter AK können mehrere Antigene auf oder in einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden. Die Daten wurden mithilfe der „FACS-Calibur“ Durchflusszytometers aufgenommen und mittels der „Cellquest“-Software entweder in einem Histogramm (Einparameterdarstellung) oder in einem Dotplot (Zweiparameterdarstellung) ausgewertet

Für alle Färbungen wurden die Proben bei 4 °C gekühlt. Pro Färbung wurden, soweit nicht anders angegeben, 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen pelletiert.

Färbung von Oberflächenmolekülen:

Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen zunächst für 10 min mit 50 µL Fc-Blocklösung inkubiert. Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden jeder Probe 50 µL Antikörperlösung in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tab. 3.5-2) in Fc-Blocklösung zugegeben und für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, pelletiert und zur direkten Messung in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen. Für die Detektion CSP-spezifischer T-Zellen wurden die Zellen zunächst ebenfalls 10 min mit 50 µL Fc-Blocklösung inkubiert. Zu der Fc-Blocklösung wurden 4-8 µL eines H2-K^d-Pentamers, das mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃ SYIPSAEKI beladen und mit dem Fluorochrom APC markiert war, pipettiert. Nach 10 min erfolgte die Färbung extrazellulärer Moleküle, wie oben beschrieben.

Färbung von intrazellulären Molekülen:

Um intrazellulär IFN- γ und TNF- α nachzuweisen, wurden 1×10^6 Zellen im FACS-Röhrchen in einem Volumen von 200 µL mit CSP₂₄₅₋₂₅₃ SYIPSAEKI (ec 0,5 µg/mL) für 6 h bei 37 °C inkubiert. In jeden Ansatz wurden zusätzlich 0,5 µL GolgiStop pipettiert, um

den Transport von Proteinen aus der Zelle zu inhibieren. Im Anschluss an die Oberflächenfärbung wurden die Zellen 20 min bei 4 °C mit 200 µL Cytofix/Cytoperm-Lösung fixiert, permeabilisiert und anschließend zweimal mit 2 mL Perm-Wash-Lösung gewaschen. Die Antikörper gegen IFN- γ und TNF- α wurden, wie in Tab. 3.5-2 angegeben, in Perm-Wash-Lösung verdünnt und 50 µL zu den Zellen gegeben. Nach 45-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen erneut zweimal mit Perm-Wash-Lösung gewaschen und für die Analyse in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-10, IL-13, IFN- γ) im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) durch den Einsatz zweier hochspezifischer AK, die je an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Zuerst wurde eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte mit einem AK gewünschter Spezifität beschichtet. Hierfür wurden je 50 µL einer 1:180 Verdünnung des AK (DuoSet[®] ELISA-Kit; R&D Systems) in 1x PBS aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundener AK wurde durch viermaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Die Blockade freier Oberflächenbindungsstellen erfolgte durch die zweistündige Inkubation mit 100 µL ELISA-Blockpuffer bei RT. Der Blockpuffer wurde durch viermaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt, und je 40 µL der unverdünnten Zellüberstände (Dreifachwerte) sowie Doppelwerte der jeweiligen Konzentration eines Zytokinstandards pipettiert. Die Bindung des Antigens an den immobilisierten AK erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen erfolgte der Nachweis des gebundenen Antigens mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Hierfür wurden die Platten nach dem Waschen mit 50 µL einer 1:180 Verdünnung des jeweiligen Biotin-AK (DuoSet[®] ELISA-Kit; R&D Systems) in 1x PBS/0,1 % BSA für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 50 µL Streptavidin-HRP-Konjugat (*horse radish peroxidase*, HRP) (1:200 in 1x PBS/0,1 % BSA) zugefügt und für 20 min inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden je 100 µL ELISA-Substratlösung pipettiert und die Reaktion nach 15 min durch Zugabe von 25 µL ELISA-Stopplösung beendet. Die Detektion erfolgte unmittelbar im

Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm, und die Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardreihe berechnet.

4.2.2 ELISA zum Nachweis von *S. ratti*-spezifischen Ig im Serum

In dieser Arbeit wurden *S. ratti*-spezifische Ig im Serum von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen. Hierfür wurde 50 µL *S. ratti*-Lysat (2,5 µg/mL) in 1x PBS auf eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte aufgebracht. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und 2 h bei RT mit 200 µL ELISA-Blockpuffer geblockt. Anschließend wurden 50 µL jedes Serums in Duplikaten (1:200) in 1x PBS/0,1 % BSA aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden fünfmal gewaschen und dann mit HRP-konjugiertem Ratte anti-Maus IgG1, IgG2b, IgG3, IgM nach Herstellerangaben für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µL ELISA-Substratlösung pipettiert. Das Abstoppen der Reaktion nach 2,5 min und die Detektion erfolgten wie in 4.2.1 beschrieben. Relative ELISA Units (REU) wurden kalkuliert indem die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm (OD_{450}) jeder Probe durch die OD_{450} der Negativkontrolle (1x PBS/0,1 % BSA) der entsprechenden Platte dividiert wurde.

4.2.3 ELISA zum Nachweis von Leishmanien-spezifischem Ig im Serum

Für die Detektion von Leishmanien-spezifischem Ig im Serum wurden promastigote *L. major*-Parasiten von der Blutagarplatte geerntet, wie in 4.1.2 beschrieben, mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 2×10^6 /mL eingestellt. 50 µL dieser Suspension (1×10^5 *L. major*) wurden in jedes Loch einer Flachboden ELISA-Platte aufgebracht und die Platte 8 min bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 50 µL 0,25 % Glutaraldehyd/1x PBS in die Vertiefung einer 96 Loch Platte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden freie Oberflächenbindungsstellen, wie in 4.2.1 beschrieben, blockiert und die Platten erneut gewaschen. Das Auftragen der Serumproben, die Wasch-, Detektions- und Entwicklungsschritte wurden, wie in 4.2.2 beschrieben, durchgeführt. REU wurden wie oben beschrieben kalkuliert.

4.2.4 Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)

Der ELISPOT ist eine vom ELISA abgewandelte Methode, um einzelne Zytokin- oder Antikörper-produzierende Zellen nachzuweisen [117]. Der ELISPOT wurde in dieser

Arbeit zum Nachweis IFN- γ -sezernierender Zellen verwendet. Hierfür wurden 96-Loch ELISPOT-Platten mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-IFN- γ AK über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit ELISPOT-Blockpuffer für 2 h bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit 1x PBS wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung zugegeben. Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3 AK, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CSP₂₄₅₋₂₅₃ oder RPMI-Vollmedium für 20 h stimuliert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 1x PBS und mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Biotin-konjugiertem anti-IFN- γ AK in einem Volumen von 50 μL 1x PBS/0,1 % BSA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde Avidin-HRP (1:400 in 1x PBS/0,1 % BSA) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde eine Substratlösung zugegeben (BDTM ELISPOT AEC Substrat-Set). Diese enthält neben H₂O₂ und NiCl das Substrat Diaminbenzidin. Das bräunliche Produkt dieses Substrats geht nach der enzymatischen Umsetzung nicht in Lösung, sondern bleibt im reaktiven Zentrum der Peroxidase gebunden und erscheint in Form von dunklen Punkten (*Spots*). Nach Erreichen einer sichtbaren Färbung (etwa 2-3 min) wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Zahl der Spots wurde mit Hilfe eines ELISPOT-Readers bestimmt. Das Ergebnis wurde in *spot forming units* (sfu, Zahl der Spots pro 10⁶ Zellen) angegeben.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile, DNase und RNase freie Reaktionsgefäße sowie pyrogenfreies, steriles Wasser („Ampuwa“) verwendet.

4.3.1 Gewinnung von DNA aus Gewebe

Für die DNA-Gewinnung wurden Füße *L. major*-infizierter Mäuse verwendet, in die zuvor *L. major* Parasiten injiziert worden waren. Die Füße der Mäuse wurden mit einer Schere in einer Petrischale zerkleinert. Es folgte eine Inkubation mit 1 mL Gewebelysepuffer über Nacht bei 56 °C und 1200 rpm auf dem Schüttelinkubator. Zusätzlich wurde jedem Ansatz 1 μL Proteinase-K zum Abbau von Proteinen und zur Freisetzung von Nukleinsäuren zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Probe zentrifugiert (13.000 x g bei 4 °C für 15 min), um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues, auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine gesättigte NaCl-Lösung (ec 25 %) zugegeben und die Probe 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die obere DNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen, in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und mit RNase A (Stock 20 mg/mL; ec 20 µg/mL) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C und 100 rpm wurden 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,5) zugegeben und die Lösung zum Mischen 10 x invertiert. Die in diesem Schritt gefällte DNA wurde pelletiert (13.000 x g, RT, 5 min) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µL 80 %-igem EtOH gewaschen, erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde nun kurz luftgetrocknet und in 1 mL *Aqua dest.* gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt (4.3.4).

4.3.2 Gewinnung von DNA aus Stuhlproben

Die DNA wurde aus 200 mg Stuhl einer Probe (siehe Abschnitt 4.5.3) mit Hilfe des „QIAamp DNA Stool Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde in 200 µL Elutionspuffer (Qiagen, Hilden) eluiert.

4.3.3 Gewinnung von RNA aus der Leber mit TRIzol® Reagenz

Für die Gewinnung von RNA aus der Leber wurden 5 mL einer Leber/Trizol-Suspension (4.1.4) mit frischem Trizol auf ein Endvolumen von 10 mL aufgefüllt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 1 mL Wasser (Ampuwa) gelöst und die Konzentration sowie die Reinheit photometrisch bestimmt. Die RNA wurde anschließend auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt.

4.3.4 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von isolierter DNA oder RNA wurde mit dem NanoDrop Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Herstellerangaben gemessen. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde mit den Quotienten 260/280 (~1,8 bei reiner DNA; ~ 2,0 bei reiner RNA) und 260/230 (~ 2,0-2,2 für DNA und RNA) bestimmt.

4.3.5 Reverse Transkription

Nach der Isolierung der Leber-RNA (0) von *P. berghei* infizierten BALB/c Mäusen wurde die erhaltene mRNA mit Hilfe von Random-Primern und Reverser Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben. Um Kontaminationen mit genomischer *P. berghei*-DNA festzustellen, wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Die Reverse Transkription wurde wie folgt angesetzt:

Ansatz:	[μ L]
Template-RNA (1 μ g/ μ L)	1,0
dNTP-Mix (10 mM)	1,0
Random-Primer (100 ng/ μ L)	3,0
Ampuwa-Wasser	7,0
Gesamtvolumen	12

Die Proben wurden 5 min auf 65 °C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt. Zu jedem Reaktionsansatz wurden 4 μ L 5 x *First Strand Buffer* (MBI, Fermentas), 0,5 μ L Reverse Transkriptase (Revert AidTM H-Minus) und 3,5 μ L Ampuwa-Wasser zugegeben. Die Proben wurden 1 h bei 42 °C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend durch eine 10-minütige Erwärmung auf 70 °C inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde für eine quantitative Real-Time-PCR (qPCR) zur Bestimmung der *P. berghei* Sporozoitenlast in der Leber (4.3.8) eingesetzt.

4.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der enzymatischen Amplifikation von DNA *in vitro* [118]. Dabei werden die Eigenschaften thermostabiler DNA-Polymerasen z. B. aus *Thermophilus aquaticus* genutzt. Sie halten Temperaturen von 95 °C stand und können DNA bei 72 °C optimal synthetisieren. Eine Matrizen-DNA (Template) wird bei 95 °C denaturiert und die Temperatur dann zur Anlagerung komplementärer Oligonukleotide (Primer) an die Einzelstränge abgesenkt (Annealing). Bei 72 °C wird der komplementäre DNA-Strang von den Primern ausgehend in 5'→3' Richtung synthetisiert. Das zwischen den Oligonukleotiden liegende DNA-Fragment wird so in jedem Zyklus vervielfältigt, und die Konzentration steigt exponentiell an. Dadurch können selbst geringe DNA-Mengen amplifiziert werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene PCRs durchgeführt, um die Persistenz der Salmonellen in Mäusen nach einer Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) zu untersuchen (4.5.13). Eine PCR wurde zur Detektion der Salmonellen (Primer: TYPH-F und TYPH-R), eine zweite zur Detektion des pST-TB Vektors (Primer s-YopE-SacII und as-CSP-I-Xho/Sal), mit dem die Salmonellen transfiziert waren, durchgeführt. Für beide Reaktionen wurden die Komponenten in 0,2 mL Reaktionsgefäßen wie folgt pipettiert:

PCR-Ansatz:	[μ L]
Template-DNA	1,0
10 x Reaktionspuffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTP-Mix (2 mM)	2,5
Primer (<i>sense</i>)	2,0
Primer (<i>anti-sense</i>)	2,0
Taq-Polymerase (LC)	0,5
Ampuwa-Wasser	13,0
Gesamtvolumen	25

Für die Amplifikation der Reaktionsansätze wurden folgende Temperaturprogramme verwendet:

Tab. 4.3-1: Temperatur-Programm für die *S. typhimurium*-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} x 45
Annealing	57 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Tab. 4.3-2: Temperatur-Programm für die pST-TB-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} x 45
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Es wurde stets eine Negativkontrolle mit Ampuwa-Wasser anstelle des Templates durchgeführt. Das Produkt der *S. typhimurium*-PCR war ein 400 bp großes, das der pST-TB-PCR ein 600 bp großes Fragment. Im Anschluss wurden die PCR-Ansätze in einem Agarosegel analysiert.

4.3.7 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wandern hierbei aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphorsäurediestergruppen von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA-Molekülen ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (bp). In dieser Arbeit wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet die in 1 x TBE-Puffer angesetzt wurden. Die Detektion der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,2 µg/mL des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid zu den Gelen. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker „100bp-Leiter plus“ verwendet.

4.3.8 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) beruht auf der herkömmlichen PCR-Methode (4.3.6) und ermöglicht die Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit einer gleichzeitigen Quantifizierung der amplifizierten Gengfragmente. Die in dieser Arbeit verwendeten qPCRs basierten auf der Verwendung von SYBR[®] Green I (Invitrogen, Darmstadt), einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich in die Furche von doppelsträngiger DNA einlagert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des PCR-Produktes zu und ermöglicht so die Quantifizierung der Zielsequenz [119]. Mit Hilfe von genspezifischen Primern wurden so die relativen Konzentrationen von parasitenspezifischen Genen nachgewiesen. Alle qPCRs wurden mit dem RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) durchgeführt. Für die relative Bestimmung der Menge an Ziel-DNA war die Bestimmung des C_t -Wertes (*cycle threshold*) essentiell. Er beschreibt den Zyklus in dem die Fluoreszenz erstmalig über den Fluoreszenz-Hintergrund ansteigt. Der C_t -Wert ist umgekehrt proportional zu der eingesetzten Menge der Ziel-DNA: je niedriger der C_t ist desto höher ist die Menge an Ziel-DNA in der Probe. Jede PCR-Reaktion wurde in Duplikaten durchgeführt. In jedem qPCR Lauf wurden pro Primerpaar zwei Negativkontrollen mit Ampuwa-Wasser anstelle des Templates durchgeführt.

A) qPCR zur relativen Quantifizierung von *S. ratti* Eiern und L1 im Stuhl

Um den *S. ratti*-Infektionsverlauf zu verfolgen wurde DNA zu den angegebenen Zeitpunkten aus Stuhlproben der Mäuse isoliert (4.3.2). Die isolierte DNA wurde 1:200 in Ampuwa-Wasser verdünnt und 2 µL für die PCR-Reaktion eingesetzt. Ein 180 bp

Fragment des *S. rattii* 28S rRNA Gens wurde amplifiziert und ein Plasmid dass dieses Fragment enthielt diente als Kalibrator. Für eine Reaktion wurden die Komponenten in 0,2 mL Reaktionsgefäßen wie folgt pipettiert:

PCR-Ansatz:	[μ L]
Template-DNA (1:200) oder Kalibrator	2,0
10 x Reaktionspuffer	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	0,4
dNTP-Mix (2,0 mM)	0,2
Primer (<i>sense</i>)	0,3
Primer (<i>anti-sense</i>)	0,3
SYBR [®] Green I (1:1000)	0,1
<i>Taq</i> -Polymerase (LC)	0,05
BSA (1 μ g/ μ L)	1,0
Ampuva-Wasser	4,65
Gesamtvolumen	10

Für die Amplifikation der Reaktionsansätze wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tab. 4.3-3: Temperatur-Programm für die *S. rattii* qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	} x 40
Annealing	50 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Für jeden Lauf wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Reaktion in jedem Reaktionsansatz zu prüfen. Hierfür wurde die Temperatur von 62 °C bis 95 °C erhöht. Um die Unterschiede der Ct Werte zwischen den Proben und dem Kalibrator in Kopien/ μ L umzurechnen wurde die *comparative quantification (efficiency corrected Ct method)* verwendet.

B) qPCR zur relativen Quantifizierung von *P. berghei* Sporozoiten in der Leber

Um die relative *P. berghei*-Parasitenlast zu bestimmen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Gesamt-RNA aus den Lebern der Mäuse isoliert (4.3.3), 1 µg davon in cDNA umgeschrieben (4.3.5) und 0,5 µL davon als Template für die qPCR eingesetzt. Für jede Probe wurden zwei verschiedene qPCRs durchgeführt. In einer qPCR wurde ein 114 bp Fragment des *P. berghei* ANKA 18S rRNA Gens amplifiziert. Als Referenz wurde für jede Probe ein 120 bp Fragment des murinen GAPDH amplifiziert. Für eine Reaktion wurden die Komponenten in 0,2 mL Reaktionsgefäßen wie folgt pipettiert:

PCR-Ansatz:	[µL]
Template-DNA	0,5
Primer (<i>sense</i>)	1,0
Primer (<i>anti-sense</i>)	1,0
RT-PCR Mastermix (Fermentas)	5,0
Ampuva-Wasser	2,5
Gesamtvolumen	10

Für die Amplifikation der Reaktionsansätze wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tab. 4.3-4: Temperatur-Programm für die *P. berghei* qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	} x 35
Annealing	50 °C	20 sec	
Elongation	68 °C	20 sec	
Linearisierung der Amplifikate	95 °C	30 sec	

Für jeden Lauf wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Reaktion in jedem Reaktionsansatz zu prüfen. Hierfür wurde die Temperatur von 67 °C bis 95 °C in 1 °C Schritten erhöht. Die relative Genexpression der *P. berghei* 18S rRNA wurde mit der Delta-Delta-C_t Methode ($\Delta\Delta C_t$) berechnet.

C) qPCR zur relativen Quantifizierung von *L. major*-Parasiten im Fuß

Um die *L. major*-Parasitenlast zu bestimmen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten DNA aus den Füßen der Mäuse isoliert (4.3.1). Die Proben wurden auf eine Konzentration von 125 pg doppelsträngige DNA pro mL eingestellt und für jede Probe wurden zwei verschiedene qPCRs durchgeführt. In einer qPCR wurde ein Fragment des *L. major* 18S rRNA Gens amplifiziert. Als Referenz wurde für jede Probe ein Fragment des Maus β -Actin Gens amplifiziert. Um Standardkurven zu erstellen wurden 10-fach Verdünnungen von genomischer Maus-DNA und einem Plasmid, das das Genfragment der *L. major* 18S rRNA enthält, verwendet. Diese wurden, zusammen mit den Proben für die qPCR eingesetzt. Für eine Reaktion wurden die Komponenten in 0,2 mL Reaktionsgefäßen wie folgt pipettiert:

PCR-Ansatz:	[μ L]
Template-DNA	1,0
Primer (<i>sense</i>)	1,0
Primer (<i>anti-sense</i>)	1,0
RT-PCR Mastermix (Fermentas)	12,5
Ampuva-Wasser	9,5
Gesamtvolumen	25

Für die Amplifikation der Reaktionsansätze wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tab. 4.3-5: Temperatur-Programm für die *L. major* qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	13 min	
Denaturierung	95 °C	20 sec	} x 40
Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
	24 °C	5 min	

Die relative Konzentration der *L. major* DNA in den Proben wurde mit Hilfe der C_t -Werte der Proben und der Standardkurven mit den bekannten Konzentrationen bestimmt. Die

erhaltenen Werte für *L. major* DNA und Maus β -Actin wurden dividiert um die relative Parasitenlast (U/pg) zu bestimmen.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Kultur von Bakterien

Salmonella typhimurium SB824 (pST-TB) wurde in LB-Medium mit Kanamycin (50 μ g/mL), Ampicillin (100 μ g/mL) und 0,3 M NaCl bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Durch die Zugabe von NaCl wurde die Expression der Komponenten des Typ III-Sekretionsapparates induziert [120].

4.4.2 Einfrieren von Bakterien

Zur Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerol-Stocks angelegt. Hierfür wurden 850 μ L einer Übernachtskultur mit 150 μ L Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80 °C gelagert. Bakterien, die auf diese Weise eingefroren werden, bleiben lange Zeit vital und können zum erneuten Animpfen in LB-Medium verwendet werden.

4.5 Tierversuche, Parasitenstammerhaltung und Herstellung von Parasiten-Antigen

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Für alle Versuche wurden weibliche, 8-10 Wochen alte BALB/c- oder C57BL/6-Mäuse eingesetzt, die im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Institut in *individually ventilated cages* (IVCs, einzelbelüftete Käfige) unter keimarmen Bedingungen gehalten wurden.

4.5.1 Gewinnung von Serum

Durch Punktion der Schwanzvene wurden Mäusen ca. 100 μ L Blut entnommen. Die Blutprobe wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

4.5.2 Infektion mit *S. ratti* und Stammerhaltung

Für die Infektion von Mäusen mit *S. ratti* wurden 1000-5000 iL3 in 30 µL 1x PBS subkutan in eine von beiden Hinterpfoten injiziert.

Der *S. ratti* Lebenszyklus wurde durch die fortlaufende Passagierung in Wistar Ratten aufrecht erhalten. Hierfür wurde der Stuhl von *S. ratti* infizierten Ratten gesammelt, in etwas Leitungswasser aufgeweicht und mit der ca. dreifachen Menge Aktivkohle vermischt. Die Aktivkohlekultur wurde mit Parafilm abgedeckt und bei 25 °C im Brutschrank gelagert. Nach sechs Tagen Inkubation wurden iL3 mit Hilfe eines Baermann Apparates isoliert [15] und dreimal in PBS/Pen-Strep gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die iL3 zur Sedimentation 30 min bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Vor einer Infektion wurden die Larven in 1x PBS aufgenommen und die Anzahl iL3/mL mikroskopisch bestimmt. Um Wistar Ratten für die Stammerhaltung mit *S. ratti* zu infizieren, wurden ihnen 2500 iL3 in einem Volumen von 200 µL 1x PBS subkutan in die Flanke injiziert.

4.5.3 Nachweis der *S. ratti*-Infektion

Der Verlauf der Infektion und die Wurmlast wurden zum einen durch die Bestimmung von *Strongyloides*-DNA im Stuhl und zum anderen durch das Auszählen von adulten Würmern im Dünndarm der Mäuse kontrolliert. Während der Experimente wurden regelmäßig Stuhlproben gesammelt, hierbei wurden die Tiere jeweils für 24 h auf Zellstoff gesetzt. Die DNA wurde wie in 4.3.2 beschrieben isoliert und für die qPCR (4.3.8-A) eingesetzt. Die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Hierfür wurden die Mäuse abgetötet, der Dünndarm präpariert, longitudinal aufgeschnitten und für 3 h bei 37 °C in einer Petrischale mit Leitungswasser inkubiert. Anschließend wurde der Darm verworfen und die adulten *S. ratti* Weibchen mikroskopisch ausgezählt.

4.5.4 Herstellung von *Strongyloides*-Antigen

Zur Herstellung von *Strongyloides*-Antigen (*S. ratti*-Lysat) wurde 1 mL aufgereinigte iL3 pelletiert und in 4 mL PBS/Pen-Strep, nach Herstellerangaben in *Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail* resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Glashomogenisator mit 15 Kolbenshüben homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1h bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch einen Filter (Porengröße 0,2 µM) sterilfiltriert. Das

Lysat wurde mit Hilfe von Amicon 10 kDa Filtern auf eine Konzentration von 1 mg/ μ L eingestellt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

4.5.5 Infektion mit *L. sigmodontis*

Für eine Infektion von Mäusen mit *L. sigmodontis* mussten zunächst Milben, die als Vektor dienten, mit Mf infiziert werden. Zur Infektion der Milben wurden Baumwollratten verwendet, die eine Mikrofilariämie von mindestens 600-1500 Mf/ μ L Blut hatten. Die Milben wurden zunächst zusammen mit Holzstreu in einen Glaskolben überführt. Nach vier Tagen wurde eine infizierte Baumwollratte auf das Milbenstreu gesetzt. Während dieser Blutmahlzeit wurden L3 von den Ratten auf die Milben übertragen. Innerhalb von 12-14 Tagen entwickelte sich in den Milben das infektiöse dritte Larvenstadium (iL3). Die Infektion der Mäuse erfolgte durch eine 20-stündige Blutmahlzeit der Milben an den Mäusen.

4.5.6 Stammerhaltung von *L. sigmodontis*

Für die Zucht und Erhaltung von *L. sigmodontis* dienten Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) als Zwischen- und Endwirte. Als natürlicher Vektor für die *L. sigmodontis* L3 dienten Milben (*Ornithonyssus bacoti*). Diese wurden in einer Kunststoffwanne mit Holzstreu bei einer Lufttemperatur von 29 °C und einer relativen Luftfeuchte von 90 % gehalten. Die Fütterung der Milben erfolgte durch eine Blutmahlzeit auf 1-4 Tage alten NMRI Mäusen.

4.5.7 Nachweis der *L. sigmodontis*-Infektion

Zum Nachweis der *L. sigmodontis*-Infektion wurde die Pleurahöhle abgetöteter Mäuse mit 5 mL 1x PBS gespült. Die Würmer konnten anschließend mikroskopisch ausgezählt werden.

4.5.8 Infektion mit *Plasmodium* spp.

Die Infektion mit *P. yoelii* erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 2×10^6 infizierten Erythrozyten (*parasitized red blood cells*; pRBCs) in 200 μ L sterilem 1x PBS.

Für die Infektion von Mäusen wurden *P. berghei* Sporozoitien verwendet, die frisch aus der Speicheldrüse von 20-25 Tage infizierten Anopheles-Mücken präpariert worden waren

(zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Heussler, BNI Hamburg). Die Mäuse wurden mit je 1000 Sporozoiten in 100 μ L PBS intravenös infiziert.

4.5.9 Nachweis von *Plasmodium* spp.-Infektionen

In regelmäßigen Abständen nach der Infektion wurden das Gewicht sowie die Parasitämie der Mäuse bestimmt. Zur Bestimmung der Parasitämie wurden Blutaussstriche von Blut aus der Schwanzvene gemacht, die Ausstriche mit Wright's stain-Lösung gefärbt und die Zahl der Parasiten mikroskopisch bestimmt. Die Parasitämie wird als prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten angegeben. Um vor Beginn der Blutphase die Parasitenlast in der Leber infizierter Mäuse zu bestimmen, wurde eine *Plasmodium*-spezifische qPCR durchgeführt (4.3.8).

4.5.10 Infektion mit *L. major*

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden aus den Blutagarplatten entnommen und dreimal mit 10 mL sterilem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C für 10 min). Anschließend wurde eine 1:10-Verdünnung der Parasiten in Paraformaldehyd-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 20 μ m, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt. Zur Infektion von Mäusen wurden 3×10^6 (hoch dosiert) oder 3×10^3 (niedrig dosiert) *L. major*-Parasiten in 30 μ L sterilem 1x PBS subkutan in eine der beiden Hinterpfoten injiziert. Um die Gedächtnis-T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden nach dem Abheilen der Primärinfektion 3×10^6 oder 3×10^3 *L. major*-Parasiten, wie oben beschrieben, injiziert und der Infektionsverlauf dokumentiert.

4.5.11 Nachweis der *L. major*-Infektion

Durch die wöchentliche Messung des Durchmessers beider Hinterpfoten wurde der Infektionsverlauf anhand der Zunahme des Pfotendurchmessers verfolgt. Dabei wurde die prozentuale Zunahme des Durchmessers der infizierten Pfote gegenüber der nicht infizierten Pfote in Prozent angegeben.

Zusätzlich erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten die relative Bestimmung der *L. major*-Parasitenlast durch eine spezifische qPCR (4.3.8)

4.5.12 Herstellung von Leishmanien-Antigen

Für die Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen (*soluble Leishmania antigen*, SLA) wurden Promastigote *L. major*-Parasiten in der stationären Wachstumsphase aus der Blutagarplatte entnommen und dreimal mit 10 mL sterilem 1x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C für 10 min). Anschließend wurde eine 1:10-Verdünnung der Parasiten in Paraformaldehyd-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer (20 µm Tiefe, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt. Die Parasiten wurden mit 1x PBS auf eine Konzentration von 1×10^9 *L. major*/mL eingestellt und in Reaktionsgefäße überführt (200 µL-Aliquots). Im Anschluss wurden die Parasiten für je 3 min abwechselnd im 55 °C warmen Wasserbad und flüssigem Stickstoff inkubiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und das SLA bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.5.13 Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824 und Persistenzanalyse

Für die Immunisierung von BALB/c Mäusen wurden *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) aus einer Übernachtskultur in 50 mL LB-Medium mit Antibiotika und 0,3 M NaCl angeimpft und bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,6-0,7$ bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Die Konzentration der Bakterien wurde anhand einer Standardkurve bestimmt. Die Bakterien wurden pelletiert (3000 x g, 20 min, 4 °C) und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in PBS aufgenommen. Jeder Maus wurden oral 5×10^8 Salmonellen in 200 µL sterilem 1x PBS mittels einer Knopfkanüle verabreicht. Die Mäuse wurden entweder einmal oder dreimal (Tag 0, 3 und 7) mit Salmonellen immunisiert. Fünf Wochen nach der letzten Verabreichung wurden die Mäuse mit ACT-CSP immunisiert (4.5.14).

Um zu untersuchen, wie lange die Salmonellen in den Mäusen persistieren, wurden zu angegebenen Zeitpunkten Stuhlproben infizierter Mäuse entnommen. Diese wurden in LB-Medium homogenisiert und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert, um vorhandene Bakterien anzureichern. Anschließend wurden die Suspensionen 5 min auf 95 °C erhitzt und zur Detektion von Salmonellen mittel PCR eingesetzt (4.3.6).

4.5.14 Immunisierung mit ACT-CSP

BALB/c Mäuse wurden mit 20 µg ACT-CSP immunisiert. Das Adenylatcyclasekonstrukt wurde in 200 µL 1x PBS intraperitoneal injiziert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse entweder zur Organentnahme getötet oder mit *P. berghei*-Sporozoitien infiziert (4.5.8).

4.5.15 Bestimmung der CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität *in vivo*

In dieser Arbeit wurde die zytotoxische Aktivität CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen *in vivo* untersucht. Hierfür wurden Milzzellen aus naiven BALB/c Spendermäusen isoliert (4.1.3), eine Hälfte der Zellen mit CSP beladen (CSP⁺) (4.1.9) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert. Die mit CSP₂₄₅₋₂₅₃ beladenen Zellen wurden, wie in 4.1.10 beschrieben, mit einer hohen Konzentration CFSE (CFSE^{high}) markiert, die unbeladenen Milzzellen mit einer niedrigen Konzentration CFSE (CFSE^{low}). Beide Zellpopulationen (CSP⁺/CFSE^{high} und CSP⁻/CFSE^{low}) konnten anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer unterschieden werden. Die Zellen wurden 1:2 gemischt und BALB/c Mäusen, die vorher mit ACT-CSP immunisiert worden sind (4.5.14), intravenös injiziert. Hierbei wurden 5 x 10⁶ Zellen in 200 µL sterilen 1x PBS pro Maus eingesetzt. Nach 5 h wurden die Milzzellen der immunisierten Mäuse isoliert und die prozentuale Verteilung von CSP⁺/CFSE^{high}- und CSP⁻/CFSE^{low}-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Zur Bestimmung der CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen in Prozent wurde folgende Formel verwendet:

$$1 - \left(\frac{\text{immunisierte Maus } \frac{\text{CSP}^+/\text{CFSE}^{\text{high}}}{\text{CSP}^-/\text{CFSE}^{\text{low}}}}{\text{naive Maus } \frac{\text{CSP}^+/\text{CFSE}^{\text{high}}}{\text{CSP}^-/\text{CFSE}^{\text{low}}}} \right) \times 100$$

4.5.16 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Um zwei verschiedene Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen wurde der *unpaired two-tailed student's t-test* verwendet. Zur statistischen Analyse von Unterschieden zwischen mehr als zwei Versuchsgruppen wurde der *one-way ANOVA* mit *Bonferroni's post test* verwendet.

5 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer bestehenden Nematodeninfektion auf die Immunantwort gegen pathogene Protozoen im Mausmodell untersucht werden. Hierfür wurde die Infektion mit dem Nagetierparasiten *Strongyloides ratti* verwendet.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in vier Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt wurde die Immunantwort der Maus auf eine *S. ratti*-Infektion untersucht. Im zweiten und dritten Abschnitt wurde untersucht, ob diese Immunantwort einen Einfluss auf den Verlauf von Koinfektionen hat. Hierfür wurden Mäuse mit intrazellulären Protozoen koinfiziert. Im zweiten Abschnitt wurden die Folgen einer Koinfektion mit *Leishmania major* untersucht. Der dritte Teil beschreibt die Analyse einer Koinfektion mit *Plasmodium yoelii*. Im letzten Abschnitt des Ergebnisteils wurde der Einfluss einer *S. ratti*-Infektion auf die Effizienz einer experimentellen Impfung gegen den Erreger der Malaria untersucht. In diese Untersuchung wurde eine zweite Nematodenspezies, *Litomosoides sigmodontis*, mit eingeschlossen. Hiermit sollte untersucht werden, ob die transiente *S. ratti*-Infektion das Immunsystem auf andere Weise beeinflusst, als die persistierende, quasi chronische Infektion mit *L. sigmodontis*.

5.1 Die Immunantwort der Maus auf eine *S. ratti*-Infektion

In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer vorliegenden Infektion mit dem pathogenen Nematoden *S. ratti* auf die Immunantwort von Mäusen gegenüber Koinfektionen und Vakzinierungen untersucht werden. Hierfür waren genaue Kenntnisse über den Infektionsverlauf und die, durch den Parasiten induzierte, Immunantwort notwendig. Um diese zu untersuchen wurden acht Wochen alte C57BL/6 Weibchen mit *S. ratti*-iL3, durch subkutane Injektion in den rechten Fußballen, infiziert und am Tag 273 auf dieselbe Weise reinfiziert. Der Verlauf der Infektion wurde anhand des Ausstoßes von Eiern und geschlüpften L1 im Stuhl der Mäuse verfolgt. Hierfür wurde der Ausstoß von *S. ratti*-DNA mittels einer *Strongyloides*-spezifischen qPCR gemessen, die ursprünglich zur Diagnose von *S. stercoralis* in humanem Stuhl etabliert wurde (Kramme *et al*, in Vorbereitung). Der zeitliche Ablauf des Experiments ist in Abb. 5.1.1-A dargestellt. Abb. 5.1.1-B zeigt, dass an Tag 5 bereits Larvenausstoß messbar war, der an Tag 7 der *S. ratti*-Infektion sein Maximum erreichte. Anschließend nahm die Menge der *S. ratti*-DNA im Stuhl der Mäuse wieder ab, bis an Tag 12 kein Larvenausstoß mehr nachweisbar war. Nachdem die Mäuse

an Tag 273 mit *S. ratti*-iL3 reinfiziert wurden, ergab sich ein vergleichbarer Infektionsverlauf mit einem maximalen Larvenausstoß an Tag 7 der Reinfektion. Dieser betrug allerdings weniger als 20 % des Maximums das während der Primärinfektion gemessen wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass C57BL/6 Mäuse nach der Injektion von *S. ratti*-iL3 eine patente Infektion entwickelten, die zum Ausstoß von Eiern und L1 im Stuhl der Mäuse führte. Diese Infektion wurde von den Mäusen erfolgreich bekämpft und verlieh ihnen eine Teil-Resistenz gegenüber einer Reinfektion, sogar 273 Tage nach der ersten Infektion.

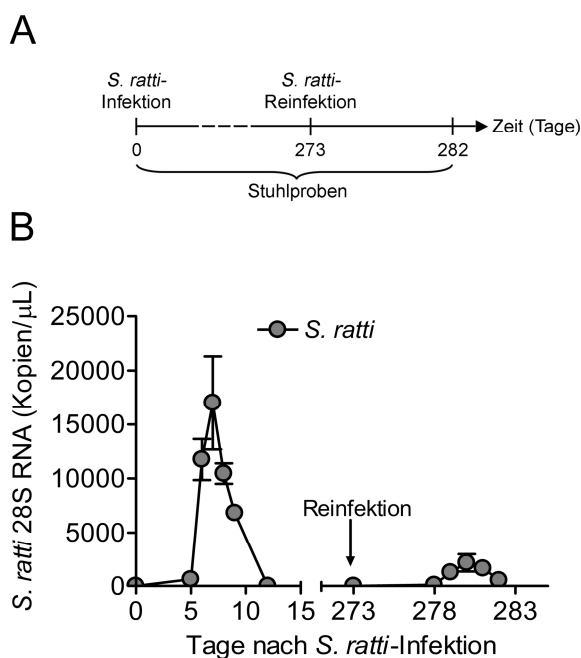


Abb. 5.1.1: Bestimmung des Verlaufs einer *S. ratti*-Infektion in C57BL/6 Mäusen mittels qPCR

(A) Gezeigt ist der zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse (n=5) wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert und an Tag 273 reinfiziert. (B) Der Larvenausstoß im Stuhl der Mäuse wurde mittels *S. ratti*-spezifischer qPCR quantifiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Gruppen- oder Einzelstuhl von fünf Mäusen in Duplikaten untersucht. Die Fehlerbalken zeigen ± SEM.

Im Folgenden sollte die zelluläre Immunantwort von C57BL/6 Mäusen während einer Infektion mit *S. ratti* untersucht werden. Um die *S. ratti*-spezifische Produktion von Zytokinen zu messen wurden mesenteriale Lymphknoten- (mesLK-) und Milzzellen an Tag 7 der Infektion und Reinfektion der Mäuse isoliert und in Anwesenheit von anti-CD3 AK und *S. ratti*-Lysat *in vitro* kultiviert. Die mesLK wurden präpariert, da sie die drainierenden Lymphknoten des Darms sind, in dem die Adulten *S. ratti*-Weibchen persistieren. Die Milzzellen wurden untersucht, da sie Aufschluss darüber geben, ob die Immunantwort einen systemischen Charakter hat. Für die Untersuchung wurde der Tag 7

der *S. ratti*-Infektion bzw. der -Reinfektion ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt der Larvenausstoß maximal war (Abb. 5.1.1-B und [28]). Abb. 5.1.2-A bis -C zeigen exemplarisch die Ergebnisse für Milz- und mesLK-Zellen an Tag 7 der Infektion. In Abb. 5.1.2-A ist der zeitliche Ablauf des Experiments dargestellt. Nach der Stimulation mit anti-CD3 AK zeigten Milzzellen aus *S. ratti*-infizierten Mäusen eine tendenziell erhöhte Produktion der Th2-Zytokine IL-10 und IL-4, während Milzzellen aus naiven Kontrollmäusen diese Zytokine kaum oder gar nicht sezernierten (Abb. 5.1.2-B). Im Gegensatz dazu war die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ sowie die Proliferation auf anti-CD3 AK der Milzzellen *S. ratti*-infizierter Mäuse signifikant reduziert (IFN- γ = $p < 0,01$; Proliferation = $p < 0,05$). Das zeigt, dass die tendenziell erhöhte Produktion von IL-10 und IL-4 nach Stimulation mit anti-CD3 AK nicht das Ergebnis einer erhöhten Proliferation war. Diese sowie weitere bereits publizierte Daten zeigen, dass eine transiente Suppression der IFN- γ -Produktion und der Proliferation nach anti-CD3 AK Stimulation ein typisches Merkmal der Immunantwort gegen *S. ratti* sind [28].

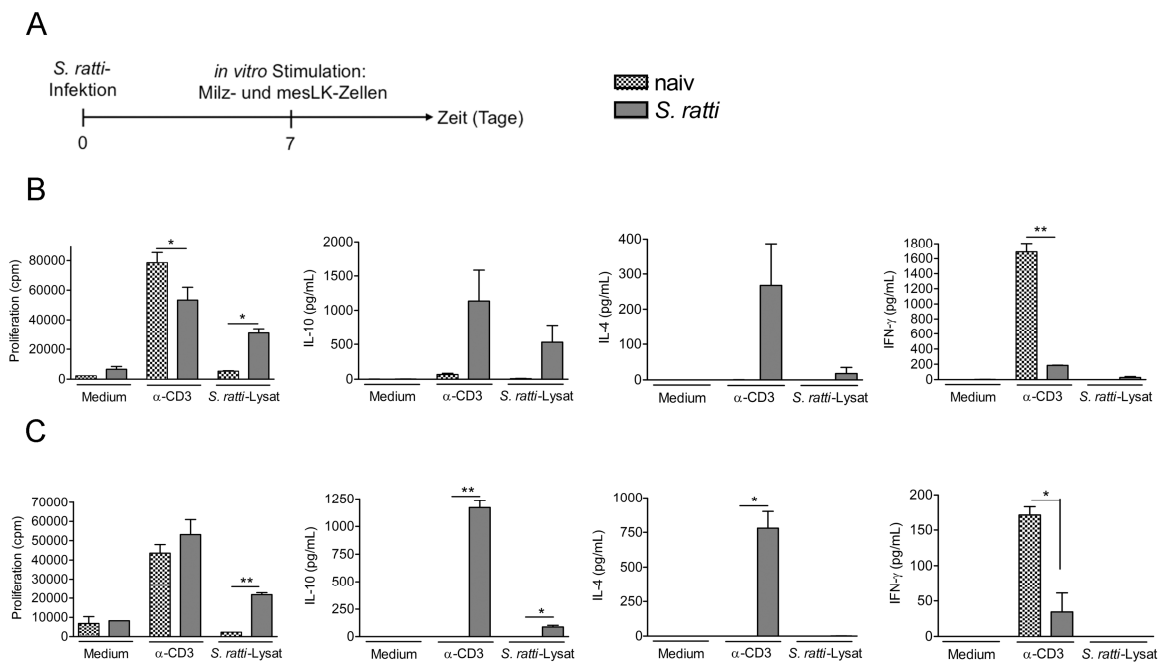


Abb. 5.1.2: Die zelluläre Immunantwort von C57BL/6 Mäusen während einer *S. ratti*-Infektion

(A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. An Tag 7 der Infektion wurden die *S. ratti*-infizierten (grau) oder naiven (kariert) Mäuse abgetötet und die Milzen (B) und mesLK (C) präpariert. 2×10^5 Milz- oder mesLK-Zellen wurden in Triplikaten in RPMI-Vollmedium, anti-CD3 AK oder *S. ratti*-Lysat inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. In den Zellüberständen wurden IL-10, IL-4 und IFN- γ mittels ELISA quantifiziert. Die Graphen zeigen exemplarisch eines von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen (student's t-test): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die spezifische Produktion von IL-10 und IL-4 auf *S. ratti*-Lysat war in den Milzzellen *S. ratti*-infizierter Mäuse leicht erhöht, während Milzzellen naiver Mäuse diese Zytokine nicht sekretierten (Abb. 5.1.2-B). Gleichzeitig war die *S. ratti*-spezifische Proliferation von Milzzellen in *S. ratti*-infizierten Mäusen signifikant gesteigert ($p < 0,05$). Nach Stimulation mit *S. ratti*-Lysat war in keiner der Mäuse eine IFN- γ Produktion messbar. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe überein [28].

Abb. 5.1.2-C zeigt die Zytokinproduktion von *ex vivo* stimulierten mesLK-Zellen. Die Produktion der Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 nach Stimulation mit anti-CD3 AK an Tag 7 war hier noch deutlicher sichtbar (IL-10 = $p < 0,01$; IL-4 = $p < 0,05$) als in den Milzzellen. Eine signifikante Suppression der IFN- γ Produktion war auch in mesLK-Zellen *S. ratti*-infizierter Mäuse zu sehen ($p < 0,05$; Abb. 5.1.2-C). Es war kein Unterschied im Proliferationsverhalten mesLK-Zellen infizierter und naiver Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3 AK messbar. Die *S. ratti*-spezifische Proliferation und IL-10 Produktion auf Lysat war in den mesLK-Zellen *S. ratti*-infizierter Mäuse signifikant erhöht (Proliferation = $p < 0,01$; IL-10 = $p < 0,01$), während keine spezifische Produktion von IL-4 und IFN- γ nachweisbar war (Abb. 5.1.2-C). Eine *S. ratti*-induzierte Th2-Immunantwort war demnach sowohl in den drainierenden Lymphknoten-Zellen als auch auf systemischer Ebene, in der Milz, messbar.

Die zelluläre Immunantwort von Milz- und mesLK-Zellen an Tag 7 der *S. ratti*-Reinfektion war tendenziell vergleichbar mit der an Tag 7 der Primärinfektion (Daten nicht gezeigt). Lediglich das Ausmaß der Produktion der Th2-Zytokine war leicht verringert und spiegelte den reduzierten Larvenausstoß der Mäuse wieder [28].

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem pathogenen Nematoden *S. ratti* eine klassische Th2-Immunantwort hervorruft, die mit einer simultanen Suppression des Th1-Zytokins IFN- γ einhergeht. Dieses Resultat stimmt mit dem Th1/Th2-Konzept überein, nach dem Th1- und Th2- Immunantworten antagonistisch wirken [6, 121, 122]. Im nächsten Abschnitt wurde der Einfluss einer *S. ratti*-Infektion auf den Verlauf einer *L. major*-Infektion untersucht, für deren Kontrolle die Ausbildung einer IFN- γ -basierten Th1-Immunantwort von zentraler Bedeutung ist [8, 123].

5.2 Untersuchung einer Koinfektion mit *S. ratti* und *L. major*

5.2.1 Einfluss der *S. ratti*-Infektion auf die Koinfektion mit *L. major*

Im Folgenden sollte der Einfluss einer bestehenden *S. ratti*-Infektion auf den Verlauf und die Immunantwort einer *L. major*-Koinfektion untersucht werden. Abb. 5.2.1-A zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Acht Wochen alte C57BL/6 Weibchen wurden mit dem pathogenen Nematoden *S. ratti* durch eine subkutane Injektion von iL3 in die rechte Hinterpfote infiziert.

An Tag 6 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse mit dem Protozoen *L. major* durch Injektion von 3×10^6 *L. major*-Promastigoten (hoch dosiert) in die selbe Pfote koinfiziert (Abb. 5.2.1-A, -B und -C). Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da die transiente *S. ratti*-spezifische Th2-Immunantwort zwischen Tag 6-9 p.i. maximal ausgeprägt ist. In diesem Zeitraum zeigten mesLK-Zellen, nach *ex vivo* Stimulation mit anti-CD3 AK und *S. ratti*-Lysat, eine maximale Produktion Th2-assoziiierter Zytokine wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Gleichzeitig war die Produktion des Th1-assoziierten Zytokins IFN- γ supprimiert und die Wurmlast im Darm und Stuhl der Mäuse maximal (siehe Abschnitt 5.1 und [28]).

Als Kontrollen dienten Mäuse, die ausschließlich mit *S. ratti* oder ausschließlich mit *L. major* infiziert wurden. Um die Gedächtnis-T-Zell-Antwort zu untersuchen wurden die Mäuse, nach Abheilen der *L. major*-Primärinfektion, mit 3×10^6 (hoch dosiert) *L. major*-Parasiten reinfiziert.

Der Verlauf der *L. major*-Infektion wurde durch die wöchentliche Messung des Durchmessers beider Hinterpfoten verfolgt. Abb. 5.2.1-B zeigt, dass kein Unterschied zwischen *L. major*- und *S. ratti*-/*L. major*-infizierten Mäusen zu sehen war. An Tag 10 und Tag 31 der *L. major*-Infektion wurde zusätzlich die relative Parasitenlast durch Quantifizierung der *L. major*-DNA in den Pfoten der Mäuse bestimmt (Abb. 5.2.1-C). *L. major*-infizierte und *S. ratti*-/*L. major*-koinfizierte Mäuse zeigten auch hier keinen Unterschied in der Schwere der Infektion. In beiden Gruppen war die *L. major*-Parasitenlast an Tag 31 fast bis zur Detektionsgrenze gesunken (Abb. 5.2.1-C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die erfolgreiche Abwehr einer *L. major*-Infektion nicht durch eine vorliegende Nematodeninfektion beeinflusst wird. In den Experimenten wurde die, für das murine Modell der Leishmaniose übliche [8], hohe Dosis von 3×10^6 *L. major*-Promastigoten für die Infektion der Mäuse verwendet.

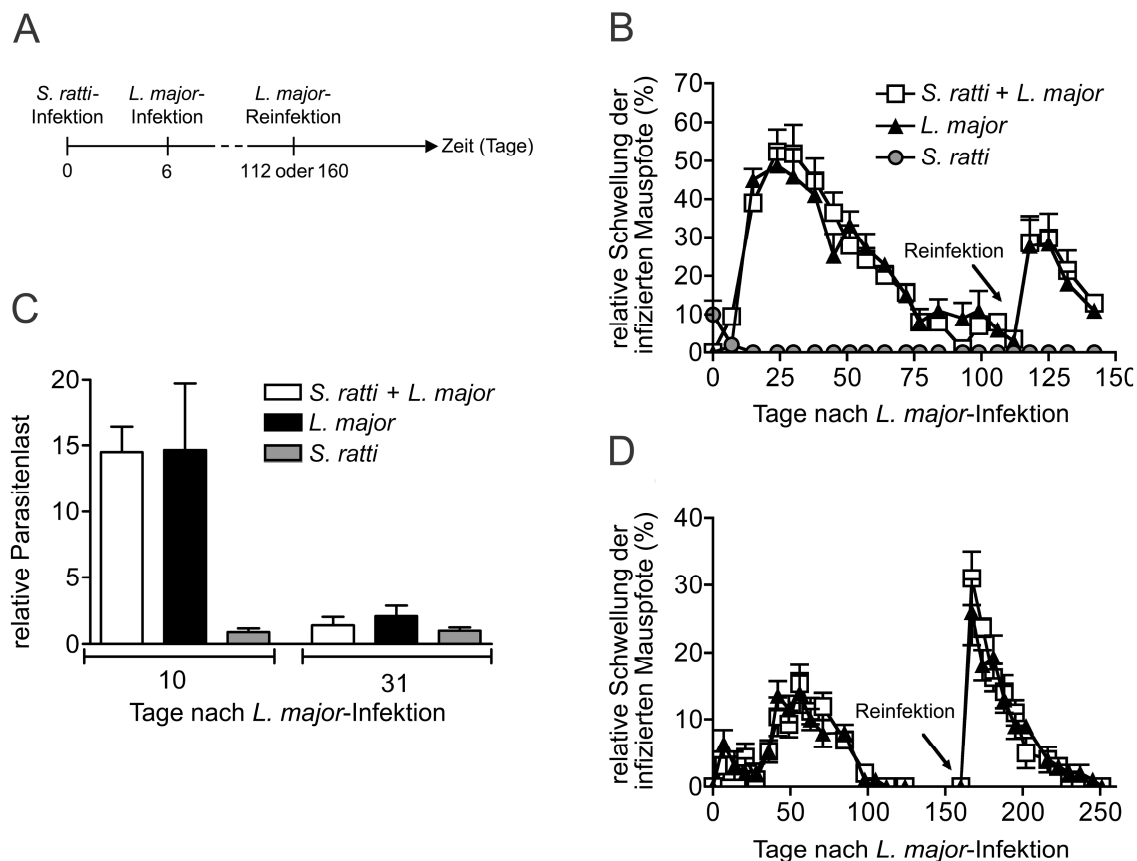


Abb. 5.2.1: Erfolgreiche Bekämpfung einer *L. major*-Infektion in Mäusen mit vorliegender *S. ratti*-Infektion

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit 3×10^6 (B, C) oder 3×10^3 (D) *L. major*-Promastigoten in dieselbe Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. An Tag 112 (B, C) oder 160 (D) wurden die Mäuse mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten reinfiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse für *S. ratti*-infizierte C57BL/6 (grau), *L. major*-infizierte (schwarz) und koinfizierte (weiß) C57BL/6 Mäuse. Der Verlauf der *L. major*-Infektion wurde durch die wöchentliche Messung der Pfotenschwellung (B, D) sowie durch Quantifizierung der *Leishmania*-DNA in den Pfoten der Mäuse mittels qPCR (C) verfolgt. Die Detektionsgrenze der qPCR wurde als die relative Parasitenlast festgelegt, die bei Mäusen ohne *L. major*-Infektion gemessen wurde. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=5-9), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Um auszuschließen, dass diese artifiziiell hohe Dosis womöglich leichte Effekte der *S. ratti*-Infektion verschleiert, wurde eine Koinfektion mit 3×10^3 (niedrig dosiert) *L. major*-Promastigoten durchgeführt (Abb. 5.2.1-D). Der Verlauf der Fußschwellung war auch hier unverändert und die Ausbildung einer Gedächtnis-T-Zell-Antwort bei einer nachfolgenden hoch dosierten *L. major* Reinfektion nicht beeinträchtigt. Um zu prüfen, ob möglicherweise erst die effektivere Gedächtnis-Immunantwort gegen *S. ratti* mit der Abwehr einer *L. major*-Infektion interferiert, wurden Mäusen an Tag 7 einer *S. ratti*-Reinfektion mit *L. major* koinfiziert. Der Verlauf der Fußschwellung von koinfizierten und von ausschließlich mit *L. major* infizierten Mäusen war unverändert (Daten nicht gezeigt).

Abschließend betrachtet konnte kein Einfluss einer vorliegenden *S. rattii*-Infektion oder -Reinfektion auf den Verlauf einer *L. major*-Primär- (hoch- und niedrig dosiert) oder -Sekundärinfektion beobachtet werden.

Obwohl die Koinfektion mit *S. rattii* keinen Einfluss auf den Verlauf einer *L. major*-Infektion zeigte, war es trotzdem möglich, dass sich die antagonistischen Immunantworten (Th1/Th2) während der Koinfektion gegenseitig beeinflussen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die zelluläre Immunantwort gegen *S. rattii* und *L. major* in einzeln sowie in koinfizierten Mäusen untersucht (Abb. 5.2.2-A bis -E). Um die *S. rattii*-spezifische Sekretion von Zytokinen zu messen, wurden mesLK-Zellen an Tag 8 nach *S. rattii*-Infektion isoliert und in Anwesenheit von anti-CD3 AK und *S. rattii*-Lysat *in vitro* kultiviert. Die *S. rattii*-spezifische Immunantwort wurde in den mesLK untersucht, da diese die drainierenden Lymphknoten des Darms sind, dem Ort an dem die adulten *S. rattii*-Weibchen persistieren. Als Zeitpunkt wurde Tag 8 nach der Wurm-Infektion gewählt, da die *S. rattii*-induzierte Th2-Immunantwort um diesem Zeitpunkt ihr Maximum erreicht (siehe 5.1 und [28]). Nach der Stimulation mit anti-CD3 AK zeigten mesLK-Zellen aus *L. major*-infizierten Mäusen keine Produktion der Th2-Zytokine IL-10 und IL-13, während die mesLK-Zellen *S. rattii*-infizierter Mäuse diese Zytokine in großen Mengen sezernierten. Im Gegensatz dazu war die Produktion von IL-10 und IL-13 in den mesLK-Zellen koinfizierter C57BL/6 Mäuse reduziert (Abb. 5.2.2-B). Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,001$), obwohl die Mäuse zu diesem Zeitpunkt erst zwei Tage mit *L. major* infiziert waren. Die Proliferation der mesLK-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 AK war in allen drei Gruppen vergleichbar (Abb. 5.2.2-B).

Die spezifische Produktion von IL-10 und IL-13 nach Stimulation mit *S. rattii*-Lysat war in den mesLK-Zellen koinfizierter Mäuse, im Vergleich zu denen aus *S. rattii*-infizierten Mäusen, nur tendenziell reduziert ($p > 0,05$), während die Proliferation nicht beeinflusst war (Abb. 5.2.2-B).

Das Th1-Zytokin IFN- γ wurde nur von mesLK-Zellen *L. major*-infizierter Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3 AK produziert. Eine transiente Suppression der IFN- γ -Produktion nach anti-CD3 AK Stimulation ist ein typisches Merkmal der Immunantwort gegen *S. rattii* (siehe Abschnitt 5.1 und [28]). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Suppression an Tag 8 der *S. rattii*-Infektion auch in koinfizierten Mäusen erhalten bleibt (Abb. 5.2.2-B).

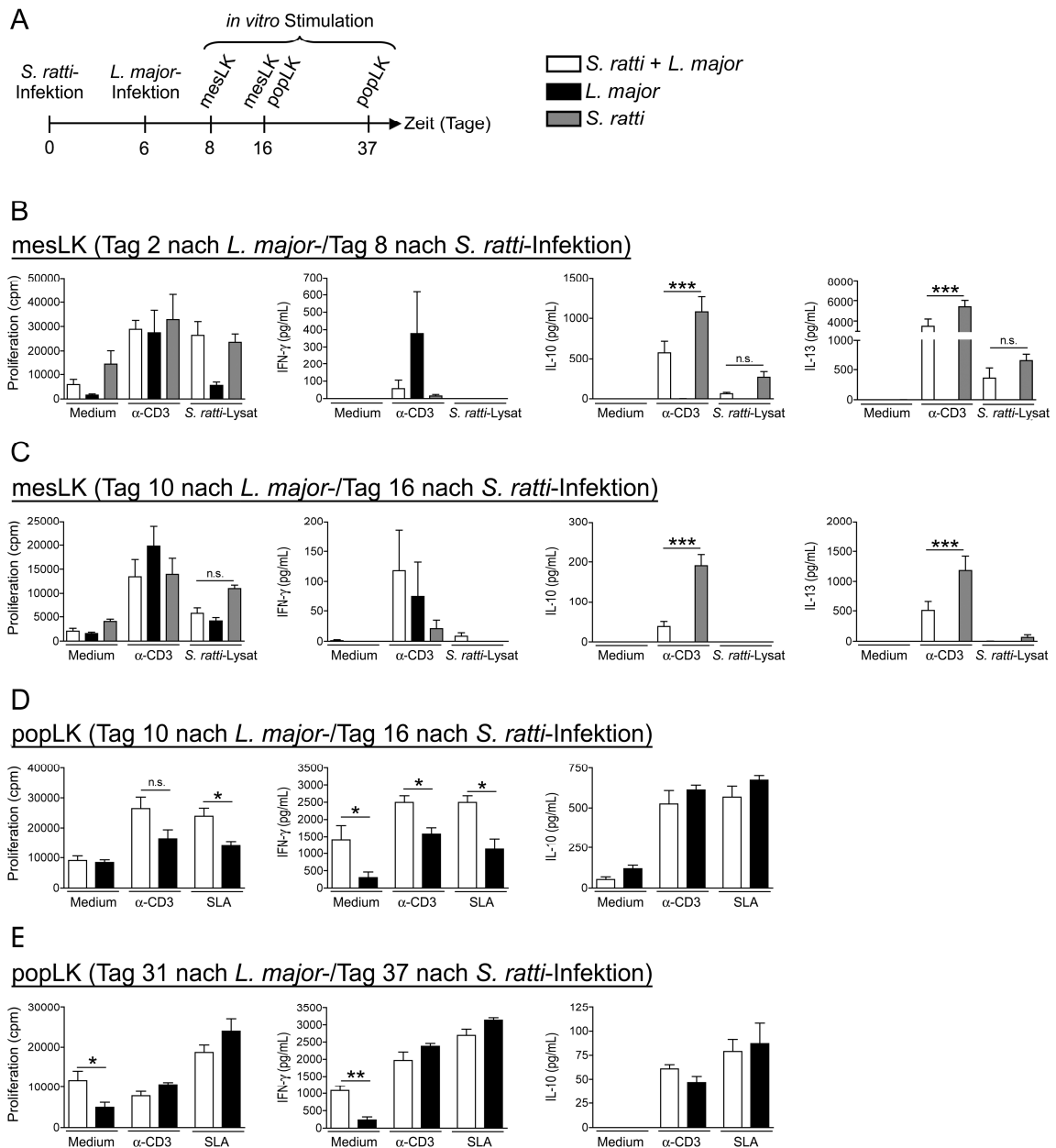


Abb. 5.2.2: Die zelluläre Immunantwort in *S. ratti* und *L. major* einzeln sowie koinfizierten Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten in dieselbe Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die *S. ratti*- (grau), *L. major*- (schwarz) oder ko-infizierten (weiß) Mäuse abgetötet und mesLK (B, C) oder popliteale LK (popLK) (D, E) präpariert. 2×10^5 mesLK- oder 3×10^5 popLK-Zellen wurden in Triplikaten in RPMI-Vollmedium, anti-CD3 AK, *S. ratti*-Lysat oder Leishmanien-Antigen (*soluble Leishmania antigen*, SLA) inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. In den Zellüberständen wurden IFN- γ , IL-10 und IL-13 mittels ELISA quantifiziert. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (B, C: n=6; D, E: n=4), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen (B, C: *one-way ANOVA* mit *Bonferroni's post test*; D, E: *student's t-test*): *p<0,05, **p<0,01, ***p=0,001.

Um die *S. ratti*- und *L. major*-spezifischen Immunantworten am gleichen Tag messen zu können, wurde Tag 16 der *S. ratti*-Infektion (entspricht Tag 10 der *L. major*-Infektion)

gewählt. Die Zellen der mesLK und der poplitealen Lymphknoten (popLK), die jeweils den Ort der *S. ratti*- bzw. der *L. major*-Infektion drainieren, wurden präpariert und *in vitro* stimuliert (Abb. 5.2.2-A). In den mesLK wurde keine *S. ratti*-spezifische Zytokinproduktion gemessen (Abb. 5.2.2-C). Dieses stimmte mit der, zu diesem späten Zeitpunkt der Infektion typischerweise abnehmenden *S. ratti*-spezifischen Th2-Immunantwort überein [28]. Trotzdem war nach Stimulation mit anti-CD3 AK noch eine deutliche Produktion von IL-10 und IL-13 in den mesLK-Zellen *S. ratti*-infizierter Mäuse messbar, die in koinfizierten Mäusen signifikant unterdrückt war ($p < 0,001$). Die, zu diesem Zeitpunkt nur noch schwache, *S. ratti*-spezifische Proliferation war in *L. major*-koinfizierten Mäusen tendenziell, jedoch nicht signifikant unterdrückt ($p > 0,05$; Abb. 5.2.2-C). Die leichte Suppression der IFN- γ Produktion, die nach Stimulation mit anti-CD3 AK an Tag 8 der *S. ratti*-Infektion in koinfizierten Mäusen beobachtet wurde (Abb. 5.2.2-B), war an Tag 16 der Infektion nicht mehr vorhanden (Abb. 5.2.2-C). Dies unterstreicht den bereits erwähnten transienten Charakter der *S. ratti*-vermittelten IFN- γ -Suppression (siehe Abschnitt 5.1 und [28]).

In den popLK-Zellen koinfizierter Mäuse war die Produktion von IFN- γ nach Stimulation mit anti-CD3 AK und SLA nicht supprimiert, sondern sogar erhöht ($p < 0,05$; Abb. 5.2.2-D). Da auch die IFN- γ Produktion der unstimulierten popLK-Zellen erhöht war ($p < 0,05$) ist es wahrscheinlich, dass die Injektion von *S. ratti*-iL3 und *L. major*-Promastigoten in dieselbe Pfote zu einem unspezifischen proinflammatorischen Milieu geführt hat. Diese gesteigerte IFN- γ -Sekretion sowie die erhöhte Proliferation unstimulierter popLK-Zellen war in koinfizierten Mäusen auch an Tag 31 sichtbar (Abb. 5.2.2-E). Zu diesem Zeitpunkt ging die Fußschwellung aller Mäuse bereits zurück. Dieses war ein Zeichen für die erfolgreiche Bekämpfung der Infektion. Die *S. ratti*-Koinfektion hatte weder an Tag 10, noch an Tag 31 der *L. major*-Infektion einen Einfluss auf die IL-10 Produktion der popLK-Zellen (Abb. 5.2.2-D und -E). IL-13 war zu keinem Zeitpunkt in den popLK-Zellen messbar, weder als Antwort auf die SLA- noch auf die anti-CD3 AK-Stimulation.

Die Analyse der *L. major*-spezifischen humoralen Immunantwort zeigte keine Unterschiede zwischen *L. major*- und *S. ratti*-/*L. major*-infizierten Mäusen (Abb. 5.2.3-A bis -E). Vor allem war die Sekretion von *L. major*-spezifischem IgG2b, dass mit Th1-Immunantworten assoziiert ist, nicht supprimiert (Abb. 5.2.3-D).

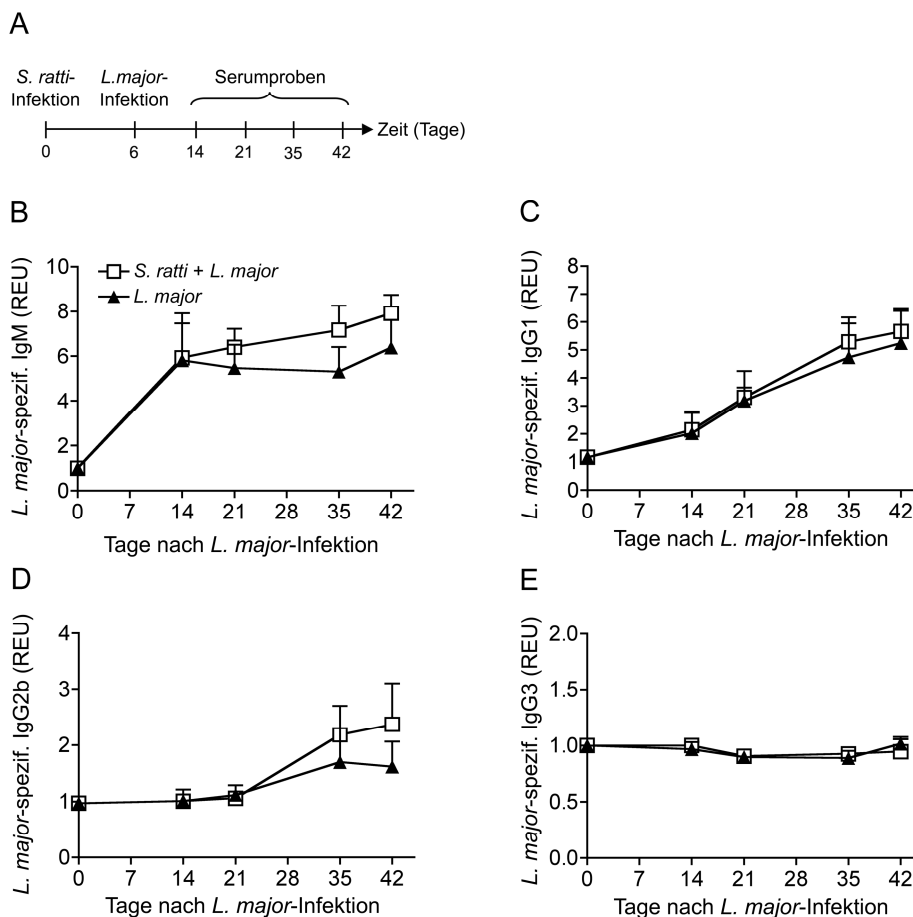


Abb. 5.2.3: Die *L. major*-spezifische humorale Immunantwort in einzeln und koinfizierten Mäusen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert, oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten in dieselbe Hinterpfote infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die relativen ELISA Units (REU) von *L. major*-spezifischem IgM (B), IgG1 (C), IgG2b (D) und IgG3 (E) im Serum (1:200) mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist eines von zwei repräsentativen Experimenten. Gezeigt sind die Mittelwerte von fünf individuell analysierten *L. major*-infizierten (schwarze Dreiecke) oder *L. major*-/*S. ratti*-koinfizierten (weiße Quadrate) Mäusen \pm SEM.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine bestehende *S. ratti*-Infektion die Ausbildung einer schützenden zellulären und humoralen Th1-Immunantwort gegen *L. major* nicht behindert. Die Koinfektion mit *S. ratti* führt sogar zu der Ausbildung einer generellen proinflammatorischen Immunantwort.

Interessanterweise wurde die etablierte Th2-Polarisierung von *S. ratti*-infizierten Mäusen durch eine nachfolgende *L. major*-Infektion teilweise unterdrückt. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die verminderte Produktion der Th2-Zytokine während der *L. major*-Koinfektion die erfolgreiche Klärung der *S. ratti*-Infektion beeinträchtigen konnte.

5.2.2 Einfluss der *L. major*-Infektion auf die Koinfektion mit *S. ratti*

Um zu untersuchen, ob eine Koinfektion mit *L. major* mit der erfolgreichen Bekämpfung einer *S. ratti*-Infektion interferiert, wurde zunächst der Larvenausstoß im Stuhl von *S. ratti*-infizierten und *S. ratti*-/*L. major*-koinfizierten Mäusen mittels qPCR verglichen (Abb. 5.2.4). Trotz der veränderten Zytokinproduktion (Abb. 5.2.2) war der Larvenausstoß der *S. ratti*-infizierten und der *S. ratti*-/*L. major*-koinfizierten Mäuse gleich. Beide Mausgruppen kontrollierten die Infektion erfolgreich (Abb. 5.2.4-B).

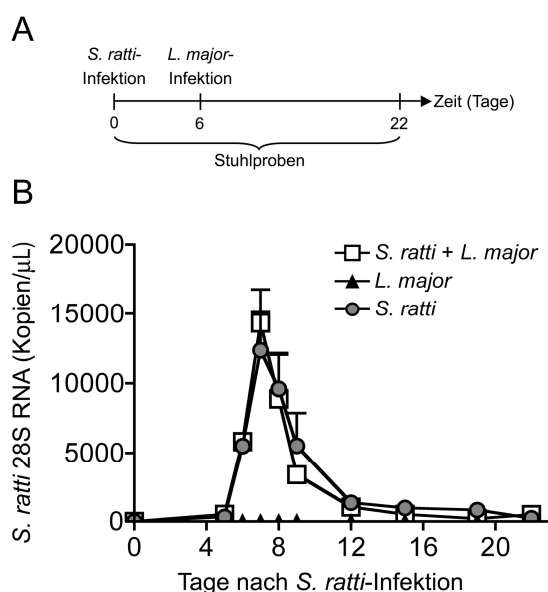


Abb. 5.2.4: Unveränderter Larvenausstoß in *S. ratti*- und *S. ratti*/*L. major*-infizierten Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse ($n=6-8$) wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert, oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten in dieselbe Hinterpfote infiziert, oder *S. ratti*-infiziert belassen. (B) Der Larvenausstoß im Stuhl der Mäuse wurde mittels *S. ratti*-spezifischer qPCR quantifiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Einzelstuhl von 6-8 Mäusen in Duplikaten untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Dieses war ebenfalls der Fall wenn die Mäuse mit *S. ratti* reinfiziert wurden. Es wurde gezeigt, dass C57BL/6 Mäuse eine Teil-Resistenz gegenüber einer *S. ratti*-Reinfektion aufbauen, die sich in einem deutlich verringerten Ausstoß von *S. ratti*-DNA im Stuhl äußert [28]. Diese Teil-Resistenz war in Mäusen mit vorangegangener *L. major*-Infektion genauso vorhanden, wie in Mäusen die nur mit *S. ratti* infiziert waren (Daten nicht gezeigt). Die Ausbildung einer Gedächtnis-Immunantwort gegen *S. ratti* wurde demnach nicht durch eine vorliegende *L. major*-Infektion gestört.

Dennoch war es denkbar, dass die verringerte Th2-Immunantwort in koinfizierten Mäusen (Abb. 5.2.2-B und -C) die Bekämpfung einer *S. ratti*-Infektion beeinträchtigen könnte, wenn die Mäuse zuerst mit *L. major* und anschließend mit *S. ratti* infiziert würden.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Koinfektions-Experimente in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Mäuse wurden zunächst mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten (hoch dosiert) infiziert und nach 14 Tagen, als die *L. major* spezifische Th1-Immunantwort etabliert war, mit *S. ratti*-iL3 koinfiziert (Abb. 5.2.5-A). Der Larvenausstoßes im Stuhl (Abb. 5.2.5-B) sowie die Wurmlast im Dünndarm (Abb. 5.2.5-C) wurden verglichen und zeigten, dass die *S. ratti*-Infektion in koinfizierten Mäusen nicht verschlimmert oder verlängert war. Zwar war der Larvenausstoß im Stuhl koinfizierter Mäuse an Tag 8 p.i. leicht erhöht, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant und spiegelte sich auch nicht in der Anzahl adulter Würmer im Darm wieder (Abb. 5.2.5-B und -C).

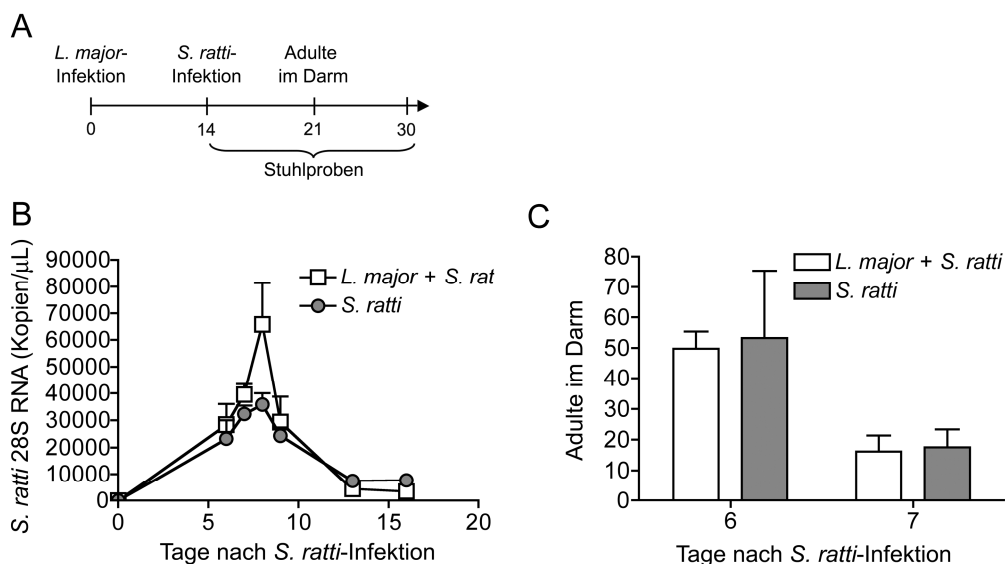


Abb. 5.2.5: Unveränderte Wurmlast in *L. major*-/*S. ratti*-koinfizierten Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden zuerst mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit *S. ratti*-iL3 in dieselbe Hinterpfote infiziert. (B) Der Verlauf der *S. ratti*-Infektion in einzeln (grau) und *L. major*-koinfizierten (weiß) Mäusen wurde durch den Nachweis von *S. ratti*-DNA im Stuhl der Mäuse mittels qPCR verfolgt. Einzelstuhl von 4 Mäusen pro Zeitpunkt wurde in Duplikaten untersucht. (C) An Tag 6 und 7 der *S. ratti*-Infektion wurden die adulten Würmer im Dünndarm der Mäuse gezählt. Gezeigt sind die Ergebnisse für je vier einzeln untersuchte Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten als Mittelwerte \pm SEM.

Um die Ursache für die unverändert erfolgreiche Bekämpfung der *S. ratti*-Infektion genauer zu untersuchen wurden die zelluläre und humorale Immunantwort analysiert (Abb. 5.2.6-A bis -G). In dieser Versuchsanordnung, der Koinfektion von *L. major*-infizierten Mäusen mit *S. ratti*, war jedoch keine Suppression der *S. ratti*-spezifischen Proliferation in koinfizierten Mäusen nachweisbar. Auch die Sekretion von IL-10 und IL-13 in mesLK-

Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 AK oder *S. ratti*-Lysat war in koinfizierten Mäusen nicht mehr unterdrückt (Abb. 5.2.6-B bis -D).

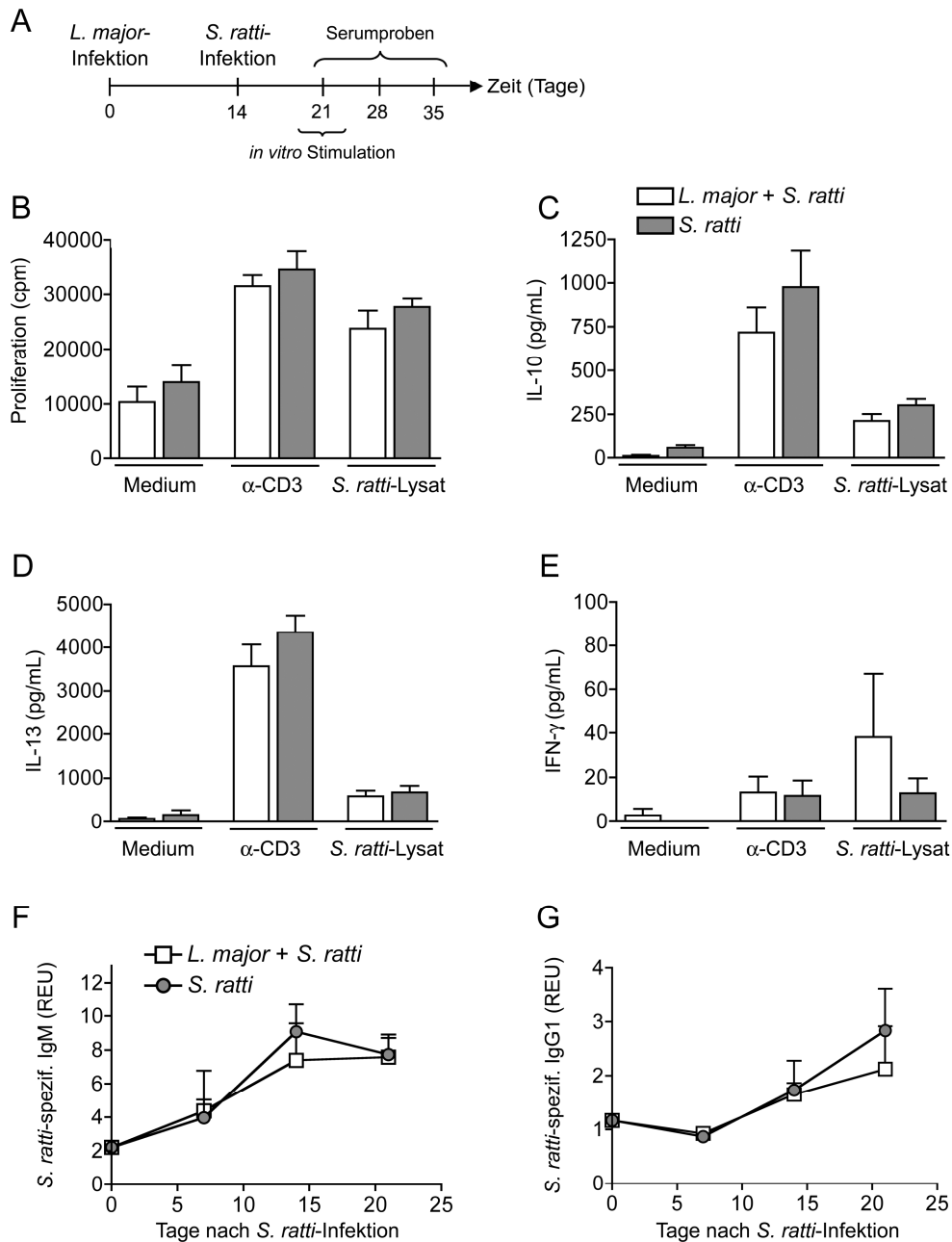


Abb. 5.2.6: Die zelluläre und humorale Immunantwort in *S. ratti*- und *L. major*-/*S. ratti*-infizierten Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden zuerst mit 3×10^6 *L. major*-Promastigoten subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse subkutan mit *S. ratti*-iL3 in dieselbe Hinterpfote infiziert. (B-E) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden *L. major*-koinfizierte (weiß) oder *S. ratti*-einzeln infizierte (grau) Mäuse abgetötet und die mesLK isoliert. 2×10^5 mesLK-Zellen wurden in Triplikaten mit RPMI-Medium, anti-CD3 AK oder *S. ratti*-Lysat inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt (B). IL-10 (C), IL-13 (D) und IFN- γ (E) wurden mittels ELISA im Zellüberstand gemessen. Die relativen ELISA Units (REU) für *S. ratti*-spezifisches IgM (F) und IgG1 (G) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA im Serum (1:200) der Mäuse bestimmt. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (B-E: n=8; F, G: n=4) als Mittelwerte \pm SEM.

Des Weiteren wurde die *S. ratti*-vermittelte Suppression von IFN γ durch die *L. major*-Koinfektion nicht aufgehoben (Abb. 5.2.6-E). Schließlich hatte die *L. major*-Koinfektion auch keinen Einfluss auf die *S. ratti*-spezifische humorale Immunantwort (Abb. 5.2.6-F und -G).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine bereits 14 Tage andauernde *L. major*-Infektion keinerlei Einfluss auf die zelluläre- und humorale Immunantwort gegen *S. ratti* hat. Die Bekämpfung der Wurminfektion wird nicht beeinflusst, obwohl eine nur zweitägige Koinfektion mit *L. major* bereits einen deutlich suppressiven Effekt auf die *S. ratti* induzierte Th2-Immunantwort hat (Abb. 5.2.2-B).

5.3 Untersuchung einer Koinfektion mit *S. ratti* und *P. yoelii*

Obwohl die Infektion mit *S. ratti* eine klassische Th2-Immunantwort auslöst (Kapitel 5.1 und [28]), störte sie die Ausbildung einer schützenden Th1-Immunantwort bei einer Koinfektion mit *L. major* nicht. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die *S. ratti*-Infektion generell keinen suppressiven Effekt auf eine Th1-Immunantwort ausübt, oder ob es an der Kombination der Erregerspezies lag. Im Folgenden wurden deshalb Koinfektions-Experimente mit *S. ratti* und einem weiteren Pathogen durchgeführt, für dessen erfolgreiche Bekämpfung ebenfalls die Ausbildung einer Th1-Immunantwort entscheidend ist.

5.3.1 Einfluss der *S. ratti*-Infektion auf die Koinfektion mit *P. yoelii* in C57BL/6 Mäusen

Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursachen Malaria und sind, wie Leishmanien, intrazelluläre protozoische Parasiten. Das Th1-Zytokin IFN- γ spielt eine zentrale Rolle bei der erfolgreichen Immunantwort gegen *Plasmodium* spp., indem es z. B. das Parasitenwachstum durch die Aktivierung klassisch aktivierter Makrophagen begrenzt [55, 62, 63]. So führte die Unterdrückung einer IFN- γ basierten Th1-Immunantwort in IL-12-, IL-2- oder IFN- γ -defizienten Mäusen zu einer erhöhten und verlängerten Parasitämie nach Infektion mit *P. chabaudi* und *P. yoelii* (nicht-letal Stamm, NL) [64, 124]. Außerdem verstarben *P. yoelii* (letal Stamm, XL) infizierte C57BL/6 Mäuse nach der Verabreichung von anti-IFN- γ -AK schneller als unbehandelte Kontrollmäuse [125].

Im Folgenden sollte der Einfluss einer *S. ratti*-Infektion auf den Verlauf und die Immunantwort bei einer *P. yoelii*-Koinfektion in C57BL/6 Mäusen untersucht werden. Abb.

5.3.1-A zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. C57BL/6 Mäuse wurden mit dem pathogenen Nematoden *S. ratti* durch die subkutane Injektion von iL3 in die rechte Hinterpfote infiziert. An Tag 6 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse mit dem Protozoen *P. yoelii* durch intraperitoneale Injektion von 2×10^6 parasitierten Erythrozyten koinfiziert (Abb. 5.3.1-B, -C). Dieser Zeitpunkt der *S. ratti*-Infektion wurde ausgewählt, da die transiente *S. ratti*-spezifische Th2-Immunantwort mit der simultanen Suppression von IFN- γ zwischen Tag 6-9 der Infektion maximal waren (siehe Kapitel 5.1 und [28]). Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6 Mäuse die nur mit *P. yoelii* infiziert wurden. Der Verlauf der *P. yoelii*-Infektion wurde durch die Bestimmung der Parasitämie und des Gewichtsverlustes der Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten verfolgt. Abb. 5.3.1-B und -C zeigen, dass die *P. yoelii*-Infektion in *P. yoelii*- und *S. ratti*-/*P. yoelii*-infizierten Mäusen gleich verlief. In beiden Gruppen waren an Tag 22 der *P. yoelii*-Infektion keine parasitierten Erythrozyten mehr im Blut nachweisbar und die Infektion wurde erfolgreich bekämpft.

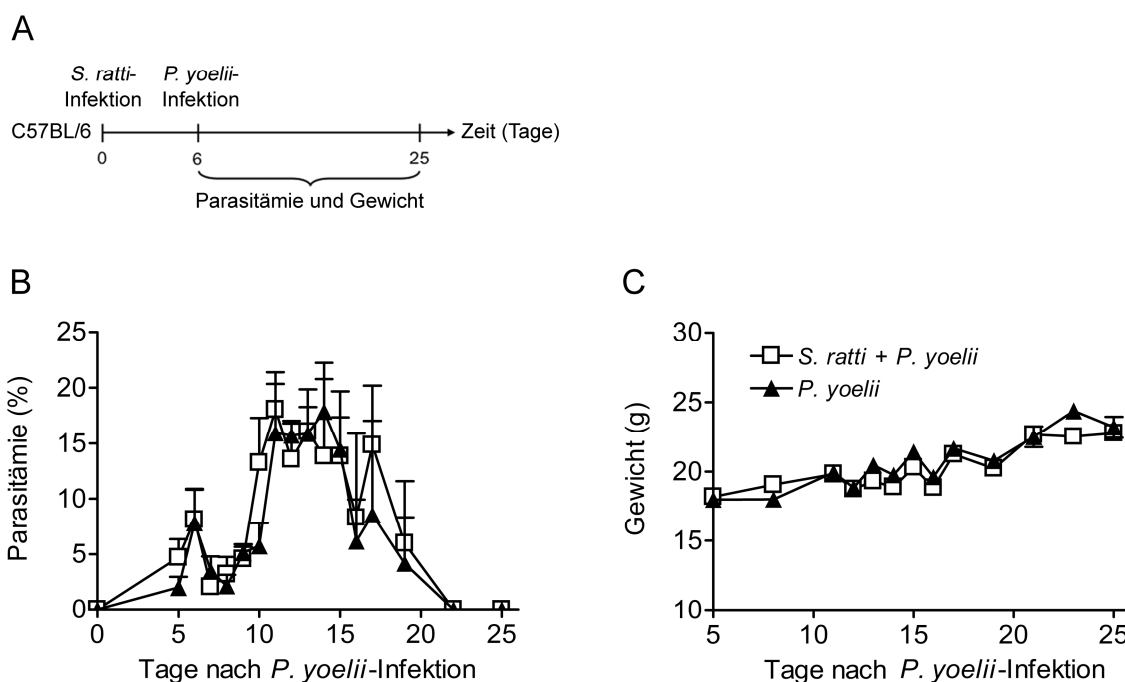


Abb. 5.3.1: Erfolgreiche Bekämpfung einer *P. yoelii*-Infektion in Mäusen mit vorliegender *S. ratti*-Infektion

(A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 1×10^6 pRBCs mit *P. yoelii* infiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse für *P. yoelii*-infizierte (schwarze Dreiecke) und *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierte (weiße Quadrate) C57BL/6 Mäuse. Der Verlauf der *P. yoelii*-Infektion wurde durch die Bestimmung der Parasitämie in den Blutaussstrichen der Mäuse (B) sowie durch die Messung des Gewichtsverlustes (C) verfolgt. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von vier unabhängigen Experimenten (n=18-23). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die erfolgreiche Abwehr der *P. yoelii*-Infektion durch die vorliegende *S. rattii*-Infektion nicht beeinflusst wurde. Dies war auch der Fall wenn C57BL/6 Mäuse gleichzeitig, oder an Tag 2 der *S. rattii*-Infektion mit *P. yoelii* koinfiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die Koinfektion mit *S. rattii* weder den Verlauf der Parasitämie noch den Gewichtsverlust während der *P. yoelii*-Infektion veränderte, konnten die antagonistischen Immunantworten (Th1/Th2) gegen *P. yoelii* und *S. rattii* sich dennoch gegenseitig beeinflussen. Im Folgenden wurde die zelluläre Immunantwort gegen *S. rattii* und *P. yoelii* in einzeln und in koinfizierten Mäusen verglichen (Abb. 5.3.2-A bis -E). Hierfür wurden Milzzellen der Mäuse isoliert, da sowohl die Immunantwort gegen *S. rattii* als auch die gegen *Plasmodium* spp. in der Milz messbar ist. Bei einer Infektion mit *Plasmodium* spp. zirkulieren infizierte Erythrozyten mit dem Blut durch den gesamten Körper. Die Immunantwort ist deshalb im Blut und in verschiedenen Organen wie Leber und Milz messbar. Bei einer *S. rattii*-Infektion drainieren die mesLK den Ort, an dem die adulten Würmer persistieren, die *S. rattii*-spezifische Immunantwort ist jedoch auch in der Milz messbar (siehe Kapitel 5.1 und [28]). Als Zeitpunkt wurde Tag 6 der Infektion mit *P. yoelii* gewählt, da hier bereits eine Parasitämie (>0,3 %) nachweisbar war (Abb. 5.3.1-B). In dem hier verwendeten Koinfektionsregime entsprach das Tag 12 der *S. rattii*-Infektion, ein Zeitpunkt an dem die *S. rattii*-induzierte Th2-Immunantwort bereits abnehmend, aber noch messbar ist [28]. Die Milzzellen wurden mit anti-CD3 AK *in vitro* stimuliert (Abb. 5.3.2-A). In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit *S. rattii*-Antigen kultiviert, um die *S. rattii*-spezifische Zytokinproduktion zu messen. Eine Stimulation mit *P. yoelii*-Antigen wurde nicht durchgeführt. Der Erreger der *Plasmodium* spp. befinden sich während der Blutphase fast durchgehend in Erythrozyten, so dass eine *Plasmodium* spp. spezifische Stimulation nur mit infizierten Erythrozyten möglich wäre. Parallel müsste eine Stimulation mit nicht-infizierten Erythrozyten durchgeführt werden. Hierfür sind große Mengen infizierter und naiver Erythrozyten erforderlich, die nicht zur Verfügung standen. Nach der Stimulation mit anti-CD3 AK zeigten Milzzellen von *P. yoelii*-infizierten Mäusen nur eine geringe Sekretion des Th2-Zytokins IL-13 während Milzzellen *S. rattii* einzeln infizierter Mäuse dieses Zytokin in signifikant ($p < 0,05$) größeren Mengen produzierten (Abb. 5.3.2-D). Im Vergleich dazu war die Sekretion von IL-13 in den Milzzellen koinfizierter C57BL/6 Mäuse tendenziell verringert ($p > 0,05$). Die Proliferation der Milzzellen nach Stimulation mit anti-CD3 AK war in *P. yoelii*-infizierten Mäusen, im

Vergleich zu *S. ratti*-infizierten Mäusen, signifikant ($p < 0,01$) reduziert. Diese Reduktion war auch in *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten Mäusen sichtbar ($p < 0,01$). Das Th2-Zytokin IL-10 wurde nach Stimulation mit anti-CD3 AK und *S. ratti*-Lysat von den Milzzellen aller Mäuse in vergleichbaren Mengen produziert (Abb. 5.3.2-C).

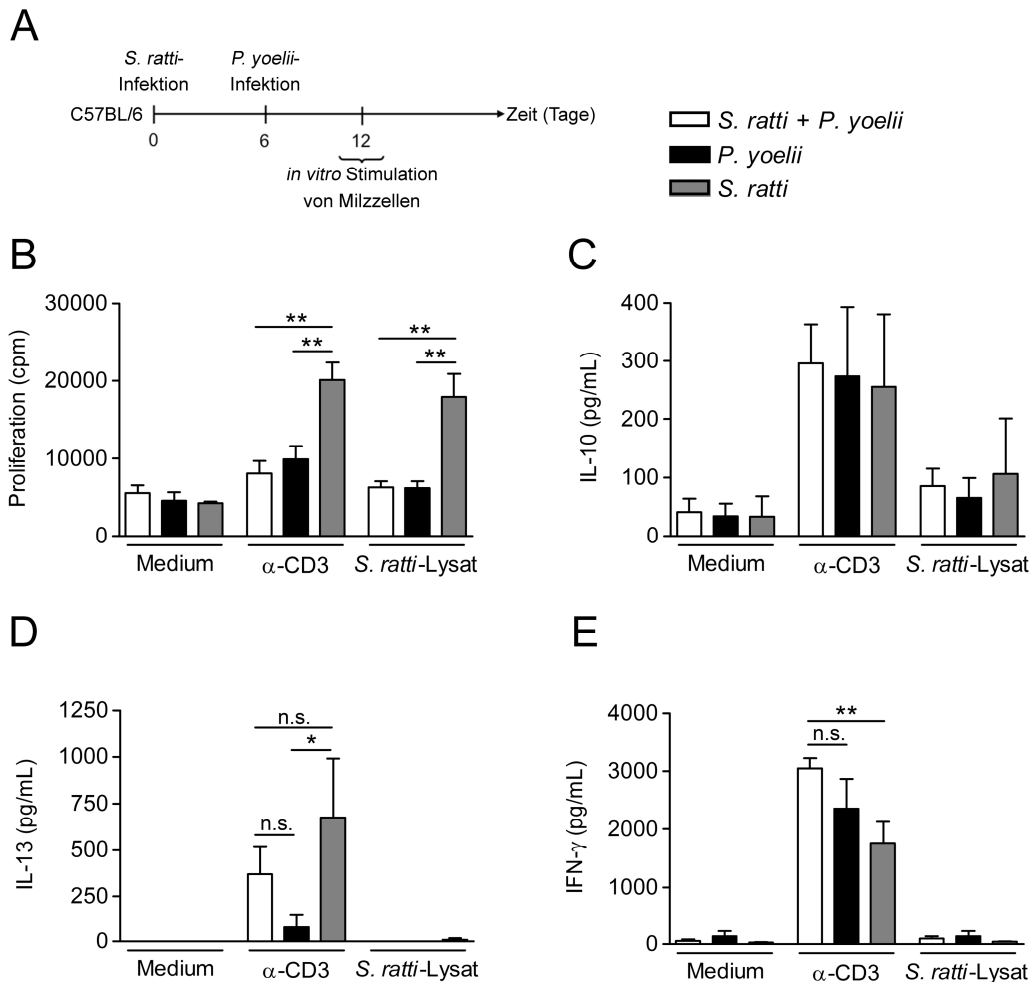


Abb. 5.3.2: Die zelluläre Immunantwort in *S. ratti* und *P. yoelii* einzeln sowie koinfizierten C57BL/6 Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 1×10^6 pRBCs mit *P. yoelii* infiziert oder naiv belassen. An Tag 6 der *P. yoelii*-Infektion (entspricht Tag 12 der *S. ratti*-Infektion) wurden die *S. ratti*- (grau), *P. yoelii*- (schwarz) oder koinfizierten Mäuse (weiß) abgetötet und die Milzzellen präpariert. 2×10^5 Milzzellen wurden in Triplikaten in RPMI-Vollmedium, anti-CD3 AK oder *S. ratti*-Lysat inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt (B). In den Zellüberständen wurden IL-10 (C), IL-13 (D) und IFN- γ (E) mittels ELISA quantifiziert. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten ($n=4$), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test*): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

In keiner der Gruppen war eine Produktion von IL-13 nach Stimulation *S. ratti*-Lysat nachweisbar (Abb. 5.3.2-D). Die Proliferation von Milzzellen nach Stimulation mit

S. ratti-Lysat war in *S. ratti*-infizierten Mäusen deutlich messbar, während sie in *P. yoelii*-infizierten und *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten Mäusen signifikant reduziert war ($p < 0,01$). Das Th1-Zytokin IFN- γ wurde von den Milzzellen aller Mäuse nach Stimulation mit anti-CD3 AK in großen Mengen produziert während nach der Stimulation mit *S. ratti*-Lysat kaum IFN- γ im Zellüberstand nachweisbar war. Interessanterweise war die IFN- γ Produktion in den Milzzellen koinfizierter Mäuse, im Vergleich zu denen *S. ratti*-infizierter Mäuse, signifikant erhöht ($p < 0,01$; Abb. 5.3.2-E). Die transiente Suppression der IFN- γ -Produktion, ein typisches Merkmal der Immunantwort gegen *S. ratti* (siehe Kapitel 5.1 und [28]), war in *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten Mäusen zu diesem Zeitpunkt aufgehoben.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine bestehende *S. ratti*-Infektion die Ausbildung einer schützenden zellulären Immunantwort gegen *P. yoelii* nicht beeinflusst. Der Verlauf und die Bekämpfung der *P. yoelii*-Infektion sind in koinfizierten Mäusen unverändert (Abb. 5.3.1-B, -C). Die tendenziell erhöhte IL-13-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3 AK hat keinen supprimierenden Effekt auf die Produktion von IFN- γ in *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten C57BL/6 Mäusen (Abb. 5.3.2-C und -D).

5.3.2 Einfluss der *S. ratti*-Infektion auf die Koinfektion mit *P. yoelii* in BALB/c Mäusen

Im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen sind BALB/c Mäuse suszeptibler für eine Infektion mit dem Erreger der murinen Malaria *P. yoelii* (NL). Zwar bekämpfen auch BALB/c Mäuse die Infektion erfolgreich innerhalb von 3-4 Wochen, der transiente Gewichtsverlust und die Parasitämie sind jedoch höher als in C57BL/6 Mäusen [126]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die genetische Prädisposition von BALB/c Mäusen für eine Th2-Immunantwort sein, während die Immunantwort von C57BL/6 Mäusen tendenziell zu Th1 polarisiert [123, 127-129].

Im Folgenden wurden die in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Experimente mit BALB/c Mäusen durchgeführt, um den Einfluss einer bestehenden *S. ratti*-Infektion auf den Verlauf einer *P. yoelii*-Infektion zu untersuchen. Der zeitliche Ablauf des Experiments ist in Abb. 5.3.3-A gezeigt. BALB/c Weibchen wurden durch die subkutane Injektion von iL3 in die rechte Hinterpfote mit *S. ratti* infiziert. An Tag 6 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse mit dem Protozoen *P. yoelii* durch intraperitoneale Injektion von 2×10^6 pRBCs koinfiziert. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6 Mäuse die nur mit *P. yoelii* infiziert

wurden. Der Verlauf der Malaria wurde durch die Bestimmung der Parasitämie und des Gewichtes der Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten verfolgt (Abb. 5.3.3-B, -C).

Im Vergleich zu nur mit *P. yoelii* infizierten Mäusen, zeigten *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierte BALB/c Mäuse eine signifikante Erhöhung der maximalen Parasitämie an Tag 16 der *P. yoelii*-Infektion ($p < 0,05$; Abb. 5.3.3-B) sowie einen tendenziell stärkeren Gewichtsverlust während der Infektion (Abb. 5.3.3-C). Dennoch waren sowohl in *P. yoelii*- als auch in *S.ratti*-/*P. yoelii*-infizierten Mäusen an Tag 26 keine Parasiten mehr im Blut nachweisbar und schließlich nahmen alle Mäuse wieder an Gewicht zu. Dieses sprach für eine erfolgreiche und unbeeinträchtigte Bekämpfung der *P. yoelii*-Infektion in beiden Mausgruppen, obwohl die *Plasmodium*-Infektion in *S. ratti*-koinfizierten Mäusen einen tendenziell schwereren Verlauf zeigte.

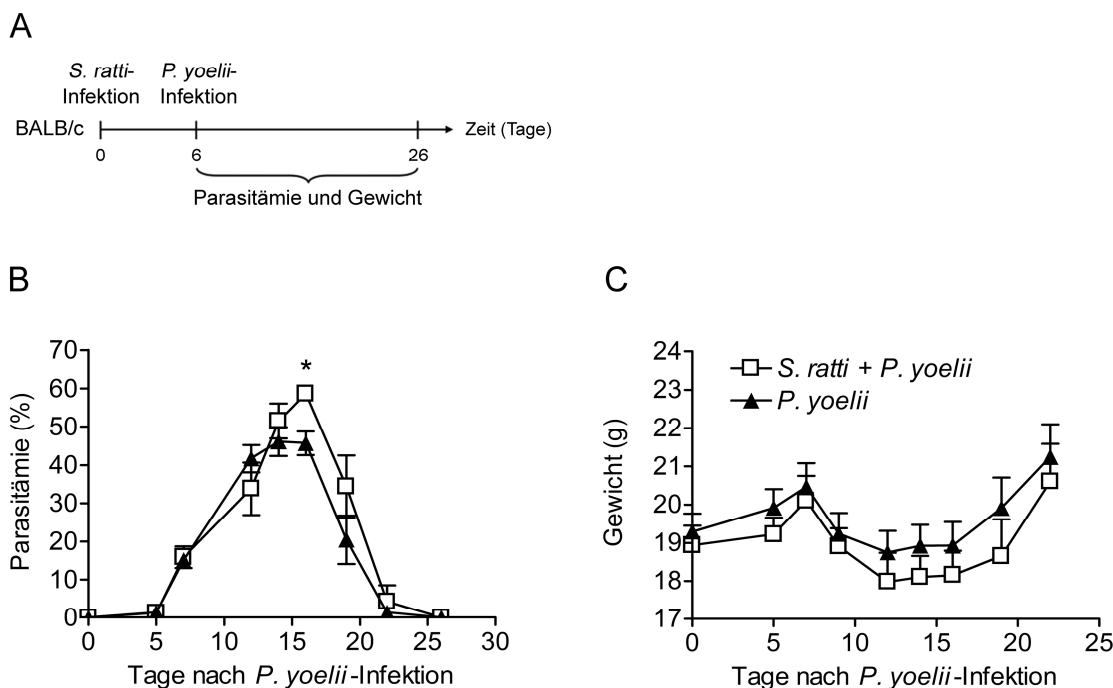


Abb. 5.3.3: Verlauf der *P. yoelii*-Infektion in *P. yoelii*-infizierten und *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten BALB/c Mäusen

(A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 1×10^6 pRBCs mit *P. yoelii* infiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse für *P. yoelii*-infizierte (schwarze Dreiecke) und *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierte (weiße Quadrate) BALB/c Mäuse. Der Verlauf der *P. yoelii*-Infektion wurde durch die Bestimmung der Parasitämie in den Blutaussstrichen der Mäuse (B), sowie durch die Messung des Gewichtsverlustes (C) verfolgt. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=6-12), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*student's t-test*): * $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob eine veränderte zelluläre Immunantwort für den schwereren Verlauf der Infektion in koinfizierten Mäusen verantwortlich war, wurde diese in einzeln

und koinfizierten BALB/c Mäusen untersucht (Abb.5.3.4-A bis -E). Zusätzlich wurde die zelluläre Immunantwort von naiven BALB/c Mäusen auf eine *P. yoelii*-Infektion gemessen. Wie bereits oben für C57BL/6 Mäuse beschrieben wurden Milzzellen an Tag 6 der *P. yoelii*-Infektion (entspricht Tag 12 der *S. rattii*-Infektion in koinfizierten Mäusen) isoliert und in Anwesenheit von anti-CD3 AK und *S. rattii*-Lysat *in vitro* kultiviert (Abb.5.3.4-A).

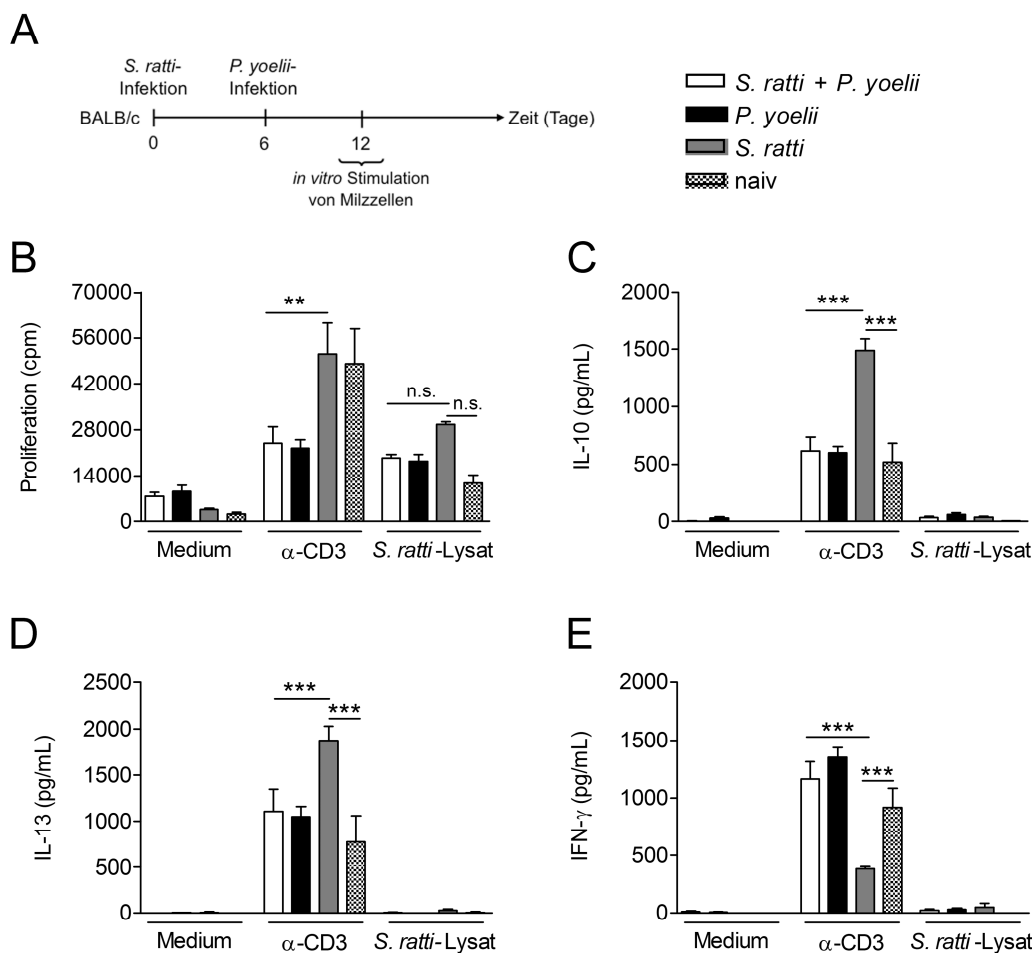


Abb.5.3.4: Die zelluläre Immunantwort in *S. rattii*- und *P. yoelii*-infizierten sowie koinfizierten BALB/c Mäusen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche acht Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit *S. rattii*-iL3 subkutan in die rechte Hinterpfote infiziert oder naiv belassen. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 1×10^6 pRBCs mit *P. yoelii* infiziert oder naiv belassen. An Tag 6 der *P. yoelii*-Infektion (entspricht Tag 12 der *S. rattii*-Infektion) wurden die *S. rattii*- (grau), *P. yoelii*- (schwarz), koinfizierten- (weiß) oder naiven (kariert) Mäuse abgetötet und die Milzzellen präpariert. 2×10^5 Milzzellen wurden in Triplikaten in RPMI-Vollmedium, anti-CD3 AK oder *S. rattii*-Lysat inkubiert. Die Proliferation wurde durch den Einbau von 3 H-Thymidin bestimmt (B). In den Zellüberständen wurden IL-10 (C), IL-13 (D) und IFN- γ (E) mittels ELISA quantifiziert. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=6), dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*one-way ANOVA* mit *Bonferroni's post test*): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Abb.5.3.4-C und -D zeigen, dass Milzzellen von *S. ratti*-infizierten Mäusen, im Vergleich zu naiven und *P. yoelii*-infizierten Mäusen, nach der Stimulation mit anti-CD3 AK deutlich mehr IL-10 und IL-13 sezernierten ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu war die Produktion dieser Th2-Zytokine in koinfizierten BALB/c Mäusen deutlich reduziert ($p < 0,001$).

Die Proliferation der Milzzellen nach Stimulation mit anti-CD3 AK war in *S. ratti*-infizierten und naiven Mäusen gleich stark (Abb.5.3.4-B). Im Vergleich dazu zeigten Milzzellen aus *P. yoelii*- oder *S. ratti*-/*P. yoelii*-infizierten Mäusen eine deutlich reduzierte Proliferation ($p < 0,01$; Abb.5.3.4-B). Eine solche Suppression der Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 AK wurde bereits in C57BL/6 Mäusen nach der Infektion sowie Koinfektion mit *P. yoelii* beobachtet (Abb. 5.3.2-B). Der gesteigerte aktivierungsinduzierte Zelltod, vor allem innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population, durch *Plasmodium*-Antigene der Blutphase wurde mehrfach beschrieben [130, 131] und könnte die Ursache für die verminderte Proliferation sein.

Die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ nach Stimulation mit anti-CD3 AK war in *S. ratti* infizierten Mäusen, im Vergleich zu naiven Kontrollmäusen, deutlich verringert ($p < 0,001$; Abb.5.3.4 -E). Wie bereits beschrieben ist eine transiente Suppression dieses Zytokins während der *S. ratti*-Infektion charakteristisch und teilweise auch noch an Tag 12 der Infektion zu beobachten [28]. Durch die Koinfektion mit *P. yoelii* wurde diese Suppression vollkommen aufgehoben, so dass *P. yoelii*- und *S. ratti*-/*P. yoelii*-infizierte Mäuse, im Vergleich zu naiven Mäusen, eine tendenziell erhöhte IFN- γ Produktion zeigten (Abb.5.3.4 -E). Eine spezifische Produktion von IL-10, IL-13 oder IFN- γ nach Stimulation mit *S. ratti*-Lysat war nicht in den Milzzellen der Mäuse messbar (Abb.5.3.4-C bis -E). *S. ratti*-infizierte Mäuse zeigten eine tendenziell erhöhte *S. ratti*-spezifische Proliferation die in *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten Mäusen nicht sichtbar war (Abb.5.3.4 -B).

Die zellulären Immunantworten von *P. yoelii*- und *S. ratti*-koinfizierten Mäusen waren folglich nahezu identisch und lieferten keine Erklärung für den leicht verschlimmerten Verlauf der Malaria in koinfizierten BALB/c Mäusen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine bestehende *S. ratti*-Infektion die Ausbildung einer schützenden zellulären Immunantwort gegen *P. yoelii* weder in C57BL/6- noch in BALB/c Mäusen beeinträchtigt. Obwohl der Verlauf der Malaria in koinfizierten BALB/c Mäusen leicht verschlimmert ist, setzt sich auch in diesen Mäusen die dominante und schützende Th1-Immunantwort gegen *P. yoelii* durch.

Generell zeigen die Abschnitte 5.2 und 5.3, dass *S. ratti* nicht mit einer schützenden Th1-Immunantwort interferiert. Diese Beobachtung ist nicht nur auf eine Parasitenspezies oder

auf einen Mausstamm beschränkt, sondern ein allgemeines Phänomen, dass sich während der *L. major*-Koinfektion in C57BL/6 Mäusen sowie während der *P. yoelii*-Koinfektion in C57BL/6 und BALB/c Mäusen zeigt.

5.4 Einfluss einer vorliegenden Nematodeninfektion auf die Effizienz einer experimentellen anti-Malaria Vakzine

In zahlreichen Tiermodellen sowie humanen Studien wurde gezeigt, dass eine vorliegende Wurminfektion die Immunantwort des Wirtes nicht nur gegenüber weiteren Infektionen, sondern auch gegenüber Vakzinierungen verändern kann. Eine abgeschwächte T-Zellantwort sowie ein reduzierter Impfschutz können die Folgen sein [103, 116, 132, 133]. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss einer *S. ratti*-Infektion auf die Immunantwort der Maus gegenüber einer experimentellen anti-Malaria Vakzine untersucht. Die Studien wurden mit weiblichen BALB/c Mäusen durchgeführt. Zusätzlich zu dem vorher verwendeten Nematoden *S. ratti* wurde der Einfluss einer weiteren Nematodenspezies untersucht, der Nagetierfilarie *L. sigmodontis*. Im Gegensatz zu dem Nematoden *S. ratti*, der eine transiente etwa 3-4 Wochen andauernde Infektion hervorruft [25, 26, 28], führt die Infektion von BALB/c Mäusen mit *L. sigmodontis* zu einer Infektion die etwa 17 Wochen andauert [32].

Als Modell für eine Vakzine wurde die experimentelle Immunisierung gegen die Leberphase von *P. berghei* genutzt. Die *P. berghei*-Infektion ist ein gut etabliertes Modell, um die letale Form der Malaria in Mäusen zu studieren [134]. Die Immunisierungen basieren auf dem Hauptoberflächenprotein der *P. berghei* Sporozoiten, dem Circumsporozoiten-Protein (CSP). Die Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen [81, 82] diente in dieser Arbeit als Maß für die Effizienz der Impfung. Es wurden zwei unterschiedliche Immunisierungen verwendet. Im ersten Teil wurde die Vakzinierung mit einer rekombinanten Adenylatcyclase, ACT-CSP, durchgeführt. Im zweiten Teil der Studie wurde eine *prime/boost*-Immunisierung genutzt, die eine Kombination aus ACT-CSP und einem rekombinanten Salmonellenstamm (SB824 (pST-TB)) ist.

5.4.1 Einfluss von zwei verschiedenen Nematodeninfektionen auf die Effizienz einer Immunisierung mit ACT-CSP

Im Folgenden wurde der Einfluss einer *S. ratti*- und einer *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz einer Immunisierung mit der rekombinanten Adenylatcyclase ACT-CSP untersucht. Abb. 5.4.1-A zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. BALB/c Weibchen wurden entweder mit *S. ratti* oder mit *L. sigmodontis* infiziert. Die Infektion mit *S. ratti* erfolgte durch subkutane Injektion von iL3 in den rechten Fußballen. Die Infektion von

BALB/c Mäusen mit *L. sigmodontis* erfolgte mittels einer natürlichen Übertragung des Parasiten durch infizierte Milben. An Tag 8 der *S. ratti*- bzw. an Tag 14 der *L. sigmodontis*-Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion mit 20 µg ACT-CSP immunisiert (Abb. 5.4.1-A). Als Zeitpunkt wurde Tag 8 der *S. ratti*-Infektion gewählt, da die Th2-Immunantwort sowie die Wurmlast an Tag 6-9 maximal ist [28]. Tag 14 der *L. sigmodontis*-Infektion wurde ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Suppression der T- und B-Zellaktivierung messbar ist (Hartmann *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

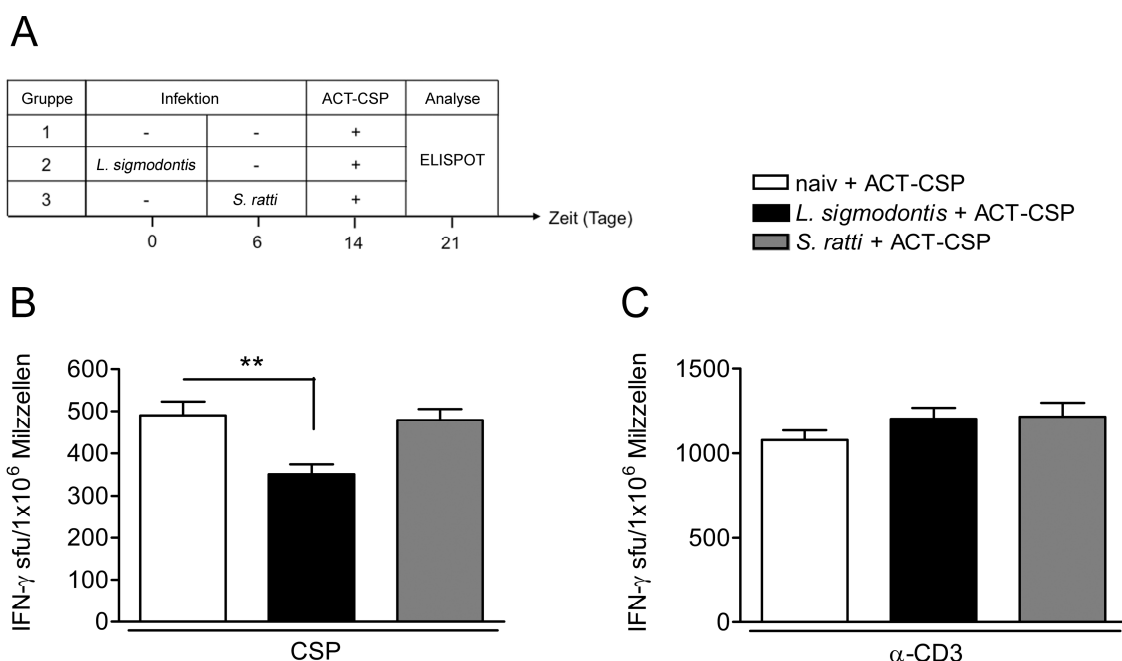


Abb. 5.4.1: Reduzierte Frequenz CSP-spezifischer IFN-γ-produzierender Milzzellen in *L. sigmodontis* infizierten Mäusen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis*- (Gr. 2; schwarze Balken) oder durch subkutane Injektion mit *S. ratti*-iL3 in die Hinterpfote infiziert (Gr. 3; graue Balken). An Tag 14 der *L. sigmodontis*- bzw. an Tag 8 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP immunisiert. Eine naive Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit ACT-CSP immunisiert (Gr. 1; weiße Balken). Sieben Tage nach der Immunisierung wurden Milzzellen präpariert und 2×10^5 Zellen mit CSP-Peptid₂₄₅₋₂₅₃ (B) oder anti-CD3 AK (C) inkubiert. Die Anzahl IFN-γ-produzierender Milzzellen nach Stimulation wurde mittels ELISPOT bestimmt (B, C). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten (n=12-17) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*student's t-test*): **p<0,01.

Als Kontrolle diente eine nicht wurminfizierte, aber mit ACT-CSP immunisierte Mausgruppe. Eine Woche nach der Immunisierung wurden die Milzzellen der Mäuse präpariert, mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid oder anti-CD3 AK stimuliert und die Zahl der IFN-γ-produzierenden Zellen mittels ELISPOT bestimmt. Die Anzahl CSP-spezifischer IFN-γ-

produzierender Zellen war in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen, im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen, signifikant reduziert ($p < 0,01$). Eine vorherige Infektion mit *S. rattii* hatte dagegen keinen Effekt auf die Induktion CSP-spezifischer IFN- γ -produzierender Zellen (Abb. 5.4.1-B). Die unspezifische Stimulation mit anti-CD3 AK zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Induktion IFN- γ -produzierender Zellen zwischen den Gruppen (Abb. 5.4.1-C). Mit diesem Resultat wurde kontrolliert, dass die Verminderung CSP-spezifischer IFN- γ -produzierender Zellen in *L. sigmodontis* infizierten Mäusen nicht das Ergebnis einer generell verringerten Vitalität der Zellen war, sondern die Reduktion CSP-spezifischer Zellen reflektierte. Eine Inkubation der Zellen ohne Stimulus führte zu keiner signifikanten IFN- γ Produktion (Daten nicht gezeigt).

Protektive CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen produzieren neben IFN- γ auch TNF- α [135]. Im folgenden Experiment wurde deshalb die Frequenz von polyfunktionalen IFN- γ -/TNF- α -produzierenden CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Milzen naiver, *L. sigmodontis*- und *S. rattii*-infizierter BALB/c Mäuse verglichen (Abb. 5.4.2-A). Hierfür wurden die Milzzellen eine Woche nach der Immunisierung mit ACT-CSP isoliert und mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid stimuliert. Die Zellen wurden auf der Oberfläche mit anti-CD8 AK und intrazellulär mit anti-IFN- γ - und anti-TNF- α AK gefärbt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abb. 5.4.2-B zusammengefasst.

Die Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ IFN- γ /TNF- α doppelt positiver Milzzellen war in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen, im Vergleich zu naiven immunisierten Mäusen, signifikant reduziert ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu war zwischen den Frequenzen protektiver Zellen in *S. rattii*-infizierten und naiven Mäusen kein signifikanter Unterschied messbar. In Abb. 5.4.2-C sind repräsentative Färbungen von CSP-stimulierten Milzzellen aus immunisierten naiven (naiv + CSP), *L. sigmodontis*- (*L. sigmodontis* + CSP) und *S. rattii*-infizierten (*S. rattii* + CSP) Mäusen gezeigt. Die Färbung von unstimulierten Milzzellen aus naiven immunisierten Mäusen (naiv – CSP) diente als Kontrolle, um den unspezifischen Hintergrund der Färbung zu detektieren (0,01 %).

Die Ergebnisse der ELISPOT-Analyse (Abb. 5.4.1-B) und der intrazellulären Zytokinfärbung (Abb. 5.4.2-B) zeigten übereinstimmend, dass die Frequenz CSP-spezifischer IFN- γ -, bzw. IFN- γ -/TNF- α -produzierender Zellen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen signifikant verringert war. Als nächstes stellte sich die Frage, ob durch die Infektion mit *L. sigmodontis* die Menge CSP-spezifischer Zellen reduziert war oder ob bei gleicher Frequenz weniger dieser CSP-spezifischen Zellen IFN- γ und TNF- α produzierten.

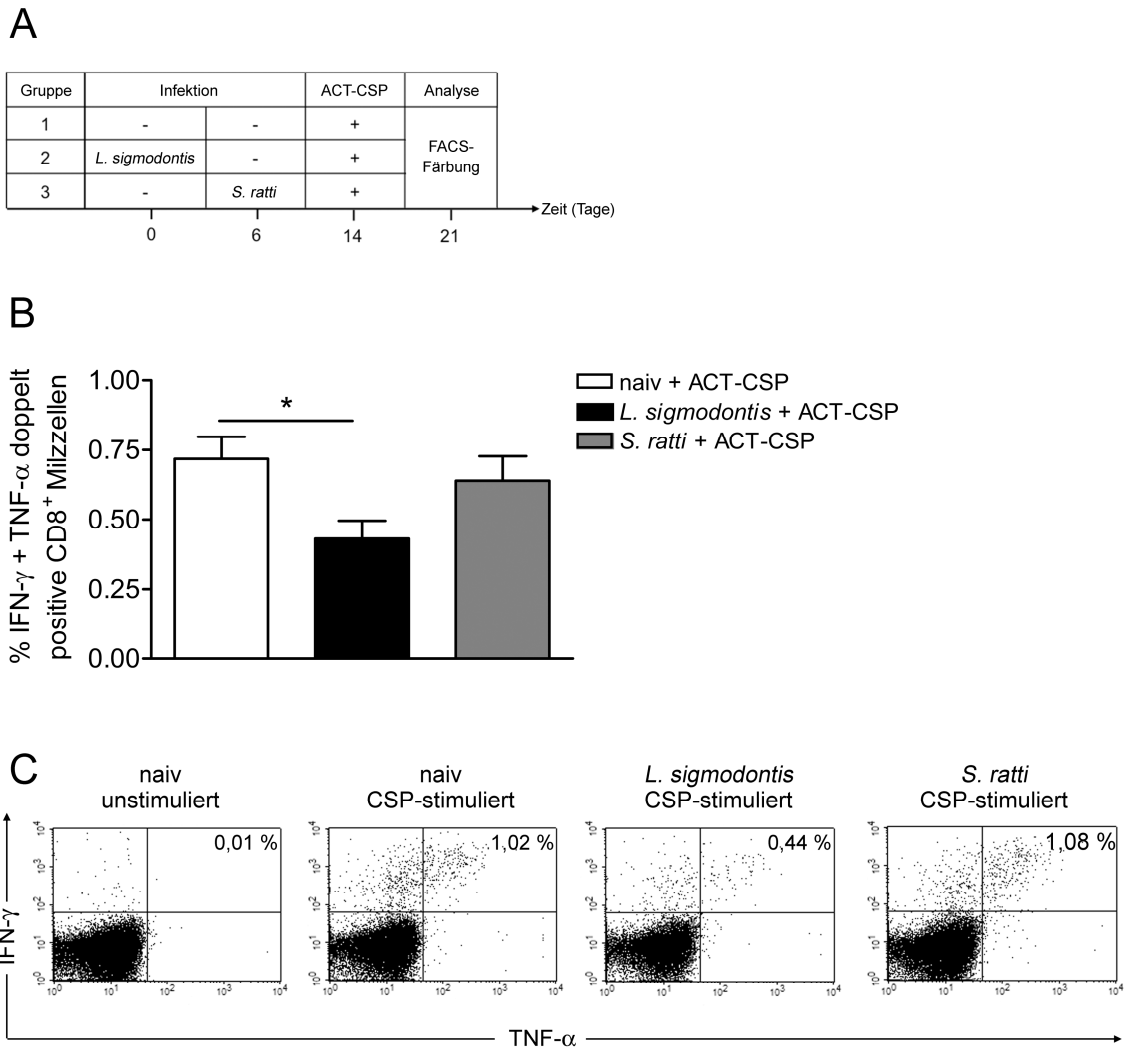


Abb. 5.4.2: Reduzierte Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ IFN- γ /TNF- α -produzierender Milzzellen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder mittels Milben mit *L. sigmodontis*- (Gr. 2) oder durch subkutane Injektion mit *S. ratti*-iL3 in die Hinterpfote infiziert (Gr. 3). An Tag 14 der *L. sigmodontis*- bzw. an Tag 8 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 20 μ g ACT-CSP immunisiert. Eine naive Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit ACT-CSP immunisiert (Gr. 1). Sieben Tage nach der Immunisierung wurden Milzzellen präpariert und 1×10^6 Zellen mit CSP-Peptid₂₄₅₋₂₅₃ stimuliert. (B) Gezeigt sind die Frequenzen CSP-spezifischer IFN- γ /TNF- α -produzierender CD8⁺ T-Zellen in den Milzen von naiven (weißer Balken), *L. sigmodontis*- (schwarzer Balken) und *S. ratti*-infizierten (grauer Balken) Mäusen. Die Daten repräsentieren die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (n=10-13) als Mittelwerte \pm SEM. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*student's t-test*): **p<0,05. (C) Gezeigt sind repräsentative Färbungen von unstimulierten Zellen aus einer naiven immunisierten (naiv/unstimuliert) Maus sowie von CSP-stimulierten Milzzellen einer naiven (naiv/CSP-stimuliert), einer *L. sigmodontis*- (*L. sigmodontis*/CSP-stimuliert) und einer *S. ratti*-infizierten (*S. ratti*/CSP-stimuliert) immunisierten Maus. Die Dot-plot-Diagramme zeigen die IFN- γ /TNF- α -Färbung von CD8⁺ Zellen. Gezeigt sind positive Zellen im Quadranten in Prozent.

Um die CSP-spezifischen T-Zellen direkt zu detektieren, wurde eine MHC-Multimer-Färbung durchgeführt. Dafür wurde ein H2-K^d-Pentamer verwendet das mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid beladen und mit dem Fluorochrom APC markiert war. Auf diese Weise konnten durchflusszytometrisch einzelne T-Zellen detektiert werden, deren T-Zell-

Rezeptoren spezifisch für das CSP-Epitop waren. Abb. 5.4.3-A zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Naive, *S. rattii*- oder *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Weibchen wurden mit ACT-CSP immunisiert. Nach sieben Tagen wurden die Milzzellen der Mäuse isoliert und mit dem H2-K^d/CSP-Pentamer sowie mit anti-CD8 AK und anti-CD62L AK gefärbt (Abb. 5.4.3-A bis -C). CD62L (L-Selectin) ist ein Homingrezeptor von naiven Lymphozyten, der aktivierten T-Zellen fehlt und so die Unterscheidung von aktivierten (CD62L^{low}) und naiven T-Zellen (CD62L^{high}) ermöglicht [136].

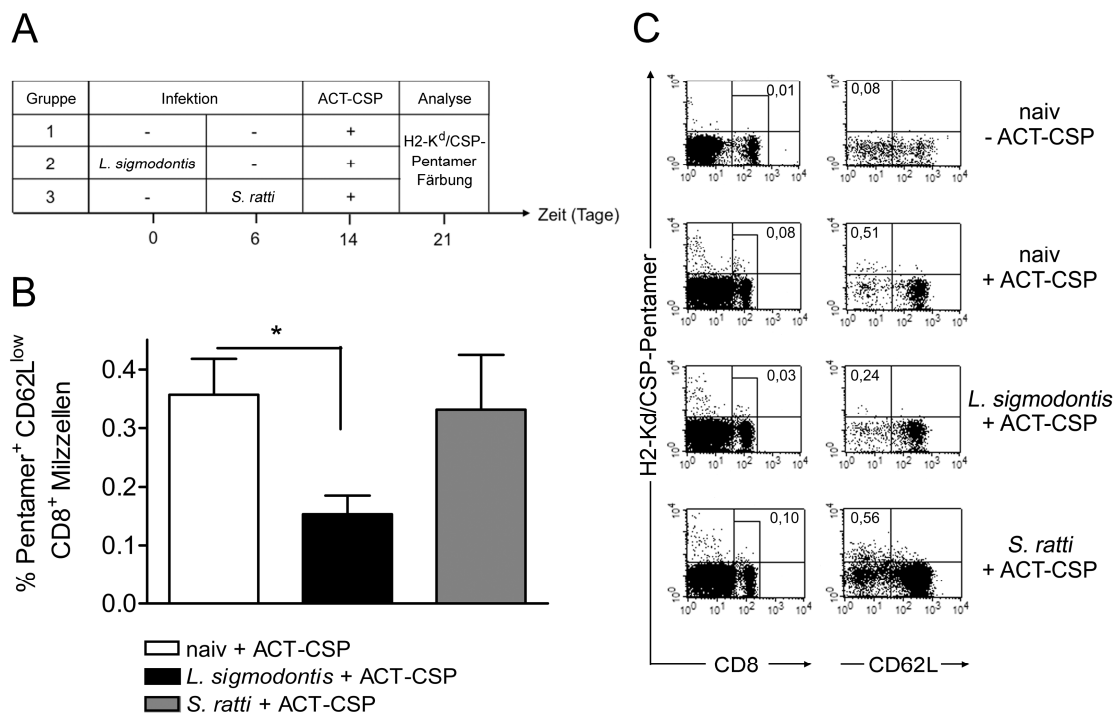


Abb. 5.4.3 Reduzierte Frequenz CSP-spezifischer aktivierter CD8⁺ T-Zellen in den Milzen *L. sigmodontis*-infizierter Mäuse

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis*- (Gr. 2) oder durch subkutane Injektion mit *S. rattii*-iL3 in die Hinterpfote infiziert (Gr. 3). An Tag 14 der *L. sigmodontis*- bzw. an Tag 8 der *S. rattii*-Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP immunisiert. Eine naive Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit ACT-CSP immunisiert (Gr. 1). Sieben Tage nach der Immunisierung wurden Milzzellen präpariert, mit dem H2-K^d/CSP-Pentamer sowie anti-CD8 AK und anti-CD62L AK gefärbt. (B) Das Diagramm fasst die Frequenzen CSP-spezifischer aktivierter (CD62L^{low}) CD8⁺ T-Zellen in den Milzen naiver (weißer Balken), *L. sigmodontis*- (schwarzer Balken) und *S. rattii*-infizierter (grauer Balken) Mäuse zusammen. Die Daten zeigen ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (n=4) als Mittelwerte ± SEM. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*student's t-test*): *p<0.05. (C) Gezeigt sind repräsentative Färbungen von Milzzellen aus einer naiven/nicht-immunisierten (naiv/-ACT-CSP), einer naiven/immunisierten (naiv/+ACT-CSP), einer *L. sigmodontis*-infizierten/immunisierten (*L. sigmodontis*+ACT-CSP) und einer *S. rattii*-infizierten/immunisierten (*S. rattii*+ACT-CSP) Maus. Die vier linken Dot-plot-Diagramme zeigen die H2-K^d/CSP-Pentamer/CD8-Färbung von Gesamtlymphozyten. Die vier rechten Dot-plot-Diagramme zeigen die CD62L H2-K^d/CSP-Pentamer-Färbung von CD8⁺ T-Zellen. Die Zahlen zeigen positive Zellen im Quadranten in Prozent.

In Abb. 5.4.3-C sind repräsentative Färbungen mit dem H2-K^d/CSP-Pentamer, anti-CD8- sowie anti-CD62L AK gezeigt. Milzzellen einer naiven/nicht immunisierten (naiv/-ACT-CSP), einer naiven/immunisierten (naiv/+ACT-CSP), einer *L. sigmodontis*- sowie einer *S. ratti* infizierten/immunisierten Maus (*L. sigmodontis*/+ACT-CSP und *S. ratti*/+ACT-CSP) wurden gefärbt. Abb. 5.4.3-B zeigt die Frequenzen CSP-spezifischer CD8⁺ Milzzellen von naiven, *L. sigmodontis*- und *S. ratti*-infizierten Mäusen nach Vakzinierung. Die Auswertung zeigte, dass in naiven und *S. ratti*-infizierten Mäusen die Frequenzen aktivierter (CD62L^{low}), CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen vergleichbar waren. Im Gegensatz hierzu war der prozentuale Anteil dieser Zellen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen signifikant verringert. Dieses Resultat zeigte, dass eine Infektion mit *L. sigmodontis* die Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen unterdrückte, während die *S. ratti*-Infektion keinen Effekt hatte.

Eine zentrale Funktion von CD8⁺ T-Zellen ist es infizierte Zellen, die ein fremdes Epitop auf ihrem MHC-I-Rezeptor präsentieren, zu erkennen und zu zerstören. Im Folgenden wurde untersucht, ob die beobachtete Reduktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in den Mäusen eine Auswirkung auf die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität hatte. Erneut wurden naive, *L. sigmodontis*- und *S. ratti*-infizierte Mäuse mit ACT-CSP immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurde die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität *in vivo* gemessen (Abb. 5.4.4-A). Hierfür wurden Milzzellen naiver Mäuse isoliert. Eine Hälfte davon wurde mit dem CSP₂₄₅₋₂₅₃-Peptid beladen und mit einer hohen Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE (CSP⁺/CFSE^{high}) markiert, die andere Hälfte der Milzzellen wurde nicht mit dem Peptid beladen und mit einer niedrigen Konzentration CFSE (CSP⁻/CFSE^{low}) markiert. Hoch- und niedrig-markierte Zellen wurden intravenös in die Mäuse transferiert. Dabei stellten CSP⁺/CFSE^{high}-Zellen die Zielzellen für die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität der CD8⁺ Zellen in den immunisierten Empfänger-Mäusen dar. Die Verminderung CSP⁺/CFSE^{high}-Zellen in einer naiven, nicht immunisierten Maus war ein Maß für die antigenunabhängige Lyse. Nach 6 h wurden die Milzzellen der Empfänger-Mäuse isoliert und die Abnahme der CSP⁺/CFSE^{high}-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 5.4.4 –B und -C).

In Abb. 5.4.4-C sind repräsentative durchflusszytometrische Messungen von Milzzellen einer naiven/nicht immunisierten, einer naiven/immunisierten sowie einer *L. sigmodontis*- und einer *S. ratti*-infizierten/immunisierten Maus gezeigt. Dargestellt ist die Anzahl von

CSP⁺/CFSE^{high}- (rechte Kurve) und CSP⁻/CFSE^{low}-Zellen (linke Kurve). Abb. 5.4.4-B zeigt die Auswertung von zwei unabhängigen Messungen für sechs Mäuse pro Gruppe.

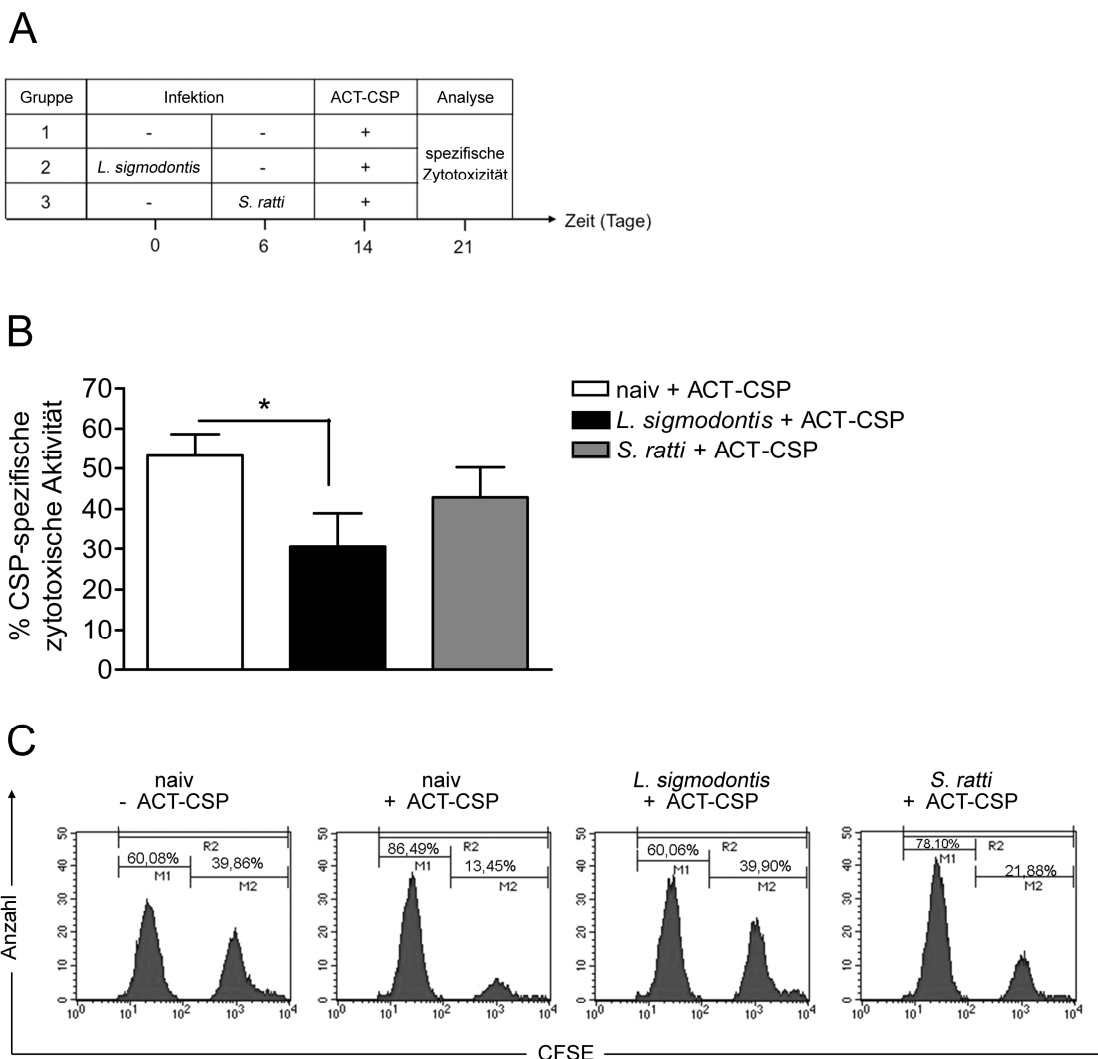


Abb. 5.4.4: Reduzierte CSP-spezifische zytotoxische Aktivität in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis*- (Gr. 2) oder durch subkutane Injektion mit *S. ratti*-iL3 in die Hinterpfote infiziert (Gr. 3). An Tag 14 der *L. sigmodontis*- bzw. an Tag 8 der *S. ratti*-Infektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP immunisiert. Eine naive Kontrollgruppe wurde ebenfalls immunisiert (Gr. 1). 7 Tage nach der Immunisierung wurde die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität in diesen Mäusen bestimmt. (B) Dargestellt ist die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität in Prozent, gemessen in Milzen von naiven (weißer Balken), *L. sigmodontis*- (schwarzer Balken) und *S. ratti*-infizierten (grauer Balken) immunisierten Mäusen. Die Daten zeigen die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=6) als Mittelwerte ± SEM. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen (*student's t-test*): *p<0.05. (C) Gezeigt sind repräsentative Messungen von Milzzellen aus einer naiven/nicht immunisierten (naiv/-ACT-CSP), einer naiven/immunisierten (naiv/+ACT-CSP), einer *L. sigmodontis*-infizierten/immunisierten (*L. sigmodontis*+ACT-CSP) und einer *S. ratti*-infizierten/immunisierten (*S. ratti*+ACT-CSP) Maus. Die Anzahl von CFSE^{low}- und CFSE^{high}-markierten Zellen wurde gemessen und als Prozent der CFSE⁺ Milzzellen ausgewertet.

Die CSP-spezifische zytotoxische Aktivität in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen war, im Vergleich zu naiven, signifikant reduziert. Die zytotoxische Aktivität in *S. ratti*-infizierten

Mäusen war im Vergleich zu naiven Mäusen tendenziell reduziert. Die zytotoxische Aktivität führte zu einer antigenspezifischen Reduktion von CSP⁺/CFSE^{high}-Zellen.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die reduzierte Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen (Abb. 5.4.1, 5.4.2 und 5.4.3) tatsächlich zu einer reduzierten CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität *in vivo* führte, während die *S. rattii*-Infektion keinen signifikanten Effekt auf die gemessenen Parameter hatte.

Schließlich sollte die Frage geklärt werden, ob die reduzierte CSP-spezifische zytotoxische Aktivität in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen einen negativen Effekt auf den Schutz der Mäuse gegenüber einer Infektion mit *P. berghei* hat. Die Detektion der Parasitämie während der Blutphase einer *Plasmodium* spp. Infektion ist die übliche und einfachste Methode, um die Effizienz einer Vakzine zu messen. Allerdings stellt dies keine adäquate Methode dar, wenn die Effizienz von Vakzinierungen untersucht werden soll, die nur einen partiellen Schutz gegenüber der Leberphase vermitteln. Wenn nicht 100 % der infizierten Hepatozyten zerstört werden, gelangen Merozoiten in den Blutstrom. Schon wenige Merozoiten, die sich während der erythrozytären Schizogonie rapide vermehren, reichen aus, um eine Parasitämie zu verursachen. Unterschiede bei der Bekämpfung infizierter Hepatozyten sind dann in der Blutphase nicht mehr messbar. Um die Effizienz einer solchen Vakzine zu messen, eignet sich die Bestimmung der Sporozoitenlast in der Leber infizierter Mäusen mittels qPCR, zu einem frühen Zeitpunkt der *Plasmodium* spp. Infektion [137, 138]. In dem hier verwendeten Modell führte die einmalige Injektion von ACT-CSP zwar zu der Induktion von CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, allerdings reichte die Frequenz dieser Zellen nicht aus, um das Auftreten der Blutphase zu verhindern [81, 82]. Die Parasitenlast sollte deshalb während der Leberphase verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden BALB/c Mäuse entweder mit *L. sigmodontis* infiziert oder naiv belassen. 14 Tage nach der Infektion mit *L. sigmodontis* wurden die Mäuse mit ACT-CSP immunisiert, eine Kontrollgruppe wurde weder infiziert noch mit ACT-CSP immunisiert. Der experimentelle Aufbau ist in Abb. 5.4.5-A dargestellt. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden alle Mäuse durch intravenöse Injektion von 1000 *P. berghei* Sporozoiten infiziert. 30 h nach der Infektion wurde die Gesamt-RNA aus den Lebern der Mäuse isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend eine qPCR zur Bestimmung der relativen Sporozoitenlast durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da 30 h nach der Infektion bereits Parasiten in der Leber nachgewiesen werden können, es jedoch noch

keine Blutphase der Plasmodien gibt. Erst etwa 44 h nach einer Infektion mit Sporozoiten kommt es zur Ruptur der Schizonten in der Leber und zu einer detektierbaren Parasitämie im Blut der Mäuse [139].

Abb. 5.4.5-B zeigt, dass die relative Konzentration der *P. berghei* 18S rRNA in naiven immunisierten Mäusen im Vergleich zu nicht-immunisierten Mäusen tendenziell verringert war ($p=0,0743$). Es ist wahrscheinlich, dass diese tendenzielle Reduktion durch die einmalige Injektion von ACT-CSP hervorgerufen wurde, die einen partiellen Schutz gegen die Leberphase vermittelte. Im Vergleich dazu war die relative Konzentration der *P. berghei* 18S rRNA in Mäusen mit *L. sigmodontis*-Infektion leicht erhöht und eher mit der Parasitenlast der nicht-immunisierten Gruppe vergleichbar ($p=0,3628$).

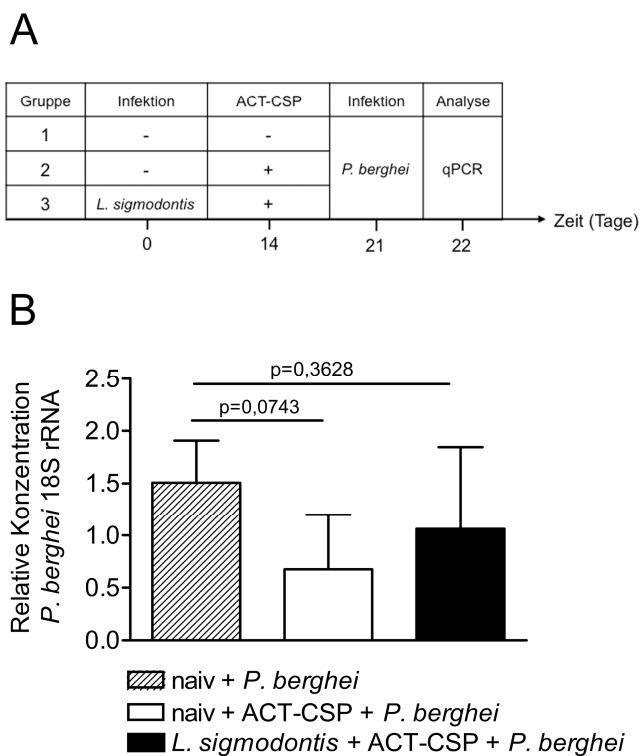


Abb. 5.4.5 Messung der relativen Parasitenlast in den Milzen *P. berghei*-infizierter Mäuse mittels qPCR

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis* infiziert oder naiv belassen. Naive sowie 14 Tage mit *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion mit ACT-CSP immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 1000 *P. berghei*-Sporozoiten durch intravenöse Injektion infiziert. Eine naive/nicht-immunisierte Kontrollgruppe wurde ebenfalls infiziert. 30 h nach der Infektion wurden die Lebern der Mäuse isoliert und die relative *P. berghei* Sporozoitenlast mittels spezifischer qPCR bestimmt. (B) Das Diagramm fasst die relative Konzentration der *P. berghei* 18S rRNA in den Lebern von naiven/nicht-immunisierten (gestreifter Balken), naiven/immunisierten (weißer Balken) und *L. sigmodontis*-infizierten/immunisierten (schwarzer Balken) Mäusen zusammen. Die Daten zeigen die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Experimenten (n=9) als Mittelwerte \pm SEM.

Diese Resultate wurden in drei unabhängigen Experimenten reproduziert, zeigten jedoch aufgrund großer Varianzen innerhalb der Gruppen bei 9 unterschiedlichen Individuen noch keine Signifikanzen. Trotzdem wiesen die Resultate klar darauf hin, dass *L. sigmodontis* auch den ACT-CSP vermittelten Schutz stören konnte.

Zusammenfassend zeigt dieser Abschnitt, dass eine Infektion mit dem Nematoden *S. ratti* keinen Einfluss auf die Effizienz einer Immunisierung mit ACT-CSP hat. Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit *L. sigmodontis* zu einer verminderten Frequenz induzierter CSP-spezifischer zytotoxischer T-Zellen, einer verminderten CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität *in vivo* sowie zu einer tendenziell erhöhten relativen Parasitenlast in den Lebern vakzinierter Mäuse nach einer *P. berghei*-Infektion.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob der negative Einfluss einer *L. sigmodontis*-Infektion auch bei einem verbesserten Vakzinierungsprotokoll gegen die Leberphase von *P. berghei* erhalten bleibt.

5.4.2 Einfluss einer vorliegenden *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz einer heterologen *prime/boost*-Immunisierung

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass eine Infektion mit der pathogenen Nagtierfilarie *L. sigmodontis* die Effizienz einer Immunisierung mit ACT-CSP in BALB/c Mäusen beeinträchtigt. S. Tartz *et al.* haben gezeigt, dass die Immunisierung mit einer Injektion ACT-CSP zwar CSP-spezifische CD8⁺ Zellen induziert, diese jedoch nicht ausreichen, um die Leberphase vollständig zu bekämpfen, und so einen Schutz gegen die Blutphase des Parasiten zu etablieren [81, 82]. Im Folgenden wurde der Einfluss einer *L. sigmodontis*-Infektion auf ein verbessertes Immunisierungsprotokoll, die heterologe *prime/boost*-Immunisierung gegen CSP, untersucht. Da die Infektion mit *S. ratti* keinen Einfluss auf die Effizienz der ACT-CSP Immunisierung zeigte (Kapitel 5.4.1), wurde die *S. ratti*-Infektion in diesem Abschnitt nicht weiter untersucht. In Abb. 5.4.6-A ist das Immunisierungsprotokoll dargestellt. BALB/c Weibchen wurden durch infizierte Milben mit *L. sigmodontis* infiziert, und an Tag 14 der Infektion wurde mit dem Immunisierungsprotokoll begonnen (Abb. 5.4.6-B). *L. sigmodontis*-infizierte und naive Kontrollmäuse (Abb. 5.4.6-A) wurden dreimal, an Tag 0, 3 und 7, bzw. an Tag 14, 17 und 21 der Wurminfektion, mit je 5×10^8 Salmonellen oral immunisiert.

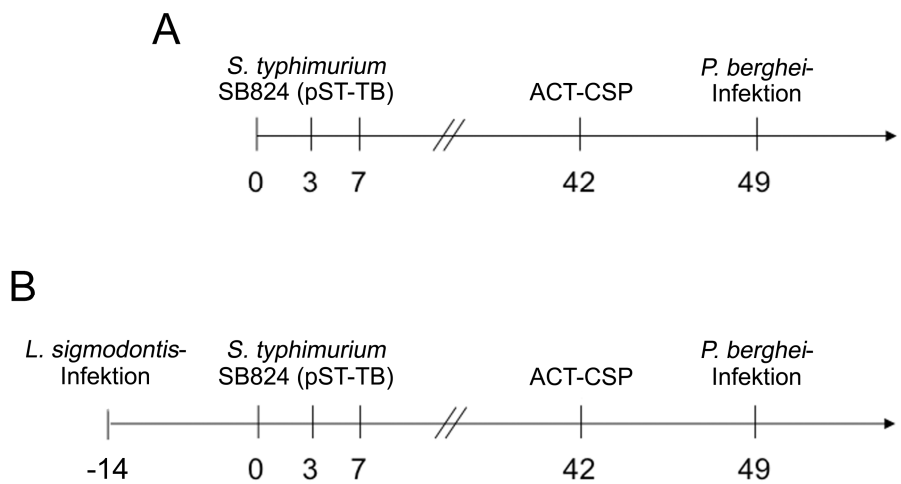


Abb. 5.4.6: Zeitlicher Ablauf der heterologen *prime/boost*-Immunisierung mit nachfolgender *P. berghei*-Infektion.

(A) 8 Wochen alte BALB/c Weibchen wurden an Tag 0, 3 und 7 mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral immunisiert. Fünf Wochen nach der letzten Salmonella-Gabe wurde eine *boost*-Immunisierung durchgeführt bei der den Mäusen intraperitoneal 20 µg ACT-CSP injiziert wurden. 7 Tage nach der *boost*-Immunisierung wurden die Mäuse mit 1000 *P. berghei* Sporoziten infiziert. (B) Acht Wochen alte BALB/c Weibchen wurden durch infizierte Milben mit *L. sigmodontis* infiziert. 14 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse wie in (A) beschrieben immunisiert und anschließend mit *P. berghei* infiziert. Als Kontrollgruppe dienten in jedem Versuch naive/nicht-immunisierte BALB/c Mäuse, die mit *P. berghei* infiziert wurden.

Nach 5 Wochen (dies entsprach Tag 42 bei naiven und Tag 56 bei *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen) wurden den Mäusen 20 µg ACT-CSP intraperitoneal injiziert.

Die Effizienz der Immunisierung wurde an zwei verschiedenen Zeitpunkten, 14 Tage nach der letzten Salmonella-Gabe (Abb. 5.4.7) und 6 Tage nach der *boost*-Immunisierung mit ACT-CSP (Abb. 5.4.8) überprüft. Hierfür wurde die CSP-spezifische T-Zellantwort mittels einer intrazellulären TNF- α -/IFN- γ -Färbung sowie einer H2-K^d/CSP-Pentamer-Färbung quantifiziert. Als Kontrolle wurden Blutproben von naiven und unvakzinierten BALB/c Mäusen parallel gefärbt. In Abb. 5.4.7 sind die Ergebnisse für die intrazelluläre Zytokin- (Abb. 5.4.7-B) und die Pentamerfärbung (Abb. 5.4.7-C) von Blutlymphozyten dargestellt. Sowohl im Blut naiver, als auch *L. sigmodontis*-infizierter Mäuse waren, nach einer dreimaligen Immunisierung mit Salmonellen, CSP-spezifische IFN- γ -/TNF- α -produzierende CD8⁺ T-Zellen sowie H2-K^d/CSP-Pentamer⁺ CD8⁺ Zellen messbar. Diese Zellen waren nicht im Blut naiver, unvakzinierten Mäuse nachweisbar (Abb. 5.4.7-B und -C). Die *L. sigmodontis*-Infektion verminderte die Frequenz dieser Zellen nicht, ihre Frequenz war interessanterweise sogar tendenziell erhöht.

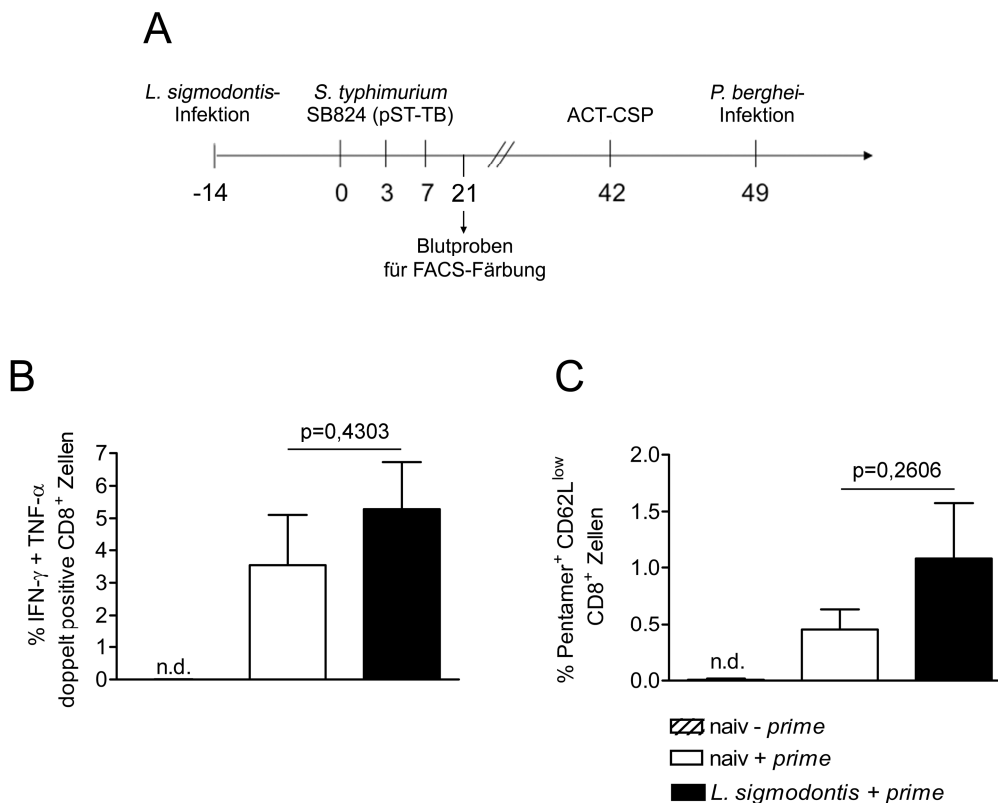


Abb. 5.4.7: Die CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in *L. sigmodontis*-infizierten und naiven BALB/c Mäusen nach *prime*-Immunsierung mit rekombinanten Salmonellen

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis* infiziert oder naiv belassen. Naive und 14 Tage mit *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse wurden dreimal mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral immunisiert (*prime*). 14 Tage nach der letzten Salmonella-Gabe wurde den Mäusen durch Punktion der Schwanzvene Blut abgenommen. (B) Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurden mit dem CSP-Peptid₂₄₅₋₂₅₃ stimuliert, dann extrazellulär mit anti-CD8 AK und anschließend intrazellulär mit anti-IFN- γ - und anti-TNF- α -AK gefärbt. Der prozentuale Anteil CSP-spezifischer IFN- γ -/TNF- α -produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurden mit dem H2-K^d/CSP-Pentamer sowie mit anti-CD8- und anti-CD62L-AK gefärbt und anschließend die Frequenz aktivierter CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse für naive/nicht-immunisierte- (gestreifter Balken), naive/immunisierte- (weißer Balken) sowie *L. sigmodontis*-infizierte/immunisierte Mäuse (schwarzer Balken) aus einem repräsentativen, von zwei unabhängigen Experimenten (n=6).

Das Vakzinierungsprotokoll wurde fortgeführt (Abb. 5.4.6) und die CSP-spezifische T-Zellantwort wurde an Tag 6 nach der *boost*-Immunsierung mit ACT-CSP kontrolliert (Abb. 5.4.8-A bis -C). Erneut wurden die Frequenzen CSP-spezifischer IFN- γ -/TNF- α -produzierender (Abb. 5.4.8-B) und H2-K^d/CSP-Pentamer-positiver, aktivierter CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.4.8-C) gemessen. Auch 6 Tage nach der *boost*-Immunsierung mit ACT-CSP war kein signifikanter Unterschied zwischen naiven und *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen messbar. In beiden Gruppen hatte sich die Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen erhöht. Im Gegensatz zu der Messung nach der *prime*-Immunsierung mit

rekombinanten Salmonellen (Abb. 5.4.7-B und -C) war die Frequenz in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen nicht mehr erhöht, sondern tendenziell verringert.

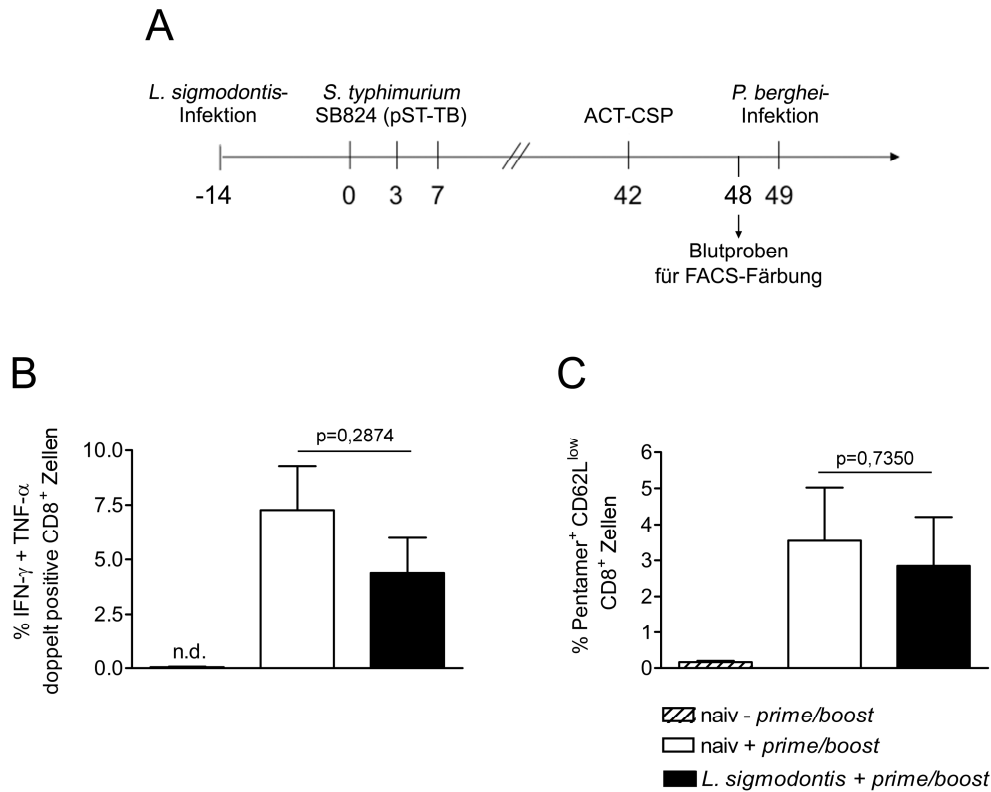


Abb. 5.4.8: Die CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in *L. sigmodontis*-infizierten und naiven BALB/c Mäusen nach einer prime/boost-Immunsierung mit rekombinanten Salmonellen und ACT-CSP

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis* infiziert oder naiv belassen. Naive und 14 Tage mit *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse wurden dreimal mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral immunisiert (prime). Fünf Wochen nach der letzten Salmonella-Gabe wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 20 μ g ACT-CSP zum zweiten Mal immunisiert (boost). 6 Tage nach der boost-Immunsierung wurde den Mäusen durch Punktion der Schwanzvene Blut abgenommen. (B) Die Lymphozyten im peripheren Blut wurden mit dem CSP-Peptid₂₄₅₋₂₅₃ stimuliert, extrazellulär mit anti-CD8- und intrazellulär mit anti-IFN- γ - und anti-TNF- α -AK gefärbt. Der prozentuale Anteil CSP-spezifischer IFN- γ /TNF- α -produzierender CD8⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Zellen aus dem peripheren Blut der Mäuse wurden mit dem H2-K^d/CSP-Pentamer sowie mit anti-CD8- und anti-CD62L-AK gefärbt und anschließend die Frequenz aktivierter CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse für naive/nicht-immunisierte- (gestreifter Balken), naive/immunisierte- (weißer Balken) sowie *L. sigmodontis*-infizierte/immunisierte Mäuse (schwarzer Balken) aus einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten (n=6).

Die tendenzielle Erhöhung der Frequenzen CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach der prime-Immunsierung von *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen (Abb. 5.4.7-B und -C) könnte eine erhöhte Suszeptibilität dieser Mäuse gegenüber den Salmonellen reflektieren. Die *Salmonella*-Immunsierung hätte durch eine verlängerte Persistenz in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen effektiver wirken können, so dass nachteilige Effekte der Wurminfektion auf die Vakzinierungseffizienz maskiert worden wären. Dies wurde

ausgeschlossen indem die Dauer des Salmonellen-Ausstoßes im Stuhl immunisierter naiver und *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c Mäuse gemessen wurde. Die Salmonellen und das pST-TB-Plasmid wurden mittels zwei verschiedener PCR-Reaktionen nachgewiesen. Es war kein Unterschied in der Persistenz von *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) messbar (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die heterologe *prime/boost*-Immunsierung eine deutlich höhere Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induzierte, als eine einmalige Immunsierung mit ACT-CSP (Abb. 5.4.2-B und Abb. 5.4.3-B). Eine vorliegende Infektion mit *L. sigmodontis* führte zu keiner signifikanten Suppression dieser CSP-spezifischen T-Zellen.

Die *prime/boost*-Immunsierung vermittelt einen 80-100 %igen Schutz gegenüber einer *P. berghei*-Infektion [82]. Obwohl die Infektion mit *L. sigmodontis* nur einen tendenziellen Einfluss auf die Induktion CSP-spezifischer Zellen durch eine *prime/boost*-Immunsierung hatte, war es möglich, dass der Schutz gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit *P. berghei* verändert war.

Tab. 5.4-1: Schutz gegenüber einer *P. berghei*-Infektion in naiven und *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen nach einer heterologen *prime/boost*-Immunsierung

Naive oder 14 Tage mit *L. sigmodontis*-infizierte BALB/c Mäuse wurden zunächst dreimal mit je 5 x 10⁸ *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral immunisiert (*prime*). Nach 5 Wochen erfolgte eine zweite Immunsierung durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP (*boost*). 7 Tage nach der Immunsierung mit ACT-CSP wurden die Mäuse mit je 1000 *P. berghei* Sporozoiten intravenös infiziert. Eine Kontrollgruppe, die keine Vakzine erhalten hatte, wurde ebenfalls infiziert. Der Verlauf der Parasitämie wurde anhand von *Wright's stain*-gefärbten Blutaussstrichen verfolgt. Mäuse, die an Tag 14 der Infektion noch keine Parasitämie im Blut aufwiesen wurden als geschützt angesehen. Dargestellt ist eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten (n=12).

<i>L. sigmodontis</i> - Infektion	Immunsierung	Anzahl infizierter Tiere/Gesamtzahl	% Schutz
-	-	12/12	0
-	<i>prime/boost</i>	2/12	83,33
+	<i>prime/boost</i>	1/12	91,66

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob sowohl naive als auch *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse die normalerweise tödliche Infektion mit *P. berghei* erfolgreich bekämpfen. Hierfür wurden die Mäuse 7 Tage nach der *boost*-Immunsierung mit ACT-CSP durch intravenöse Injektion von 1000 *P. berghei* Sporozoiten infiziert und die Parasitämie anschließend anhand von Blutaussstrichen verfolgt (Abb. 5.4.6-A). Mäuse, die

14 Tage nach der Infektion keinen Parasitämie im Blut aufwiesen, wurden als geschützt angesehen. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind in Tab. 5.4-1 zusammengefasst. Während sich in allen nicht-immunisierten Kontrollmäuse eine Parasitämie entwickelte, führte die heterologe *prime/boost*-Immunsierung bei 83,33 % der Mäuse zu einer sterilen Immunität. Mäuse mit einer *L. sigmodontis*-Infektion waren zu 91,66 % gegen eine *P. berghei*-Infektion geschützt. Die Infektion mit *L. sigmodontis* führte also zu keiner signifikanten Veränderung des Impfschutzes. Die Mäuse bei denen eine Parasitämie im Blut nachgewiesen wurde, zeigten keine Unterschiede in der Höhe, unabhängig davon, ob sie naiv und nicht immunisiert, naiv und immunisiert oder mit *L. sigmodontis*-infiziert und immunisiert waren (Abb. 5.4.9-B).

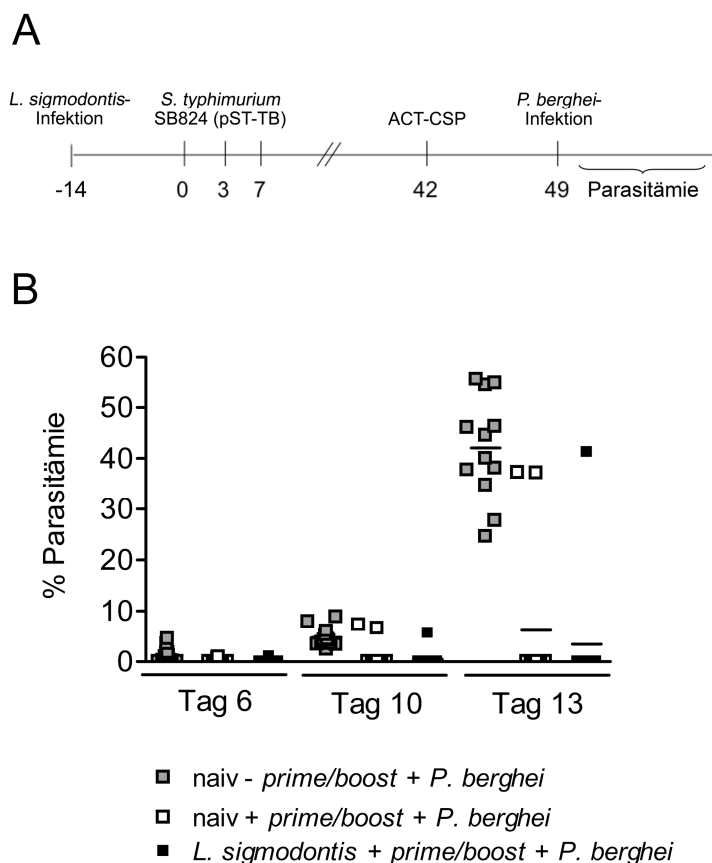


Abb. 5.4.9: Unveränderte Parasitämiebelastung im Blut von nicht-immunisierten und immunisierten naiven und *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen nach der Infektion mit *P. berghei*

(A) zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. Weibliche 8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden entweder durch Milben mit *L. sigmodontis* infiziert oder naiv belassen. Naive und 14 Tage mit *L. sigmodontis*-infizierte Mäuse wurden dreimal mit 5×10^8 *S. typhimurium* SB824 (pST-TB) oral immunisiert (*prime*), nach fünf Wochen erfolgte die Zweit-Immunsierung durch intraperitoneale Injektion von 20 µg ACT-CSP (*boost*). 7 Tage nach der Gabe von ACT-CSP erfolgte die Infektion mit 1000 *P. berghei* Sporozoiten durch intravenöse Injektion. Eine Kontrollgruppe wurde nicht immunisiert, sondern nur mit *P. berghei* infiziert. (B) Der Verlauf der Parasitämie wurde zu den angegebenen Zeitpunkten anhand *Wright's stain*-Färbungen von Blutausstrichen verfolgt. Jeder Messwert repräsentiert eine Maus, dargestellt sind die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=12).

Die Resultate zeigen, dass eine vorliegende Infektion mit *L. sigmodontis* keinen Einfluss auf den vermittelten Schutz einer *prime/boost*-Immunisierung hatte. Weder die Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, noch der Schutz gegenüber einer nachfolgenden *P. berghei*-Infektion war signifikant verändert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine *L. sigmodontis*-Infektion die Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen verringert, wenn die Mäuse nur einmal mit ACT-CSP immunisiert werden. Dies spiegelt sich anschließend in einer tendenziell erhöhten Parasitenlast in der Leber der Mäuse wieder, wenn sie nach der Immunisierung mit *P. berghei* infiziert werden. Im Gegensatz dazu hat die *L. sigmodontis*-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der verbesserten heterologen *prime/boost*-Immunisierung mit Salmonellen und ACT-CSP. Damit übereinstimmend wird der Schutz gegenüber einer *P. berghei*-Infektion durch *L. sigmodontis* nicht beeinträchtigt.

6 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine vorliegende Wurminfektion auf das Immunsystem der Maus auswirkt. Im Fokus stand die Frage, ob und wie die Immunantwort gegenüber Koinfektionen und Vakzinierungen verändert wird.

6.1 Die Infektion von Mäusen mit *S. ratti* als natürlicher Th2-Stimulus für das Immunsystem

In dieser Arbeit wurde die Infektion von Mäusen mit *S. ratti* als Modell für eine humane Nematodeninfektion verwendet. Hierfür war eine genaue Kenntnis des Infektionsverlaufs und der Immunantwort notwendig (siehe Kapitel 5.1). Der Verlauf einer *S. ratti*-Infektion in Mäusen wurde mittels *S. ratti*-spezifischer qPCR verfolgt. Der maximale Ausstoß von *Strongyloides*-DNA im Stuhl der Mäuse wurde zwischen Tag 6 und Tag 8 der Infektion gemessen. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein, bei denen der Infektionsverlauf in Mäusen durch das Auszählen von Larven im Stuhl verfolgt wurde [26, 140]. Anschließend nahm der Ausstoß von *Strongyloides*-DNA bis zum Tag 12 der Infektion rapide ab, bis die Infektion spätestens an Tag 30-40 erfolgreich von den Mäusen bekämpft wurde (Abb. 5.1.1-B, Abb. 5.2.4-B, Abb. 5.2.5-B). Während einer Reinfektion mit *S. ratti* ergab sich ein vergleichbarer Infektionsverlauf, bei dem der maximale Larvenausstoß weniger als 20 % des Maximums der Primärinfektion betrug (Abb. 5.1.1-B). Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die eine Teil-Resistenz der Mäuse gegenüber einer *S. ratti*-Reinfektion beschreiben [25, 26].

Sowohl im Menschen, als auch in Nagetieren wurde die Induktion einer Th2-Immunantwort während *Strongyloides*-Infektionen beschrieben [23, 141-143]. Diese Th2-Immunantwort hat einen schützenden Charakter und spielt eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung einer *Strongyloides*-Infektion. So führt die Verabreichung von IL-27, einem Zytokin das Th1-Immunantworten verstärkt und Th2-Immunantworten abschwächt, zu einer verlängerten *Strongyloides venezuelensis*-Infektion [144]. Damit übereinstimmend führt das Fehlen von IL-12, einem Zytokin das Th1-Immunantworten fördert, zu einer verstärkten Th2-Immunantwort, sowie einer schnelleren Bekämpfung von *S. venezuelensis* in IL-12 defizienten Mäusen [141].

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Immunantwort an Tag 7 der Primär- und Sekundärinfektion untersucht. Sowohl in den drainierenden mLK, als auch systemisch in der Milz,

war eine Th2-Immunantwort messbar (Abb. 5.1.2-B und -C). Auch andere Studien beschreiben eine starke Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-10 oder IL-13 im Dünndarm sowie im Lungenparenchym von Mäusen an Tag 7 einer *S. venezuelensis*-Primärinfektion [141, 142]. Eine Kinetik der Immunantwort zeigte, dass die Th2-Immunantwort den Verlauf des Larvenausstoßes widerspiegelt [28].

Während der Th2-Immunantwort war die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ , sowohl in den Milzen als auch in den mesLK *S. ratti*-infizierter Mäuse, nach Stimulation mit anti-CD3 AK deutlich supprimiert (Abb. 5.1.2-B und -C). Dieses Ergebnis stellte sich als ein typisches Merkmal der Immunantwort gegen *S. ratti* heraus [28]. Die Infektion von Mäusen mit dem Darmparasiten *Heligmosomoides polygyrus* führt ebenfalls zu einer Suppression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17. Diese Suppression wird durch IL-10 verursacht, denn die Blockade von IL-10 stellt die IFN- γ Produktion wieder her [145, 146]. IL-10 wird nicht nur von Th2-Zellen, sondern auch von Tregs produziert und stellt einen immunsupprimierenden Mechanismus dar, der den Wirt vor einer überschießenden Immunantwort schützt [147, 148]. Die Suppression von IFN- γ während der *S. ratti*-Infektion korreliert ebenfalls mit der Produktion von IL-10 (Abb. 5.1.2; [28]). Da die IL-10 Produktion und der Wurmausstoß während der *S. ratti*-Infektion gleichzeitig ihr Maximum erreichen [28], könnte dieses eine Nematoden-induzierte Modulation des Immunsystems reflektieren [149, 150].

Die antigenspezifische Stimulation von Milz- und mesLK-Zellen mit *S. ratti*-Lysat führte zur Produktion von IL-10 in *S. ratti*-infizierten Mäusen, während das klassische Th2-Zytokin IL-4 nur in geringem Ausmaß von Milzzellen produziert wurde (Abb. 5.1.2-B und -C). Zwar wurde auch in *S. ratti*-infizierten Ratten die Produktion von IL-4 in den mesLK nach Stimulation mit *S. ratti*-Antigen beschrieben [23], aber die Rolle von IL-4 bei der Bekämpfung von *Strongyloides*-Infektionen ist unklar. Das Fehlen von IL-4 in IL-4-defizienten Mäusen führt kaum zu einer Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber einer *S. ratti*-Infektion [151]. Allerdings ist die IL-4 Rezeptor α -Kette (IL-4R α) für eine schnelle Bekämpfung von *S. venezuelensis* in Mäusen essentiell [142]. Die kinetische Analyse der Immunantwort *S. ratti*-infizierter Mäuse zeigte, dass nicht die Produktion von IL-4, sondern die eines anderen Th2-Zytokins, IL-13, charakteristisch für die *S. ratti*-Infektion ist [28]. Hierzu passt, dass die Rezeptoren für IL-4 und IL-13 ihre Signale beide über die IL-4R α Kette vermitteln [152, 153]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde aus diesem Grund nicht IL-4 als charakteristisches Th2-Zytokin der *S. ratti*-induzierten Th2-Immunantwort gemessen, sondern IL-13.

Es wurde zu keinem Zeitpunkt eine signifikante IFN- γ Produktion nach Stimulation mit *S. ratti* Antigen gemessen.

Ein häufiger Kritikpunkt bei der Verwendung von murinen *S. ratti*-Infektionen als Infektionsmodell ist, dass nicht Mäuse, sondern Ratten (*Rattus norvegicus*) die natürlichen Wirte für diesen Erreger sind [15]. An dieser Stelle soll betont werden, dass der Infektionsverlauf und die Immunantwort in Mäusen und Ratten vergleichbar sind. Auch in Ratten wird eine *S. ratti*-Primärinfektion innerhalb von 20-40 Tagen durch eine Th2-Immunantwort kontrolliert, und führt zu einer Teil-Resistenz gegenüber einer *S. ratti*-Reinfektion [23, 27].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die Infektion von Mäusen mit *S. ratti* zu einer patenten Infektion führt, die von den Mäusen durch eine klassische Th2-Immunantwort kontrolliert wird. Die Intensität der Immunantwort korreliert mit der Wurmlast und ist nicht nur in den drainierenden mesLK, sondern auch auf systemischer Ebene in Milzzellen messbar [28]. Die in Kapitel 5.1 dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in C57BL/6 Mäusen durchgeführt, die Ergebnisse für BALB/c Mäuse sind vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Die Infektion mit *S. ratti* wurde in dieser Arbeit als Modell für einen natürlichen und systemischen Th2-Stimulus genutzt, wie er auch im Menschen durch Wurminfektionen induziert werden kann [116]. Im zweiten und dritten Abschnitt der Arbeit wird der Einfluss einer solchen Th2-Polarisierung auf die Immunantwort gegenüber Koinfektionen im Mausmodell beschrieben.

6.2 Der Einfluss einer *S. ratti*-Infektion auf die Immunantwort der Maus gegenüber Koinfektionen mit pathogenen Protozoen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen einer Koinfektion mit zwei Parasiten untersucht, für deren erfolgreiche Bekämpfung jeweils eine Th2- bzw. eine Th1-Immunantwort erforderlich sind. Hierfür wurden zwei verschiedene Koinfektionen im Mausmodell etabliert: die Koinfektion mit *S. ratti* und *L. major* und die Koinfektion mit *S. ratti* und *P. yoelii*. Der Krankheitsverlauf und die Immunantworten in koinfizierten Mäusen wurden untersucht und mit denen in einzeln infizierten Mäusen verglichen.

6.2.1 Infektionsverlauf und Immunantwort bei einer *S. ratti*-/*L. major*-Koinfektion

Für die erfolgreiche Bekämpfung einer *L. major*-Infektion ist die Ausbildung einer IFN- γ basierten Th1-Immunantwort zentral [8]. Die Auswirkung einer etablierten *S. ratti*-spezifischen Th2-Immunantwort auf die Bekämpfung einer *L. major*-Infektion wurde in C57BL/6 Mäusen untersucht.

Eine vorliegende *S. ratti*-Infektion behinderte weder die Kontrolle einer hoch-, noch einer niedrig dosierten *L. major*-Infektion in C57BL/6 Mäusen. Die Ausbildung einer schützenden Gedächtnis-T-Zell-Antwort in koinfizierten Mäusen war ebenfalls nicht verändert (Abb. 5.2.1-B, -D). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde weder die lokale *L. major*-spezifische Th1-Immunantwort in den popLK (Abb. 5.2.2-D, -E), noch die systemische humorale Immunantwort, das heißt *L. major*-spezifisches Ig im Serum (Abb. 5.2.3), durch eine *S. ratti*-Koinfektion supprimiert. Hingegen zeigten popLK-Zellen koinfizierter Mäuse eine erhöhte Proliferation und IFN- γ Produktion nach Stimulation mit anti-CD3 AK und Leishmanien-Antigen. Des Weiteren wurde eine spontane Proliferation und Zytokinsekretion in Abwesenheit von Stimulanzen in den popLK-Zellen koinfizierter Mäuse beobachtet. Dieses spricht für eine generalisierte Aktivierung der Lymphozyten in koinfizierten Mäusen (Abb. 5.2.2-D, -E).

Obwohl die *L. major*-Infektion lokal im Fuß an der Inokulationsstelle verbleibt und die adulten *S. ratti* Weibchen im Dünndarm der Maus parasitieren, wird in dem hier verwendeten Koinfektionsmodell keine kompartmentalisierte Immunantwort gegen Parasiten an verschiedenen Orten im Körper untersucht, wie es bei der Koinfektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. sigmodontis* und *L. major* der Fall ist [107]. Da beide Infektionen in denselben Fuß der Mäuse erfolgten, drainierten die untersuchten popLK Gewebe, in dem sowohl *L. major*-Parasiten, als auch migrierende *S. ratti*-Larven im Verlauf der Koinfektion vorhanden waren. In den popLK-Zellen *S. ratti*-/*L. major*-koinfizierter Mäuse dominierte offenbar die *L. major*-spezifische Th1-Immunantwort.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wurde auch in *Nippostrongylus brasiliensis* infizierten C57BL/6 Mäusen die effiziente Bekämpfung einer *L. major*-Koinfektion beschrieben, obwohl die Wurminfektion eine Th2-Immunantwort induziert [154]. Eine unveränderte, oder sogar beschleunigte Bekämpfung von *L. major* wurde in C57BL/6 Mäusen beschrieben, die vorher mit *L. sigmodontis* infiziert worden waren [107]. Des Weiteren wurde eine erhöhte IFN- γ Produktion nach Stimulation mit *L. major*-Antigen, sowie in Abwesenheit von Stimulanzen, in *L. sigmodontis*-/*L. major*-koin-

fizierten Mäusen beschrieben. Diese Ergebnisse sind mit der, in dieser Arbeit beobachteten, erhöhten proinflammatorischen Immunantwort in den popLK von *S. ratti*-/*L. major*-koinfizierten Mäusen vergleichbar (Abb. 5.2.2-D, -E). Während die *L. sigmodontis*-Infektion in BALB/c Mäusen dauerhaft ist, kommt es in C57BL/6 Mäusen nicht zu einer patenten Infektion, da die L4 sich nie zu fortpflanzungsfähigen Adulten entwickeln [32, 35]. Die Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. sigmodontis* ähnelt, bezüglich der transienten Natur, dem verwendeten *S. ratti*-Koinfektionsmodell. Im Gegensatz dazu, repräsentiert *S. mansoni* eine chronische Helminthen-Infektion, die Immunantworten gegenüber unbeteiligten Antigenen in verschiedenen Koinfektions- und Autoimmunerkrankungsmodellen beeinflusst [155, 156]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine bereits vorliegende *S. mansoni*-Infektion Th1-Immunantworten supprimiert, und so die Bekämpfung von *L. major* [157] und *L. donovani* [158] in C57BL/6 Mäusen beeinträchtigt. Auch die chronische Infektion von BALB/c Mäusen mit dem Bandwurm *Taenia crassiceps* führt bei einer nachfolgenden *L. major*- oder *L. mexicana*-Koinfektion zu vergrößerten Läsionen [108]. In einer Studie die eine effiziente Bekämpfung von *L. major* in *S. mansoni*-infizierten C57BL/6 und BALB/c Mäusen zeigt, wird eine sehr hoch dosierte *L. major*-Infektion verwendet (4×10^7 Promastigote anstatt der üblichen 3×10^6), die trotz der vorhandenen chronischen Wurminfektion als ein sehr starker Th1-Stimulus fungieren könnte [107, 154, 159].

Bezüglich eines umgekehrten Einflusses der *L. major*-Infektion auf die Immunantwort der Maus gegen *S. ratti*, wurde eine Suppression der lokalen *S. ratti*-spezifischen Th2-Immunantwort beobachtet. Überraschenderweise war diese Suppression schon am zweiten Tag der nachfolgenden *L. major*-Koinfektion in den mesLK messbar (Abb. 5.2.2-B), während eine vorangegangene, bereits 14 Tage andauernde, *L. major*-Infektion keinerlei Einfluss hatte (Abb. 5.2.6-B bis -E). Das zeigt deutlich, dass die Etablierung einer schützenden lokalen *S. ratti*-spezifischen Th2-Immunantwort nicht beeinträchtigt wird, wenn Mäusen mit einer vorliegenden *L. major*-induzierten Th1-Immunantwort koinfiziert werden. Die *S. ratti*-spezifische Th2-Immunantwort in den mesLK ist kurzlebig und beginnt ab Tag 8 der Infektion wieder abzuklingen [28]. Die *L. major*-Koinfektion an Tag 6 der *S. ratti*-Infektion, hat die Abnahme der wurmspezifischen Th2-Immunantwort beschleunigt. Dieses führte in der Konsequenz zu der beobachteten Suppression der Th2-Immunantwort an Tag 2 der *L. major*-Koinfektion (Abb. 5.2.2-B). Von besonderem Interesse war hier, dass eine lokale Infektion wie *L. major*, die in C57BL/6 Mäusen

üblicherweise auf die drainierenden Lymphknoten (popLK) beschränkt ist [8], einen systemischen Einfluss hatte, indem sie die Immunantwort in den mesLK veränderte. Interessant war auch, dass die reduzierte *S. ratti*-spezifische Immunantwort, während der *L. major*-Koinfektion, für die erfolgreiche Bekämpfung der Wurminfektion ausreichte (Abb. 5.2.4).

Im Gegensatz hierzu führt die artifizielle Modulation einer *Strongyloides*-induzierten Th2-Polarisierung zu einer beeinträchtigten Wurmabwehr. Eine artifizielle Th1-Polarisierung in IL-27 transgenen Mäusen [144], sowie in Mäusen die mit rekombinanten IL-12 behandelt wurden [160], erhöht die Wurmlast während einer *Strongyloides*-Infektion. Auch das Fehlen einer effizienten Th2-Immunantwort in IL-5 defizienten Mäusen [161, 162], oder während einer IL-5 Neutralisierung [163, 164], führt zu einer verschlimmerten *Strongyloides*-Infektion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen also, dass die natürliche Modulation einer Nematoden-spezifischen Th2-Immunantwort, wie in unserem Modell, eine schützende Immunantwort des Wirtes weniger beeinflusst, als eine artifiziell herbeigeführte Modulation.

6.2.2 Infektionsverlauf und Immunantwort bei einer *S. ratti*-/*P. yoelii*-Koinfektion

Für die Kontrolle einer *Plasmodium* spp.-Infektion spielt die Ausbildung einer IFN- γ basierten Th1-Immunantwort eine entscheidende Rolle [55, 62, 63]. Um zu untersuchen, ob die *S. ratti*-induzierte Th2-Immunantwort generell keinen Einfluss auf die Entstehung von Th1-Immunantworten hat, oder ob dies nur ein Phänomen war, dass sich auf die Koinfektion mit *L. major* beschränkte, wurde eine *S. ratti*-/*P. yoelii*-Koinfektion in C57BL/6 und in BALB/c Mäusen untersucht.

Die Ergebnisse der Koinfektion von C57BL/6 Mäusen mit *S. ratti* und *P. yoelii* waren mit Daten aus dem *S. ratti*-/*L. major*-Koinfektionsmodell vergleichbar. Der Krankheitsverlauf der *P. yoelii*-Infektion wurde durch die vorliegende Wurminfektion nicht verändert (Abb. 5.3.1) und die *P. yoelii*-induzierte Th1-Immunantwort dominierte die *S. ratti*-induzierte Th2-Immunantwort in koinfizierten Mäusen (Abb. 5.3.2).

Die Koinfektion von BALB/c Mäusen mit *S. ratti* und *P. yoelii* führte zu einer erhöhten maximalen Parasitämie an Tag 16 der *P. yoelii*-Koinfektion und zu einem tendenziell stärkeren Gewichtsverlust (Abb. 5.3.3). Eine bestehende *S. ratti*-Infektion hatte in BALB/c

Mäusen demnach einen negativen Effekt, der in C57BL/6 Mäusen nicht auftrat. BALB/c Mäuse sind susceptibler gegenüber einer Infektion mit *P. yoelii*, als C57BL/6 Mäuse [126] und es ist möglich, dass die genetische Prädisposition der BALB/c Maus zu einer Th2-Immunantwort hierbei eine Rolle spielt [123, 127, 128]. Theoretisch hätte die natürliche Th2-Polarisierung von BALB/c Mäusen durch eine vorliegende *S. ratti*-Infektion verstärkt werden, und so zu dem verschlimmerten Krankheitsverlauf führen können. Allerdings ergab die Analyse der Zytokinantwort in BALB/c Mäusen keine Hinweise für einen solchen Zusammenhang. In koinfizierten BALB/c Mäusen dominierte, wie bereits in C57BL/6 Mäusen, die *P. yoelii*-induzierte Th1- über die *S. ratti*-induzierte Th2-Immunantwort. Erneut war die charakteristische Suppression des Th1-Zytokins IFN- γ in *S. ratti* einfach infizierten Mäusen durch die Koinfektion mit *P. yoelii* vollkommen aufgehoben (Abb.5.3.4). Die Analyse der zellulären Immunantwort zeigte somit keine Unterschiede zwischen *S. ratti*-/*P. yoelii*-koinfizierten und *P. yoelii*-einzeln infizierten Mäusen und erklärte die erhöhte Parasitämie in koinfizierten BALB/c Mäusen nicht.

Die publizierten Ergebnisse im Bereich der Helminthen/Plasmodien-Koinfektion sind häufig widersprüchlich und von dem genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig, die für die Studien verwendet werden [116]. Es gibt eine Vielzahl von Malaria-Erregern die für die Infektion von Nagetieren in experimentellen Studien genutzt werden, um die verschiedenen Symptome der humanen Malaria zu modellieren, obwohl keine Spezies die ganze Bandbreite der Symptome der humanen Malaria hervorruft. In der vorliegenden Arbeit wurde die Koinfektion mit *S. ratti* und *P. yoelii* untersucht. *P. yoelii* gilt, wie auch *P. chabaudi*, als Modell zur Studie der nicht-letalen humanen Malaria und wird vor allem verwendet, um die Immunantwort während der Blutphase einer Infektion mit Plasmodien zu untersuchen [55]. Die meisten Koinfektionsstudien mit Helminthen und *P. yoelii* wurden in BALB/c Mäusen durchgeführt [165-168]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit beschreiben sie eine erhöhte Parasitämie in Helminthen/Plasmodien-koinfizierten Mäusen. In diesen Studien ist die Erhöhung der Parasitämie jedoch deutlicher ausgeprägt, als während der Koinfektion mit *S. ratti* und *P. yoelii*. Teilweise zeigen koinfizierte Mäuse sogar eine erhöhte Sterblichkeit während der sonst nicht-letalen *P. yoelii*-Infektion. Die Behandlung der Wurminfektion mit Praziquantel, vor der *P. yoelii*-Koinfektion, verhindert den Tod koinfizierter BALB/c Mäuse [165, 168]. Das zeigt, dass nur lebende Würmer die Bekämpfung einer *Plasmodium*-Infektion beeinträchtigen.

In der hier beschriebenen Koinfektion von C57BL/6 Mäusen mit *S. ratti* und *P. yoelii* war keine Erhöhung der Parasitämie sichtbar. Im Gegensatz dazu beschreiben Tetsutani *et al.* eine drastische Erhöhung der Parasitämie und der Sterblichkeit von *H. polygyrus*-/*P. yoelii*-koinfizierten Mäusen, obwohl die verwendete Infektionsdosis mit $2,5 \times 10^4$ pRBCs [169] deutlich geringer war, als die in dieser Studie verwendeten 1×10^6 pRBCs. Auch in Helminthen-Koinfektionsstudien mit *P. chabaudi* wurde eine erhöhte Parasitämie und eine teilweise erhöhte Sterblichkeit beschrieben, sowohl in BALB/c [170], als auch in C57BL/6 Mäusen [171-174].

Während in der vorliegenden Studie die Auswirkung einer transienten *S. ratti*-Infektion untersucht wurde, die innerhalb von 3-4 Wochen von der Maus kontrolliert wird [28], werden in den oben zitierten Studien Koinfektionen mit *S. mansoni* [168, 172], *E. caproni* [165-167], *H. polygyrus* ([167, 171, 173, 174] oder *L. sigmodontis* [170] untersucht. Diese Helminthen verursachen in den verwendeten Mausstämmen eine langlebige, z. T. sogar chronische Infektion. Solche Wurminfektionen können die Immunantwort gegenüber *Plasmodium* spp. durch die Induktion von immunsuppressiven Mechanismen nachhaltiger beeinflussen, als die kurzlebige *S. ratti*-Infektion. So wurde für die Koinfektion von C57BL/6 Mäusen mit *H. polygyrus* und *P. yoelii* gezeigt, dass die erhöhte Sterblichkeit der Mäuse mit einer wurminduzierten Aktivierung von $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ T-Zellen (Tregs) zusammenhängt. Die Depletion dieser Zellen stellt die Immunität koinfizierter Mäuse gegenüber *P. yoelii* wieder her [169].

Die Induktion immunsupprimierender Mechanismen kann für Infektionen, in denen eine überschießende Immunantwort des Wirtes zu einer Immunpathologie führt, auch von Vorteil sein. So können Infektionen mit *L. sigmodontis* oder *S. mansoni* Mäuse vor der tödlichen zerebralen Malaria während einer *P. berghei* ANKA-Infektion schützen [175, 176].

6.2.3 Die *S. ratti*-Infektion interferiert nicht mit der Abwehr einer Protozoen-Koinfektion

Zusammenfassend sind die Ergebnisse aus den Koinfektionsmodellen mit *S. ratti* und *L. major* sowie *S. ratti* und *P. yoelii* vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Helminthen, hatte eine vorliegende *S. ratti*-Infektion keinen starken Einfluss auf den Verlauf einer *L. major* oder *P. yoelii*-Koinfektion. Da dieses Phänomen in beiden Koinfektionsmodellen beobachtet wurde, scheint die *S. ratti*-Infektion generell keinen störenden Einfluss auf die Ausbildung von Th1-Immunantworten zu haben.

Die *S. rattii*-Infektion wird von den Mäusen innerhalb von 3-4 Wochen erfolgreich bekämpft. Die Infektion zeichnet sich durch eine kurze Phase (3-5 Tagen) aus, in der die Th2-Immunantwort und die reziproke Suppression der Th1-Zytokinen maximal ausgeprägt sind [25, 26, 28]. Es ist wahrscheinlich, dass dieser transiente Charakter der Infektion der Grund für den geringen Einfluss ist, den die Wurminfektion auf die *L. major*- bzw. auf die *P. yoelii*-Infektion hat. Außerdem ist es möglich, dass die induzierte Th2-Immunantwort zusätzlich nicht stark genug ist. Chronische Wurminfektionen können durch eine Th2-Polarisierung die Ausbildung von Th1-Immunantworten beeinträchtigen, sie können jedoch auch zu einer generellen Suppression des Immunsystems führen. Hierbei werden Elemente der wirtseigenen Regelkreise, wie zum Beispiel Tregs [41, 169, 177] oder AAMΦ induziert [43, 149].

Die beiden hier verwendeten Koinfektionsmodelle sowie die anderen zitierten Studien zeigen, welche Bedeutung jeder einzelne Protagonist während einer Koinfektion hat. Zu den Protagonisten zählen die Wurmspezies, die Spezies des koinfizierenden Parasiten sowie der genetische Hintergrund der Maus. Außerdem können die Infektionsdosis, die Reihenfolge der Infektionen und das Stadium der Wurminfektion eine Rolle spielen [116]. Da diese Variablen jedoch auch die Unterschiede in humanen Populationen und ihren Parasiten reflektieren, sind die heterogenen Ergebnisse dieser Studien dennoch von Nutzen und spiegeln die Situation im Menschen wieder. Während zum Beispiel in thailändischen Erwachsenen die Malaria-Inzidenz durch Helmintheninfektionen erhöht wird [104], zeigen andere Studien, dass Wurminfektionen vor einer Malaria schützen können. Jedoch scheinen die Stärke der Infektion und das Alter der Patienten von Bedeutung zu sein [105, 178].

Die Tatsache, dass ein gewisses Ausmaß an Immunmodulation die Kontrolle einer Infektion nicht unbedingt beeinträchtigen muss, ist vor allem für humane Koinfektion ermutigend. Die hier diskutierten Studien zeigen jedoch auch, dass vor allem Helminthen die eine chronische Infektion verursachen das immunologische Gleichgewicht des Wirtes nachhaltig stören können.

In Kapitel 5.4 wird der Einfluss einer bestehenden Nematodeninfektion auf die Effizienz einer Vakzine untersucht. Für diese Studie wurde neben der kurzlebigen *S. rattii*-Infektion, auch die langlebige Infektion mit dem Nematoden *L. sigmodontis* untersucht.

6.3 Der Einfluss von Nematodeninfektionen auf die Effizienz einer Vakzinierung

Viele moderne Vakzinierungen zielen darauf ab, eine effiziente Th1-Immunantwort zu induzieren. Da Helmintheninfektionen in der Regel eine Th2- oder eine regulatorische Immunantwort auslösen stellte sich vor allem in den letzten Jahren verstärkt die Frage nach einem möglichen Einfluss von Helminthen-Infektionen auf die Effizienz von Vakzinen.

6.3.1 *L. sigmodontis* beeinträchtigt die Effizienz der ACT-CSP Immunisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer *S. ratti*- und einer *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz einer experimentellen anti-Malaria Vakzine in BALB/c Mäusen untersucht. Zunächst wurde der Einfluss dieser beiden Nematodeninfektionen auf eine Vakzinierung mit ACT-CSP analysiert. Diese Immunisierung induziert CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für das CSP₂₄₅₋₂₅₃-Epitop von *P. berghei* Sporozoitens sind [81, 82]. Sie spielen eine entscheidende Rolle für den Schutz der Mäuse gegenüber der Leberphase von *P. berghei* [76, 77].

Während eine vorliegende *S. ratti*-Infektion keinen Einfluss auf die Induktion CSP-spezifischer IFN- γ - (Abb. 5.4.1-B), oder IFN- γ /TNF- α -produzierender CD8⁺ T-Zellen hatte (Abb. 5.4.2-B), störte eine vorliegende *L. sigmodontis*-Infektion die Induktion dieser Zellen in ACT-CSP immunisierten Mäusen. Die Färbung der T-Zellrezeptoren von CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für das CSP₂₄₅₋₂₅₃-Epitop waren, zeigte, dass die Frequenz dieser Zellen durch eine vorliegende *L. sigmodontis*-Infektion tatsächlich signifikant reduziert wurde. Eine *S. ratti*-Infektion hingegen reduzierte die Frequenz H2-K^d/CSP-Pentamer positiver Zellen nicht (Abb. 5.4.3-B). Dazu passend führte die Reduktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen zu einer reduzierten CSP-spezifischen zytotoxischen Aktivität *in vivo*, während die Infektion mit *S. ratti* erneut keinen signifikanten Effekt hatte. Schließlich wurden ACT-CSP immunisierte Mäuse mit und ohne *L. sigmodontis*-Infektion mit *P. berghei* infiziert und die relative Parasitenlast in den Lebern der Mäuse mittels qPCR verglichen (Abb. 5.4.5). Das Experiment wurde drei Mal wiederholt und erbrachte stets das gleiche Ergebnis: Die Immunisierung mit ACT-CSP reduzierte die relative Parasitenlast tendenziell, während diese Tendenz durch eine *L. sigmodontis*-Infektion aufgehoben wurde. Aufgrund großer Unterschiede innerhalb der Gruppen erreichten diese Ergebnisse keine Signifikanz. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Unterschiede, bei einer Erhöhung der untersuchten Individuen, signifikant werden

würden. Diese Resultate sprechen dafür, dass die *L. sigmodontis*-Infektion den leichten Schutz, der durch die ACT-CSP Immunisierung vermittelt wird, beeinträchtigt.

S. ratti und *L. sigmodontis* wurden in dieser Arbeit bezüglich ihres Einflusses auf das Immunsystem verglichen, da sie sich wesentlich voneinander unterscheiden. Während die *S. ratti*-Infektion eine patente, jedoch transiente Infektion auslöst, die vor allem durch die Induktion einer Th2-Immunantwort charakterisiert ist [25, 26, 28], löst *L. sigmodontis* in BALB/c Mäusen eine etwa 17 Wochen anhaltende, patente Infektion aus [32], die neben einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort vor allem regulatorische Mechanismen wie Tregs [41, 42] und AAMΦ [43] aktiviert. Damit stellt die *S. ratti*-Infektion der Maus ein Modell für eine Wurminfektion dar, die erfolgreich vom Immunsystem des Wirtes geklärt wird, während die *L. sigmodontis*-Infektion von BALB/c Mäusen ein Modell für eine lang anhaltende, fast chronische Wurminfektion ist.

Studien im Mausmodell haben klare Hinweise darauf gegeben, dass Helminthen die Effizienz von Vakzinen beeinträchtigen können. So verändern *S. mansoni* oder *B. malayi* die Immunantwort von Mäusen gegenüber unbeteiligten Antigenen, indem sie eine Th2-Immunantwort auslösen [179-181] und die Induktion einer schützenden CD8⁺ T-Zellantwort wird in *S. mansoni* oder auch *H. polygyrus*-infizierten Mäusen beeinträchtigt [179, 182]. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten, reduziert eine Infektion mit *S. mansoni* die Effizienz einer HIV-DNA basierten Vakzine, indem sie die Induktion von spezifischen IFN-γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen stört [183]. Durch die Eliminierung der Helminthen-Infektion, 8 Wochen vor der Vakzinierung, kann die T-Zellantwort vollständig wiederhergestellt werden [184]. Eine *S. mansoni*-Infektion beeinträchtigt auch die BCG Impfung gegen *Mycobacterium tuberculosis* im Mausmodell [185]. Zahlreiche humane Studien berichten über eine verschlechterte Immunantwort gegenüber Cholera- [112], BCG- [114, 177] und Tetanus-Vakzinierungen [113, 186, 187] in wurminfizierten Patienten. Im Allgemeinen weisen diese Studien auf eine verminderte Th1-Immunantwort gegenüber der Vakzinierung [113, 186-188] sowie auf einen niedrigeren Antikörpertiter in den Patienten hin [113, 115, 186, 188, 189]. Eine Entwurmung der Patienten hebt die wurm-induzierten Effekte wieder auf [112, 114, 188]. In diesen Studien sind es chronische Wurminfektionen mit *S. mansoni*, *O. volvulus*, *W. bancrofti* oder *A. lumbricoides*, die einen negativen Effekt auf die Effizienz einer Vakzine ausüben. Filarien wie *W. bancrofti*, *O. volvulus*, aber auch die in der vorliegenden

Studie verwendete Filarie *L. sigmodontis*, sind zudem für ihre immunsupprimierenden Eigenschaften bekannt [149].

Tartz *et al.* [81] zeigten, dass eine einmalige Immunisierung mit ACT-CSP zwar CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert, diese jedoch nicht ausreichen, um Mäuse bei einer nachfolgenden *P. berghei*-Infektion vor einer Blutphase zu schützen [81]. Interessanterweise erhöht eine homologe *prime/boost*-Immunisierung mit ACT-CSP, also die zweimalige Immunisierung mit ACT-CSP, die Anzahl der protektiven Zellen nicht [81]. Die Impfeffizienz läßt sich jedoch durch die Suppression von wirtseigenen Kontrollmechanismen verbessern. Wird den Mäusen einen Tag vor der zweiten ACT-CSP-Injektion ein Antikörper gegen das *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4* (anti-CTLA-4) verabreicht, so wird die Gesamtzahl CSP-spezifischer IFN γ -produzierender Zellen signifikant erhöht und schützte 60 % der Mäuse vor der Blutphase einer *P. berghei*-Infektion [81]. CTLA-4 ist ein negativer Regulator der T-Zellantwort der auf aktivierten T-Zellen und auf Tregs exprimiert wird [86].

Diese Daten geben Hinweise auf einen möglichen Mechanismus, mit dem *L. sigmodontis* die Effizienz der ACT-CSP Immunisierung in der vorliegenden Studie beeinflusst haben kann. Durch eine Infektion mit *L. sigmodontis* werden Tregs induziert [41, 42]. Die *L. sigmodontis*-Infektion könnte die immunsupprimierenden Mechanismen in den Mäusen gesteigert und so mit der Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen interferiert haben. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Verabreichung von anti-CTLA-4 den negativen Einfluss der *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz der ACT-CSP Vakzinierung vermindern kann.

Interessant war nun die Frage, ob eine vorliegende *L. sigmodontis*-Infektion auch die Wirksamkeit einer effizienteren Vakzine, die es schafft, die wirtseigenen Kontrollmechanismen zu durchbrechen, beeinträchtigen würde. In Kapitel 5.4.2 wurde deshalb der Einfluss einer *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz einer heterologen *prime/boost*-Immunisierung untersucht.

6.3.2 *L. sigmodontis* hat keinen negativen Effekt auf die Effizienz der heterologen *prime/boost*-Immunisierung

Die heterologe *prime/boost*-Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen und ACT-CSP induziert deutlich mehr CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen und kann die Mäuse, auch ohne

die Verabreichung von anti-CTLA-4, zu 80-100 % vor einer *P. berghei* Blutphase schützen [82].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer *L. sigmodontis*-Infektion auf die Effizienz der heterologen *prime/boost*-Immunsierung untersucht (Kapitel 5.4.2). Obwohl die *L. sigmodontis*-Infektion die Effizienz der ACT-CSP Immunsierung verschlechterte, war interessanterweise kein negativer Effekt auf die *prime*-Immunsierung mit rekombinanten Salmonellen nachweisbar. Ganz im Gegenteil schienen in *L. sigmodontis*-infizierten Mäuse sogar tendenziell mehr CSP-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert zu werden, als in naiven, immunisierten Mäusen (Abb. 5.4.7). Dieser Effekt war nach der *boost*-Immunsierung mit ACT-CSP allerdings wieder aufgehoben, und die Frequenz CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen war in naiven, immunisierten Mäusen tendenziell erhöht (Abb. 5.4.8). Die Möglichkeit, dass die *L. sigmodontis*-Infektion die Bekämpfung der rekombinanten Salmonellen verzögert hatte, und so zu einer effizienteren Immunsierung in *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen führte, wurde ausgeschlossen.

Zusammenfassend zeigte die *L. sigmodontis*-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Vakzinierungseffizienz und den vermittelten Schutz der effektiveren *prime/boost*-Immunsierung (Abb. 5.4.9; Tab. 5.4-1).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die regulatorischen Mechanismen, die durch *L. sigmodontis* induziert werden, nicht ausreichen, um der massiven Induktion von CSP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach einer heterologen *prime/boost*-Immunsierung entgegenzuwirken.

Diese Ergebnisse sind in Bezug auf humane Impfungen sehr interessant. Sie weisen darauf hin, dass vorliegende Wurminfektionen die Impfeffizienz reduzieren können, vor allem wenn die Vakzine per se nicht sehr effizient ist. Hierzu passen Studien, die einen starken Einfluss von Wurminfektionen auf die BCG Vakzine gegen *M. tuberculosis* beschreiben [114, 185]. BCG ist eine Vakzine, die mit einem Schutz von 0-80 % einen eher geringen protektiven Effekt hat [190].

Neben der Effizienz der Vakzine kommt es auch auf die Wurmspezies an. Helminthen, die besonders effiziente Mechanismen zur Suppression des Immunsystems des Wirtes entwickelt haben, scheinen potentiell ein Problem für die Vakzinierungseffizienz darzustellen. Das muss bei der Planung von Vakzinierungskampagnen in Regionen bedacht werden, in denen chronische Wurminfektionen endemisch sind. Die Entwurmung der Bevölkerung vor einer Impfkampagne könnte die Impfeffizienz erhöhen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch auch, dass gute Adjuvantien oder Impfreime die Problematik verringern können. Ist eine Impfung effizient genug, um selbst wurminduzierte regulatorische Mechanismen zu durchbrechen, wie die heterologe *prime/boost*-Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen und ACT-CSP ist, muss eine vorliegende chronische Wurminfektion keine Einschränkung für die Impfeffizienz bedeuten. In Übereinstimmung mit dem hier verwendeten Impfmodell, beschreibt eine aktuelle Studie von Noland *et al.* einen heterogenen Einfluss einer *H. polygyrus*-Infektion auf die Effizienz von zwei verschiedenen potentiellen anti-Malaria Vakzinen. Während die *H. polygyrus*-Infektion die Wirksamkeit einer DNA-basierten Vakzine beeinträchtigt, hat die Infektion keinen Einfluss auf die Effizienz einer Vakzine mit attenuierten Sporoziten [191]. Solche Impfmodelle sind gut geeignet, um zu verstehen welche Schlüsselmechanismen für die Effizienz einer Vakzine entscheidend sind.

6.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Infektion mit *S. ratti* den Verlauf einer *L. major*-Koinfektion nicht verändert. Umgekehrt verändert eine vorliegende *L. major*-Infektion auch den Verlauf einer *S. ratti*-Infektion nicht, obwohl die *S. ratti*-induzierte Th2-Immunantwort durch eine zwei Tage andauernde *L. major*-Koinfektion supprimiert wird.

Die Koinfektion von Mäusen mit *S. ratti* hat ebenfalls keinen starken Effekt auf die Bekämpfung der *P. yoelii*-Infektion, wenn auch der Verlauf der Malaria in koinfizierten BALB/c Mäusen leicht verschlimmert ist. Vergleichbar zum *S. ratti*-/*L. major*-Koinfektionsmodell führt die *P. yoelii*-Koinfektion in C57BL/6 und BALB/c Mäusen zu einer supprimierten *S. ratti* induzierten Th2-Immunantwort. Auch in diesem Modell sollte deshalb kontrolliert werden, ob die Bekämpfung der *S. ratti*-Infektion beeinträchtigt wird, wenn die Mäuse zuerst mit *P. yoelii* infiziert und dann mit *S. ratti* koinfiziert werden.

Da die *L. sigmodontis*-Infektion, im Gegensatz zur *S. ratti*-Infektion, die Immunantwort gegenüber einer Vakzine beeinträchtigt, stellt sich die Frage, ob eine *L. sigmodontis*-Infektion den Verlauf einer Koinfektion nachhaltiger beeinflussen würde, als eine *S. ratti*-Infektion.

Koinfektionsstudien mit *L. sigmodontis* und *L. major* wurden in C57BL/6 Mäusen bereits durchgeführt und zeigten, dass die Mäuse eine kompartimentierte Immunantwort gegenüber beiden Pathogenen etablieren können [107]. Bis jetzt wurden allerdings noch

keine Koinfektionsstudien mit *L. sigmodontis* und *P. yoelii* beschrieben. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die lang anhaltende *L. sigmodontis*-Infektion den Verlauf der *P. yoelii*-Infektion effektiver beeinflusst als *S. ratti*. Graham *et al.* zeigten, dass eine vorliegende *L. sigmodontis*-Infektion bei einer *P. chabaudi*-Koinfektion zu einer erhöhten Anämie und einem stärkeren Gewichtsverlust bei BALB/c Mäuse führt, allerdings ist dies von dem Stadium der Wurminfektion abhängig [170].

In dieser Arbeit wurden Mäuse an Tag 14 der *L. sigmodontis*-Infektion vakziniert. Zu diesem Zeitpunkt sind in der Pleurahöhle von BALB/c Mäusen L4, jedoch noch keine adulten Würmer oder Mikrofilarien (Mf) [35]. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass gerade bei Filarien, wie *L. sigmodontis*, das Ausmaß der Immunmodulation stark von dem Stadium der Wurminfektion abhängt. So unterdrücken *L. sigmodontis* adulte Weibchen eine Lipopolysaccharid-induzierte Sepsis, während Mf diesen Effekt nicht haben [192] und *L. sigmodontis*-/*P. chabaudi*-koinfizierte Mäuse zeigen einen milderen Verlauf der Malaria wenn Mf anwesend sind [170].

Es wäre interessant, den Einfluss verschiedener *L. sigmodontis*-Stadien auf die Effizienz der experimentellen anti-Malaria Vakzinierungen zu untersuchen. Hierfür könnten BALB/c Mäuse an Tag 35, bzw. an Tag 60 der *L. sigmodontis*-Infektion vakziniert werden, um den Einfluss von adulten Würmern bzw. Mf auf die Effizienz die Vakzinierung zu untersuchen. Falls eine länger andauernde *L. sigmodontis*-Infektion die Effizienz einer Vakzinierung beeinflussen würde, könnte zudem untersucht werden, ob eine Entwurmung diesen negativen Effekt aufhebt. Da die Mäuse in der vorliegenden Studie schon an Tag 14 der *L. sigmodontis*-Infektion vakziniert wurden, erschien es nicht sinnvoll den Einfluss einer Entwurmung in diesem experimentellen Ansatz zu untersuchen.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass *L. sigmodontis* die Induktion CSP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach ACT-CSP Immunisierung supprimiert, jedoch bleibt unklar, welcher Mechanismus für die Suppression verantwortlich ist.

Der immunsupprimierende Effekt von Helminthen-Infektionen auf die Effizienz von Vakzinen wird häufig durch Zellen wie Tregs oder AAMΦ vermittelt, indem diese Zellen immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 [113, 186], TGF-β [91, 101, 174] oder auch IL-35 [193] sezernieren. Ob diese Mediatoren auch für die in dieser Arbeit beobachtete Suppression eine Rolle spielen, sollte vor allem an Tag 14 der *L. sigmodontis*-Infektion

untersucht werden, also an dem Zeitpunkt, an dem die ACT-CSP Immunisierung durchgeführt wird.

Ein immer genaueres Verständnis der Auswirkungen vorliegender Helminthen-Infektionen auf Koinfektionen und Vakzinierungen ist notwendig, um die Behandlungsmöglichkeiten und Impfprotokolle zu verbessern, und so die medizinische Versorgung von Menschen zu gewährleisten, die in Endemiegebieten parasitärer Helminthen leben.

7 LITERATUR

- 1 **Romagnani, S.**, Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 227-257.
- 2 **Kupfer, A. and Singer, S. J.**, Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* 1989. **7**: 309-337.
- 3 **Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.**, Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989. **46**: 111-147.
- 4 **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L.**, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986. **136**: 2348-2357.
- 5 **Romagnani, S.**, Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991. **12**: 256-257.
- 6 **Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A.**, Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. **383**: 787-793.
- 7 **Romagnani, S.**, The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997. **18**: 263-266.
- 8 **Sacks, D. and Noben-Trauth, N.**, The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 845-858.
- 9 **Hsieh, C. S., Heimberger, A. B., Gold, J. S., O'Garra, A. and Murphy, K. M.**, Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 6065-6069.
- 10 **Seder, R. A. and Paul, W. E.**, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 635-673.
- 11 **Oxenius, A., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H.**, CD4+ T-cell induction and effector functions: a comparison of immunity against soluble antigens and viral infections. *Adv Immunol* 1998. **70**: 313-367.
- 12 **Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R. and Vitetta, E. S.**, Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988. **334**: 255-258.
- 13 **Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D. and Hotez, P. J.**, Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 2006. **367**: 1521-1532.
- 14 **Speare, R.**, Infection with *Strongyloides stercoralis*. *Med J Aust* 1987. **147**: 46.
- 15 **Viney, M. E. and Lok, J. B.**, *Strongyloides* spp. (May 23, 2007), Worm-Book, doi/10.1895/wormbook.1.141.1. Available at <http://www.wormbook.org>, 2007. **1.134.1**.
- 16 **Grove, D. I.** (Ed.) *Strongyloidiasis a Major Roundworm Infection of man*. Taylor and Francis, London 1989.
- 17 **Streit, A.**, Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. *Parasitology* 2008. **135**: 285-294.
- 18 **Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard, R., Thybo, S., Verweij, J. J. and Magnussen, P.**, Strongyloidiasis--the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009. **103**: 967-972.
- 19 **Marcos, L. A., Terashima, A., Dupont, H. L. and Gotuzzo, E.**, *Strongyloides* hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008. **102**: 314-318.

- 20 **Ramanathan, R. and Nutman, T.**, *Strongyloides stercoralis* infection in the immunocompromised host. *Curr Infect Dis Rep* 2008. **10**: 105-110.
- 21 **Vadlamudi, R. S., Chi, D. S. and Krishnaswamy, G.**, Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clin Mol Allergy* 2006. **4**: 8.
- 22 **Machado, E. R., Ueta, M. T., Lourenco, E. V., Anibal, F. F., Roque-Barreira, M. C. and Faccioli, L. H.**, Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasite Immunol* 2007. **29**: 549-557.
- 23 **Wilkes, C. P., Bleay, C., Paterson, S. and Viney, M. E.**, The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats. *Parasite Immunol* 2007. **29**: 339-346.
- 24 **Sheldon, A.**, Studies on active acquired resistance, natural and artificial, in the rat to infection with *Strongyloides ratti*. *Am J Hyg* 1937. **25**: 53-65.
- 25 **Dawkins, H. J. and Grove, D. I.**, Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. *Int J Parasitol* 1981. **11**: 89-96.
- 26 **Dawkins, H. J., Grove, D. I., Dunsmore, J. D. and Mitchell, G. F.**, *Strongyloides ratti*: susceptibility to infection and resistance to reinfection in inbred strains of mice as assessed by excretion of larvae. *Int J Parasitol* 1980. **10**: 125-129.
- 27 **Uchikawa, R., Ichiki, H. and Komaki, E.**, Antibody responses and protective immunity in rats receiving repeated inoculations of *Strongyloides ratti*. *J Parasitol* 1991. **77**: 737-741.
- 28 **Eschbach, M. L., Klemm, U., Kolbaum, J., Blankenhaus, B., Brattig, N. and Breloer, M.**, *Strongyloides ratti* infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice. *Parasite Immunology* 2010. **32**: 370-383.
- 29 **Taylor, M. J.**, A new insight into the pathogenesis of filarial disease. *Curr Mol Med* 2002. **2**: 299-302.
- 30 **Schulz-Key, H.**, Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. *Acta Leiden* 1990. **59**: 27-44.
- 31 **Hise, A. G., Daehnel, K., Gillette-Ferguson, I., Cho, E., McGarry, H. F., Taylor, M. J., Golenbock, D. T., Fitzgerald, K. A., Kazura, J. W. and Pearlman, E.**, Innate immune responses to endosymbiotic Wolbachia bacteria in *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM. *J Immunol* 2007. **178**: 1068-1076.
- 32 **Petit, G., Diagne, M., Marechal, P., Owen, D., Taylor, D. and Bain, O.**, Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains. *Ann Parasitol Hum Comp* 1992. **67**: 144-150.
- 33 **Siddiqui, M. A. and Kershaw, W. E.**, Host-parasite relations in cotton rat filariasis. II: The quantitative transmission of *Litomosoides carinii* to Delhi and Carworth strains of white rats, including the effect of age. *Ann Trop Med Parasitol* 1976. **70**: 313-322.
- 34 **Marechal, P., Le Goff, L., Petit, G., Diagne, M., Taylor, D. W. and Bain, O.**, The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice. *Parasite* 1996. **3**: 25-31.
- 35 **Babayan, S., Ungeheuer, M. N., Martin, C., Attout, T., Belnoue, E., Snounou, G., Renia, L., Korenaga, M. and Bain, O.**, Resistance and susceptibility to filarial infection with *Litomosoides sigmodontis* are associated with early differences in parasite development and in localized immune reactions. *Infect Immun* 2003. **71**: 6820-6829.

- 36 **Korten, S., Volkman, L., Saeftel, M., Fischer, K., Taniguchi, M., Fleischer, B. and Hoerauf, A.**, Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. *J Immunol* 2002. **168**: 5199-5206.
- 37 **Al-Qaoud, K. M., Fleischer, B. and Hoerauf, A.**, 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* 1998. **10**: 17-25.
- 38 **Al-Qaoud, K. M., Taubert, A., Zahner, H., Fleischer, B. and Hoerauf, A.**, Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*: role of CD4+ T cells in controlling larval development. *Infect Immun* 1997. **65**: 2457-2461.
- 39 **Volkman, L., Saeftel, M., Bain, O., Fischer, K., Fleischer, B. and Hoerauf, A.**, Interleukin-4 is essential for the control of microfilariae in murine infection with the filaria *Litomosoides sigmodontis*. *Infect Immun* 2001. **69**: 2950-2956.
- 40 **Saeftel, M., Arndt, M., Specht, S., Volkman, L. and Hoerauf, A.**, Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis. *Infect Immun* 2003. **71**: 6978-6985.
- 41 **Taylor, M. D., Harris, A., Babayan, S. A., Bain, O., Culshaw, A., Allen, J. E. and Maizels, R. M.**, CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. *J Immunol* 2007. **179**: 4626-4634.
- 42 **Taylor, M. D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J. E. and Maizels, R. M.**, Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* 2005. **174**: 4924-4933.
- 43 **Taylor, M. D., Harris, A., Nair, M. G., Maizels, R. M. and Allen, J. E.**, F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol* 2006. **176**: 6918-6927.
- 44 **von Stebut, E.**, Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol* 2007. **16**: 340-346.
- 45 **Von Stebut, E.**, Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 2007. **17**: 115-122.
- 46 **Brewig, N.**, Die Rolle von Langerin (CD207) - positiven dendritischen Zellen im experimentellen Mausmodell der Leishmaniose (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) *Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften*. Universität Hamburg, Hamburg 2009, pp 96.
- 47 **Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. and Sacks, D.**, A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 2000. **165**: 969-977.
- 48 **WHO**, World Health Organisation: World Malaria Report 2010 <http://www.who.int/malaria/en/2010>.
- 49 **Good, M. F. and Doolan, D. L.**, Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol* 1999. **11**: 412-419.
- 50 **Chatterjee, S., Wery, M., Sharma, P. and Chauhan, V. S.**, A conserved peptide sequence of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and antipeptide antibodies inhibit *Plasmodium berghei* sporozoite invasion of Hep-G2 cells and protect immunized mice against *P. berghei* sporozoite challenge. *Infect Immun* 1995. **63**: 4375-4381.

- 51 **Ancsin, J. B. and Kisilevsky, R.,** A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J Biol Chem* 2004. **279**: 21824-21832.
- 52 **Lang, W. and Löscher, T.,** Tropenmedizin in Klinik und Praxis. New York: Thieme, Stuttgart 2000, pp 10-30.
- 53 **Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. and Doumbo, O. K.,** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002. **415**: 673-679.
- 54 **Clark, I. A., Alleva, L. M., Mills, A. C. and Cowden, W. B.,** Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin Microbiol Rev* 2004. **17**: 509-539, table of contents.
- 55 **Li, C., Seixas, E. and Langhorne, J.,** Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol* 2001. **189**: 115-126.
- 56 **Hill, A. V.,** Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 2006. **6**: 21-32.
- 57 **Overstreet, M. G., Cockburn, I. A., Chen, Y. C. and Zavala, F.,** Protective CD8 T cells against *Plasmodium* liver stages: immunobiology of an 'unnatural' immune response. *Immunol Rev* 2008. **225**: 272-283.
- 58 **Weiss, W. R., Sedegah, M., Berzofsky, J. A. and Hoffman, S. L.,** The role of CD4+ T cells in immunity to malaria sporozoites. *J Immunol* 1993. **151**: 2690-2698.
- 59 **Doolan, D. L. and Hoffman, S. L.,** IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol* 1999. **163**: 884-892.
- 60 **Rzepczyk, C. M., Anderson, K., Stamatiou, S., Townsend, E., Allworth, A., McCormack, J. and Whitby, M.,** Gamma delta T cells: their immunobiology and role in malaria infections. *Int J Parasitol* 1997. **27**: 191-200.
- 61 **Su, Z. and Stevenson, M. M.,** Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun* 2000. **68**: 4399-4406.
- 62 **Stevenson, M. M. and Tam, M. F.,** Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 1993. **92**: 77-83.
- 63 **De Souza, J. B., Williamson, K. H., Otani, T. and Playfair, J. H.,** Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* 1997. **65**: 1593-1598.
- 64 **Su, Z. and Stevenson, M. M.,** IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 2002. **168**: 1348-1355.
- 65 **Stevenson, M. M., Su, Z., Sam, H. and Mohan, K.,** Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. *Microbes Infect* 2001. **3**: 49-59.
- 66 **Langhorne, J., Quin, S. J. and Sanni, L. A.,** Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol* 2002. **80**: 204-228.
- 67 **Langhorne, J., Gillard, S., Simon, B., Slade, S. and Eichmann, K.,** Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *Int Immunol* 1989. **1**: 416-424.

- 68 **Langhorne, J. and Simon, B.**, Limiting dilution analysis of the T cell response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. *Parasite Immunol* 1989. **11**: 545-559.
- 69 **Shear, H. L., Srinivasan, R., Nolan, T. and Ng, C.**, Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J Immunol* 1989. **143**: 2038-2044.
- 70 **Saul, A.**, The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells. *Parasitol Today* 1999. **15**: 455-457.
- 71 **Good, M. F., Kaslow, D. C. and Miller, L. H.**, Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998. **16**: 57-87.
- 72 **von der Weid, T., Honarvar, N. and Langhorne, J.**, Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J Immunol* 1996. **156**: 2510-2516.
- 73 **Oliveira-Ferreira, J. and Daniel-Ribeiro, C.**, Protective CD8+ T cell responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001. **96**: 221-227.
- 74 **Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C.**, Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967. **216**: 160-162.
- 75 **Nussenzweig, R. S. and Chen, D.**, Some characteristics of the immune response to sporozoites of simian and human malaria. *Bull Pan Am Health Organ* 1974. **8**: 198-204.
- 76 **Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R. and Nussenzweig, V.**, Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987. **330**: 664-666.
- 77 **Romero, P., Maryanski, J. L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. and Zavala, F.**, Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 1989. **341**: 323-326.
- 78 **Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. and Hoffman, S. L.**, Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med* 1996. **183**: 1739-1746.
- 79 **Trimnell, A., Takagi, A., Gupta, M., Richie, T. L., Kappe, S. H. and Wang, R.**, Genetically attenuated parasite vaccines induce contact-dependent CD8+ T cell killing of *Plasmodium yoelii* liver stage-infected hepatocytes. *J Immunol* 2009. **183**: 5870-5878.
- 80 **Renggli, J., Hahne, M., Matile, H., Betschart, B., Tschopp, J. and Corradin, G.**, Elimination of *P. berghei* liver stages is independent of Fas (CD95/Apo-I) or perforin-mediated cytotoxicity. *Parasite Immunol* 1997. **19**: 145-148.
- 81 **Tartz, S., Kamanova, J., Simsova, M., Sebo, P., Bolte, S., Heussler, V., Fleischer, B. and Jacobs, T.**, Immunization with a circumsporozoite epitope fused to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against *Plasmodium berghei* liver-stage malaria. *Infect Immun* 2006. **74**: 2277-2285.
- 82 **Tartz, S., Russmann, H., Kamanova, J., Sebo, P., Sturm, A., Heussler, V., Fleischer, B. and Jacobs, T.**, Complete protection against *P. berghei* malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing *Salmonella* type III secretion system and *Bordetella* adenylate cyclase toxoid. *Vaccine* 2008. **26**: 5935-5943.
- 83 **Simsova, M., Sebo, P. and Leclerc, C.**, The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*--a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 2004. **293**: 571-576.

- 84 **Sebo, P., Moukrim, Z., Kalhous, M., Schaft, N., Dadaglio, G., Sheshko, V., Fayolle, C. and Leclerc, C.**, In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying multiple copies of a viral CD8(+) T-cell epitope. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999. **26**: 167-173.
- 85 **Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guernonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Sebo, P.**, Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 2000. **68**: 247-256.
- 86 **Chambers, C. A., Kuhns, M. S., Egen, J. G. and Allison, J. P.**, CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001. **19**: 565-594.
- 87 **Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J. and Jacobson, J.**, Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 2008. **118**: 1311-1321.
- 88 **Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Jr., Stadecker, M. J. and Gause, W. C.**, Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007. **7**: 975-987.
- 89 **Maizels, R. M. and Yazdanbakhsh, M.**, Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 733-744.
- 90 **Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., El Kasm, K. C., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J. and Wynn, T. A.**, Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 2009. **5**: e1000371.
- 91 **Doetze, A., Satoguina, J., Burchard, G., Rau, T., Loliger, C., Fleischer, B. and Hoerauf, A.**, Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* 2000. **12**: 623-630.
- 92 **Merrill, J. E.**, Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother (1991)* 1992. **12**: 167-170.
- 93 **Pallone, F. and Monteleone, G.**, Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998. **43**: 735-736.
- 94 **Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M. and Fabry, Z.**, Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol* 2003. **15**: 59-69.
- 95 **Wu, Z., Nagano, I., Asano, K. and Takahashi, Y.**, Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitol Res* 2010. **107**: 1173-1188.
- 96 **Khan, W. I., Blennerhasset, P. A., Varghese, A. K., Chowdhury, S. K., Omsted, P., Deng, Y. and Collins, S. M.**, Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun* 2002. **70**: 5931-5937.
- 97 **Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K. and Akdis, C. A.**, Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004. **199**: 1567-1575.

- 98 **Karlsson, M. R., Rugtveit, J. and Brandtzaeg, P.**, Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004. **199**: 1679-1688.
- 99 **van den Biggelaar, A. H., van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G. and Yazdanbakhsh, M.**, Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000. **356**: 1723-1727.
- 100 **Araujo, M. I., Hoppe, B., Medeiros, M., Jr., Alcantara, L., Almeida, M. C., Schriefer, A., Oliveira, R. R., Kruschewsky, R., Figueiredo, J. P., Cruz, A. A. and Carvalho, E. M.**, Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis* 2004. **190**: 1797-1803.
- 101 **Dittrich, A. M., Erbacher, A., Specht, S., Diesner, F., Krokowski, M., Avagyan, A., Stock, P., Ahrens, B., Hoffmann, W. H., Hoerauf, A. and Hamelmann, E.**, Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 2008. **180**: 1792-1799.
- 102 **Hartmann, S., Schnoeller, C., Dahten, A., Avagyan, A., Rausch, S., Lendner, M., Bocian, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Lucius, R., Worm, M. and Hamelmann, E.**, Gastrointestinal nematode infection interferes with experimental allergic airway inflammation but not atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2009. **39**: 1585-1596.
- 103 **Mwangi, T. W., Bethony, J. M. and Brooker, S.**, Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Ann Trop Med Parasitol* 2006. **100**: 551-570.
- 104 **Nacher, M., Singhasivanon, P., Yimsamran, S., Manibunyong, W., Thanyavanich, N., Wuthisen, R. and Looareesuwan, S.**, Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *J Parasitol* 2002. **88**: 55-58.
- 105 **Lyke, K. E., Dicko, A., Dabo, A., Sangare, L., Kone, A., Coulibaly, D., Guindo, A., Traore, K., Daou, M., Diarra, I., Sztejn, M. B., Plowe, C. V. and Doumbo, O. K.**, Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. *Am J Trop Med Hyg* 2005. **73**: 1124-1130.
- 106 **O'Neal, S. E., Guimaraes, L. H., Machado, P. R., Alcantara, L., Morgan, D. J., Passos, S., Glesby, M. J. and Carvalho, E. M.**, Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2007. **195**: 142-148.
- 107 **Lamb, T. J., Graham, A. L., Le Goff, L. and Allen, J. E.**, Co-infected C57BL/6 mice mount appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Litomosoides sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. *Parasite Immunol* 2005. **27**: 317-324.
- 108 **Rodriguez-Sosa, M., Rivera-Montoya, I., Espinoza, A., Romero-Grijalva, M., Lopez-Flores, R., Gonzalez, J. and Terrazas, L. I.**, Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol* 2006. **242**: 61-71.
- 109 **Babu, S., Bhat, S. Q., Kumar, N. P., Jayantasri, S., Rukmani, S., Kumaran, P., Gopi, P. G., Kolappan, C., Kumaraswami, V. and Nutman, T. B.**, Human type 1 and 17 responses in latent tuberculosis are modulated by coincident filarial infection through cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and programmed death-1. *J Infect Dis* 2009. **200**: 288-298.

- 110 **Babu, S., Bhat, S. Q., Kumar, N. P., Anuradha, R., Kumaran, P., Gopi, P. G., Kolappan, C., Kumaraswami, V. and Nutman, T. B.,** Attenuation of toll-like receptor expression and function in latent tuberculosis by coexistent filarial infection with restoration following antifilarial chemotherapy. *PLoS Negl Trop Dis* 2009. **3**: e489.
- 111 **Raso, G., Luginbuhl, A., Adjoua, C. A., Tian-Bi, N. T., Silue, K. D., Matthys, B., Vounatsou, P., Wang, Y., Dumas, M. E., Holmes, E., Singer, B. H., Tanner, M., N'Goran E, K. and Utzinger, J.,** Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Cote d'Ivoire. *Int J Epidemiol* 2004. **33**: 1092-1102.
- 112 **Cooper, P. J., Chico, M., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Levine, M. M., Griffin, G. E. and Nutman, T. B.,** Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* 2001. **69**: 1574-1580.
- 113 **Cooper, P. J., Espinel, I., Paredes, W., Guderian, R. H. and Nutman, T. B.,** Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J Infect Dis* 1998. **178**: 1133-1138.
- 114 **Elias, D., Wolday, D., Akuffo, H., Petros, B., Bronner, U. and Britton, S.,** Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol* 2001. **123**: 219-225.
- 115 **Prost, A., Schlumberger, M. and Fayet, M. T.,** Response to tetanus immunization in onchocerciasis patients. *Ann Trop Med Parasitol* 1983. **77**: 83-85.
- 116 **Helmbly, H.,** Helminths and our immune system: friend or foe? *Parasitol Int* 2009. **58**: 121-127.
- 117 **Czerkinsky C.C., N. L. A., Nygren H., Ouchterlony O., Tarkowski A.,** A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods* 1983. **65**: 109-121.
- 118 **Saiki RK, G. D., Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.,** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988. **239**: 487-491.
- 119 **Holzappel, B. and Wickert, L.,** Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit.* 2007. **37**: 120-126.
- 120 **Collazo, C. M. and Galán, J. E.,** Requirement for Exported Proteins in Secretion through the Invasion-Associated Type III System of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 1996. **64**: 3524-3531.
- 121 **Muraille, E. and Leo, O.,** Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol* 1998. **47**: 1-9.
- 122 **Mosmann, T. R. and Sad, S.,** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996. **17**: 138-146.
- 123 **Reiner, S. L. and Locksley, R. M.,** The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995. **13**: 151-177.
- 124 **van der Heyde, H. C., Pepper, B., Batchelder, J., Cigel, F. and Weidanz, W. P.,** The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Exp Parasitol* 1997. **85**: 206-213.
- 125 **Kobayashi, F., Ishida, H., Matsui, T. and Tsuji, M.,** Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection. *J Vet Med Sci* 2000. **62**: 583-587.

- 126 **Sayles, P. C. and Wassom, D. L.**, Immunoregulation in murine malaria. Susceptibility of inbred mice to infection with *Plasmodium yoelii* depends on the dynamic interplay of host and parasite genes. *J Immunol* 1988. **141**: 241-248.
- 127 **Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Taniguchi, T., Liu, F. T. and Ueno, H.**, Genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Exp Eye Res* 2006. **82**: 210-218.
- 128 **Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.**, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989. **7**: 145-173.
- 129 **Yagi, J., Arimura, Y., Takatori, H., Nakajima, H., Iwamoto, I. and Uchiyama, T.**, Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells. *Int Immunol* 2006. **18**: 1681-1690.
- 130 **Helmby, H., Jonsson, G. and Troye-Blomberg, M.**, Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect Immun* 2000. **68**: 1485-1490.
- 131 **Mukherjee, P., Devi, Y. S. and Chauhan, V. S.**, Blood stage malaria antigens induce different activation-induced cell death programs in splenic CD4+T cells. *Parasite Immunol* 2008. **30**: 497-514.
- 132 **Bundy, D., Sher, A. and Michael, E.**, Good worms or bad worms: do worm infections affect the epidemiological patterns of other diseases? *Parasitol Today* 2000. **16**: 273-274.
- 133 **Borkow, G. and Bentwich, Z.**, Chronic parasite infections cause immune changes that could affect successful vaccination. *Trends Parasitol* 2008. **24**: 243-245.
- 134 **de Souza, J. B. and Riley, E. M.**, Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 2002. **4**: 291-300.
- 135 **Korten, S., Anderson, R. J., Hannan, C. M., Sheu, E. G., Sinden, R., Gadola, S., Taniguchi, M. and Hill, A. V.**, Invariant Valpha14 chain NKT cells promote *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein-specific gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-producing CD8+ T cells in the liver after poxvirus vaccination of mice. *Infect Immun* 2005. **73**: 849-858.
- 136 **Tedder, T. F., Luscinskas, W. and Kansas, G. S.**, Regulation of leukocyte migration by L-selectin: mechanisms, domains and ligands. *Behring Inst Mitt* 1993: 165-177.
- 137 **Witney, A. A., Doolan, D. L., Anthony, R. M., Weiss, W. R., Hoffman, S. L. and Carucci, D. J.**, Determining liver stage parasite burden by real time quantitative PCR as a method for evaluating pre-erythrocytic malaria vaccine efficacy. *Mol Biochem Parasitol* 2001. **118**: 233-245.
- 138 **Bruna-Romero, O., Hafalla, J. C., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Sano, G., Tsuji, M. and Zavala, F.**, Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol* 2001. **31**: 1499-1502.
- 139 **Khan, Z. M. and Vanderberg, J. P.**, Role of host cellular response in differential susceptibility of nonimmunized BALB/c mice to *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* sporozoites. *Infect Immun* 1991. **59**: 2529-2534.
- 140 **Sato, Y. and Toma, H.**, *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. *Int J Parasitol* 1990. **20**: 57-62.

- 141 **Machado, E. R., Carlos, D., Lourenco, E. V., Sorgi, C. A., Silva, E. V., Ramos, S. G., Ueta, M. T., Aronoff, D. M. and Faccioli, L. H.,** Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. *Microbes Infect* 2009. **11**: 571-578.
- 142 **Negrao-Correa, D., Pinho, V., Souza, D. G., Pereira, A. T., Fernandes, A., Scheuermann, K., Souza, A. L. and Teixeira, M. M.,** Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for intestinal IL-4 production. *Int J Parasitol* 2006. **36**: 1185-1195.
- 143 **Porto, A. F., Neva, F. A., Bittencourt, H., Lisboa, W., Thompson, R., Alcantara, L. and Carvalho, E. M.,** HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* 2001. **23**: 503-507.
- 144 **Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J. and Nakanishi, K.,** IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 2007. **179**: 4415-4423.
- 145 **Elliott, D. E., Metwali, A., Leung, J., Setiawan, T., Blum, A. M., Ince, M. N., Bazzone, L. E., Stadecker, M. J., Urban, J. F., Jr. and Weinstock, J. V.,** Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *J Immunol* 2008. **181**: 2414-2419.
- 146 **Setiawan, T., Metwali, A., Blum, A. M., Ince, M. N., Urban, J. F., Jr., Elliott, D. E. and Weinstock, J. V.,** *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory T-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. *Infect Immun* 2007. **75**: 4655-4663.
- 147 **O'Garra, A., Vieira, P. L., Vieira, P. and Goldfeld, A. E.,** IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004. **114**: 1372-1378.
- 148 **Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. and Fisher, P. B.,** Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004. **22**: 929-979.
- 149 **Hoerauf, A., Satoguina, J., Saeftel, M. and Specht, S.,** Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunol* 2005. **27**: 417-429.
- 150 **Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D. and Allen, J. E.,** Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 2004. **201**: 89-116.
- 151 **Watanabe, K., Hamano, S., Yada, S., Noda, K., Kishihara, K., Nomoto, K. and Tada, I.,** The effect of interleukin-4 on the induction of intestinal mast cells and chronological cytokine profiles during intestinal nematode *Strongyloides ratti* infection. *Parasitol Res* 2001. **87**: 149-154.
- 152 **Callard, R. E., Matthews, D. J. and Hibbert, L.,** IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today* 1996. **17**: 108-110.
- 153 **McKenzie, A. N. and Fallon, P. G.,** Decoy receptors in the regulation of T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 2003. **197**: 675-679.
- 154 **Sadick, M. D., Street, N., Mosmann, T. R. and Locksley, R. M.,** Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. *Infect Immun* 1991. **59**: 4710-4714.
- 155 **Dunne, D. W. and Cooke, A.,** A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 420-426.
- 156 **Pearce, E. J. and MacDonald, A. S.,** The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 499-511.

- 157 **La Flamme, A. C., Scott, P. and Pearce, E. J.**, Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. *Parasite Immunol* 2002. **24**: 339-345.
- 158 **Hassan, M. F., Zhang, Y., Engwerda, C. R., Kaye, P. M., Sharp, H. and Bickle, Q. D.**, The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 2006. **169**: 943-953.
- 159 **Yoshida, A., Maruyama, H., Yabu, Y., Amano, T., Kobayakawa, T. and Ohta, N.**, Immune response against protozoal and nematodal infection in mice with underlying *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Int* 1999. **48**: 73-79.
- 160 **Rotman, H. L., Schnyder-Candrian, S., Scott, P., Nolan, T. J., Schad, G. A. and Abraham, D.**, IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol* 1997. **19**: 29-39.
- 161 **Korenaga, M., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Sato, Y., Takatsu, K. and Tada, I.**, The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. *Immunology* 1991. **72**: 502-507.
- 162 **Ovington, K. S., McKie, K., Matthaei, K. I., Young, I. G. and Behm, C. A.**, Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5. *Immunology* 1998. **95**: 488-493.
- 163 **Korenaga, M., Hitoshi, Y., Takatsu, K. and Tada, I.**, Regulatory effect of anti-interleukin-5 monoclonal antibody on intestinal worm burden in a primary infection with *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Int J Parasitol* 1994. **24**: 951-957.
- 164 **Watanabe, K., Sasaki, O., Hamano, S., Kishihara, K., Nomoto, K., Tada, I. and Aoki, Y.**, *Strongyloides ratti*: the role of interleukin-5 in protection against tissue migrating larvae and intestinal adult worms. *J Helminthol* 2003. **77**: 355-361.
- 165 **Noland, G. S., Graczyk, T. K., Fried, B., Fitzgerald, E. J. and Kumar, N.**, Exacerbation of *Plasmodium yoelii* malaria in *Echinostoma caproni* infected mice and abatement through anthelmintic treatment. *J Parasitol* 2005. **91**: 944-948.
- 166 **Noland, G. S., Graczyk, T. K., Fried, B. and Kumar, N.**, Enhanced malaria parasite transmission from helminth co-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 2007. **76**: 1052-1056.
- 167 **Noland, G. S., Urban, J. F., Jr., Fried, B. and Kumar, N.**, Counter-regulatory anti-parasite cytokine responses during concurrent *Plasmodium yoelii* and intestinal helminth infections in mice. *Exp Parasitol* 2008. **119**: 272-278.
- 168 **Sangweme, D., Shiff, C. and Kumar, N.**, *Plasmodium yoelii*: adverse outcome of non-lethal *P. yoelii* malaria during co-infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c mouse model. *Exp Parasitol* 2009. **122**: 254-259.
- 169 **Tetsutani, K., Ishiwata, K., Ishida, H., Tu, L., Torii, M., Hamano, S., Himeno, K. and Hisaeda, H.**, Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. *Eur J Immunol* 2009. **39**: 2822-2830.
- 170 **Graham, A. L., Lamb, T. J., Read, A. F. and Allen, J. E.**, Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *J Infect Dis* 2005. **191**: 410-421.
- 171 **Helmby, H.**, Gastrointestinal nematode infection exacerbates malaria-induced liver pathology. *J Immunol* 2009. **182**: 5663-5671.
- 172 **Helmby, H., Kullberg, M. and Troye-Blomberg, M.**, Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect Immun* 1998. **66**: 5167-5174.

- 173 **Segura, M., Matte, C., Thawani, N., Su, Z. and Stevenson, M. M.**, Modulation of malaria-induced immunopathology by concurrent gastrointestinal nematode infection in mice. *Int J Parasitol* 2009. **39**: 1525-1532.
- 174 **Su, Z., Segura, M., Morgan, K., Loredó-Osti, J. C. and Stevenson, M. M.**, Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infect Immun* 2005. **73**: 3531-3539.
- 175 **Specht, S., Ruiz, D. F., Dubben, B., Deininger, S. and Hoerauf, A.**, Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria. *Microbes Infect* 2010. **12**: 635-642.
- 176 **Waknine-Grinberg, J. H., Gold, D., Ohayon, A., Flescher, E., Heyfets, A., Doenhoff, M. J., Schramm, G., Haas, H. and Golenser, J.**, *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. *Malar J* 2010. **9**: 5.
- 177 **Wammes, L. J., Hamid, F., Wiria, A. E., de Gier, B., Sartono, E., Maizels, R. M., Luty, A. J., Fillie, Y., Brice, G. T., Supali, T., Smits, H. H. and Yazdanbakhsh, M.**, Regulatory T cells in human geohelminth infection suppress immune responses to BCG and *Plasmodium falciparum*. *Eur J Immunol* 2010. **40**: 437-442.
- 178 **Briand, V., Watier, L., JY, L. E. H., Garcia, A. and Cot, M.**, Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? *Am J Trop Med Hyg* 2005. **72**: 702-707.
- 179 **Actor, J. K., Shirai, M., Kullberg, M. C., Buller, R. M., Sher, A. and Berzofsky, J. A.**, Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 948-952.
- 180 **Kullberg, M. C., Pearce, E. J., Hieny, S. E., Sher, A. and Berzofsky, J. A.**, Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol* 1992. **148**: 3264-3270.
- 181 **Pearlman, E., Kazura, J. W., Hazlett, F. E., Jr. and Boom, W. H.**, Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J Immunol* 1993. **151**: 4857-4864.
- 182 **Khan, I. A., Hakak, R., Eberle, K., Sayles, P., Weiss, L. M. and Urban, J. F., Jr.**, Coinfection with *Heligmosomoides polygyrus* fails to establish CD8+ T-cell immunity against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2008. **76**: 1305-1313.
- 183 **Da'Dara, A. A., Lautsch, N., Dudek, T., Novitsky, V., Lee, T. H., Essex, M. and Harn, D. A.**, Helminth infection suppresses T-cell immune response to HIV-DNA-based vaccine in mice. *Vaccine* 2006. **24**: 5211-5219.
- 184 **Da'dara, A. A. and Harn, D. A.**, Elimination of helminth infection restores HIV-1C vaccine-specific T cell responses independent of helminth-induced IL-10. *Vaccine* 2010. **28**: 1310-1317.
- 185 **Elias, D., Akuffo, H., Pawlowski, A., Haile, M., Schon, T. and Britton, S.**, *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2005. **23**: 1326-1334.
- 186 **Nookala, S., Srinivasan, S., Kaliraj, P., Narayanan, R. B. and Nutman, T. B.**, Impairment of tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human lymphatic filariasis. *Infect Immun* 2004. **72**: 2598-2604.
- 187 **Sabin, E. A., Araujo, M. I., Carvalho, E. M. and Pearce, E. J.**, Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis* 1996. **173**: 269-272.

- 188 **Cooper, P. J., Chico, M. E., Losonsky, G., Sandoval, C., Espinel, I., Sridhara, R., Aguilar, M., Guevara, A., Guderian, R. H., Levine, M. M., Griffin, G. E. and Nutman, T. B.**, Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 2000. **182**: 1199-1206.
- 189 **Cooper, P. J., Espinel, I., Wieseman, M., Paredes, W., Espinel, M., Guderian, R. H. and Nutman, T. B.**, Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response. *Infect Immun* 1999. **67**: 5951-5957.
- 190 **Rouanet, C. and Locht, C.**, Boosting BCG to protect against TB. *Expert Rev Respir Med* 2010. **4**: 339-348.
- 191 **Noland, G. S., Chowdhury, D. R., Urban, J. F., Jr., Zavala, F. and Kumar, N.**, Helminth infection impairs the immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* DNA vaccine, but not irradiated sporozoites, in mice. *Vaccine* 2010. **28**: 2917-2923.
- 192 **Hubner, M. P., Pasche, B., Kalaydjiev, S., Soboslay, P. T., Lengeling, A., Schulz-Key, H., Mitre, E. and Hoffmann, W. H.**, Microfilariae of the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* exacerbate the course of lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Infect Immun* 2008. **76**: 1668-1677.
- 193 **Collison, L. W., Chaturvedi, V., Henderson, A. L., Giacomini, P. R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C. J., Brown, S. A., Rehg, J. E., Jones, M. L., Ni, H. T., Artis, D., Turk, M. J. and Vignali, D. A.**, IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* **11**: 1093-1101.