

**Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Dir.: Prof. Dr. B. Fleischer**

**Expression von Prostaglandin E<sub>2</sub> in Entwicklungsstadien der  
Filarie *Onchocerca* sowie in Wirtszellen von  
Onchozerkosepatienten**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Arline Schwohl**

**aus Hamburg**

**Hamburg 2004**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Onchocerca volvulus</i> .....	1
1.1.1	Vorkommen von <i>O. volvulus</i> .....	1
1.1.2	Der Lebenszyklus von <i>O. volvulus</i> .....	3
1.1.3	Bekämpfung der Onchozerkose .....	7
1.1.4	Mikrofilarien als pathogenes Agens der Parasit-Wirt-Interaktion ..	9
1.2	Immunantwort des menschlichen Organismus auf ein pathogenes Agens.....	11
1.3	Prostaglandin E <sub>2</sub> .....	13
1.3.1	Entstehung und Rolle von Prostaglandin E <sub>2</sub> im Stoffwechsel des Wirts.....	13
1.3.2	Rolle von Prostaglandin E <sub>2</sub> im Immunsystem .....	16
1.3.3	Eicosanoidproduktion von Parasiten.....	18
1.4	Fragestellungen .....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1	Untersuchte Filarien .....	20
2.2	Immunhistologischer Nachweis von PGE <sub>2</sub> .....	22
2.2.1	Reagenzien zur histologischen Färbung.....	22
2.2.2	APAAP-Methodik.....	23
2.2.3	Absorption des Anti-PGE <sub>2</sub> -Serums .....	24
2.2.4	Immunhistologischer Nachweis von TGF-β1 und anderen Proteinen.....	25
2.3	Immunfluoreszenznachweis von PGE <sub>2</sub> in Mikrofilarien.....	26
2.3.1	Reagenzien.....	26
2.3.2	Immunfluoreszenz-Methodik.....	27
2.3.3	Produktion von PGE <sub>2</sub> durch Mikrofilarien.....	29
2.4	PGE <sub>2</sub> -Bestimmung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie .....	30
2.4.1	Reagenzien.....	30
2.4.2	Methodik.....	30
2.5	Zytospin von mononukleären Zellen.....	32
2.5.1	Reagenzien.....	32
2.5.2	Stimulation von mononukleären Zellen.....	32

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Methodisch bedingte Variationen der Immunhistologie.....	33
3.1.1	Konzentrationen des PGE <sub>2</sub> -Antiserums .....	33
3.1.2	Einfluß der Fixierungen .....	33
3.1.3	Negativkontrollen mit BSA .....	34
3.1.4	Spezifitätsnachweis durch Absorptionsversuche des PGE <sub>2</sub> - Antiserums mit PGE <sub>2</sub> oder mit Arachidonsäure .....	35
3.1.5	Variation bei verschiedenen Proben .....	37
3.2	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in Filarien.....	38
3.2.1	Unbehandelte Patienten .....	38
3.2.2	Behandelte Patienten .....	45
3.3	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in Wirtszellen.....	47
3.3.1	Wirtszellen im Onchozerkom .....	47
3.3.2	Wirtszellen in der Haut .....	54
3.4	Versuche zum Nachweis von PGE <sub>2</sub> in Mikrofilarien durch Immunfluoreszenz .....	56
3.5	Nachweis von PGE <sub>2</sub> mit der Hochleistungsflüssig-chromatographie- Massenspektrometrie .....	57
3.6	Bildung von PGE <sub>2</sub> durch Makrophagen nach Stimulation mit <i>O.</i> <i>volvulus</i> -Extrakt.....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>85</b>

<b>Abbildung 1</b>	Vorkommen der Onchozerkose	<b>2</b>
<b>Abbildung 2</b>	Lebenszyklus von <i>O. volvulus</i>	<b>5</b>
<b>Abbildung 3</b>	Schematische Darstellung von <i>O. volvulus</i> im Querschnitt	<b>6</b>
<b>Abbildung 4</b>	Hyperreaktive Form der Onchozerkose	<b>10</b>
<b>Abbildung 5</b>	Stoffwechselwege zur Bildung von PGE <sub>2</sub> .	<b>14</b>
<b>Abbildung 6</b>	PGE <sub>2</sub> -Wirkungen auf Th <sub>1</sub> und Th <sub>2</sub> -Zellen	<b>17</b>
<b>Abbildung 7</b>	Negativkontrolle mit Serumalbumin	<b>34</b>
<b>Abbildung 8</b>	Spezifitätsnachweis mit Arachidonsäure	<b>35</b>
<b>Abbildung 9</b>	Spezifitätsnachweis durch Absorption des PGE <sub>2</sub> -Antiserum mit PGE <sub>2</sub>	<b>36</b>
<b>Abbildung 10</b>	Nachweis von PGE <sub>2</sub> in der Hypodermis	<b>39</b>
<b>Abbildung 11</b>	Nachweis von PGE <sub>2</sub> in Uterus- und Darmepithel	<b>39</b>
<b>Abbildung 12</b>	Nachweis von PGE <sub>2</sub> in Oozyten in Ovar und Uterus	<b>40</b>
<b>Abbildung 13</b>	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in einer männlichen Filarie	<b>41</b>
<b>Abbildung 14</b>	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in der Pseudocoelomhöhle	<b>41</b>
<b>Abbildung 15</b>	Mikrofilarien im Knotengewebe	<b>42</b>
<b>Abbildung 16</b>	Tumor in lebenden Weibchen	<b>44</b>
<b>Abbildung 17</b>	Variationen der Markierung von PGE <sub>2</sub>	<b>44</b>
<b>Abbildung 18</b>	Behandlung mit Ivermectin	<b>45</b>
<b>Abbildung 19</b>	Behandlung mit Doxycyclin	<b>46</b>
<b>Abbildung 20</b>	Nachweis von PGE <sub>2</sub> in Riesenzellen	<b>48</b>
<b>Abbildung 21</b>	Weibchen mit markierten Makrophagen	<b>48</b>
<b>Abbildung 22</b>	Markierte Makrophagen	<b>49</b>
<b>Abbildung 23</b>	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in Plasmazellen	<b>50</b>
<b>Abbildung 24</b>	Markierte Riesenzellen bei der hyperreaktiven Form	<b>51</b>
<b>Abbildung 25</b>	Vergleich von PGE <sub>2</sub> und TGF-β	<b>52</b>
<b>Abbildung 26</b>	Ivermectinbehandlung	<b>53</b>
<b>Abbildung 27</b>	Makrophagen in der Haut bei der generalisierten Form	<b>54</b>
<b>Abbildung 28</b>	Makrophagen in der Haut bei der hyperreaktiven Form	<b>55</b>
<b>Abbildung 29</b>	PGE <sub>2</sub> -Nachweis in Extrakten von adulten Weibchen von <i>O. volvulus</i> mit der Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie	<b>57</b>
<b>Abbildung 30</b>	Versuch des PGE <sub>2</sub> -Nachweises in unstimulierten mononukleären Zellen in der APAAP-Färbung	<b>59</b>
<b>Abbildung 31</b>	Mit LPS inkubierte mononukleäre Zellen	<b>60</b>
<b>Abbildung 32</b>	Nachweis von PGE <sub>2</sub> im Zytoplasma mononukleärer Zellen	<b>60</b>

## Abkürzungen

aaM	alternativ aktivierte Makrophagen
AMCA	7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetate
APAAP	alkalische Phosphatase–anti-alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches 3', 5'-Adenosin-monophosphat
CD1	“cluster of differentiation 1”
CD68	“cluster of differentiation 68”
COX	Cyclooxygenasen
DC	dendritische Zellen
EDAC	1-Ethyl-3-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
HBSS	„Hank´s balanced salt solution“
HPLC-MS	„High pressure liquid chromatography-mass spectrometry“
HSP60	Hitzeschockprotein 60
IL	Interleukin
kaM	klassisch aktivierte Makrophagen
L1, L2, L3, L4	erstes bis viertes Larvenstadium von <i>O. volvulus</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC387	“macrophage L1 protein calprotectin antibody”
MHC	„major histocompatibility complex“
OCP	Onchocerciasis Control Programme in West Africa
OvE	<i>Onchocerca-volvulus</i> -Extrakt
PBS	„phosphate buffered saline“
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBST	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20

## Abkürzungen

---

TGF- $\beta$	“transforming growth factor beta”
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
WHO	World Health Organisation
WSP	„ <i>Wolbachia</i> surface protein“

# 1 Einleitung

## 1.1 *Onchocerca volvulus*

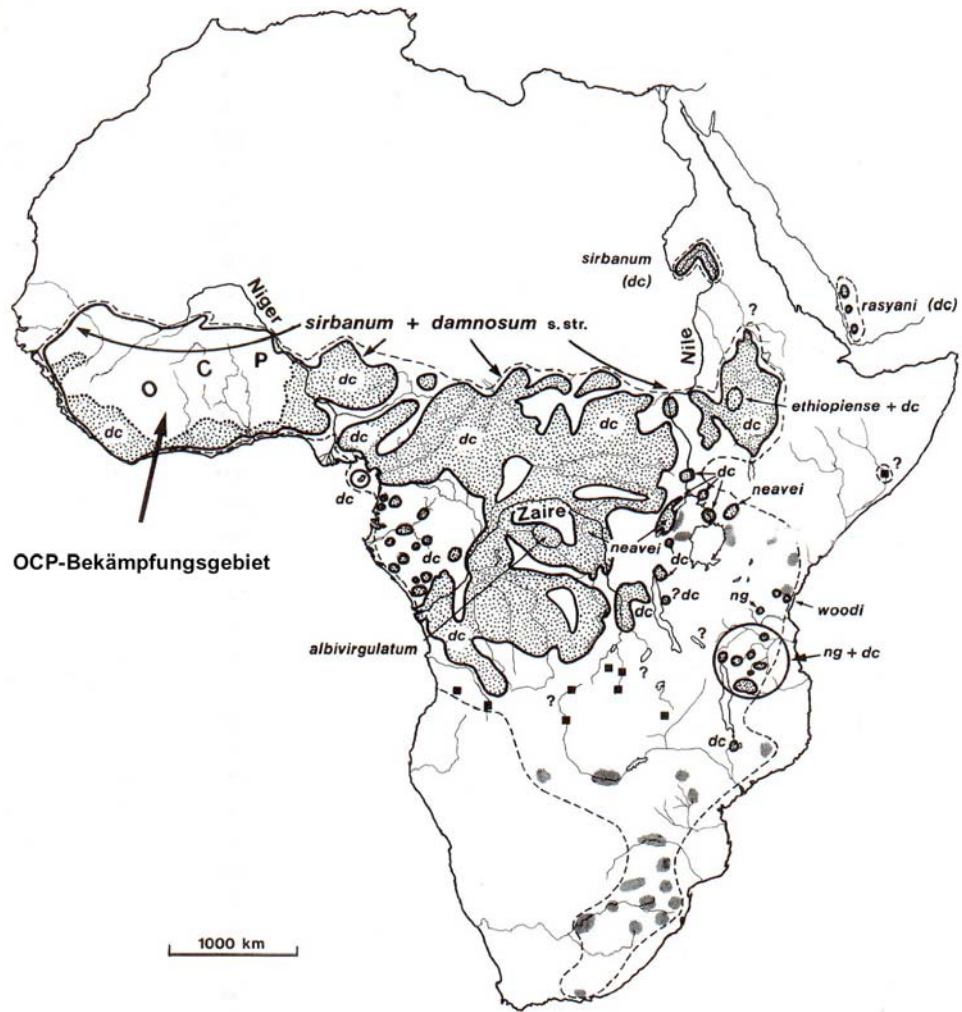
### 1.1.1 Vorkommen von *O. volvulus*

Die Onchozerkose ist eine bedeutende Infektion des Menschen, die hauptsächlich im tropischen Afrika und zu einem geringeren Anteil in Lateinamerika und im Jemen endemisch ist (WHO, 1987). Die Onchozerkose wird von dem im menschlichen Bindegewebe lebenden Nematoden *Onchocerca volvulus* (Ordnung Spirurida, Überfamilie Filarioidea) verursacht, deren Überträger Kriebelmücken der Gattung *Simulium* sind.

In 37 Ländern sind ca. 18 Millionen Menschen mit *O. volvulus* infiziert. Insgesamt leben in den Risikogebieten mehr als 120 Millionen Menschen. Der Hauptanteil der betroffenen Bevölkerung lebt außerhalb des Gebietes des "Onchocerciasis Control Programme" (OCP), das elf Länder Westafrikas umfaßte. Außerhalb des OCP-Gebietes sind 94,5 Millionen Menschen infektionsgefährdet. Dieser Parasit stellt eine der wichtigen humanpathogenen Filarien dar (WHO, 1995).

Die Onchozerkose wird auch als „Flußblindheit“ bezeichnet, da das Auftreten der Infektion an das Vorkommen schnell fließender Gewässer gebunden ist, an denen die Überträgermücken leben und den Menschen infizieren. Kriebelmücken benötigen sauerstoffreiche, schnell fließende Gewässer als Brutplätze. Durch die Abhängigkeit von *O. volvulus* von seinem Vektor und damit dessen Habitat zeigt die Infektion diese ausgeprägte fokale Endemizität. In hyperendemischen Regionen können mehr als 90% der Erwachsenen mit *O. volvulus* infiziert sein (McMahon und Simonsen, 1996).

Die natürlichen Überträger von *O. volvulus* gehören in Westafrika zum *Simulium damnosum*-Komplex, in Ostafrika und im Jemen zum *S. damnosum*-Komplex und der *S. neavei*-Gruppe. In Mittelamerika findet die Übertragung durch *S. ochraceum* statt, und in Südamerika sind andere *Simulium*-Arten die Überträger (WHO, 1995).



**Abbildung 1.** Vorkommen der Onchozerkose (Roger W. Crosskey, Lane und Crosskey, 1993).



Der Parasit verursacht Schäden an mehreren Organsystemen des menschlichen Organismus. Dazu gehören in erster Linie Manifestationen an der Haut mit starkem Juckreiz, potentiell schwere Veränderungen und Schädigungen an den Augen, am Lymphsystem sowie eine Schwächung des Immunstatus des Patienten (WHO, 1987, 1995). Eine durch *O. volvulus* verursachte Erkrankung und Blindheit kann die Lebenserwartung um zehn und mehr Jahre reduzieren (Kirkwood et al., 1983).

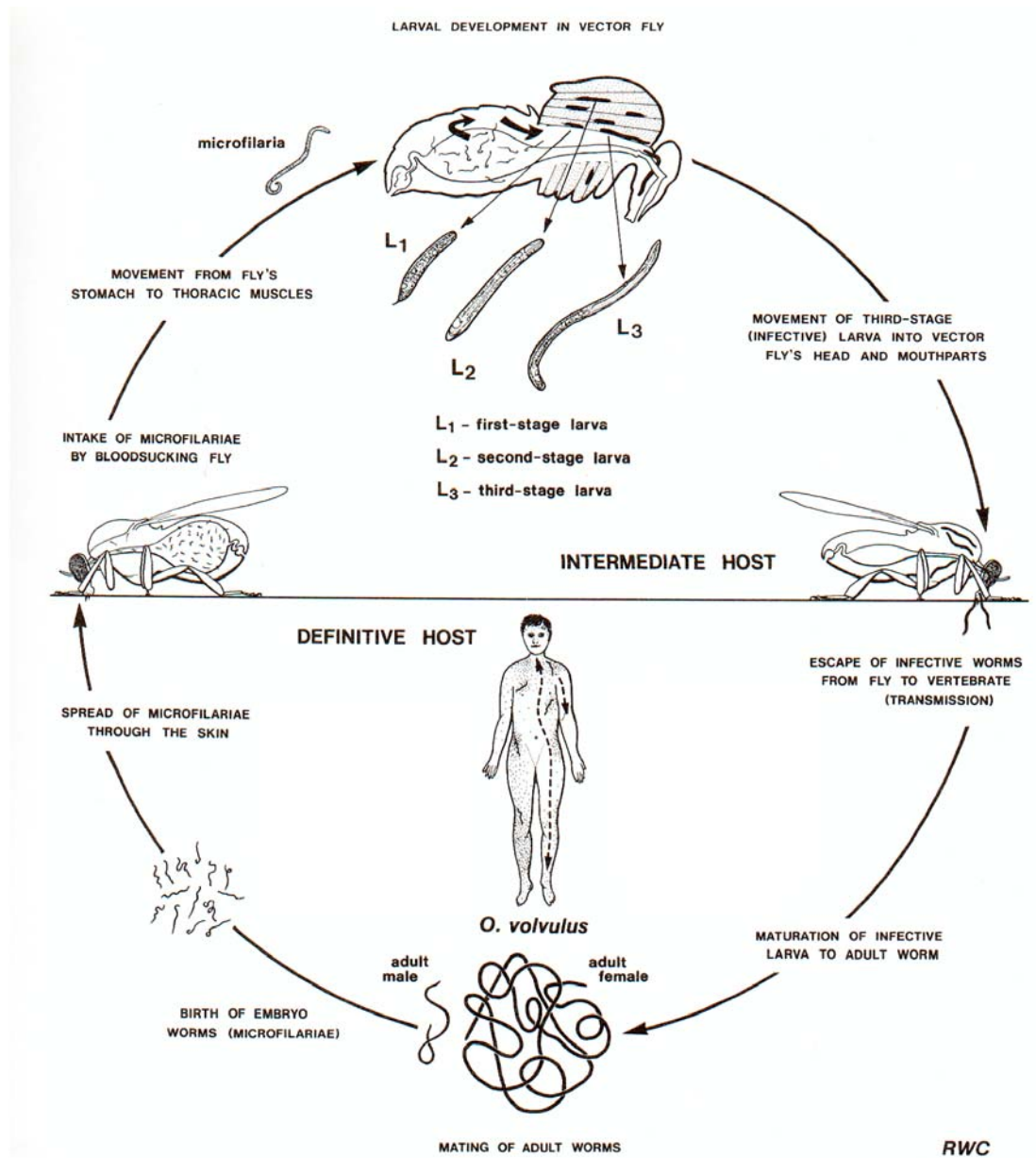
### **1.1.2 Der Lebenszyklus von *O. volvulus***

Der Entwicklungszyklus von *O. volvulus* verläuft in fünf Stadien, wobei die Larvenstadien L2 und L3 im Zwischenwirt *Simulium* heranreifen, um dann die weitere Entwicklung und Fortpflanzung im Endwirt Mensch zu vollziehen (Duke, 1990). Die Übertragung der infektiösen Larven (L3) auf den Menschen erfolgt während einer Blutmahlzeit der Kriebelmücken. Die L3 wandern durch das Subkutangewebe und häuten sich innerhalb von 3-6 Tagen zum vierten Larvenstadium (L4) (Bianco et al., 1989; Strote und Bonow, 1991). Nachdem die L4 sich ein weiteres Mal gehäutet haben, wachsen die Filarien zum adulten Wurm heran.

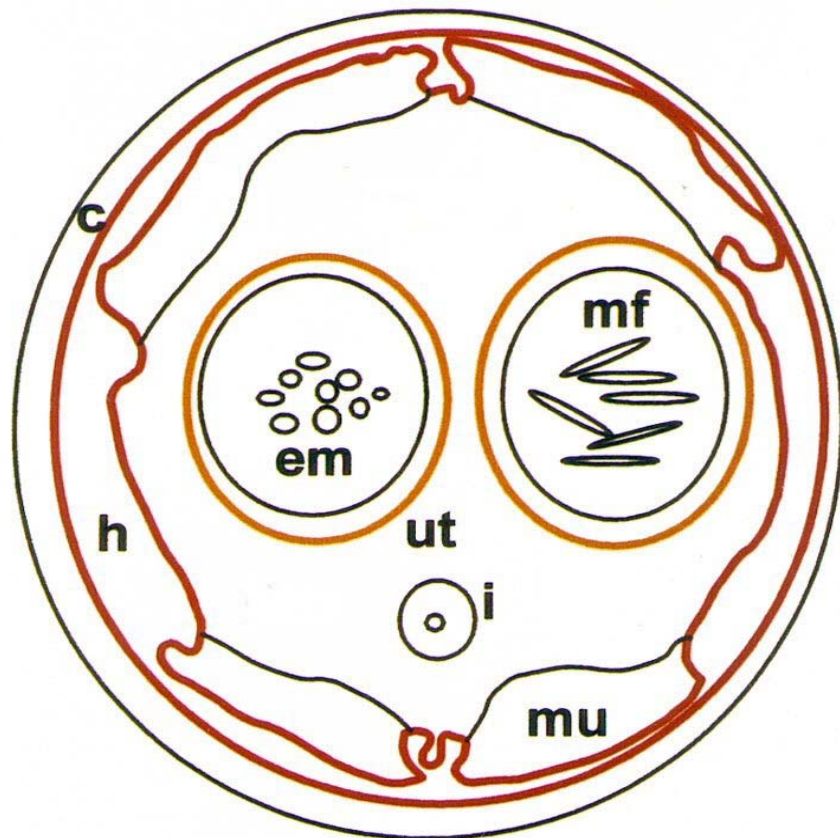
Die adulten Weibchen, mit einer Länge zwischen 20 und 60 cm, wachsen innerhalb von 12 Monaten nach der Infektion heran und liegen eng zusammengerollt in fibrösen Knoten (Onchozerkome). Die Onchozerkome befinden sich meist oberflächlich im Unterhautbindegewebe (Nelson, 1970). Sie können aber auch in tieferen Gewebsschichten vorkommen (Kilian, 1988) und enthalten 1 bis 10 und mehr adulte Würmer (Albiez et al., 1985). Die adulten Männchen hingegen sind sehr viel kleiner als die Weibchen. Sie erreichen nur eine Länge von 2 bis 8 cm. Die Männchen sind sehr beweglich, wandern zwischen den Knoten und begatten die sessilen Weibchen durch Einbringen von Sperma in die Vagina, die sich im Vorderende des Weibchens befindet (Neafie, 1972).

Aus einem produktiven Weibchen schlüpfen pro Tag durchschnittlich 700 bis 1500 ungescheidete Mikrofilarien (L1). Insgesamt produzieren die Weibchen innerhalb von 10 bis 15 Jahren Millionen von Mikrofilarien. Diese erreichen Längen um 300  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von 5 bis 9  $\mu\text{m}$ . Die Mikrofilarien wandern aus dem Knoten in die menschliche Haut und in die Augen. Hier können sie 6 bis 24 Monate leben und bei einer Blutmahlzeit von weiblichen Simulien aufgenommen werden.

Weiterhin wurden bei älteren, nicht fertilen, sowie bei moribunden und toten Weibchen von *O. volvulus* polymorphe Neoplasien festgestellt. Diese pleomorphen, basophilen Zellen scheinen von Ovarialzellen abzustammen und erstrecken sich von der Pseudocoelomhöhle über den gesamten Wurm, komprimieren damit seine inneren Organe und führen zum Tod der Filarie (Duke et al., 2000).



**Abbildung 2.** Lebenszyklus von *O. volvulus* (Roger W. Crosskey, Lane und Crosskey, 1993).



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung von *O. volvulus* im Querschnitt  
c = Kutikula, em = Embryonen, h = Hypodermis, mu = Muskulatur der Körperwand, ut = Uterusepithel, i = Darm, mf = Mikrofilarien (Dr. Gabriele

### 1.1.3 Bekämpfung der Onchozerkose

Die Bekämpfung der Onchozerkose beruht auf zwei unterschiedlichen Strategien:

- Vektorkontrolle durch Insektizide.
- Einsatz von Chemotherapeutika.

Die Möglichkeit eines Immunschutzes durch eine Impfung ist bisher offen.

#### Vektorbekämpfung

Das wichtigste und umfassendste Projekt zur Bekämpfung der Simulien wurde 1974 in Westafrika als „Onchocerciasis Control Programme“ (OCP) unter Leitung der WHO begonnen. Es wurde im Jahr 2002 beendet (Dadzie et al., 2003). Das Zielgebiet umfaßte 11 Länder mit Flußläufen von insgesamt 23.000 km Länge. Regelmäßig wurden über den Brutplätzen der *Simulien* per Hubschrauber Insektizide versprüht. Hierdurch konnte die Übertragung erfolgreich gesenkt und schließlich sogar unterbrochen werden (WHO, 1987; 1995).

#### Massenbehandlung

Die Behandlung der Patienten mit dem Mikrofilarizid Ivermectin (Mectizan®), stellt zur Zeit die wichtigste Möglichkeit bei der Bekämpfung der Onchozerkose dar. Ivermectin ist ein Derivat des Avermectin B1. Es bewirkt eine Verringerung der Mikrofilariendichte bei geringen Nebenwirkungen. Nach seiner Zulassung wird dieses Medikament seit 1987 von den Herstellern kostenlos an die Ministerien und Organisationen, die es an mit Onchozerkose infizierte Personen verteilen, ausgegeben (Mectizan Donation Program).

Der Wirkungsmechanismus des Ivermectin beruht auf einer Interaktion mit dem Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA). Durch diese Neurotransmitter ansprechende Reaktion, kommt es zu einer Veränderung im Bewegungsmuster der Filarien. Die lähmende Wirkung der Filarien hat zur Folge, daß diese besser von den Abwehrzellen des Immunsystems angegriffen und eliminiert werden können. Auch die Mikrofilarien im Uterus werden in ihrem Bewegungsmuster verändert, so daß die Mikrofilarien beim Geburtsvorgang, der ein aktiver Prozess ist, nicht schlüpfen können.

---

Ivermectin wirkt nicht direkt mikrofilarizid, da es in vitro erst bei einer 1000-fachen Konzentration der therapeutisch erreichbaren Konzentration die Filarien tötet (Chavasse und Davies, 1990). Weiterhin hält die mikrofilarizide Wirkung von Ivermectin auf die Mikrofilarien im Uterus nur für ein paar Monate an, so daß innerhalb eines Jahres 20% und mehr der Menschen erneut behandelt werden müssen. Adulte Filarien, die bis zu 15 Jahre leben und frühe embryonale Stadien, wie Oozyten und Morulae, bleiben vom Ivermectin weitgehend unbeeinflusst, was der Grund für die beschränkte Wirksamkeit des Ivermectins ist (WHO, 1995).

Eine andere mögliche Strategie zur Bekämpfung der Onchozerkose ist, die Embryogenese im frühen Stadium komplett oder zumindest über einen langen Zeitraum zu blockieren. Diese Strategie stützt sich auf die Sterilisation der adulten Filarien durch Elimination ihrer intrazellulären Rickettsien-artigen Wolbachien mit Hilfe des Tetracyclins Doxycyclin. Seit 1999 finden Therapiestudien mit Doxycyclin statt. Es konnte gezeigt werden, daß bei mit Doxycyclin behandelten Filarien die Bakteriendichte stark reduziert war und auch keine normale Embryonalentwicklung mehr auftrat. Außerdem war deutlich zu erkennen, daß viele adulte Filarien jetzt degeneriert oder sogar tot waren (Hoerauf et al., 2000, 2003; Bandi et al., 2001).

Neuere Studien haben gezeigt, daß die Kombination von Ivermectin und Doxycyclin eine komplette Blockierung der Embryogenese der Filarien für mindestens 18 Monate, wenn nicht sogar irreversibel, zur Folge hat. Das Prinzip der Bekämpfung der Wolbachien in Kombination mit der Ivermectinbehandlung ist höchst effektiv und bietet die Möglichkeit, die Fortpflanzung zu unterbrechen (Hoerauf et al., 2001, 2003).

### **Nodulektomien zur Verringerung der Mikrofilariendichte**

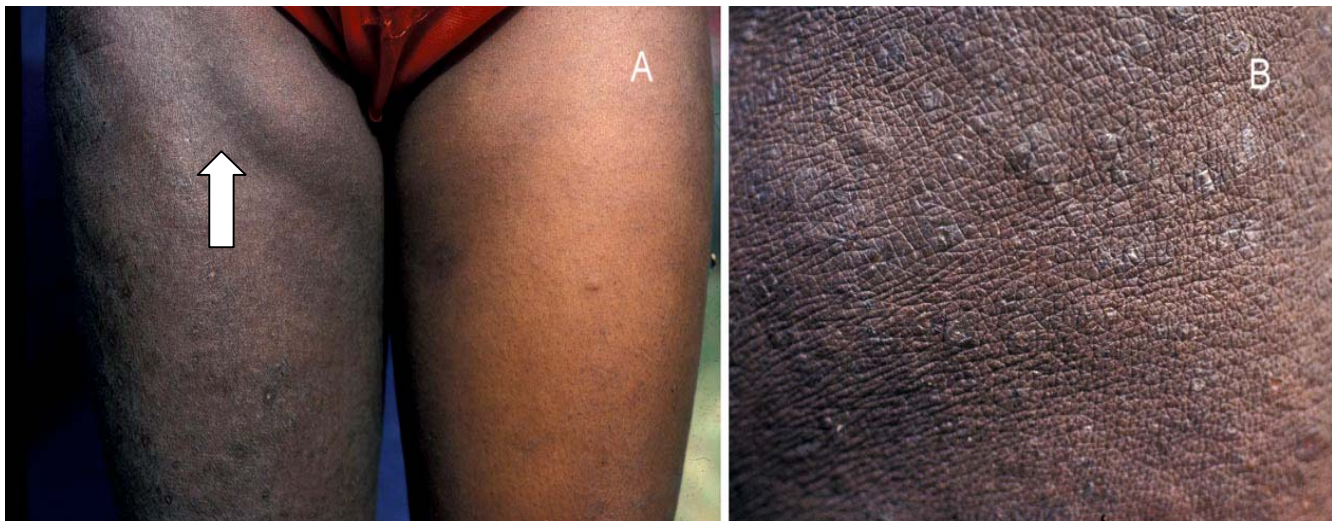
Eine vorübergehende Verringerung der Filariendichte, kann durch Nodulektomie, das heißt Entfernung von Onchozerkomen, erzielt werden. Diese Methode ist nur in Gebieten mit einer nicht zu großen Anzahl infizierter Menschen geeignet. Regelmäßige jährliche oder halbjährliche Nodulektomien wurden mehrere Jahrzehnte in Guatemala und Mexico erfolgreich angewendet (Figueroa Marroquin, 1974; Salazar Mallén, 1974).

Für Afrika ist diese Methode zur Bekämpfung wenig geeignet, weil es sich um große Bevölkerungsgruppen handelt und da die Nodulektomie selten eine vollständige Entfernung aller adulten Weibchen bedeutet. Es können aber individuell die Mikrofilarienzahlen gesenkt und dadurch die Symptome gemildert werden (Albiez, 1985; Guderian et al., 1987). Diese Nodulektomien müssen jedoch bei andauernder Exposition regelmäßig vorgenommen werden. Der Mangel an Ärzten und die hohen Kosten erschweren die Durchführbarkeit dieser Methode. Weiterhin können durch Nodulektomien Knoten und Hautproben für Studienzwecke gewonnen werden, wie dies auch bei den Knoten der vorliegenden Arbeit der Fall war.

#### **1.1.4 Mikrofilarien als pathogenes Agens der Parasit-Wirt-Interaktion**

Personen mit Onchozerkose können bis zu 12 Millionen Mikrofilarien und mehr beherbergen (Schulz-Key, 1990). Pro Milligramm Haut variiert die Mikrofilariendichte zwischen weniger als einer Mikrofilarie bis zu mehreren Hundert, selten bis zu mehr als 700 Mikrofilarien. Zwischen 50 000 bis 70 000 Mikrofilarien können jeden Tag sterben (Schulz-Key und Karam, 1986; Duke, 1993). Tote Mikrofilarien stimulieren eine lokale entzündliche Reaktion des Wirtes, wobei bei chronischen Infektionen der kumulative Effekt der sterbenden Mikrofilarien eine erhebliche Entzündung auslösen kann. Die Manifestationen der entzündlichen Reaktionen betreffen vor allem Haut, Lymphknoten und Augen.

Bei einer Minderheit der Personen führt die Onchozerkose zu sehr ausgeprägten Krankheitserscheinungen, wie stark vergrößerten, regionalen Lymphknoten, hyperreaktiver lokalisierter Dermatitis, Ödemen und einer typischen Dunkelfärbung der Haut (Hyperpigmentierung). Hierbei werden häufig niedrige Mikrofilariendichten registriert. Diese Form der Onchozerkose wird auch als *hyperreaktive* Form oder „Sowda“ (arabisch „aswad“ = schwarz) bezeichnet. Sie manifestiert sich vorzugsweise bei Teenagern und jungen Erwachsenen (Albiez et al., 1985). Die „Sowda“-Form ist das Resultat einer hyperreaktiven Entzündung, die zur Eliminierung der Mikrofilarien führt und zur Schädigung der Haut (Ottesen, 1995; Hoerauf und Brattig, 2002), (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** Hyperreaktive Form der Onchozerkose

(A) Typisches Bild einer 21jährigen Liberianerin mit hyperreaktiver Onchozerkose. Asymmetrie der Läsionen und erhebliche Schwellung der femoralen Lymphknoten rechts (Pfeil). (B) Detailaufnahme der Haut des rechten Oberschenkels einer 22jährigen Liberianerin mit papulärer Dermatitis und Lichenifikation. Stelle der Operation an der Crista iliaca. Von beiden Patientinnen wurden Knoten untersucht.



Meist kommt es jedoch trotz hoher Mikrofilariendichte erstaunlicherweise nur zu einer geringen inflammatorischen Reaktion. Bei dieser Form, der generalisierten Onchozerkose, kann die Haut fast normal aussehen. Diese Beobachtungen haben zu der Annahme geführt, daß Mikrofilarien antiinflammatorische Mechanismen auslösen (Maizels et al., 1993; Ottesen, 1995; Brattig 2004) oder immunsuppressive Wirkungen von den Mikrofilarien selbst ausgehen, die bisher nicht näher geklärt werden konnten. Das Überleben des Parasiten *O. volvulus* im Wirt über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren und die eingeschränkte T-Zellantwort sind charakteristisch für die Onchozerkose.

## **1.2 Immunantwort des menschlichen Organismus auf ein pathogenes Agens**

Bei Kontakt des menschlichen Organismus mit verschiedensten Umweltstoffen reagiert dieser mit einer Immunantwort bzw. einer inflammatorischen Reaktion. Die Reaktion hängt von der Natur des einwirkenden Agens und dem involvierten Gewebe ab.

Bei der Regulation der adaptiven Immunantwort spielen Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen eine entscheidende Rolle. Die Antigen-spezifische Immunantwort wird durch spezielle Zytokine der T-Helferzellen (Th) reguliert. Die T-Helferzellen werden in zwei Subtypen unterteilt, in Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen. Bei der Stimulation von T-Lymphozyten durch die Antigen-präsentierenden Zellen tritt neben dem Signal 1 (Ligation des T-Zellrezeptors durch MHC-gebundenes Peptid) und dem Signal 2 (Ligation durch ko-stimulatorische Moleküle) ein drittes, polarisierendes Signal der APC in Form von immunmodulierenden Zytokinen auf, hier sind besonders IL-12 bzw. IL-10 und Prostaglandin E<sub>2</sub> zu nennen, die eine Differenzierung von Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Zellen fördern (Kapsenberg und Kalinski, 1999; Kapsenberg et al., 1999; Gratchev et al., 2001). Dieses dritte Signal der APC wird durch Moleküle des Pathogens ausgelöst, durch Pathogen-induzierte Moleküle oder Gewebefaktoren. Eine Polarisierung der T-Lymphozyten zu Th<sub>1</sub>-Zellen wird charakteristischerweise durch Bakterien oder Viren ausgelöst. Helmintheninfektionen führen dagegen zu einer Aktivierung von Th<sub>2</sub>-Zellen (Maizels et al., 2003).

In Abhängigkeit von der Dominanz von IL-12/IL-18 (Th<sub>1</sub>-Förderung) oder von IL-4/IL-10 und PGE<sub>2</sub> (Th<sub>2</sub>-Förderung) werden Typ 1-APC bzw. dendritische Zellen (DC) vom Typ 2-APC/DC unterschieden (Kapsenberg und Kalinski, 1999; Kapsenberg et al., 1999; Gratchev et al., 2001; Gordon 2003). Zu den Typ 1-APC gehören die klassisch aktivierten Makrophagen (kaM). Diese induzieren durch Produktion von IL-12 die Differenzierung von Th-Zellen zu Th1-Lymphozyten und werden selbst durch IL-12 oder  $\gamma$ -Interferon zu kaM polarisiert.

Zu den Typ 2-APC werden die alternativ aktivierten Makrophagen (aaM) gezählt, die durch IL-4 und IL-10 polarisiert werden und die T-Zellantwort in Richtung Th<sub>2</sub> durch die Produktion von PGE<sub>2</sub> verschieben (Song et al., 2000; Gratchev et al., 2001;).

Alternativ aktivierte Makrophagen bewirken eine Unterdrückung der Inflammation, indem sie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 exprimieren und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-12 und TNF $\alpha$  verhindern (Gratchev et al., 2001). Andererseits sind aaM an den verschiedenen Phasen der Wundheilung und der Angiogenese beteiligt. Außerdem sind aaM an der Bereitstellung von Faktoren zur Fibrogenese involviert. Sie sind daher häufig in fibrotischen Geweben zu beobachten (Song et al., 2000).

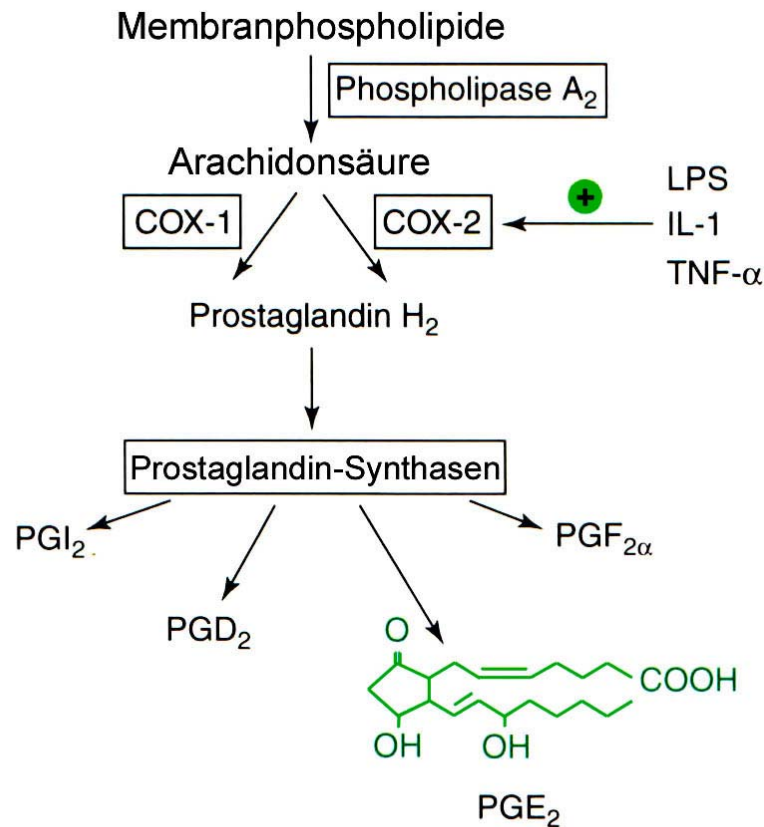
Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion unterschieden. Die Th<sub>1</sub>-Zellen produzieren neben größeren Mengen des Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL-2) hauptsächlich  $\gamma$ -Interferon, ein Zytokin, das für die Hochregulation der MHC-Klasse-2-Moleküle verantwortlich ist und auf diese Weise fördernd auf die zelluläre Immunantwort wirkt (Hasler et al., 1983; Betz und Fox, 1991).  $\gamma$ -Interferon stimuliert Makrophagen. Beide Zytokine sind verantwortlich für eine lokale Inflammation und die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Neben den Th<sub>1</sub>-Zytokinen werden die Th<sub>2</sub>-Zytokine für die Eliminierung extrazellulärer Pathogene benötigt. Th<sub>2</sub>-Zellen synthetisieren IL-4 und IL-5 (Mosmann und Coffman, 1989). IL-4 ist ein Regulator der Immunglobulinproduktion der B-Zellen (Gratchev et al., 2001).

### 1.3 Prostaglandin E<sub>2</sub>

#### 1.3.1 Entstehung und Rolle von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Stoffwechsel des Wirts

Prostaglandine (PG) sind sauerstoffabhängige Derivate der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure mit einer Cyclopentanringstruktur. Arachidonsäure ist ein natürlicher Bestandteil der Phospholipide in der Plasmamembran. Die Prostaglandine gehören mit ihren 20 C-Atomen, wie die Prostacycline, Leukotriene und Thromboxane zu den Eicosanoiden (eikosi, griechisch, bedeutet 20). Fast alle Körperzellen können Eicosanoide bilden.

Für ihre Synthese wird zunächst durch eine Phospholipase A<sub>2</sub> Arachidonsäure aus Membranphospholipiden abgespalten. Das Enzym wird von Hormonen und anderen Reizen über G-Proteine aktiviert. Anschließend führen zwei verschiedene Wege - entweder über die Enzyme der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 oder über Lipoxygenase - von der Arachidonsäure zu den Eicosanoiden. Die Cyclooxygenase-1 wird von den meisten Geweben konstitutiv gebildet, wohingegen die Cyclooxygenase-2 ein induzierbares Enzym ist (Harris et al., 2002). Durch die Reaktion von Lipoxygenasen entstehen aus der Arachidonsäure Leukotriene, während Cyclooxygenasen in zwei Schritten aus dem Arachidonat unter Sauerstoffverbrauch Prostaglandin H<sub>2</sub> bilden. Von diesem Metabolit führen zellspezifische Prostaglandin-Synthasen zu den verschiedenen Prostaglandinen, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Stoffwechselwege zur Bildung von PGE<sub>2</sub>

Arachidonsäure wird durch eine Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranphospholipiden abgespalten. Die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) bilden aus dem Arachidonat Prostaglandin H<sub>2</sub>. Von diesem Metabolit führen zellspezifische Prostaglandin-Synthasen zu den verschiedenen Prostaglandinen PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> (Modifiziert nach Trends in Immunology, Vol. 23, No. 3, 2002).

Das Wirkspektrum der Eicosanoide ist vielfältig. Prostaglandine wirken in ihrer unmittelbaren Umgebung durch Bindung an spezifische Rezeptoren der Plasmamembran und Auslösung von intrazellulären Reaktionen (Harris et al., 2002). Sie haben eine parakrine sowie autokrine Wirkung.

Die Eicosanoide stellen Stimulatoren für bestimmte hydrophile Hormone dar und wirken sehr vielfältig. Sie beeinflussen den Knochenstoffwechsel, kontrollieren die Kontraktion der glatten Muskulatur, greifen in die Ausschüttung von Zellprodukten ein, wirken auf das autonome Nervensystem und sind wirkungsvolle Schmerzsignale.

PGE<sub>2</sub> bindet an vier Rezeptorsubtypen (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> und EP<sub>4</sub>), die von verschiedenen Zellen exprimiert werden. Diese Rezeptoren bestehen aus sieben hydrophoben transmembranen Domänen und sind an spezifische G-Proteine gekoppelt. In die Signalweitergabe durch diese Rezeptoren sind der „second messenger“ zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP), freies Ca<sup>2+</sup> und Inositolphosphat involviert. Abhängig vom Stimulus, dem Ort und dem Ausmaß der Entzündung, unterscheiden sich bei den verschiedenen EP-Rezeptorsubtypen die Wege zur Weiterleitung und Umformung der Signale (Yoshikai, 2001; Harris et al., 2002). Experimentell konnte gezeigt werden, daß Mäuse, bei denen die EP-Rezeptoren nicht vorhanden waren, nach unterschiedlicher Stimulation keine febrilen Reaktionen entwickelten im Gegensatz zu den Mäusen, die diese Rezeptoren besaßen (Ushikubi et al., 1998). Als Antwort auf endogene oder exogene Pyrogene erzeugt PGE<sub>2</sub> Fieber durch Bindung an den EP<sub>3</sub>-Rezeptor.

PGE<sub>2</sub> bindet an die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP<sub>3</sub> und EP<sub>4</sub>, die dadurch zur Produktion des „second messenger“ cAMP stimuliert werden. Zusätzlich wird durch die Bindung von PGE<sub>2</sub> an die Rezeptorsubtypen EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub> die Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Balance zu Gunsten der Th<sub>2</sub>-Antwort verschoben. Dies geschieht durch Unterdrückung der IL-12 Antwort und Förderung der IL-4-Produktion (Yoshikai, 2001).

### 1.3.2 Rolle von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Immunsystem

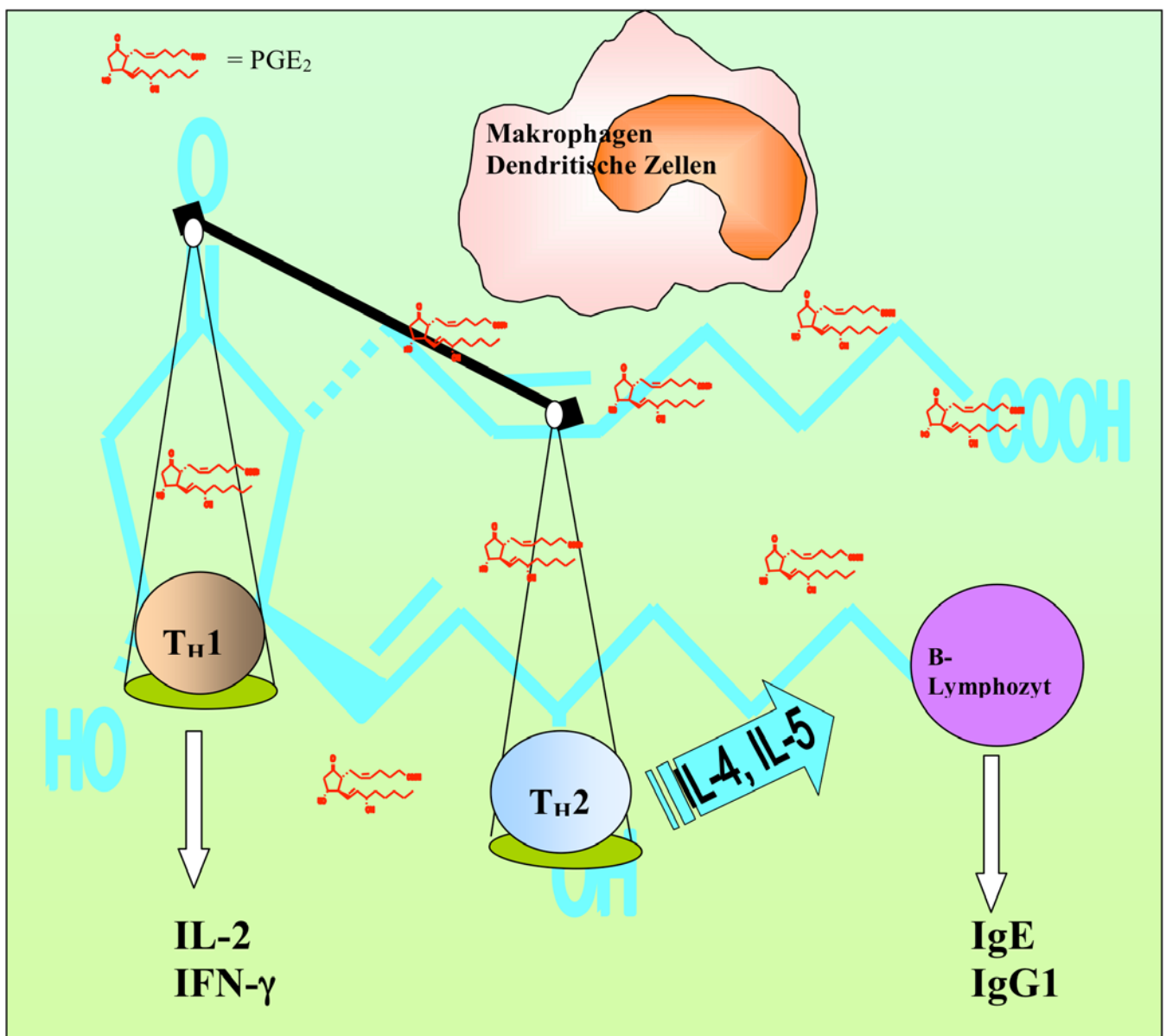
Prostaglandine können durch eine Reihe von Membran-aktivierenden Faktoren, z.B. IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Lipopolysaccharid (LPS) und verschiedene Komponenten des Komplementsystems, induziert werden (Phipps et al., 1991; Harris et al., 2002). Makrophagen, dendritische Zellen und Fibroblasten produzieren als Hauptprodukt des Arachidonsäure-Metabolismus Prostaglandine (Kurland und Bockman, 1978; Heinen et al., 1986; Frey et al., 1986; Phipps et al., 1988; Harris et al., 2002).

Studien über Prostaglandine der E-Reihe zeigten, daß sie die Zellen des Immunsystems beeinflussen. Dazu gehören Makrophagen, die als Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems fungieren, B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren (humorale Antwort), und T-Lymphozyten, die Tumorzellen oder viral infizierte Zellen angreifen (zellvermittelte Immunantwort) und die B-Zellen durch Interleukine in ihrer Produktion von Antikörpern unterstützen.

Die Prostaglandine der E-Reihe (PGE) werden als Immunsuppressoren bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit, die Proliferation von T-Zellen, die Produktion von IL-2 und die Synthese von IgM-Antikörpern durch B-Lymphozyten zu verhindern. Wie bereits erwähnt, bindet PGE<sub>2</sub> an die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP<sub>2</sub> und EP<sub>4</sub>, die dadurch zur Produktion des „second messenger“ cAMP stimuliert werden (Phipps et al., 1990; Roper et al., 1990; Harris et al., 2002). So erhöht das Derivat Dibutyryl-cAMP die IL-4-induzierte IgE- und IgG4-Produktion und verhindert gleichzeitig die IgM-Produktion. Außerdem beeinflusst PGE<sub>2</sub> die Interleukinsynthese von T-Helferzellen. PGE kann mit anderen Mediatoren stimulierend zusammenwirken. Beim Zusammenspiel von Lipopolysaccharid (LPS) mit PGE<sub>2</sub> oder von PGE<sub>2</sub> mit IL-4 kommt es bei Mäusen zu einer starken Erhöhung der IgE- und IgG1-Synthese von B-Zellen, während auf der anderen Seite die IgM- und IgG2-Produktion verringert wird (Phipps et al., 1990, 1991; Roper et al., 1990; Roper und Phipps, 1992; Harris et al., 2002). Diese Wirkung auf die IgG4- und IgE-Synthese durch PGE<sub>2</sub> zeigt, daß PGE<sub>2</sub> die Th<sub>2</sub>-Antwort fördert. Diese Reaktionen können bei Allergien und Asthma eine Rolle spielen.

Die Synthese von IL-4 und IL-5, einem Hauptprodukt der Th<sub>2</sub>-Lymphokine, wird durch PGE<sub>2</sub> nicht beeinträchtigt (Phipps et al., 1990; Muñoz et al., 1990 a; 1990 b; Novak und Rotherberg, 1990; Gajewski et al., 1990; Betz und Fox, 1991). IL-5 reguliert die Eosinophilenproduktion und -aktivität (Pene et al., 1988).

Abbildung 6 fasst die Wirkung des von Makrophagen produzierten PGE<sub>2</sub> auf Th<sub>2</sub>- und Th<sub>1</sub>-Zellen zusammen: Es wird der fördernde Effekt auf die Th<sub>2</sub>-Antwort (IL-4 und IL-5) sowie die hemmende Wirkung auf die Th<sub>1</sub>-Antwort (Freisetzung von IL-2 und  $\gamma$ -Interferon) dargestellt.



**Abbildung 6.** PGE<sub>2</sub>-Wirkungen auf Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen

PGE<sub>2</sub>-fördernder Effekt auf die Th<sub>2</sub>-Antwort mit Bildung von IL-4 und IL-5. Hemmende Wirkung des PGE<sub>2</sub> auf die Th<sub>1</sub>-Antwort, mit Freisetzung von IL-2 und  $\gamma$ -Interferon (Modifiziert nach Phipps et al., 1991).

### 1.3.3 Eicosanoidproduktion von Parasiten

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß Parasiten Eicosanoide produzieren. Zum Beispiel konnte die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in einigen Protozoen, Trematoden, Zestoden und Nematoden (*Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Dirofilaria immitis*) nachgewiesen werden (Belley und Chadee, 1995, Dauschies und Joachim, 2000). Welche Enzyme und Gene hierbei beteiligt sind, ist noch ungeklärt. Ein Nachweis analoger Cyclooxygenase-Enzyme (COX-Enzyme) konnte noch nicht erbracht werden (Belley und Chadee, 1995). Der Trematode *Schistosoma mansoni* und der Zestode *Spirometra erinacei* können Linolensäure zu Arachidonsäure metabolisieren und PGE<sub>2</sub> produzieren. Bei den Trematoden wurde nachgewiesen, dass COX-Inhibitoren wie Indomethacin und Aspirin keinen Einfluß auf die Prostaglandinproduktion hatten (Ramaswamy et al., 2000). Bei den Zestoden konnte die PGE<sub>2</sub>-Produktion allerdings durch Indomethacingaben um 76% gesenkt werden (Fukushima et al., 1993).

Weitere Studien zeigen, daß auch Mikrofilarien von *B. malayi* PGE<sub>2</sub> aus endogener Arachidonsäure bilden können und sie auf die gesamte Oberfläche, ohne spezifische Lokalisation, sezernieren, was vermuten läßt, daß die Mikrofilarien keine spezifische Pore zur Sekretion dieses niedermolekularen Metaboliten benutzen (Liu und Weller, 1990; Liu et al., 1992).



## 1.4 Fragestellungen

Ausgehend von früheren Beobachtungen über die PGE<sub>2</sub>-Bildung von *Brugia malayi* und *Wuchereria bancrofti* (Longworth et al., 1985; Liu und Weller, 1989; 1990; Liu et al., 1990 b) sollte geprüft werden, ob PGE<sub>2</sub> auch von den Filarien *O. volvulus* und *O. ochengi* und als Reaktion auf den Parasiten auch von Wirtszellen gebildet wird.

### PGE<sub>2</sub> in Filarien

Immunhistologisch sollten Onchozerkome und Hautproben von Onchozerkose-Patienten untersucht werden, um festzustellen

- ob PGE<sub>2</sub> in Weibchen, Männchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* vorkommt und in welchen Organen und Zellen,
- ob Unterschiede in der Prostaglandinbildung zwischen der generalisierten und der hyperreaktiven Form der Onchozerkose bestehen und
- ob eine unterschiedliche Prostaglandinbildung bei mit Ivermectin oder mit Doxycyclin behandelten Patienten nachzuweisen ist.

Mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) sollte PGE<sub>2</sub> in Extrakten von *O. volvulus* und *O. ochengi* nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Bildung von PGE<sub>2</sub> durch Arachidonsäure exponierte *O. volvulus*-Mikrofilarien geprüft.

Ferner sollte mit der Methode der Immunfluoreszenz in lebenden, isolierten Mikrofilarien der Nachweis von PGE<sub>2</sub> und dessen Bildung aus Arachidonsäure erbracht werden.

### PGE<sub>2</sub> in Wirtszellen

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob PGE<sub>2</sub> auch in den Wirtszellen im Knoten und der Haut nachweisbar ist und wenn ja, in welchen Zellen.

In-vitro-Experimente sollten zeigen, ob humane mononukleäre Zellen PGE<sub>2</sub> nach Stimulation mit *Onchocerca*-Produkten bilden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchte Filarien

Die für diese Arbeit verwendeten Filarien, Knoten und Hautschnitte standen in den Abteilungen für Helminthologie und für Klinische Chemie des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin zur Verfügung. Diese waren in mehreren früheren Studien gewonnen worden. Die Gewinnung von bioptischem Material durch Nodulektomien für Forschungszwecke war von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg geprüft und gebilligt worden.

Folgende *Onchocerca*-Proben wurden verwendet (s. auch Tabellen 1 und 2) :

- 81 Knoten von 61 Patienten aus Ghana, Liberia, Mali und Uganda mit Weibchen und Männchen von *O. volvulus* (Büttner et al., 1988; Albiez et al., 1988; Fischer et al., 1993; Hoerauf et al., 2002 b)
- Hautproben aus Burkina-Faso und Liberia (Büttner et al., 1988)
- Isolierte, in flüssigem Stickstoff eingefrorene Weibchen und Männchen sowie in RPMI 1640, 10%igem fetalen Kälberserum (FCS) und 10%igem Dimethylsulfoxid suspendierte und in Stickstoff gelagerte Mikrofilarien von *O. volvulus* aus Macenta, Guinea, 1996 (Haffner et al., 1998)
- Weibchen, Männchen und Mikrofilarien von *O. ochengi* aus Ngaoundere, Kamerun, die in gleicher Weise behandelt wurden. Diese Würmer entstammten der Zusammenarbeit von PD Dr. N. Brattig, Bernhard-Nocht-Institut und PD Dr. A. Renz, Universität Tübingen.

Die meisten Patienten hatten vor der Operation keine filariziden Medikamente eingenommen. Eine kleine Anzahl war vorher behandelt worden. Die mit Ivermectin behandelten Patienten wurden mehrere Monate und einige außerdem vier, 24 oder 120 Stunden nach der Einnahme von 0,15 – 0,4 mg/kg Körpergewicht Ivermectin operiert. Die Doxycyclin-Behandlung lief über einen Zeitraum von sechs Wochen, wobei die Patienten mit 100 mg Doxycyclin pro Tag behandelt worden waren. Die Nodulektomie fand vier Monate später statt (Hoerauf et al., 2000).

**Tabelle 1.** Herkunft der Knoten

Herkunft der Knoten	Ghana	Uganda	Liberia	Burkina-Faso	Mali
Generalisierte Form, unbehandelte Personen	<b>18 Patienten 28 Knoten</b>	<b>0</b>	<b>8 Patienten 8 Knoten</b>	<b>3 Patienten 3 Knoten</b>	<b>3 Patienten 3 Knoten</b>
Generalisierte Form, Doxycyclin-behandelte Personen	<b>2 Patienten 3 Knoten</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Ivermectin-behandelte Personen	<b>5 Patienten 5 Knoten</b>	<b>3 Patienten 6 Knoten</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Sowda, unbehandelte Personen	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19 Patienten 25 Knoten</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Gesamtzahl der Knoten für die immunhistologische Färbung</b>	<b>36 Knoten</b>	<b>6 Knoten</b>	<b>33 Knoten</b>	<b>3 Knoten</b>	<b>3 Knoten</b>

**Tabelle 2.** Herkunft der Hautproben

Herkunft der Haut	Liberia	Burkina-Faso
Generalisierte Form, unbehandelte Personen	<b>14 Patienten</b>	<b>2 Patienten</b>
Sowda, unbehandelte Personen	<b>8 Patienten</b>	<b>0</b>

## 2.2 Immunhistologischer Nachweis von PGE<sub>2</sub>

### 2.2.1 Reagenzien zur histologischen Färbung

Bis auf einige Ausnahmen wurden die Reagenzien für diese Versuche von der Firma DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland, bezogen.

- Zunächst wurde eine Stammlösung des Trishydroxymethylaminomethan-Puffers (Tris-Puffer) (0,05 M) hergestellt:

Tris	60,57 g
NaCl	87,66 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

- Aus der Stammlösung wurde der Gebrauchspuffer hergestellt und der pH-Wert von 7,6 eingestellt:

Stammlösung	100 ml
HCl	40 ml
Aqua dest.	+ 860 ml

- Für die Herstellung des Chromogens wurde der Tris-Puffer mit pH 8,2 (0,1 M) verwendet:

Tris	12,11 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

- Rohistol
- Alkohol 100%, 96%, 80%, 70%
- Aqua dest.
- 1% Ammoniumchlorid
- 0,05 M Glycin → 1,857 g Glycin in 500 ml TBS-Gebrauchspuffer
- 0,1% BSA-Puffer → Bovines Serumalbumin gelöst in Gebrauchspuffer
- 10% BSA
- Primär-Antikörper: monoklonaler Maus-Antikörper gegen PGE<sub>2</sub> in den verschiedenen Verdünnungen (in 0,1% BSA), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K. Brune; Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen, Deutschland (Brune et al., 1985)

- PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)
- Arachidonsäure (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Kaninchen gegen Maus IgG (Z 259) (DakoCytomation)
- APAAP-Komplex, Maus (DO 651) (DakoCytomation)
- Substrat : 0,024 g Levamisol-Hydrochlorid  
0,010 g Fast Red TR/Hemi-(Zinkchlorid)-Salz  
0,002 g Naphthol AS-MX-Phosphat  
200 µl N, N-Dimethylformamid
- Mayers Hämalanlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 2.2.2 APAAP-Methodik

Die Färbungen wurden nach den Anweisungen des Herstellers (DAKO) durchgeführt und geringfügig durch die in der Abteilung für Helminthologie (BNI, Hamburg) gewonnenen Erfahrungen abgewandelt.

Die Proben wurden mit folgenden Fixativen behandelt:

Karnovsky-Lösung (2% Paraformaldehyd oder 0,0025% Glutaraldehyd) oder 4% gepuffertes Formaldehyd oder 70% Ethanol.

Nach der Fixierung erfolgte die Einbettung in Paraffin.

#### **Behandlung der mit Formalin und Karnovsky-Lösung fixierten Schnitte**

Die mit Formalin und Karnovsky-Lösung fixierten Schnitte mußten im Gegensatz zu den mit Ethanol fixierten Schnitten noch mit 0,1% Ammoniumchlorid für 30 Min und für weitere 15 Min in einer 0,05 molaren Glycin-Lösung inkubiert werden. Danach wurden alle Objektträger in einem 0,1%igem BSA-Puffer gelagert.

Zwischenzeitig wurde eine Feuchtkammer durch Lagerung von mit Aqua dest. befeuchtetem Zellstoff in luftdichten Kammern vorbereitet.

Nun konnten die Objektträger der 0,1%igen BSA-Lösung entnommen und abgetrocknet werden, damit die nächste Verdünnung nicht verfälscht wurde, und in die vorbereitete Feuchtkammer gelegt werden. In der Kammer wurden sie mit Hilfe einer Spritze und eines sterilen Filters mit 10%igem BSA beschichtet, bis der gesamte Objektträger gut bedeckt war und für 30 Min inkubiert. Danach fünfminütiges Lagern in einer 0,1%igen BSA-Lösung.

Inkubation der Objektträger in der Feuchtkammer für 60 Min mit dem primären Antikörper (Anti-PGE<sub>2</sub>) in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:250 - 1:2000). Nach der Inkubation Lagerung der Objektträger im Gebrauchspuffer. Anschließende Inkubation in der Feuchtkammer mit dem Kaninchen-gegen-Maus-Antikörper in der Verdünnungsstufe 1:25 für 30 Min. Waschen der Objektträger im Gebrauchspuffer und Inkubation mit dem APAAP-Komplex für 30 Min in der Verdünnungsstufe 1:50.

Lösen von 2 mg Naphthol in 0,2 ml N,N-Dimethylformamid und 9,8 ml Tris-Puffer (pH 8,2). Zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase mit 10 µl Levamisol 0,1 M versetzen. Diese erzeugte Lösung zu 10 mg Fast-Red-Salz geben und nach kurzem Schütteln filtrieren, da sich bereits nach dem Schütteln eine Rotfärbung zeigte. Aufbringen des Substrats auf die Paraffinschnitte und 15minütiges inkubieren. Reinigung der Objektträger im Puffer und in Aqua dest.

Bläuen der Objektträger mit Hämalaun für 10 Min und anschließendes Abspülen unter fließendem Leitungswasser für 20 Min.

### **2.2.3 Absorption des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums**

Zum Spezifitätsnachweis des eingesetzten Antikörpers wurden die Objektträger mit verschiedenen absorbierten Seren inkubiert.

Das Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum wurde im Verhältnis 1:1 mit PGE<sub>2</sub> gemischt, um die PGE<sub>2</sub>-Antikörper aus dem Serum zu entfernen. Es wurde erwartet, daß mit Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum positive Präparate an konsekutiven Parallelschnitten mit dem absorbierten Serum keine Reaktion mehr zeigen würden.

Um zu prüfen, ob dieses Verfahren nicht zu einer unspezifischen Absorption führt, wurde das Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum mit dem Vorläufermetabolit des PGE<sub>2</sub>, der Arachidonsäure, im Verhältnis 1:1 absorbiert (1 µg Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum plus 1µg Arachidonsäure).

Als weitere Kontrolle wurden Inkubationen mit 0,1% BSA an Stelle von Anti-PGE<sub>2</sub> durchgeführt.

Darauffolgend mehrmaliges Waschen in Gebrauchspuffer, Inkubation in der Feuchtkammer mit dem Kaninchenserum gegen Maus-Antikörper in der Verdünnung 1:25 und dem APAAP-Komplex in der Verdünnung 1:50.

#### 2.2.4 Immunhistologischer Nachweis von TGF- $\beta$ 1 und anderen Proteinen

Zusätzlich wurden mehrere Knoten von unbehandelten Patienten mit der generalisierten und der hyperreaktiven Form der Onchozerkose immunhistologisch auf TGF- $\beta$ 1 untersucht. Die Färbungen wurde nach den Anweisungen des Herstellers des Kits (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) durchgeführt und geringfügig durch die in der Abteilung für Helminthologie des BNI gewonnenen Erfahrungen abgewandelt.

Als Primär-Antikörper diente Anti-Human-TGF- $\beta$ 1-Serum von der Ziege in der Verdünnung 1:200 (R&D Systems).

Der Nachweis von *Wolbachia*-Endobakterien in den Filarien erfolgte mit Antiserum gegen die Wolbachien von *Dirofilaria immitis* mit der Verdünnung 1:1000 bis 1:4000 mit der APAAP-Methode. Das Serum wurde von Dr. Claudio Bandi, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, Italien zur Verfügung gestellt.

L1-Protein mit AK gegen MAC387 = 1:50 (DaKo Cytomation)

CD68 mit AK = 1:50 (DaKo Cytomation)

CD1a mit unverdünntem monoklonalen Antikörper (Immunotech, Marseille, Frankreich)

Tryptase mit AK = 1:200 (DaKo Cytomation)

Außerdem standen von allen Knoten und Hautproben mit Eosin gefärbte Schnitte zur Verfügung.

## 2.3 Immunfluoreszenznachweis von PGE<sub>2</sub> in Mikrofilarien

Die Immunfluoreszenzmethode wurde nach den Veröffentlichungen von Liu et al. (1992) über den PGE<sub>2</sub>-Nachweis bei *B. malayi* und *W. bancrofti* durchgeführt.

Die Reagenzien wurden überwiegend von der Firma Sigma bezogen.

### 2.3.1 Reagenzien

- Gebrauchspuffer:

Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20 (TBST)

50 mM Tris HCl	6,057 g/l
150 mM NaCl	8,766 g/l
0,05 (v/v) % Tween 20	500 µl/l
1 mM EDTA	0,372 g/l
0.5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,087 g/l

- Waschlösung: ausbalanzierte Salzlösung nach Hanks (HBSS)
- Fixativ: 1-Ethyl-3-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid, EDAC
- Milieu: RPMI 1640-Medium + 2% Agar + 2% Fettsäure-freies BSA
- Beschichtung des Objektträgers: Poly-L-Lysin (0,1%)
- Blockierungsreagenz: 1% normales Ziegen Serum in HBSS
- Primärantikörper: Kaninchen-anti-PGE<sub>2</sub>-Serum (1:10) (Sigma)
- Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) (1:500) (Sigma)
- Fluorochrom: Streptavidin-AMCA (7-Amino-4-Methyl-Coumarin-3-Acetat) (1:50); (Immunotech, Marseille, Frankreich)
- PGE<sub>2</sub>-Vorläufermetabolit: Arachidonsäure (10 mg) in Ethanol (3ml)
- Verdünnung der Arachidonsäure in RPMI-Medium: 1:100, 1:200, 1:2000



### 2.3.2 Immunfluoreszenz-Methodik

#### Vorbereitung der Mikrofilarien

Es wurden für den Versuch in Stickstoff eingefrorene Mikrofilarien von *O. volvulus* sowie von *O. ochengi* benutzt. Die in Stickstofftanks in Kryotubes aufbewahrten Mikrofilarien wurden aufgetaut und wenn suspendiert in 15 ml-Spitzröhrchen mit einem kleinem Volumen von erwärmten RPMI 1640-Medium überführt. Das Medium durfte nicht über 37°C erhitzt werden, um die Mikrofilarien nicht zu schädigen.

Sie wurden dann zweimal für 15 Min bei 200 x g (= 970 rpm) zentrifugiert. Um die Anzahl sowie Vitalität der Mikrofilarien zu bestimmen, wurde 1 µl Flüssigkeit mit Mikrofilarien auf einen Objektträger gegeben. Zur Bestimmung wurde ein 10-faches Objektiv benutzt. Die Suspension mit den Mikrofilarien wurde dann auf ca. 2000-10 000 Mikrofilarien/ml eingestellt.

#### Mischen von Mikrofilarien, Weichagar und BSA

Es wurde nun eine 50 µl Weichagar-Probe (2%) auf 37°C mit Hilfe eines Wärmeblocks erwärmt sowie eine 50 µl BSA-Probe (2%) bei Raumtemperatur aufgetaut, um dann schnell, bevor der Agar wieder fest wurde, 50 µl BSA zum Weichagar (37°C) zuzugeben. Das Ganze wurde gemischt (1%), um dann die Mikrofilarien in das 1%ige Gemisch aus BSA und Weichagar einzubringen.

#### Inkubation zur möglichen PGE<sub>2</sub>-Freisetzung

Tropfen mit 5 µl des Mikrofilarien-Agar-BSA-Gemischs mit 10-50 Mikrofilarien wurden nun pro Reaktionszone des Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgers aufgebracht. Diese Objektträger mußten nun für 1-2 Min abkühlen, um den Agar zu festigen und die Mikrofilarien zu immobilisieren. Über Nacht wurde im Inkubator bei 37°C inkubiert.

### **Fixierung der Mikrofilarien und des PGE<sub>2</sub>**

Nach der Inkubation waren die Mikrofilarien immer noch vital, was mit Hilfe eines Kontrollobjektträgers gezeigt werden konnte, bei dem der Agar durch vorsichtiges Erhitzen wieder zum Schmelzen gebracht wurde.

Die Objektträger wurden nun mit 50%-igem 1-Ethyl-3-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid beschichtet, jeweils 5 µl pro Reaktionsfeld, um den Mikrofilarien-BSA-Agar und die darin befindlichen Prostaglandine zu fixieren, und dann erneut zu inkubieren, diesmal bei Raumtemperatur und nur für 30 Min. Danach dreimaliges Waschen mit HBSS.

### **Blockierung nicht spezifischer Bindungsstellen**

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde jedes Reaktionsfeld des Objektträgers mit 5 µl eines 1%-igen normalen Ziegenserums beschichtet und dann bei Raumtemperatur für 60 Min inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer.

### **Färbung von PGE<sub>2</sub> mit einem primären und sekundären Antikörper**

Als nächstes wurden die Objektträger mit Kaninchen-anti-Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10-1:300), als spezifisches Antiserum, für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann dreimaliges Waschen mit TBST.

Danach Inkubation der Objektträger mit biotinyliertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:500) über Nacht bei 37°C, wobei jeweils 5 µl des IgG pro Reaktionsfeld benutzt wurden. Erneutes dreimaliges Waschen mit TBST. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C mit dem Fluorochrom Streptavidin-AMCA in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:50 - 1:500). Es wurden jeweils 3 µl pro Reaktionsfeld verwendet und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Auswertung der behandelten Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops. Hier sollten sich die so behandelten PGE<sub>2</sub> produzierenden Mikrofilarien in einer deutlichen Blaufärbung darstellen.

### **2.3.3 Produktion von PGE<sub>2</sub> durch Mikrofilarien**

Dieser Versuch wurde nach Liu und Weller (1990) durchgeführt.

Die Methodik zum Nachweis von PGE<sub>2</sub> folgte der ersten Versuchsreihe (siehe 2.3.2). Zusätzlich wurden die Mikrofilarien diesmal mit 0,1 nM Arachidonsäure über einen Zeitraum von vier Stunden bei 37°C inkubiert.

## 2.4 PGE<sub>2</sub>-Bestimmung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie

Diese Versuche wurden nach der Anleitung von Dr. R. Rickert und Prof. Dr. H. Steinhart, Abteilung für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien stammen aus der Lebensmittelchemieabteilung.

### 2.4.1 Reagenzien

Arachidonsäure

Kollagenase in HBSS (0,5%) (Boehringer, Mannheim)

Chloroform-Ameisensäure-Gemisch: 1-2 Tropfen einer 0,1 M Ameisensäure in 500 µl Chloroform (Sigma)

Natriumsulfat (Sigma)

Eluent: Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure, 31/69/0,02 (v/v/v)

### 2.4.2 Methodik

#### **Gewinnung der Weibchen von *O. volvulus* und *O. ochengi* nach Kollagenaseverdauung**

Da die Weibchen meist noch nicht vollständig frei vom Wirtsgewebe waren, wurden sie in eine Petrischale mit PBS-Lösung gegeben, um mikroskopisch feststellen zu können, inwieweit sie sich noch im Onchozerkom befinden. Wenn dies der Fall war, wurden die Weibchen mit Hilfe einer 0,5%igen Kollagenase-HBSS-Lösung aus dem Wirtsgewebe befreit, indem sie zusammen mit dem Kollagenase-HBSS-Gemisch für vier Stunden bei 37°C ins Wasserbad gestellt wurden.

Für die Männchen galt dieser Schritt nicht, da sie bereits vollständig vom Wirtsgewebe befreit waren. Lebende Mikrofilarien wurden wie oben dargestellt (2.3.2) aufbereitet und bei 37°C für eine Stunde mit Arachidonsäure (3 µg/ml) inkubiert. Zusammen mit den Weibchen und Männchen wurden sie dann weiterbehandelt.

### **Homogenisieren der Filarien**

Die Weibchen, Männchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* wurden wiederholt in PBS gewaschen und in sterilen Kompressen getrocknet. Mit einer Pinzette wurden die Adulten jeweils in eine Mörserschale gegeben. Die Filarien wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mit einem groben Mörser zerkleinert. Die Mikrofilarien wurden nach dem Waschen durch Ultraschall (10 x 15 Sek) zerkleinert.

### **Extraktion der homogenisierten Filarien**

Bei dem Extraktionsvorgang mußte darauf geachtet werden, daß die zu untersuchenden Substanzen bei der Aufarbeitung keiner Oxidation unterlagen. Deswegen wurde versucht, möglichst in schonendem Milieu bei Raumtemperatur zu arbeiten. Die Proben wurden nach dem Homogenisieren mit einem Chloroform-Ameisensäure-Gemisch in schwach saurem pH-Bereich (3-3,5) extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde für 10 Min bei 500 U/min zentrifugiert.

Die Proben in ihrer Chloroformphase wurden in braune Reagenzgläser überführt, um dann Natriumsulfat über den erhaltenen Chloroformextrakt zu filtrieren. Das Natriumsulfat absorbiert das restliche Wasser aus dem Chloroform, so daß zum Abgasen unter einem Stickstoffstrom bei 40°C kein Wasser mehr vorhanden war und es nicht zum Siedeverzug kommen konnte. In der Chloroformphase befanden sich jetzt nur noch die Eicosanoide als nicht dissoziierte Säuren.

Das Chloroform wurde nun bei 40°C bis zur vollständigen Trockenheit mit Stickstoff abgegast, ggf. wurden noch einmal 3 ml Chloroform zum vollständigen Entfernen der Ameisensäure zugegeben.

Zum Schluß wurde jede Probe mit Eicosanoiden ins Laufmittel (200 µl Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure) für die HPLC aufgenommen.

Es wurden dann jeweils 50 µl zur Messung ins HPLC/API-ES-Massenspektrometer injiziert.

## 2.5 Zytospin von mononukleären Zellen

### 2.5.1 Reagenzien

Extrakt von *O. volvulus*-Weibchen aus Macenta, Guinea von 1996

Rekombinantes Hitzeschockprotein 60 (HSP60) von Wolbachien aus *O. volvulus* von PD Dr. K. Erttmann (BNI, Hamburg)

IL-4 (Biomol)

IL-10 (R&D Systems)

Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma)

Dexamethason (Sigma)

### 2.5.2 Stimulation von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen wurden von gesunden deutschen Spendern nach der Standardmethode isoliert (Brattig et al, 1997).  $2 \times 10^6$  mononukleäre Zellen/ml wurden drei bis sechs Tage bei 37°C in RPMI-Medium mit verschiedenen Reagenzien inkubiert: *O. volvulus*-Extrakt (OvE; 10-50 µg/ml), HSP60 (4-25 µg/ml), IL-4 (2 ng/ml) plus Dexamethason (200 ng/ml), IL-10 (2 ng/ml) und Dexamethason (200 ng/ml) oder LPS (1 ng/ml) oder unbehandelt belassen. Die Sterilität des OvE wurde in Blutagartests geprüft (Haffner et al., 1998).

Nach der Inkubation wurden die stimulierten Zellen in Röhrchen bei 200 U/Min fünf Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt.

#### Präparation von Zytospins

Es wurde jeweils ein Objektträger zusammen mit einem Filterpapier und einem Trichter in den Rotor der Zytocentrifuge eingelegt.

Jeweils 100 µl ( $1 \times 10^5$ ) der behandelten mononukleären Zellen wurden in die einzelnen Trichter gegeben, die danach für 10 Min bei 600 U/Min zentrifugiert wurden. Abschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern über Nacht getrocknet.

Nach Fixierung der Objektträger in Aceton und dreistündiger Verdampfung konnten die Zellen auf den Objektträgern bei -70°C in Alufolie eingewickelt gelagert werden, um sie später zusammen mit den histologischen Präparaten in der Immunhistologie nach der APAAP-Methodik anzufärben (siehe 2.2.2).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Methodisch bedingte Variationen der Immunhistologie**

##### **3.1.1 Konzentrationen des PGE<sub>2</sub>-Antiserums**

Die Gewebe-Präparate wurden immunhistologisch unter Verwendung des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums in den Verdünnungsstufen 1:250, 1:300, 1:500, 1:750 und 1:1000 getestet. Es stellte sich heraus, daß die Verdünnung 1:250 am besten geeignet war, da hier die Färbung am deutlichsten ausgeprägt war und die einzelnen Gewebsstrukturen gut von einander abzugrenzen waren.

Die Kutikula zeigte sich in allen Fällen eindeutig nicht gefärbt. Die Hypodermis wies hingegen immer eine eindeutig positive Reaktion auf. Davon wiederum klar abzugrenzen war die Muskulatur, die in den meisten Fällen nicht gefärbt erschien. Das Uterusepithel, der Darm sowie der Hintergrund waren in einer Verdünnung von 1:250 allerdings häufig noch schwach angefärbt. Diese Effekte traten bei einer Verdünnung von 1:500 meist nur noch ganz geringfügig auf oder fehlten. Bei der Verdünnung von 1:500 zeigte sich häufig bereits eine schwächere, aber immer noch eindeutige Färbung der Hypodermis. Dieses Muster fand sich abgestuft in den verschiedenen Verdünnungsstufen.

Auch die Makrophagen und Riesenzellen im Knoten wiesen bei der Verdünnung 1:250 eine stärkere Färbung auf als bei der Verdünnung 1:500.

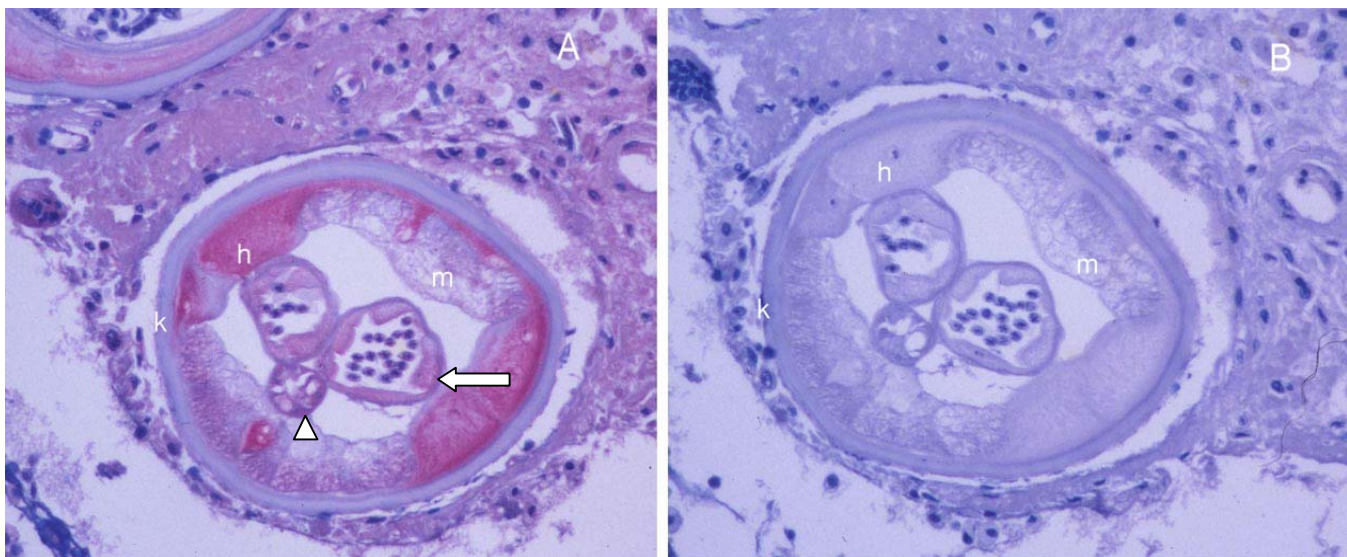
##### **3.1.2 Einfluß der Fixierungen**

Sowohl nach Fixierung mit Ethanol wie mit Formaldehyd- oder Paraformaldehyd-Lösung (Karnovsky-Lösung) führte die Anwendung des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums zur spezifischen Markierung von Filarien und Wirtszellen bei einem Teil der untersuchten Onchozerkome (Abbildungen 7 A und 9 C, Ethanolfixierung; Abb. 13, Karnovskyfixierung; Abb. 24 Formaldehydfixierung). Alle Markierungen wurden mindestens an zwei Paraffinschnitten unabhängig voneinander an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse waren für die betreffenden Paraffinblöcke immer reproduzierbar.

Blöcke mit reagierenden Geweben reagierten immer und Blöcke mit nicht reagierenden Geweben blieben auch bei der Wiederholung negativ.

### 3.1.3 Negativkontrollen mit BSA

Bei jeder Färbung wurden Kontrollschnitte mitgeführt, bei denen anstelle des Antiserums gegen PGE<sub>2</sub> eine BSA-Lösung eingesetzt wurde. Die Korrektheit der Färbereaktion wurde bestätigt, da Markierungen von Filarien und Wirtszellen nur bei Einsatz des Antiserums gegen PGE<sub>2</sub>, nicht jedoch bei Verwendung von Serumalbumin eintraten (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** Negativkontrolle mit Serumalbumin

(A) Weibliche *O. volvulus* mit dem typischen Verteilungsmuster für PGE<sub>2</sub>. Hypodermis positiv für PGE<sub>2</sub>. Epithel des Darms (Pfeilkopf) und des Uterus (Pfeil) nur schwach positiv. Muskulatur und Kutikula blieben bei der Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum ungefärbt. (B) Konsekutiver Schnitt des Knotens aus A, der anstelle des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums mit BSA inkubiert wurde. Alle Zellen der Filarie blieben ungefärbt. (A und B) Knoten eines unbehandelten Patienten mit generalisierter Onchozerkose aus Ghana. k, Kutikula; h, Hypodermis; m, Muskulatur. x 220



### 3.1.4 Spezifitätsnachweis durch Absorptionsversuche des PGE<sub>2</sub>-Antiserums mit PGE<sub>2</sub> oder mit Arachidonsäure

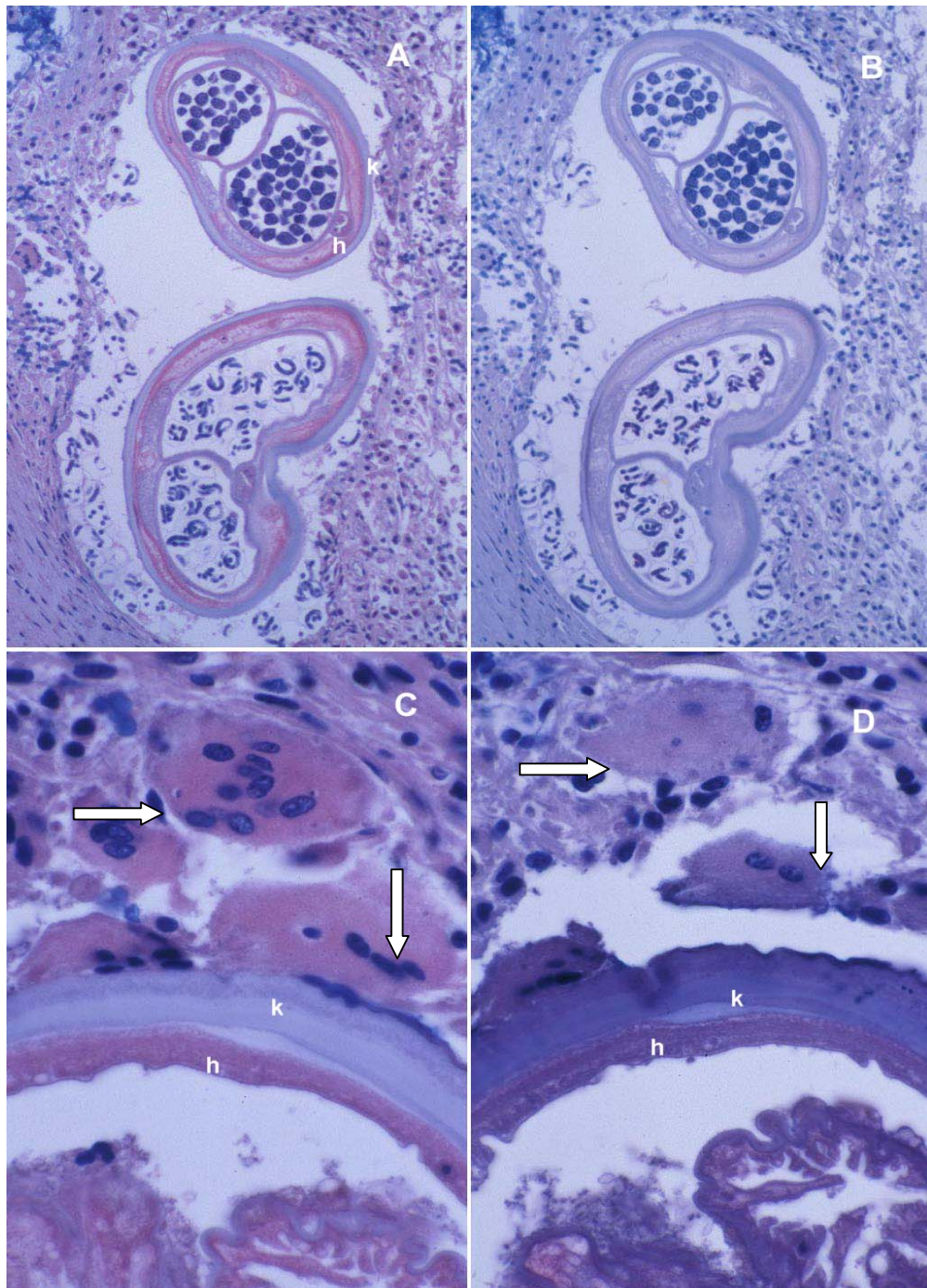
Die entscheidende Kontrolle zur Spezifität des eingesetzten Serums erfolgte in Versuchen, bei denen dem Inkubationsansatz äquivalente Mengen von PGE<sub>2</sub> zugesetzt wurden. Dadurch sollte geprüft werden, in wieweit der Effekt des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums in der APAAP-Färbung durch Neutralisation aufgehoben werden konnte. In der Tat waren unter diesen Versuchsbedingungen alle Strukturen der Filarie sowie die Wirtszellen im umliegenden Humangewebe vollständig farblos (Abbildung 9). Die fehlende Markierung bei der Verwendung von Serum nach Absorption mit PGE<sub>2</sub> belegt, daß das verwendete Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum spezifisch für PGE<sub>2</sub> ist. Es konnte daher für den immunhistologischen Nachweis von PGE<sub>2</sub> verwendet werden.

In weiteren Experimenten wurde in den Versuchsansätzen Arachidonsäure, der Vorläufermetabolit des PGE<sub>2</sub>, an Stelle von PGE<sub>2</sub> eingesetzt. Trotz Zusatz der Arachidonsäure war die Hypodermis in allen Fällen positiv angefärbt. Die Kutikula und Muskulatur waren nicht gefärbt, das Uterusepithel, der Darm und die Wirtszellen waren schwach gefärbt erkennbar (Abbildung 8). Die Inkubation mit einem PGE<sub>2</sub>-ähnlichen Vorläufermolekül führte nicht zur Absorption des Anti-PGE<sub>2</sub>-Antikörpers.



**Abbildung 8.** Spezifitätsnachweis mit Arachidonsäure

Stark gefärbte Hypodermis sowie nicht gefärbte Kutikula und Muskulatur einer weiblichen Filarie nach Färbung mit einem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum, das vorher mit Arachidonsäure inkubiert worden war. Der Absorptionsversuch führte nicht zu einer Entfernung des Anti-PGE<sub>2</sub>-Antikörpers aus dem Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit der generalisierten Form. h, Hypodermis; m, Muskulatur. x 400



**Abbildung 9.** Spezifitätsnachweis durch Absorption des PGE<sub>2</sub>-Antiserum mit PGE<sub>2</sub>

(A) Typisches Verteilungsmuster für PGE<sub>2</sub>. Hypodermis positiv für PGE<sub>2</sub>, Muskulatur und Kutikula nicht gefärbt. (B) Konsekutiver Schnitt des Knotens aus A. Alle Strukturen der Filarie sind nach der Absorption nicht gefärbt. (C) Deutlich positiv markierte Hypodermis und negative Kutikula. Markierte Riesenzellen (Pfeile) im Wirtsgewebe. (D) Konsekutiver Schnitt des Knotens aus C. Alle Strukturen der Filarie sowie die Riesenzellen (Pfeile) im umliegenden Humangewebe sind ungefärbt. (A-D) Knoten unbehandelter Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. Weibliche *O. volvulus*-Filarien. (A und C) Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. (B und D) Reaktion nach Absorption des Anti-PGE<sub>2</sub>-Serums mit PGE<sub>2</sub>. k, Kutikula; h, Hypodermis. (A und B) x 100. (C und D) x 500

### 3.1.5 Variation bei verschiedenen Proben

Schnitte von verschiedenen Knoten oder Hautproben reagierten unterschiedlich mit dem Antiserum. Ein Teil der Blöcke reagierte positiv und ein Teil negativ. Eine Abhängigkeit von der Herkunft aus verschiedenen Ländern war dabei nicht festzustellen (Abbildung 7 a und 8, Ghana; 12 A, Burkina Faso; 14 Liberia; 18, Uganda; 25 A, Mali).

Dabei verhielten sich die Markierungen der Würmer anders als die der Wirtszellen. Bei einigen Blöcken waren nur die Filarien, bei anderen Proben nur die Wirtszellen und bei wieder anderen waren sowohl die Filarien wie ein Teil der Wirtszellen markiert. Es lag nicht daran, daß die Blöcke für die Immunhistologie nicht mehr geeignet gewesen wären. Alle Knoten wurden auch mit einem Antikörper gegen das „*Wolbachia* Surface Protein“ (WSP) der *Wolbachia*-Endobakterien untersucht. Mit Ausnahme der Proben, bei denen die *Wolbachien* durch Behandlung der Patienten mit Doxycyclin entfernt worden waren, reagierten die Endobakterien in allen Knoten positiv. Ebenso reagierten alle Knoten positiv, die mit anderen Antikörpern wie dem gegen das L1-Protein der Makrophagen oder die Tryptase der Mastzellen, untersucht wurden. Es gab keinen Knoten, der nicht mindestens mit dem Anti-WSP-Antikörper und einem oder mehreren anderen Antikörpern reagiert hätte (nicht gezeigt). Die Variation kann mit der Instabilität des niedermolekularen ungesättigten Eicosanoids zusammenhängen.

### Schlußfolgerung

Mit Hilfe der verschiedenen Methoden gelang es, die Spezifität des PGE<sub>2</sub>-Antikörpers nachzuweisen und somit eine sichere Grundlage für die immunhistologische Lokalisierung von PGE<sub>2</sub> zu schaffen.

## 3.2 PGE<sub>2</sub>-Nachweis in Filarien

### 3.2.1 Unbehandelte Patienten

Bei den Onchozerkomschnitten generalisierter Patienten konnte der Nachweis von PGE<sub>2</sub> meist in einer charakteristischen Verteilung in den Geweben und Zellen der adulten Filarien nachgewiesen werden. Wenn eine Filarie markiert war, so war fast immer die Hypodermis stark markiert. Auffällig gefärbt waren die Lateralleisten. Aber auch die Medianleisten und die interchordale Hypodermis zeigten dann Färbungen von PGE<sub>2</sub>. Gelegentlich waren die Faltenbildungen der hypodermalen Zellmembran nahe dem Lumen der Pseudocoelomhöhle in den Lateralleisten oder nahe der Kutikula stärker markiert als die übrigen Anteile der Hypodermis (Abbildung 10). Das würde eine Sekretion von PGE<sub>2</sub> in den extrazellulären Raum in diesen Bereichen nahe legen. In der Kutikula konnte nie PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden, und die Muskulatur der Körperwand und die glatten Muskelzellen der Uteruswand waren bei den meisten Filarien nicht markiert (Abbildung 7 A). Nur bei wenigen Würmern fand sich eine schwache Rotfärbung der Muskulatur nach Fixierung mit Ethanol. Da diese nur in einigen Abschnitten und mal im fibrillären und mal im afibrillären Anteil der Muskulatur zu beobachten war, kann bezweifelt werden, ob es sich hier um eine spezifische PGE<sub>2</sub>-Markierung gehandelt hat.

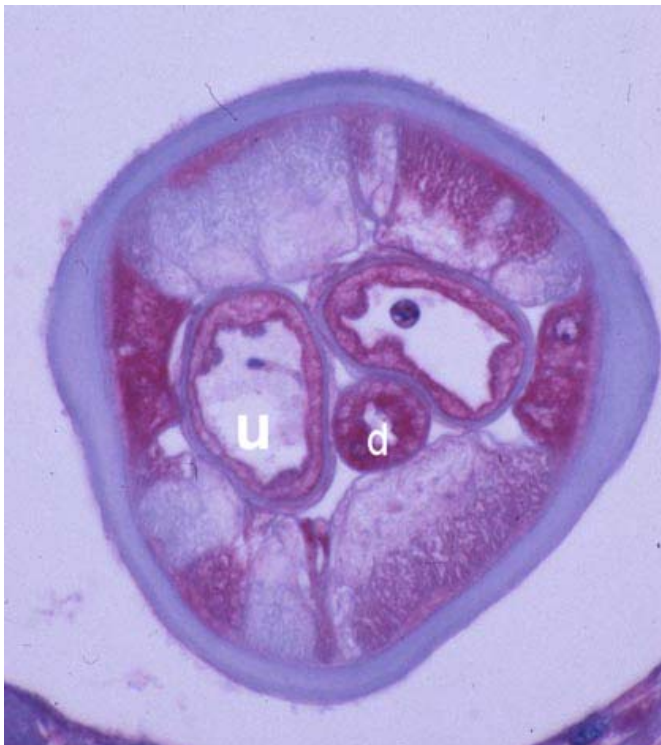
Unabhängig voneinander, aber oft auch in demselben Wurmabschnitt waren die Epithelien von einem oder beiden Ästen von Uterus oder Ovidukt und vom Darm bei Weibchen häufig markiert (Abbildung 11).

In den Ovarien waren die Oozyten fast immer, im Uterus häufig stark markiert. Es gab aber auch Oozyten im Uterus, die keine Färbung erkennen ließen (Abbildung 12 A und B). Die Spermien im Uterus ergaben keinen Hinweis für PGE<sub>2</sub> (Abbildung 12 A und B). Die Mikrofilarien im Uterus ließen sich nur vereinzelt anfärben.

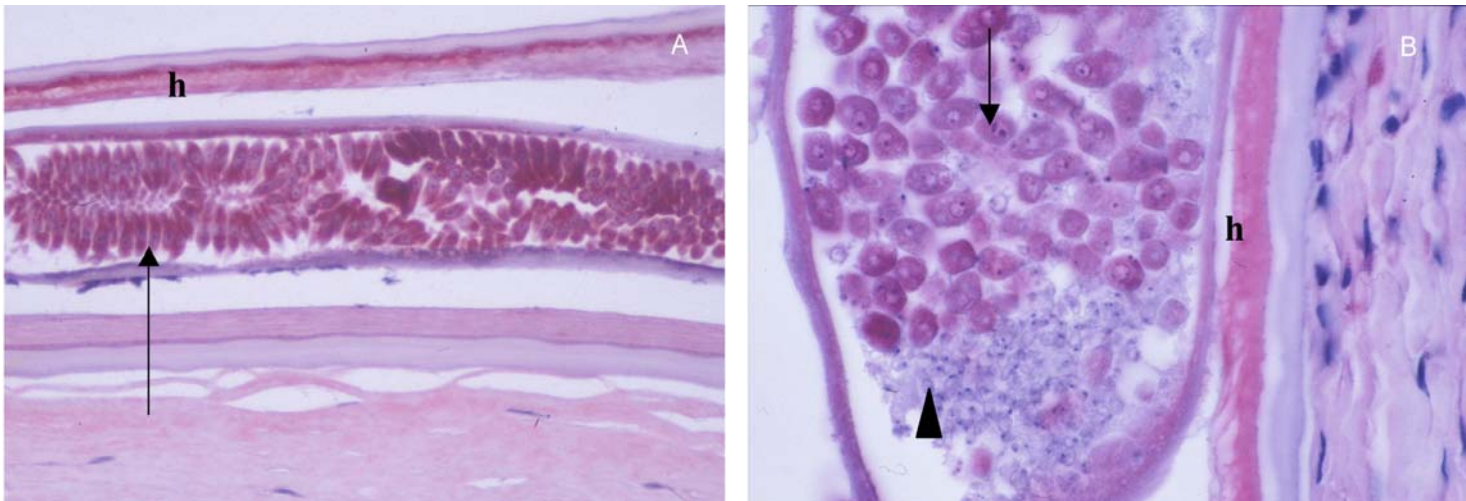
Der Hintergrund blieb im Gegensatz dazu meist nur sehr schwach gefärbt, so daß der Unterschied zwischen spezifischer Markierung und Hintergrund gut zu erkennen war.

**Abbildung 10.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> in den Labyrinth der Hypodermis

Markierte Labyrinth nahe der Kutikula und nahe des Lumens in den Lateralleisten der Hypodermis (Pfeile) eines Weibchens. Knoten eines unbehandelten Patienten mit generalisierter Onchozerkose aus Burkina Faso. h, Hypodermis; k, Kutikula. x 550

**Abbildung 11.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> in Uterus- und Darmepithel

Positiv sind Hypodermis, Darmepithel, Uterusepithel in beiden Ästen und der fibrilläre Anteil der Wandmuskulatur bei Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten mit generalisierter Onchozerkose aus Ghana. Weibliche Filarie von *O. volvulus*. d, Darm; u, Uterus. x 640

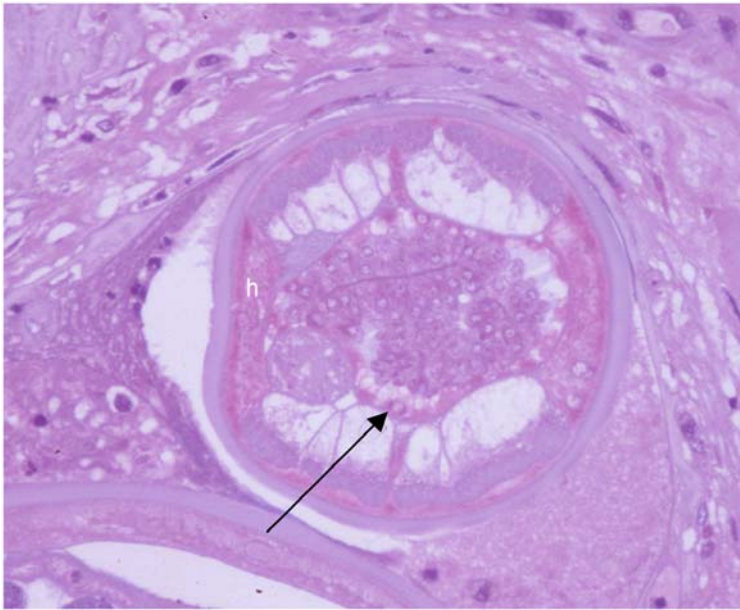


**Abbildung 12.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> in Oozyten in Ovar und Uterus

(A) Filarie mit positiver Hypodermis und Oozyten im Ovar (Pfeil) bei Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. x 320. (B) Filarie mit positiver Hypodermis und Oozyten im Uterus (Pfeil), sowie negativen Spermien im Uterus (Pfeilkopf). x 460. Knoten unbehandelter Patienten aus Burkina Faso (A) und Ghana (B) mit generalisierter Onchozerkose. h, Hypodermis

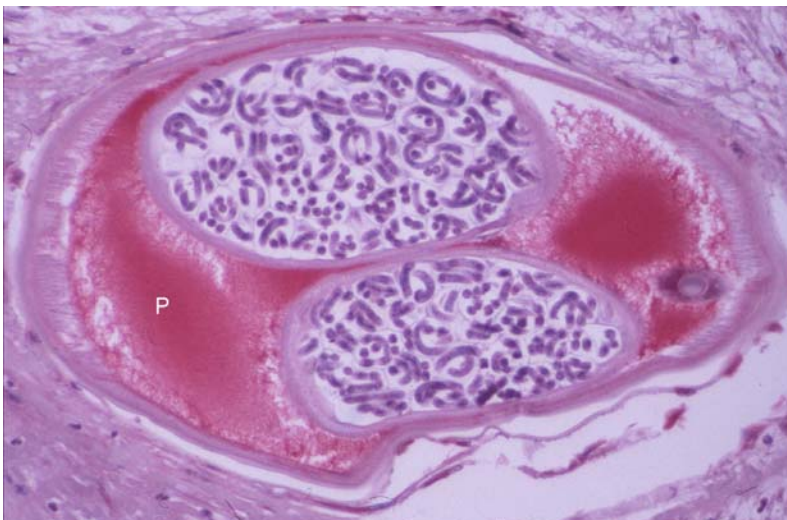
Bei den Männchen erhielten wir entsprechende Ergebnisse wie bei den Weibchen. In der Hypodermis konnte PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die Epithelien des Genitaltraktes waren gelegentlich markiert, die Stadien der Spermio-genese stellten sich nicht gefärbt dar (Abbildung 13).

In einigen Fällen war bei Männchen und Weibchen unabhängig von der Herkunft der Knoten, der Fixierung und der Verdünnung die Flüssigkeit in der Pseudocoelomhöhle gefärbt (Abbildung 14).



**Abbildung 13.** PGE<sub>2</sub>-Nachweis in einer männlichen Filarie

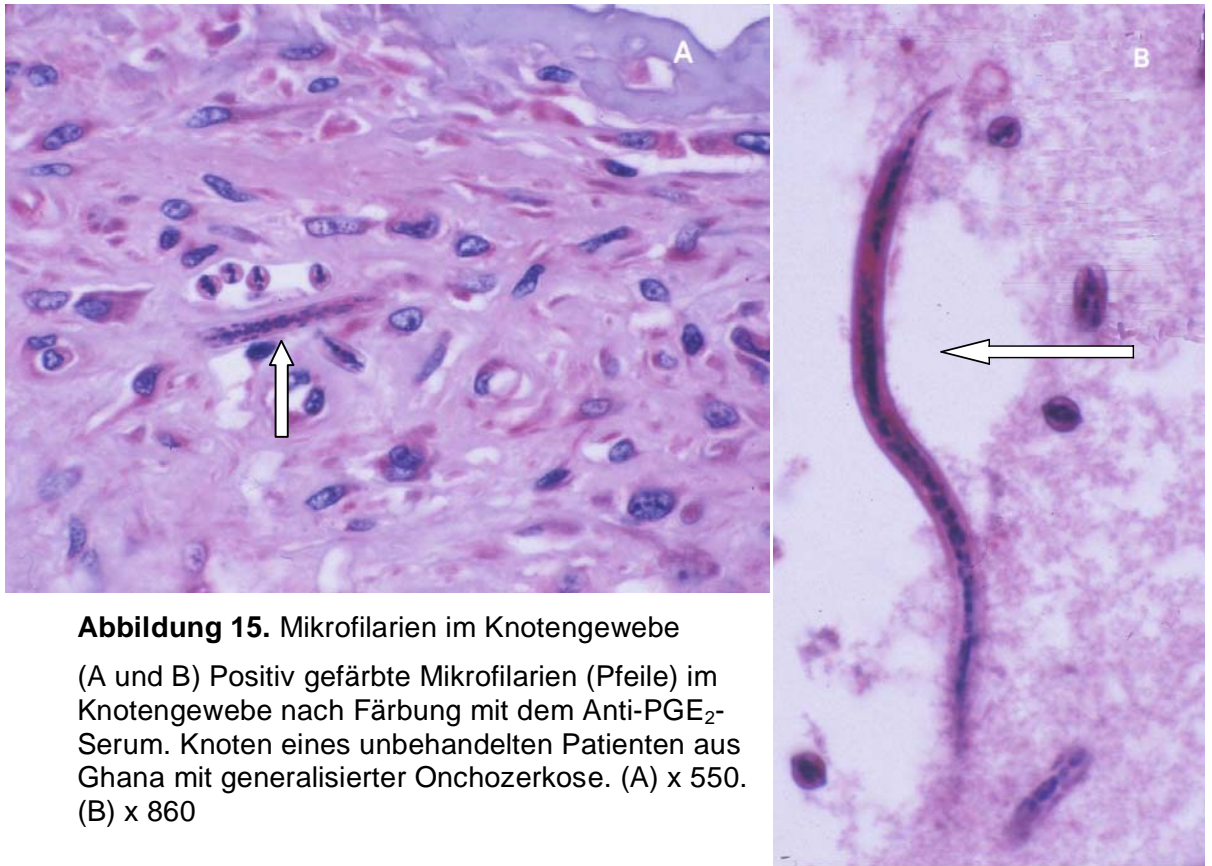
Schwach positive Hypodermis und Epithel des Genitaltraktes (Pfeil) bei Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Die Spermien sind negativ. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. h, Hypodermis. x 370



**Abbildung 14.** PGE<sub>2</sub>-Nachweis in der Pseudocoelomhöhle

Gefärbte Flüssigkeit in der Pseudocoelomhöhle eines Weibchens nach Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Liberia mit der generalisierten Form. p, Pseudocoelomhöhle. x 200

Die Mikrofilarien im Knotengewebe von Personen mit einer generalisierten Onchozerkose oder in der Haut waren meist nicht markiert. In einigen Knoten waren eine kleine Anzahl, aber niemals alle Mikrofilarien markiert. Das gilt für intakte ebenso wie für tote, in Auflösung befindliche Mikrofilarien (Abbildung 15 A und B).



**Abbildung 15.** Mikrofilarien im Knotengewebe  
(A und B) Positiv gefärbte Mikrofilarien (Pfeile) im Knotengewebe nach Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. (A) x 550. (B) x 860

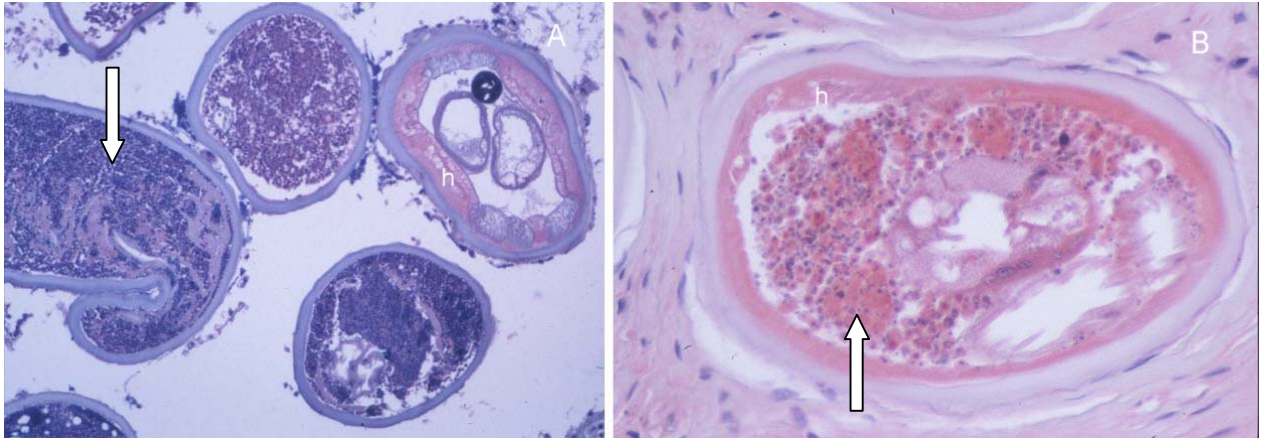
Bei etwa 17% von mit Ivermectin behandelten Weibchen und bei etwa 2% der unbehandelten Weibchen von *O. volvulus* fanden Duke et al. (2002) Neoplasien in der Pseudocoelomhöhle und gelegentlich auch in den Organen, die zum Tod der Filarien führen. Die Autoren nehmen an, daß die Tumoren von den Oozyten in den Ovarien ausgehen, konnten das aber nicht sicher belegen. In der vorliegenden Arbeit ließen viele Tumorzellen lichtmikroskopisch kaum noch Zytoplasma neben dem Kern erkennen. In diesen Fällen war auch keine PGE<sub>2</sub>-Markierung in den Tumorzellen zu finden, selbst wenn benachbarte Strukturen positiv waren (Abbildung 16 A). Dagegen war das Zytoplasma in den Tumorzellen, die mehr Zytoplasma aufwiesen, deutlich markiert, wenn „lebende“, wenn auch moribunde Würmer verwendet wurden (Abbildung 16 B).



---

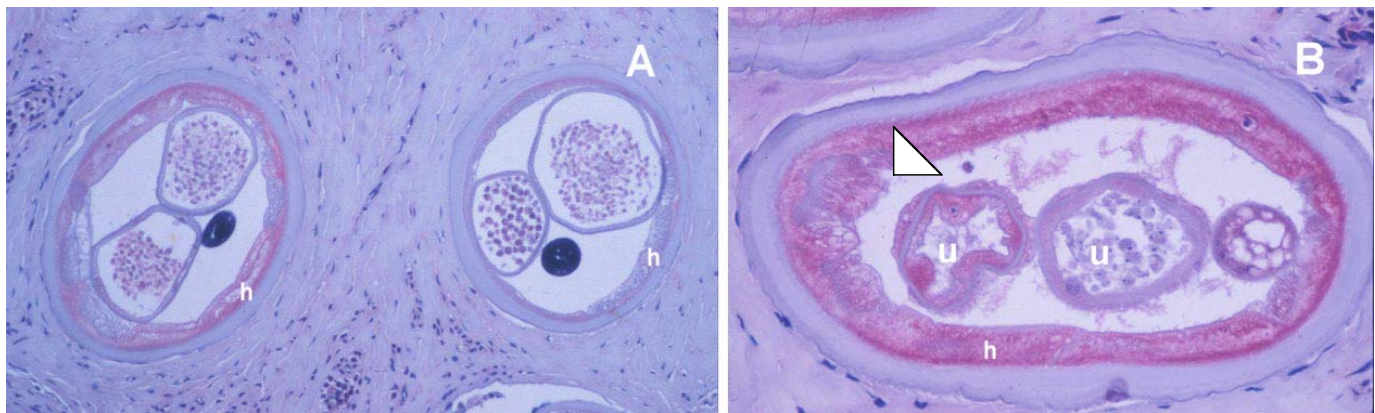
Bei Vergleich von Proben von Patienten mit der hyperreaktiven oder der generalisierten Form der Onchozerkose unbehandelter Patienten, ergaben sich für die Filarien keine Unterschiede im Vorkommen von PGE<sub>2</sub>.

Unabhängig von der erheblichen Variation durch die Beschaffenheit der Knoten, die Fixierung und die Verdünnung des primären Antikörpers war regelmäßig eine von der Methode unabhängige Variation der Markierung zu beobachten. So kamen in einem Knotenschnitt sowohl für PGE<sub>2</sub> positive als auch negative Wurmanschnitte vor (Abbildung 17 A). Sogar innerhalb eines Wurmanschnittes konnte ein Uterusast für PGE<sub>2</sub> positiv erscheinen, der zweite hingegen nicht (Abbildung 17 B). Das galt für alle Organe der Filarien. Auch zwischen den verschiedenen Würmern desselben Paraffinschnittes gab es oft unterschiedliche Anfärbungen. Die kleineren Männchen waren so gut wie immer schwächer als benachbarte Weibchen markiert.



**Abbildung 16.** Tumor in lebenden Weibchen

(A und B) Lebendes Weibchen mit degenerativ veränderter Uteruswand und einem Tumor. In A weitgehend negative Anschnitte (Pfeil) neben dem Anschnitt eines anderen lebenden Weibchens und in B neben positiver Hypodermis und Darm auch positive Tumorzellen in der Pseudocoelomhöhle (Pfeil). Behandlung der Schnitte mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit der generalisierten Form. h, Hypodermis. (A) x 100. (B) x 260



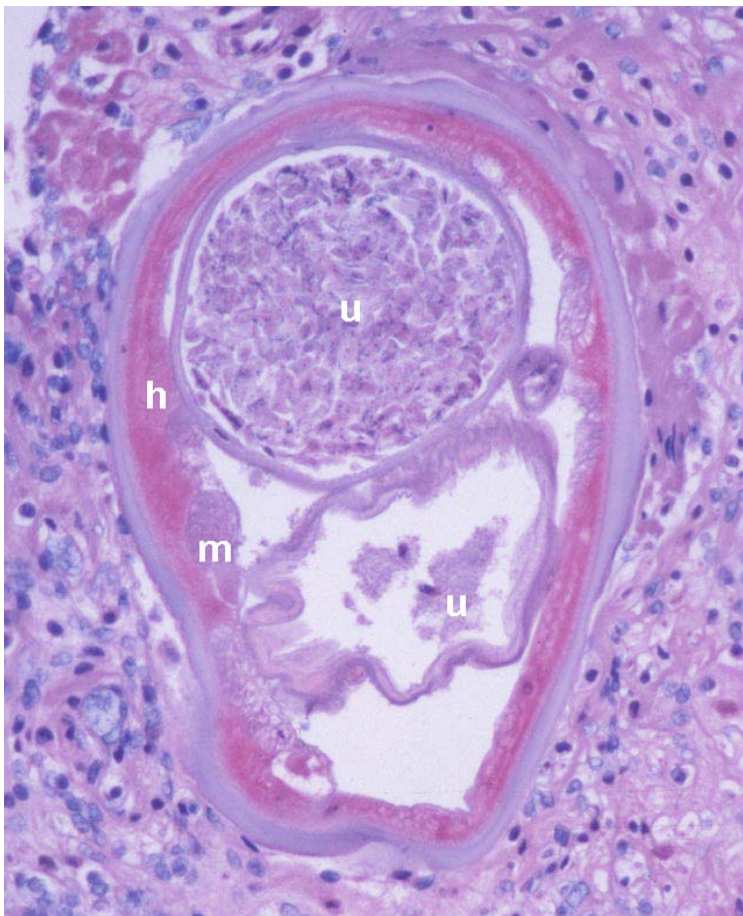
**Abbildung 17.** Variationen der Markierung von PGE<sub>2</sub>

(A) Variation der Markierung bei einer weiblichen Filarie. Hypodermis in einem Anschnitt dieser Filarie deutlich positiv gefärbt (links), wohingegen die Hypodermis in einem anderen Anschnitt nicht gefärbt zu erkennen ist (rechts). x 120. (B) Variation des Uterusepithels in einem Schnitt einer weiblichen Filarie. Der eine Uterusast stellt sich gefärbt dar (links), der andere nicht. Positive Markierung der Hypodermis, schwache Färbung des afibrillären Teils der Wandmuskulatur (Pfeilkopf) x 260. (A und B) Knoten von zwei unbehandelten Patienten aus Ghana mit der generalisierten Form der Onchozerkose. Behandlung der Schnitte mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. h, Hypodermis; u, Uterus

### 3.2.2 Behandelte Patienten

#### 3.2.2.1 Behandlung mit Ivermectin

Das Medikament der Wahl zur individuellen und auch zur Massenbehandlung der Onchozerkose ist zur Zeit Ivermectin. Es wurden 11 Knoten von acht Patienten untersucht, die mit einer oder mehreren Dosen Ivermectin zwei Jahre, ein Jahr, oder 1-2 Tage vor der Nodulektomie behandelt worden waren. Auch hier ergaben sich bezüglich der Anfärbung der Filarien keine Unterschiede zu Filarien von unbehandelten Patienten. Die Hypodermis war immer deutlich positiv dargestellt. Dagegen grenzten sich die Kutikula und die Muskulatur ab, die beide eindeutig nicht gefärbt waren. Das Uterusepithel und der Darm zeigten eine ganz schwache oder teilweise keine Färbung (Abbildung 18). Das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> war daher nicht durch eine Ivermectinbehandlung der Patienten und damit der Würmer beeinflussbar.

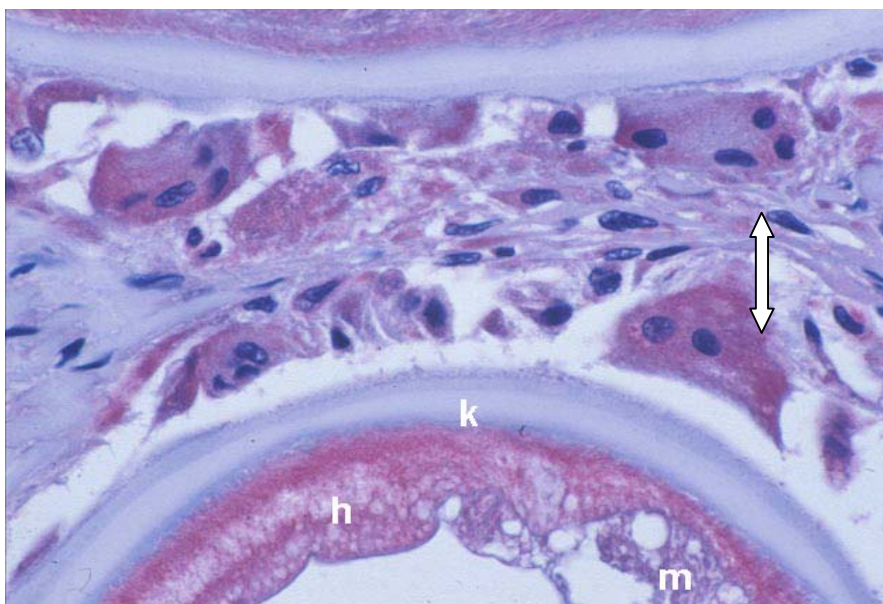


**Abbildung 18.** Behandlung mit Ivermectin

Weibliche Filarie mit positiver Hypodermis nach Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Mikrofilarien im Uterus sind als Folge der Ivermectintherapie degeneriert. Knoten eines Patienten aus Uganda mit generalisierter Onchozerkose, der ein Jahr und ein zweites mal 24 Stunden vor der Nodulektomie mit Ivermectin behandelt worden war. h, Hypodermis; m, Muskulatur; u, Uterus. x 700

### 3.2.2.2 Behandlung mit Doxycyclin und Ivermectin

Wie bei vielen anderen Filarien leben in allen *O. volvulus*-Würmern Endobakterien der Gattung *Wolbachia*, deren Anwesenheit obligat für die Embryogenese ist. Auch die Expression verschiedener Proteine wird durch *Wolbachien* beeinflusst. Um zu untersuchen, ob das auch für die Expression von  $\text{PGE}_2$  gilt, wurden Knoten von Patienten untersucht, die sechs Wochen mit Doxycyclin behandelt worden waren, so daß nach einigen Monaten keine lebenden *Wolbachien* mehr vorhanden waren (Hoerauf et al., 2003). Interessanterweise konnte ich feststellen, daß  $\text{PGE}_2$  bei diesen Filarien in gleicher Weise wie bei den Filarien unbehandelter Personen exprimiert wurde. Die Hypodermis zeigte regelmäßig eine  $\text{PGE}_2$ -Färbung. Davon ließen sich die Kutikula und die Muskulatur eindeutig abgrenzen, die beide keine Reaktionen für  $\text{PGE}_2$  zeigten. Das Uterusepithel und der Darm erschienen nicht bis teilweise dezent positiv gefärbt. Ein Einfluß durch eine Doxycyclinbehandlung war daher nicht feststellbar (Abbildung 19). Diese Patienten hatten zusätzlich zum Doxycyclin auch eine Dosis Ivermectin eingenommen, das aber keinen Einfluß auf die  $\text{PGE}_2$ -Expression gehabt haben dürfte, wie oben beschrieben ist.



**Abbildung 19.** Behandlung mit Doxycyclin

Sowohl die Hypodermis, wie auch die Riesenzellen des Wirtes (Pfeil) sind nach Inkubation mit dem Anti- $\text{PGE}_2$ -Serum gefärbt dargestellt. Die Kutikula und die Muskulatur des Wurmes bleiben ebenso ungefärbt wie das Bindegewebe des Wirtes. Knoten eines Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose, der sechs Wochen mit 100 mg Doxycyclin pro Tag und später einmal sechs Wochen mit Ivermectin behandelt wurde. Fünf Monate nach Doxycyclin und zwei Monate nach Ivermectin. k, Kutikula; h, Hypodermis; m, Muskulatur. x 570

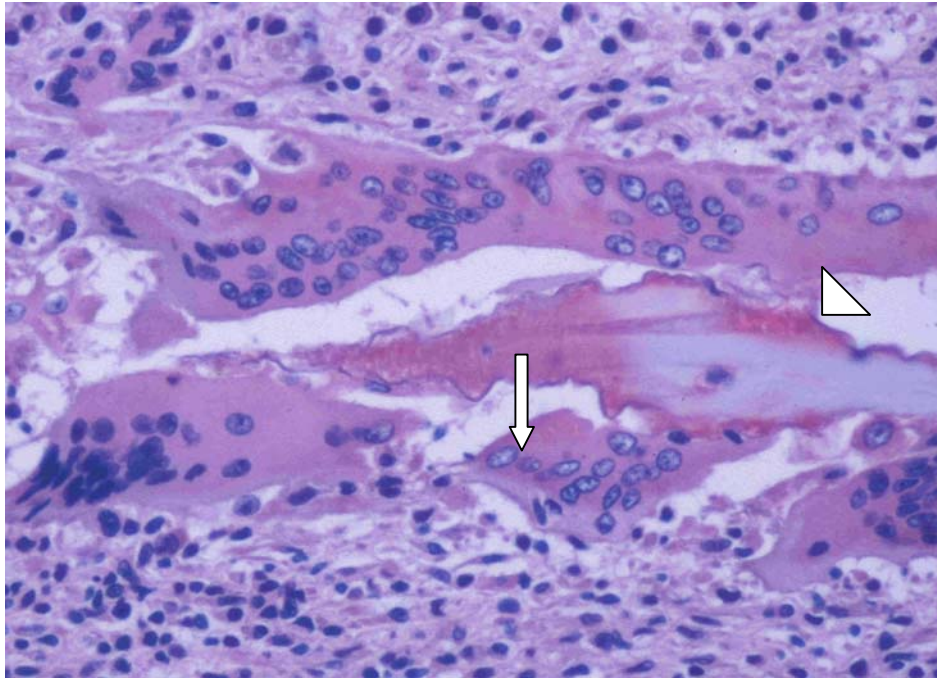
### **3.3 PGE<sub>2</sub>-Nachweis in Wirtszellen**

Die Wirtszellen wurden zunächst morphologisch identifiziert. Eine große Anzahl von Schnitten war im Rahmen anderer Studien schon mit Antikörpern gegen verschiedene zellspezifische Proteine gefärbt worden, die mehr oder weniger spezifisch für verschiedene Zelltypen sind. Makrophagen wurden mit Anti-L1-Protein-Serum, Anti-CD68-Serum und Anti-TGF- $\beta$ -Serum markiert, wobei das Anti-L1-Protein-Serum auch neutrophile Granulozyten färbt, die sich aber morphologisch unterscheiden lassen. Mastzellen wurden mit Anti-Tryptase-Serum gefärbt und Langerhanszellen in der Haut mit Anti-CD1-Serum. Es lagen auch mit Lymphozytenmarkern gefärbte Schnitte vor. Aber die hier relevanten Plasmazellen wurden morphologisch identifiziert. Schnitte, bei denen es infolge einer zu geringen Serumverdünnung zu einer Überfärbung gekommen war, wurden nicht berücksichtigt.

#### **3.3.1 Wirtszellen im Onchozerkom**

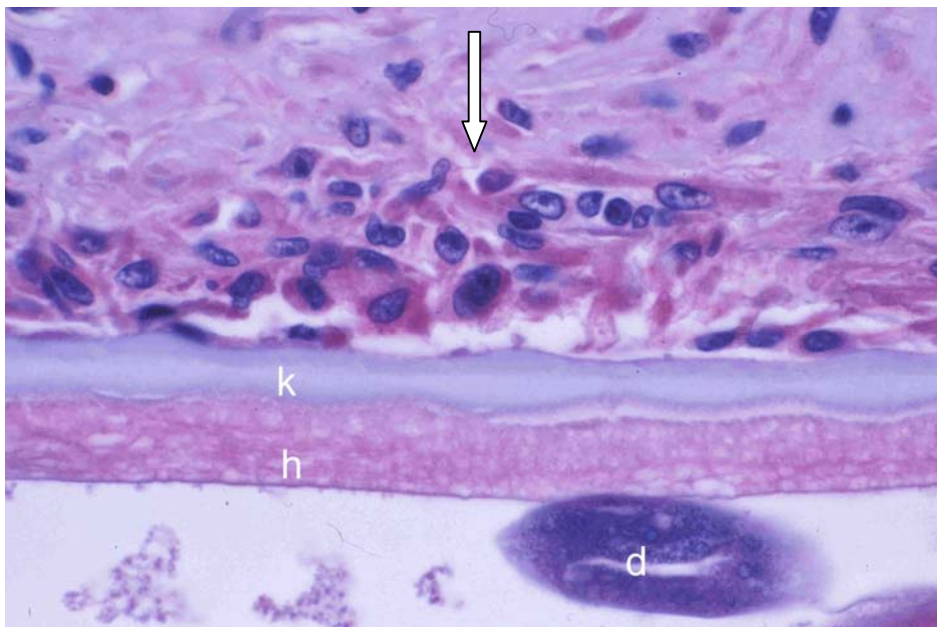
##### **3.3.1.1 Unbehandelte Onchozerkosepatienten**

Die Untersuchungen des Wirtsgewebes ergaben, daß vor allem Makrophagen im Bindegewebe des Knotens bei der generalisierten Form der Onchozerkose häufig positiv markiert hervortraten. Die Mehrzahl der Zellen wurde allerdings nicht gefärbt. Das ließ sich oft an einem Schnitt erkennen (Abbildung 25 A). Häufig waren die Makrophagen, die zu mehrkernigen kleinen oder großen Riesenzellen fusioniert waren, positiv markiert (Abbildung 9 C, 19 und 24). Die großen mehrkernigen Riesenzellen, die sich an die Kutikula der toten Makrofilarien anheften, waren fast alle markiert (Abbildung 20). Viele der an die „lebenden“ adulten Filarien angelagerten Makrophagen waren PGE<sub>2</sub>-positiv (Abbildung 21). Aber auch Makrophagen, die im Knotengewebe zwischen den Wurmschlingen lagen, waren markiert (Abbildung 22 und 26). Schaumzellen im Randbereich der Zysten um die Würmer in den Knoten waren nur wenig oder gar nicht gefärbt (nicht gezeigt).



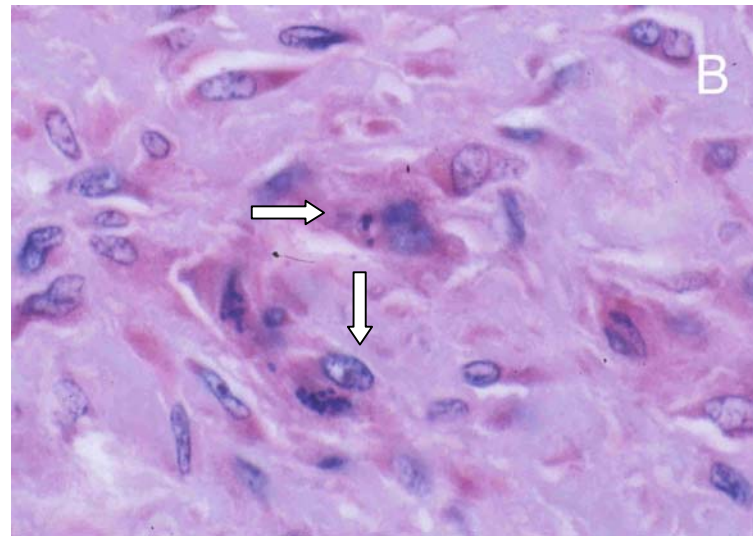
**Abbildung 20.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> in Riesenzellen

Stark markierte Riesenzellen (Pfeil) um den Kutikula-Rest eines toten Weibchens (Pfeilkopf), nach Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. x 370



**Abbildung 21.** Weibchen mit markierten Makrophagen

Längsschnitt eines Weibchens mit positiver Hypodermis und markierten Makrophagen (Pfeil) an der Kutikula nach Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit der generalisierten Form. k, Kutikula; h, Hypodermis; d, Darm. x 540



**Abbildung 22.** Markierte Makrophagen

(A) Positiv markierte Makrophagen nahe eines Weibchens mit positiver Hypodermis, von denen einer an ein Mikrofilarien-Fragment adhäsiert (Pfeil). x 470. (B) Positiv gefärbte Makrophagen (Pfeile) in der Nähe des Weibchens aus (A), von denen einige Mikrofilarien-Fragmente attackieren und aufnehmen. x 770. (A und B) Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. Behandlung der konsekutiven Schnitte mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. h, Hypodermis.

Weiterhin gelang regelmäßig der PGE<sub>2</sub>-Nachweis in einem Teil der Plasmazellen des Knotengewebes (Abbildung 23). Die Endothelzellen waren meistens nur schwach positiv oder nicht markiert.

**Abbildung 23.** PGE<sub>2</sub>-Nachweis in Plasmazellen

Plasmazellen (Pfeil) im Gewebe zwischen den Wurmschlingen eines Weibchens sind markiert. Die meisten Makrophagen sind hier nicht gefärbt (Pfeilköpfe). Auch die Endothelien der Kapillaren sind nicht markiert (Stern). Knoten eines unbehandelten Patienten aus Ghana mit generalisierter Onchozerkose. Behandlung des Schnittes mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. x 400

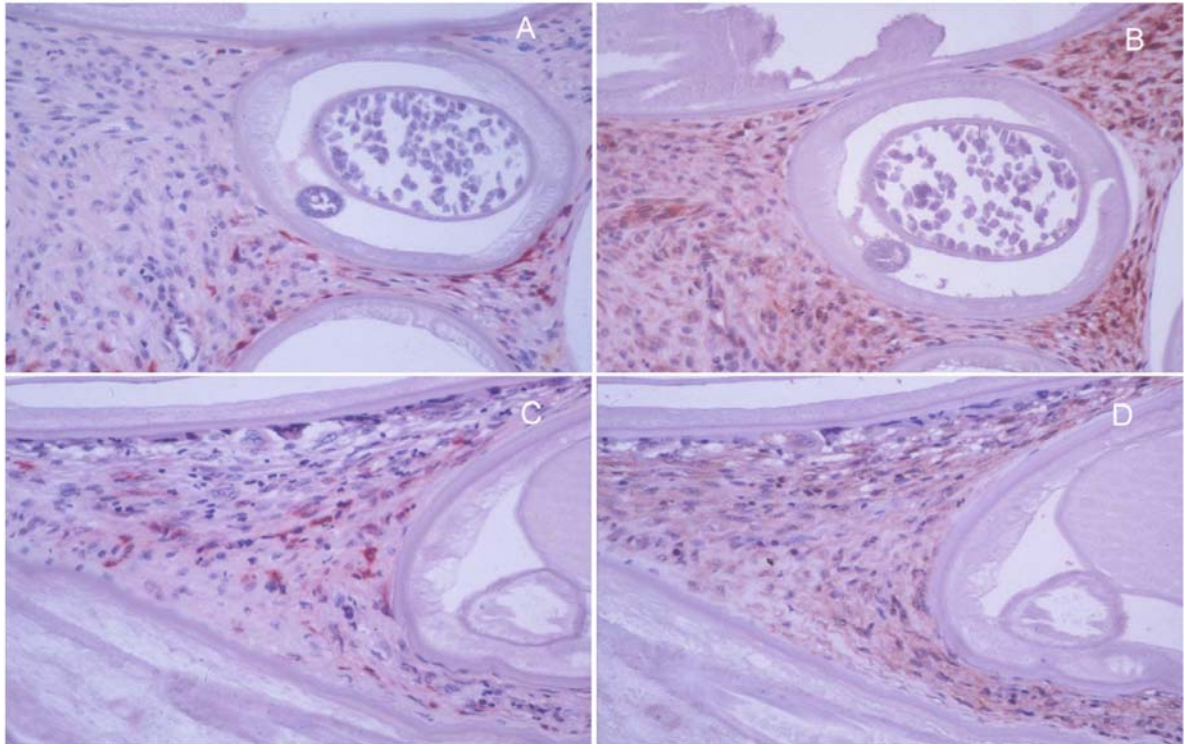
Bei der hyperreaktiven Form konnte PGE<sub>2</sub> wie auch bei der generalisierten Form in Makrophagen und Riesenzellen nachgewiesen werden (Abbildung 24). Ein Unterschied zwischen generalisierter und hyperreaktiver Form ließ sich für PGE<sub>2</sub> nicht feststellen. Aber es war vielleicht die Anzahl der untersuchten Knoten von Patienten mit hyperreaktiver Onchocerciasis zu gering.



**Abbildung 24.** Markierte Riesenzellen bei der hyperreaktiven Form

Markierte Riesenzellen (Pfeile) um eine Filarie gruppiert. Knoten einer unbehandelten Patientin aus Liberia mit der hyperreaktiven Form der Onchozerkose. Färbung des Schnittes mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. x 700

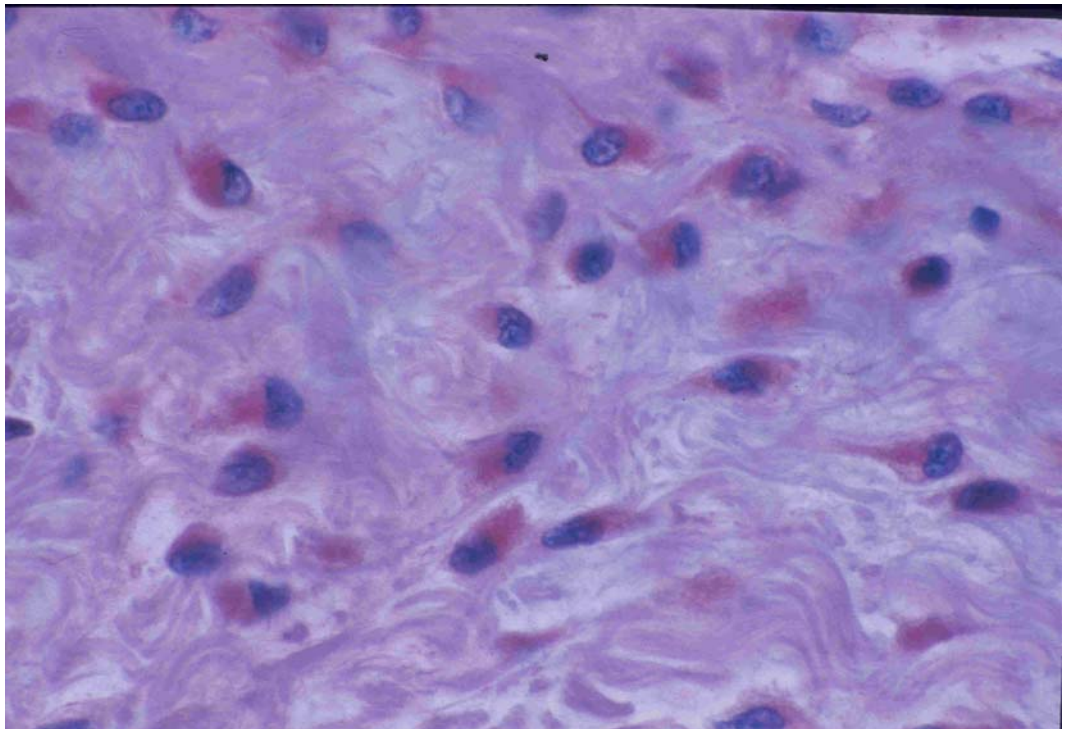
Von Interesse war der Vergleich mit dem Ergebnis der Markierung mit dem Anti-TGF- $\beta$ -Serum, weil sowohl PGE<sub>2</sub> wie TGF- $\beta$  1 Immunsuppression anzeigen. Bei Knoten von Patienten mit immunsupprimierter generalisierter wie bei denen von Patienten mit hyperreaktiver Onchozerkose exprimierten sehr viel mehr Makrophagen TGF- $\beta$  1 als PGE<sub>2</sub> (Abbildung 25 A-D). Für die PGE<sub>2</sub>-Expression konnte kein Unterschied zwischen der generalisierten und der hyperreaktiven Form festgestellt werden. Für TGF- $\beta$  1 galt, daß bei der hyperreaktiven Form weniger TGF- $\beta$  1 von Makrophagen exprimiert wurde als bei der generalisierten Form (Abbildung 25 A und B).



**Abbildung 25.** Vergleich von PGE<sub>2</sub> und TGF- $\beta$  1 in konsekutiven Schnitten  
(A) Nur wenige Makrophagen und keine Endothelien sind nach Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum im Wirtsgewebe markiert. (B) Viele Makrophagen und auch Endothelien sind nach Färbung mit dem Anti-TGF- $\beta$ -Serum markiert. (C) Wenige Makrophagen sind nach Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum im Wirtsgewebe markiert. (D) Deutlich mehr Makrophagen sind nach Färbung mit dem Anti-TGF- $\beta$ -Serum markiert als in C. (A und B) Knoten eines unbehandelten Patienten aus Mali mit der generalisierten Form der Onchozerkose. (C und D) Knoten eines unbehandelten Patienten aus Liberia mit der hyperreaktiven Form der Onchozerkose. (A-D) x 130

### 3.3.1.2 Behandlung mit Ivermectin und Doxycyclin

Es fanden sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Ivermectin und Doxycyclin behandelten Patienten. Denn auch bei mit Ivermectin wie mit Doxycyclin behandelten Patienten zeigten sich einkernige und vielkernige Makrophagen (Riesenzellen) deutlich positiv markiert abgrenzbar vom nicht gefärbtem Hintergrund (Abbildung 26).



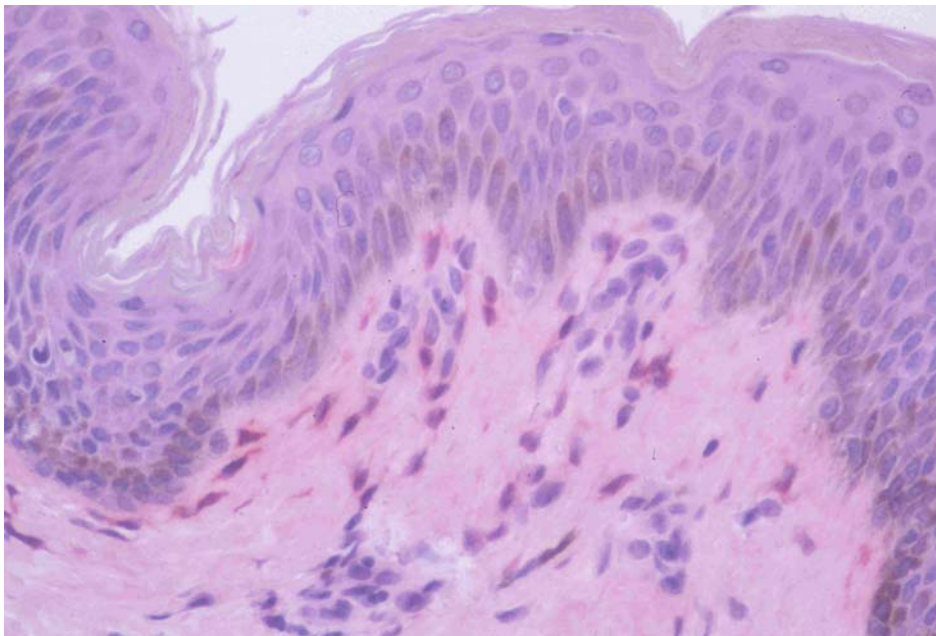
**Abbildung 26.** Ivermectinbehandlung

Positiv markierte Makrophagen im Wirtsgewebe zwischen den Schlingen einer Filarie nach Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Knoten eines 24 Monate, 12 Monate und 48 Stunden vor der Nodulektomie mit Ivermectin behandelten Patienten aus Uganda mit generalisierter Onchozerkose. x 620

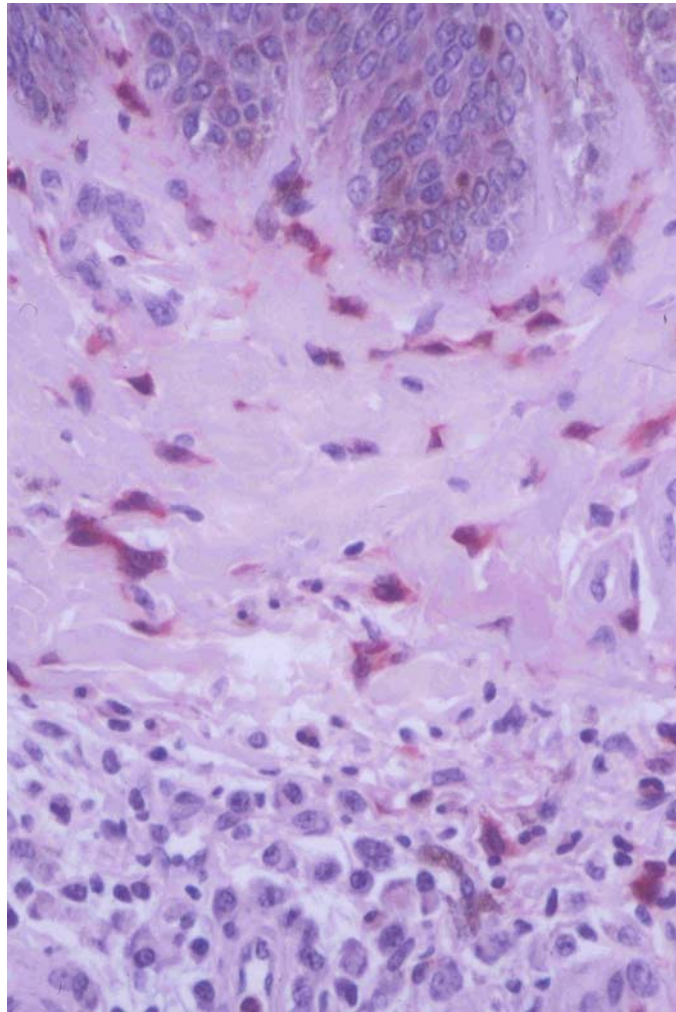
### 3.3.2 Wirtszellen in der Haut

In Hautschnitten von Personen mit der generalisierten und hyperreaktiven Form der Onchozerkose wurden weniger Proben als von den Onchozerkomschnitten untersucht. Es zeigte sich zwischen den beiden Formen kein Unterschied im PGE<sub>2</sub> Nachweis. Es waren vor allem die Makrophagen, die in den äußeren Schichten des Koriums lagen, in denen PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte (Abbildung 27 und 28). In der Epidermis waren in Parallelschnitten zu solchen die nach Anwendung von Anti-CD1-Serum Langerhanszellen erkennen ließen, keine entsprechenden Zellen mit PGE<sub>2</sub> markiert, so daß angenommen werden muß, daß die dendritischen Zellen in der Haut möglicherweise nicht oder nur selten PGE<sub>2</sub>-positiv sind (nicht gezeigt). Auf Parallelschnitten, die mit Anti-TGF-β-Serum gefärbt waren, zeigten die Langerhanszellen oft deutliche Markierungen (nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Beobachtungen an den Hautschnitten die Ergebnisse der Untersuchung der Onchozerkome bestätigten.



**Abbildung 27.** Makrophagen in der Haut bei der generalisierten Form  
Positiv gefärbte Makrophagen in der äußeren Schicht des Koriums, nach  
Färbung mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum. Hautschnitt eines unbehandelten  
Patienten mit generalisierter Onchozerkose aus Liberia. x 350



**Abbildung 28.** Makrophagen in der Haut bei der hyperreaktiven Form  
Makrophagen, nach Inkubation mit dem Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum, in der äußeren  
Schicht des Koriums markiert. x 240. Hautschnitt eines unbehandelten  
Patienten aus Liberia mit der hyperreaktiven Form der Onchozerkose

### 3.4 Versuche zum Nachweis von PGE<sub>2</sub> in Mikrofilarien durch Immunfluoreszenz

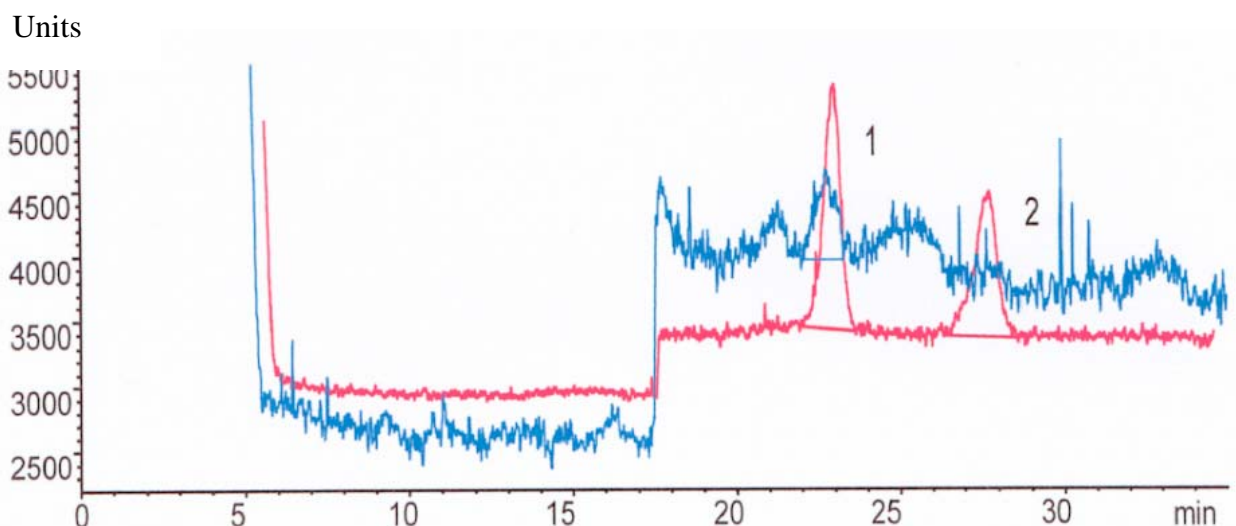
In einer weiteren Versuchsreihe sollte getestet werden, ob sich PGE<sub>2</sub> in „lebenden“ Mikrofilarien nachweisen lässt. Für unsere Versuche wurden in einem schützenden Medium in Stickstoff eingefrorene Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* verwendet. Die Versuche, PGE<sub>2</sub> mit Hilfe der Immunfluoreszenz in den Mikrofilarien nachzuweisen, führten im Unterschied zur APAAP-Technik nicht zu klaren Ergebnissen. Eine positive Fluoreszenz war im Fluoreszenzmikroskop vereinzelt sichtbar. Eine Fluoreszenz, die einen positiven PGE<sub>2</sub>-Nachweis bedeutet, ließ sich allerdings nur sehr kurzzeitig und nur bei wenigen Mikrofilarien erkennen (nicht gezeigt).

Da PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure gebildet wird, wurden einige Mikrofilarien für vier Stunden mit Arachidonsäure inkubiert. Dieser Versuch sollte zeigen, ob Mikrofilarien aus Arachidonsäure PGE<sub>2</sub> bilden können. Doch auch hierbei war es nicht zu einer deutlichen, andauernden Fluoreszenz gekommen, so daß die Bildung von PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure durch Mikrofilarien mit der Immunfluoreszenzmethode nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

### 3.5 Nachweis von PGE<sub>2</sub> mit der Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie

In Zusammenarbeit mit Dr. R. Rickert und Professor Dr. H. Steinhart (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg) wurden Analysen mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie durchgeführt, um damit PGE<sub>2</sub> in adulten Männchen, Weibchen sowie Mikrofilarien von *O. volvulus* und in deren Kulturüberständen nachzuweisen. Mit Hilfe dieser biochemischen Technik konnte gezeigt werden, daß PGE<sub>2</sub> in Extrakten von adulten Weibchen (Abbildung 29) und Mikrofilarien vorhanden, jedoch in exkretorisch-sekretorischen Produkten von Mikrofilarien nicht klar detektierbar war. Positive PGE<sub>2</sub>-Signale fanden sich auch für Extrakte der Weibchen und Mikrofilarien von der verwandten Art *O. ochengi*.

Um festzustellen, ob Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* PGE<sub>2</sub> selbst produzieren oder ob sie es aus dem Wirtsgewebe aufnehmen, wurden einige Proben mit lebenden Mikrofilarien vor dem Test für eine Stunde bei 37°C mit Arachidonsäure inkubiert. Hierbei zeigte sich ein Unterschied im Vergleich zum Leerwert, der immer im Test zur Kontrolle mitgeführt wurde. Im Leerwert wurde kein Signal gesehen. Hingegen wiesen die Mikrofilarien, die mit Arachidonsäure inkubiert wurden, ein für PGE<sub>2</sub> positives Signal auf.



**Abbildung 29.** PGE<sub>2</sub>-Nachweis in Extrakten von adulten Weibchen von *O. volvulus* mit der Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie

Blaue Linie: Chromatogramm mit virtuellen Einheiten (Units) von Extrakten von *O.-volvulus*-Weibchen. Rote Linie: Chromatogramm für den PGE<sub>2</sub>-(1) und PGD<sub>2</sub>-(2)-Standard

### 3.6 Bildung von PGE<sub>2</sub> durch Makrophagen nach Stimulation mit *O. volvulus*-Extrakt

Mehrere Veröffentlichungen (Snijders et al. 1998; Neves et al., 1999) haben gezeigt, daß Monozyten in mononukleären Zellsuspensionen nach Stimulation mit z.B. LPS oder Parasiten (*S. mansoni*) PGE<sub>2</sub> bilden.

In In-vitro-Versuchen wurde daher geprüft, ob Monozyten aus dem peripheren Blut von gesunden deutschen Spendern nach Exposition mit *O.-volvulus*-Extrakt PGE<sub>2</sub> bilden. Hierfür wurden die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut entweder unbehandelt belassen oder mit verschiedenen Substanzen (IL-4 und Dexamethason, IL-10 und Dexamethason, LPS, HSP60 oder *O.-volvulus*-Extrakt) inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und dem Zytospin zugeführt. Nach Fixierung der Präparate wurde eine APAAP-Färbung durchgeführt.

In den Zytospinpräparationen unstimulierter mononukleärer Zellen zeigte sich, daß die Monozyten in 10 von 13 Ansätzen keine Anfärbung nach der APAAP-Färbung aufwiesen (Abbildung 30).

Nach Stimulation mit LPS stellten sich die mononukleären Zellen wie erwartet angefärbt dar (Abbildung 31).

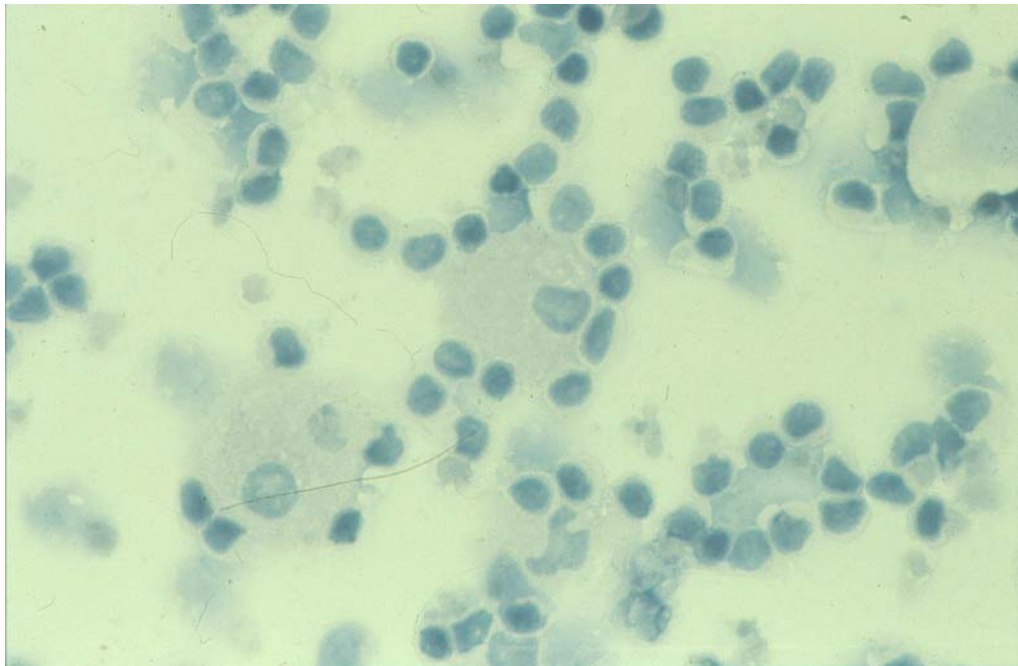
Wenn die mononukleären Zellen mit *O.-volvulus*-Extrakt stimuliert worden waren, fanden sich positive Reaktionen für PGE<sub>2</sub> in 7 von 10 Präparationen (Abbildung 32 A und B).

Nach Stimulation der mononukleären Zellen mit IL-10 und Dexamethason, Stimuli alternativ aktivierter Makrophagen, erschienen in 7 der 10 Präparate Monozyten positiv für PGE<sub>2</sub> gefärbt. Weiterhin zeigten ungefähr die Hälfte der Zytospinpräparate nach Stimulation der mononukleären Zellen mit IL-4 und Dexamethason oder mit HSP60 eine PGE<sub>2</sub>-positive APAAP-Färbereaktion (nicht gezeigt).

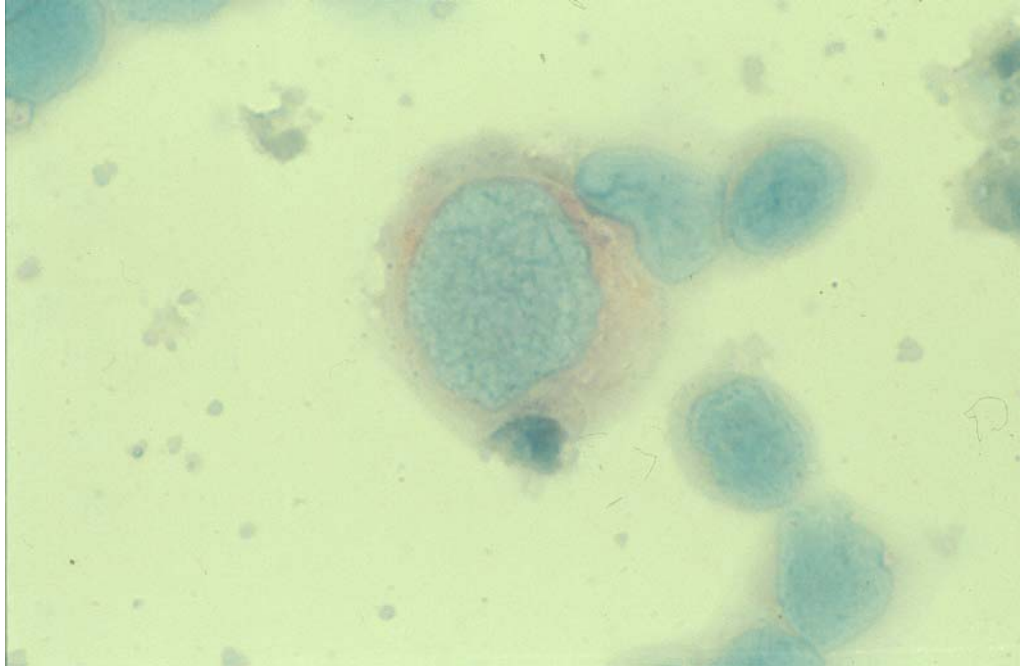


Um eine Spezifität dieser Anfärbung von PGE<sub>2</sub> zu testen, habe ich bei der Färbereaktion einigen Zytospins zusätzlich PGE<sub>2</sub> hinzugefügt. Hier war deutlich zu sehen, daß in diesen Zytospins die mononukleären Zellen keinerlei Anfärbung aufwiesen, im Gegensatz zu den nur mit Anti-PGE<sub>2</sub>-Serum behandelten Zytospins (Absorption des Antikörpers durch das Antigen).

Von Bedeutung für den PGE<sub>2</sub>-Nachweis war die Inkubationsdauer der mononukleären Zellen mit den unterschiedlichen Stimuli. Es wurde für drei oder sechs Tage inkubiert. Nach sechs Tagen Kultur war die PGE<sub>2</sub>-Färbung deutlicher ausgeprägt als nach drei Tagen. Zu dem späteren Zeitpunkt zeigte die Zellstruktur allerdings bereits Zeichen der Auflösung.

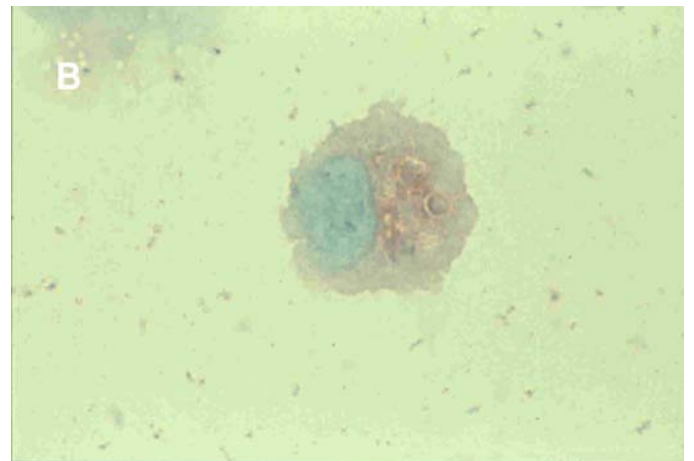
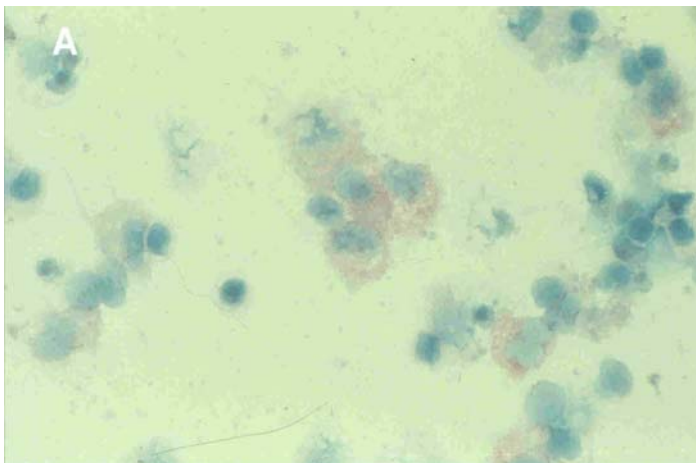


**Abbildung 30.** Versuch des PGE<sub>2</sub>-Nachweises in unstimulierten mononukleären Zellen in der APAAP-Färbung (Zytospinpräparat)  
Kein PGE<sub>2</sub>-Nachweis, erkennbar an der fehlenden Färbung. X 1200



**Abbildung 31.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> im Zytoplasma mit LPS inkubierter mononukleärer Zellen

Deutlicher PGE<sub>2</sub>-Nachweis, erkennbar an der spezifischen Rotfärbung der Zellen. APAAP-Färbung eines Zytospinpräparates. X 2300



**Abbildung 32.** Nachweis von PGE<sub>2</sub> im Zytoplasma mit *O.-volvulus*-Extrakt stimulierter mononukleärer Zellen

(A und B) Nachweis von interplasmatischem PGE<sub>2</sub> drei Tage nach Stimulation mit *O.-volvulus*-Extrakt. APAAP-Färbung eines Zytospinpräparates. (A) x 460. (B) x 1500

## 4 Diskussion

Eicosanoide und Prostaglandine spielen eine wichtige Mediatorrolle im Menschen. Ihr Wirkungsspektrum ist vielfältig (siehe 1.3.1). Die Prostaglandine sind sauerstoffabhängige Derivate der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure. In zwei Schritten bilden Cyclooxygenasen aus der Arachidonsäure unter Sauerstoffverbrauch Prostaglandin  $H_2$  (Harris et al., 2002). Von diesem Metabolit führen zellspezifische Prostaglandin-Synthasen zu den verschiedenen Prostaglandinen  $PGI_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$  und  $PGE_2$  (Abbildung 5). Prostaglandine werden als Hauptprodukt des Arachidonsäure-Metabolismus von Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet (Kurland und Bockman, 1978; Heinen et al., 1986; Frey et al., 1986; Phipps et al., 1988; Kanesa-thasan et al., 1991; Harris et al., 2002). Sie modulieren die Immunantwort.

Prostaglandinfreisetzung von monozytären Zellen wurde bei verschiedenen Parasiteninfektionen beschrieben (Neves et al., 1999). Mehrere Studien haben gezeigt, daß das Eicosanoid Prostaglandin  $E_2$  auch von verschiedenen Parasiten gebildet wird (*S. mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Spirometra mansoni*, *B. malayi*, *W. bancrofti*, *D. immitis*, *Oesophagostomum dentatum*, *Trichostrongylus colubriformis*) (Liu et al., 1992; Belley und Chadee, 1995; Dauschies und Joachim, 2000). Bisher wurde Prostaglandin  $E_2$  in den verschiedenen Parasiten durch Gaschromatographie, Massenspektrometrie, Radioimmunassay oder Enzymimmunassay nachgewiesen. Eine genaue Lokalisation des  $PGE_2$  innerhalb der Parasiten gelang nicht. Der Nachweis von  $PGE_2$  in *O. volvulus* wurde bisher nicht geführt. In der vorliegenden Arbeit konnte daher erstmalig  $PGE_2$  in *O. volvulus* nachgewiesen werden. In der immunhistologischen Färbung gelang weiterhin erstmalig die Lokalisation des  $PGE_2$  in den verschiedenen Geweben und Zellen der Filarien.

### **Produktion von PGE<sub>2</sub> in Filarien**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Methoden das Vorkommen und die Bildung von PGE<sub>2</sub> bei adulten *O. volvulus* und *O. ochengi*, sowie bei Mikrofilarien untersucht.

In der Immunhistologie wurden Onchozerkome und Hautproben mit verschiedenen Fixativen behandelt. Sowohl die Fixierung mit Ethanol wie die mit Formaldehyd oder Paraformaldehyd führte zur spezifischen PGE<sub>2</sub>-Markierung der Filarien. In den Schnitten nach Ethanol-Fixierung zeigten sich allerdings auch die Muskulatur der Körperwand und die glatten Muskelzellen der Uteruswand vereinzelt markiert. Diese Markierungen werteten wir nicht als organspezifische Markierungen für de novo synthetisiertes PGE<sub>2</sub>. Es ist eher anzunehmen, daß es sich hierbei um in die Muskulatur diffundiertes PGE<sub>2</sub> handelte, da die Ethanolfixierung die zu fixierenden Substanzen nicht so optimal bindet wie die Formaldehydfixierung.

Weiterhin könnten Schwankungen des PGE<sub>2</sub>-Nachweises in den verschiedenen Strukturen der Filarien damit erklärbar sein, daß Eicosanoide innerhalb von Sekunden bis Minuten inaktiviert werden können. Dies geschieht durch enzymatische Reduktion von Doppelbindungen und Dehydrierung von Hydroxyl-Gruppen. Durch den schnellen Abbau ist ihre Reichweite wirksam begrenzt (Koolman und Röhm, 1998). Außerdem handelt es sich beim PGE<sub>2</sub> um ein sehr kleines Lipidmolekül, so daß der eingesetzte monoklonale Antikörper (Anti-PGE<sub>2</sub>) das PGE<sub>2</sub> schon bei kleineren Veränderungen nicht mehr erkennen kann.

Hauptsächlich war PGE<sub>2</sub> in der Hypodermis der adulten Filarien nachzuweisen. Der Grund hierfür könnte sein, daß die Hypodermis das Gewebe mit der höchsten Stoffwechselaktivität der Filarien ist, da sich hier die meisten Mitochondrien und der Golgi-Apparat befinden (Franz, 1988). Auch die Oozyten im Uterus zeigten häufig eindeutig Prostaglandin E<sub>2</sub>. Hingegen waren die Mikrofilarien nur vereinzelt spezifisch für PGE<sub>2</sub> markiert. Ein Erklärungsversuch wäre, daß die Oozyten teilungsfähige Stadien sind und sie damit eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität aufweisen, daß sich die Zellen der Mikrofilarien hingegen im Wirt nicht mehr teilen und somit eine andere Stoffwechselaktivität aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Mikrofilarien kein PGE<sub>2</sub> benötigen. Darüber liegen jedoch keine Kenntnisse vor. Die Bildung von PGE<sub>2</sub> von Mikrofilarien ist in der Literatur gut dokumentiert. So konnten Liu und Mitarbeiter die Produktion und Sekretion von PGE<sub>2</sub> bei *B. malayi* und *W. bancrofti* nachweisen (Liu et al., 1992).

PGE<sub>2</sub> ließ sich immunhistologisch in der Flüssigkeit der Pseudocoelomhöhle nachweisen und zwar auch bei der Fixierung mit Formaldehyd und Paraformaldehyd. Wie im Ergebnisteil beschrieben, waren die von Franz (1988) beschriebenen Faltenbildungen der hypodermalen Zellmembran nahe dem Lumen der Pseudocoelomhöhle in den Lateralleisten und nahe der Kutikula stärker für PGE<sub>2</sub> markiert als die übrigen Anteile der Hypodermis. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, daß PGE<sub>2</sub> zumindest die innere Membran der Hypodermis passieren kann und in die Pseudocoelomhöhle eintritt. Das bedeutet, daß PGE<sub>2</sub> aus dem intrazellulären Raum in den extrazellulären Raum gelangen kann. Diese Tatsache läßt annehmen, daß PGE<sub>2</sub> auch durch die äußere Zellmembran der Hypodermis und feinste Kanäle in der Kutikula nach außen in die Umgebung des Wirtes gelangen kann. Elektronenmikroskopisch wurde dieses Phänomen für die Glutathion-S-Transferase 1 bei *O. volvulus* (OvGST1) (Wildenburg et al., 1998) und für ein Polyamin-oxidierendes Enzym (PAO) nachgewiesen (Gutiérrez-Peña et al., 1997). In diesen Arbeiten konnten die Autoren die spezifischen Markierungen für die Enzyme in den typischen Regionen der Hypodermis und der Pseudocoelomhöhle nachweisen. Sie konnten aber mit dem Elektronenmikroskop die Markierung auch in der Epikutikula finden, was zu dem Schluß führte, daß diese Enzyme aus den Filarien sezerniert werden. Anhand der Literatur und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man daher den Schluß ziehen, daß das PGE<sub>2</sub> von den Filarien in die Umgebung des Wirtes sezerniert wird. Die Instabilität von PGE<sub>2</sub> macht es jedoch unwahrscheinlich, dieses Lipid in der Kutikula oder Epikutikula zu lokalisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch eine Anzahl von Weibchen von *O. volvulus* mit Neoplasien untersucht. Das Vorkommen von Tumoren in der Pseudocoelomhöhle und gelegentlich auch in den Organen, führt zur Kompression dieser und damit zum Tod der Filarien (Duke et al., 2002). Duke und Mitarbeiter nehmen an, daß die Tumoren von den Oozyten in den

Ovarien ausgehen, konnten das aber nicht sicher belegen. In meiner Arbeit stellte sich heraus, daß die Tumorzellen, die neben den Kernen noch Zytoplasma erkennen liessen, die spezifische Markierung für PGE<sub>2</sub> aufwiesen und sich somit wie die Oozyten der *O. volvulus* verhielten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese von Duke, daß die Tumorzellen ihren Ursprung in den Oozyten haben.

Die Behandlung von Onchozerkose-Patienten mit den Chemotherapeutika Ivermectin und Doxycyclin hatte keinen Einfluß auf die PGE<sub>2</sub>-Produktion in den Filarien, da sich PGE<sub>2</sub> bei Knoten von mit Ivermectin und Doxycyclin behandelten Personen wie in Knoten un behandelter Personen fand. Das bedeutet, daß das Fehlen der durch Doxycyclin entfernten *Wolbachia*-Endobakterien keinen wesentlichen Einfluß auf die Expression von PGE<sub>2</sub> in den Filarien hat. Eine Zunahme eines Filarienproteins nach dem Verschwinden der Endobakterien war für das Hitzeschockprotein 60 beobachtet worden (Büttner und Hörauf, pers. Mitteilung).

Mit der Immunfluoreszenz wurden Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* auf das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> geprüft. Mit dieser Methode gelang es leider nicht eindeutig, PGE<sub>2</sub> in lebenden Mikrofilarien nachzuweisen. Die Fluoreszenz in den Mikrofilarien war meist zu schwach und nur kurzzeitig zu erkennen. Eine mögliche Erklärung ist, daß das PGE<sub>2</sub> auf Grund seiner kurzen biologischen Halbwertszeit sehr instabil ist und nach dem Auftauen der Filarien bereits verändert oder nicht mehr ausreichend vorhanden war, so daß der eingesetzte monoklonale Antikörper keine Möglichkeit hatte, sich zu binden.

Da PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure synthetisiert wird, wurde in weiteren Versuchsreihen geprüft, ob Mikrofilarien, die nach dem Auftauen aus dem schützenden Medium mit Arachidonsäure wiederbelebt und inkubiert worden waren, PGE<sub>2</sub> produzieren konnten. Auch hier zeigte sich nur eine schwache kurzzeitige Fluoreszenz, so daß wir mit dieser Methode keinen eindeutigen Nachweis für eine Produktion von PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure erzielen konnten. Eine Erklärung kann sein, daß die Mikrofilarien nach dem Auftauen nicht mehr vital genug und somit nicht mehr in der Lage waren, einen PGE<sub>2</sub>-Stoffwechsel aufrechtzuerhalten. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß der Reifegrad der Mikrofilarien bedeutend ist für die Bildung von PGE<sub>2</sub>.

Mit der Methode der Massenspektrometrie wurden Extrakte von Weibchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* und *O. ochengi* auf das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> untersucht. Es gelang der eindeutige Nachweis von PGE<sub>2</sub> in Weibchen, während in Mikrofilarien die Signale für PGE<sub>2</sub> in den meisten Fällen nur gering und häufig keine Signale für PGE<sub>2</sub> festzustellen waren. Auch hier mag wie bei der Immunfluoreszenz die geringe Stabilität des PGE<sub>2</sub> ein Grund dafür sein, daß wir nur schwach positive Signale für PGE<sub>2</sub> erhielten. Weiterhin standen nur eine begrenzte Anzahl von Filarien zur Verfügung, so daß auch nur geringe Extraktmengen zur massenspektrometrischen Bestimmung eingesetzt werden konnten.

Auch mit dieser Methode sollte die PGE<sub>2</sub>-Bildung von Filarien aus Arachidonsäure geprüft werden. Es wurden einige Mikrofilarien mit Arachidonsäure vorinkubiert. Es zeigte sich, daß in diesen Extrakten PGE<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte, im Gegensatz zum Leerwert der im Test mitgeführt wurde. Doch auch hier erhielten wir nur wenige schwache positive Signale für PGE<sub>2</sub>. Wie bei der Immunfluoreszenz waren die verwendeten Filarien vorher in Stickstoff eingefroren, so daß die Möglichkeit besteht, daß die Filarien nicht mehr vital genug waren, um das PGE<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure zu bilden. Auch hier war das Parasitenmaterial limitiert.

Eicosanoide werden von verschiedenen Parasiten produziert. Bekannt ist die PGE<sub>2</sub>-Produktion bei Protozoen (*Entamoeba histolytica*), Trematoden (*S. mansoni*, *Trichobilharzia ocellata*), Zestoden (*Taenia taeniaeformis*, *S. erinacei*) und Nematoden (*B. malayi*, *W. bancrofti*, *D. immitis*) (Belley und Chadee, 1995; Ramaswamy et al., 2000). Nematoden bilden keine Arachidonsäure selbst, haben aber Zugang zur Wirtsarachidonsäure (Liu und Weller, 1990). Longworth und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Mikrofilarien und adulte *B. malayi* exogene Arachidonsäure aufnehmen können und diese zu endogenen Phospholipiden metabolisieren (Longworth et al., 1988). Welche Enzyme und Gene hierbei beteiligt sind, ist noch ungeklärt. Ein Nachweis analoger humaner COX-Enzyme konnte noch nicht erbracht werden (Belley und Chadee, 1995).

Ein Enzym zur Bildung von PGD<sub>2</sub> bei *O. volvulus* ist die Glutathion-S-Transferase 1. Interessanterweise ist es eines der wenigen *O. volvulus*-Enzyme, die offenbar sezerniert werden und möglicherweise eine Freisetzung von PGD<sub>2</sub> bedingen. Glutathion-S-Transferase 1 ist in der äußeren Schicht der Hypodermis und der Basalschicht der Kutikula lokalisiert (Sommer et al., 2003). Bei Mauseinfektionen mit *S. mansoni* konnte gezeigt werden, daß das PGD<sub>2</sub> die Migration von Langerhanszellen zum Lymphknoten hemmt. Dieser Effekt scheint an dem parasitenproduzierten PGD<sub>2</sub> zu liegen und nicht an anti-entzündlichen Zytokinen, die vom Wirt gebildet werden. Dieser Mechanismus könnte eine zusätzliche Strategie der Parasiten sein, daß Immunsystem des Wirtes aktiv zu modulieren (Angeli et al., 2001). Es wäre denkbar, daß *O. volvulus*-Mikrofilarien denselben Mechanismus nutzen und dadurch der Immunantwort des Wirtes entgehen.

Die Rolle von Eicosanoiden bei der Parasit-Wirt-Interaktion ist nicht genau geklärt. Die vorherrschende Meinung ist, daß parasitenproduzierte Eicosanoide dazu beitragen, die Wirtsreaktion, insbesondere die Funktion von Makrophagen, sowie T- und B-Zellen zu hemmen. Es ist aber auch möglich, daß parasitenproduzierte Eicosanoide direkt in die Pathophysiologie der Infektion involviert sind, indem sie physiologische Prozesse im Wirt modulieren und den Parasiten somit dessen Migration, Reproduktion und Persistenz im Wirt ermöglichen (Belley und Chadee, 1995). Die Unfähigkeit des Wirtes, eine effektive Immunantwort gegen Mikrofilarien aufzubauen, kann in diesem Zusammenhang stehen. Zum Beispiel sind Lymphozyten und Makrophagen bei einer Filarieninfektion weitgehend nicht in der Lage, die lebenden Mikrofilarien zu entfernen. Vom Parasiten produziertes PGE<sub>2</sub> kann dazu beitragen, daß Immunsystem des Wirtes mit anderen relevanten Wirtsmediatoren wie IL-10 und TGF-β zu supprimieren und sich somit weitgehend ungehindert fortpflanzen zu können. Ähnlich wie die menschlichen COX-Enzyme als Angriffspunkte zur Bekämpfung von Erkrankungen dienen, könnten die Parasiten-Analoga bei der Bekämpfung von Parasiteninfektionen von Bedeutung sein.



Einen weiteren Hinweis dafür, daß Eicosanoide, die von Filarien produziert werden, eine Rolle bei der Wirt-Parasit-Interaktion spielen, erhielt man aus Studien über das Diethylcarbamazin (DEC). Diethylcarbamazin ist ein Inhibitor der Eicosanoidsynthese. Es wird für die Behandlung der lymphatischen Filariose eingesetzt. Früher wurde es auch für die Onchozerkose verwendet. In-vitro-Studien haben gezeigt, daß Diethylcarbamazin bei Konzentrationen, die dem Serumspiegel entsprechen, keine direkte mikrofilarizide Wirkung hat. Es verändert den Arachidonsäure-Metabolismus der Mikrofilarien und der Endothelzellen des Wirtes. Daraus resultieren Vasokonstriktionen und eine veränderte Adhäsion der Endothelzellen, was dazu führt, daß die Mikrofilarien immobilisiert werden. Dadurch können diese besser von den Abwehrzellen des Immunsystems angegriffen werden. Diethylcarbamazin reduziert so die Anzahl der zirkulierenden Mikrofilarien in der Haut und in der Blutbahn erheblich (Maizels et al., 1992; Sommer et al., 2003). Eine antiparasitäre Wirkung könnte auch mit der Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Bildung des Parasiten zusammenhängen.

### **Produktion und Wirkung von PGE<sub>2</sub> in Wirtszellen**

Da PGE<sub>2</sub> von humanen mononukleären Zellen nach Stimulation durch Parasiten gebildet wird (z. B. durch *S. mansoni*), wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirtszellen in den Knoten und in der Haut auf PGE<sub>2</sub> untersucht. Hier zeigte sich, daß sich in mononukleären und polynukleären Makrophagen häufig PGE<sub>2</sub> nachweisen ließ. Bei den dargestellten Makrophagen handelte es sich möglicherweise zu einem Teil um die Reihe der alternativ aktivierten Makrophagen, da Makrophagen durch PGE<sub>2</sub> von klassisch aktivierten Makrophagen zu alternativ aktivierten Makrophagen polarisiert werden. Die alternativ aktivierten Makrophagen wirken anti-inflammatorisch, indem sie die Th<sub>1</sub>-vermittelte inflammatorische Reaktion verhindern (Goerdts und Orfanos, 1999). Sie polarisieren die Immunantwort in Richtung Th<sub>2</sub>-Antwort durch Bildung von PGE<sub>2</sub>, IL-10 und den IL-1R-Antagonisten. Durch Bildung von PGE<sub>2</sub> und Abgabe ins Wirtsgewebe verhindern die Filarien, daß sie vom Wirt abgetötet werden, indem die Immunantwort durch die alternativ aktivierten Makrophagen eingeschränkt wird. Alternativ aktivierte Makrophagen produzieren selbst PGE<sub>2</sub> und wirken immunsuppressiv.

---

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß PGE<sub>2</sub> auch von Plasmazellen gebildet wird.

In meinen Versuchen war in Parallelschnitten der Epidermis feststellbar, daß durch Anti-CD1-Serum identifizierte Langerhanszellen PGE<sub>2</sub>-negativ waren. Es wurde angenommen, daß die dendritischen Zellen in der Haut bei der Onchozerkose möglicherweise nicht oder nur selten PGE<sub>2</sub>-positiv sind. Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß menschliche dendritische Zellen 6-18 Stunden nach Stimulation mit LPS PGE<sub>2</sub> bilden (Norgauer et al., 2003; Fogel-Petrovic et al., 2004). Zu beachten ist, daß eine zeitlich begrenzte Produktion von PGE<sub>2</sub> festgestellt wurde.

Die Wirtszellen im Knoten und in der Haut wurden auch bei der hyperreaktiven Form der Onchozerkose auf PGE<sub>2</sub> untersucht. Hier fand ich, daß PGE<sub>2</sub>, wie auch bei der generalisierten Form, in Makrophagen und Riesenzellen nachgewiesen werden kann.

Weil sowohl PGE<sub>2</sub> wie TGF-β 1 einen Status von Immunsuppression anzeigen, wurde ein Vergleich der Markierung beider Mediatoren durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß TGF-β 1 viel häufiger als PGE<sub>2</sub> in Makrophagen nachweisbar war. Zwischen der generalisierten und der hyperreaktiven Form konnte kein Unterschied bezüglich der PGE<sub>2</sub>-Expression von Makrophagen festgestellt werden. Bei der Expression von TGF-β 1 von Makrophagen zeigte sich in unseren Versuchen, daß bei der hyperreaktiven Form, wie zu erwarten, weniger TGF-β 1 von den Makrophagen gebildet wurde als bei der generalisierten Form (Hoerauf et al., 2003). Dasselbe Ergebnis wäre für die PGE<sub>2</sub>-Produktion zu vermuten gewesen. Daß ich in den Versuchen mit PGE<sub>2</sub> jedoch keine Unterschiede in der Produktion von PGE<sub>2</sub> von Wirtszellen bei der generalisierten und hyperreaktiven Form erhalten habe, mag daran gelegen haben, daß mir eine zu geringe Anzahl von Knoten mit der hyperreaktiven Form der Onchozerkose zur Verfügung gestanden hat.

---

Monozyten in mononukleären Zellsuspensionen bilden nach Stimulation mit LPS oder Parasiten (*S. mansoni*) PGE<sub>2</sub> (Snijders et al. 1998; Neves et al., 1999). Es sollte in der vorliegenden Arbeit daher in In-vitro-Versuchen geprüft werden, ob Monozyten aus dem peripheren Blut nach Exposition mit *O. volvulus*-Extrakt PGE<sub>2</sub> bilden. Hierfür wurden die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut entweder unbehandelt belassen oder mit verschiedenen Substanzen (z. B. *O. volvulus*-Extrakt oder LPS) inkubiert und eine APAAP-Färbung von Zytospin-Präparaten durchgeführt.

In den Zytospinpräparationen unstimulierter mononukleärer Zellen zeigte sich, daß die Monozyten in 10 von 13 Ansätzen keine Markierung für PGE<sub>2</sub> aufwiesen. In den drei positiven Ansätzen war möglicherweise bakterielles Wachstum für eine positive Reaktion verantwortlich. Nach Stimulation mit LPS waren die Zellen PGE<sub>2</sub>-positiv. Die Zellen, die trotz Stimulation mit LPS keine Färbung aufwiesen, wiesen unter dem Mikroskop Degenerationsmerkmale auf.

Nach Stimulation von mononukleären Zellen mit *O.-volvulus*-Extrakt fanden sich Markierungen für PGE<sub>2</sub> in 7 von 10 Präparationen (Abbildung 32 A und B). Die PGE<sub>2</sub>-Bildung war nicht auf eine bakterielle Kontamination zurückzuführen, da die Sterilität der *O.-volvulus*-Extrakte im Blutagartest bestätigt wurde. PGE<sub>2</sub> ließ sich auch in den Zellkulturüberständen in einem ELISA-Verfahren nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Die Produktion von PGE<sub>2</sub> durch den Parasiten und die Induktion der PGE<sub>2</sub>-Bildung durch Wirtszellen, kann eine Rolle beim Überleben der Filarie im Gewebe des immunkompetenten Wirtes spielen und im Kontext mit verschiedenen anderen Mechanismen der Parasit-Wirt-Interaktion stehen.

## 5 Zusammenfassung

Die parasitäre Filarie *Onchocerca volvulus* kann im Wirtsgewebe leben, ohne von den Abwehrmechanismen des Wirtes abgetötet zu werden. Mikrofilarien spielen eine zentrale Rolle bei der Parasit-Wirt-Interaktion, da sie das häufigste Stadium im Wirt repräsentieren. Prostaglandin E<sub>2</sub> ist ein physiologischer Mediator und Immunmodulator, der die Th<sub>1</sub>-Antwort hemmt und die Th<sub>2</sub>-Antwort fördert. Die verstärkte Th<sub>2</sub>-Antwort führt zu einer vermehrten Produktion von IL-4 und IL-5, die Immunregulatoren von Eosinophilie und Hyper-IgE darstellen. Diese Reaktionslage kennzeichnet die Onchozerkose.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorkommen von Prostaglandin E<sub>2</sub> bei Weibchen, Männchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* und bei der verwandten Filarie *O. ochengi* untersucht werden. Mit der Immunhistologie wurden Onchozerkome sowie Hautproben von generalisierten und hyperreaktiven sowie unbehandelten und behandelten Onchozerkose-Patienten auf das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> in den verschiedenen Geweben und Zellen der Filarien geprüft. Eine weitere Methode zum Nachweis von PGE<sub>2</sub> und der eigenständigen Bildung aus Arachidonsäure in Mikrofilarien von *O. volvulus* wurde an „lebenden“, isolierten Mikrofilarien mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt.

Außerdem wurden Extrakte von *O.-volvulus*- und *O.-ochengi*-Weibchen, Männchen und Mikrofilarien in der Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie auf PGE<sub>2</sub> analysiert. Auch hierbei wurde die Bildung von PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure in Extrakten von *O.-volvulus*-Mikrofilarien geprüft.

Weiterhin wurde das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> in Wirtszellen im die Parasiten umgebenden Wirtsgewebe immunhistologisch untersucht. Zum Nachweis der Bildung von PGE<sub>2</sub> in Wirtszellen wurden diese nach In-vitro-Stimulation mit *Onchocerca*-Produkten mit der Immunzytologie untersucht.

Mit diesen drei Nachweismethoden konnte ich das Vorkommen von PGE<sub>2</sub> in Weibchen, Männchen und in den Mikrofilarien von *O. volvulus* sichern. Die immunhistologischen Untersuchungen ergaben ein spezifisches Muster für die Präsenz von PGE<sub>2</sub> in den einzelnen Geweben der Filarien. Während die Kutikula in keinem Fall positiv reagierte, wies die Hypodermis regelmäßig eine spezifische Immunreaktion für PGE<sub>2</sub> auf. Die Epithelien von Darm und Uterus wiesen meist eine schwache PGE<sub>2</sub>-Reaktion auf.

Die Entwicklungsstadien im Uterus der Weibchen waren nur bei einem Teil der Proben positiv. Keine Unterschiede im Vorkommen von PGE<sub>2</sub> fanden sich zwischen der generalisierten und der hyperreaktiven Form der Onchozerkose. Es wurde beobachtet, daß PGE<sub>2</sub> in Knoten von mit Ivermectin und Doxycyclin behandelten Personen in gleicher Weise nachweisbar war, wie bei unbehandelten Personen. Das Vorhandensein von PGE<sub>2</sub> war somit unbeeinflusst von der Ivermectinbehandlung und unabhängig von der Präsenz der Wolbachia-Endobakterien. Die Spezifität der Immunreaktion wurde in wiederholten Versuchen durch Hemmung der Antikörperreaktion durch PGE<sub>2</sub>-Zusatz nachgewiesen.

Mit der HPLC-Massenspektrometrie konnte der Nachweis von PGE<sub>2</sub> in *O. volvulus* bestätigt werden. PGE<sub>2</sub> war sowohl in Extrakten aus Weibchen und Mikrofilarien von *O. volvulus* als auch von *O. ochengi* nachweisbar. Weiterhin sprachen die biochemischen Analysen dafür, daß Mikrofilarien PGE<sub>2</sub> aus Arachidonsäure synthetisieren und es kein vom Wirt aufgenommenes PGE<sub>2</sub> war, das nachgewiesen wurde.

Zytospinuntersuchungen mit kultivierten mononukleären Zellen gesunder Probanden bestätigten die Ergebnisse der Immunhistologie. Bei dieser Methode wurden mononukleäre Zellen drei oder sechs Tage lang mit *O.-volvulus*-Extrakt, IL-4/Dexamethason oder IL-10/Dexamethason inkubiert. In der Immunzytologie konnte gezeigt werden, daß mit *O.-volvulus*-Antigen stimulierte Zellen zum größten Teil PGE<sub>2</sub> bilden, im Unterschied zu den unstimulierten mononukleären Zellen, die keine Anfärbungen und somit keine Prostaglandin E<sub>2</sub>-Produktion aufwiesen. *O.-volvulus*-Antigene lösen demnach die Bildung von PGE<sub>2</sub> in Makrophagen aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Anwendung verschiedener Untersuchungsmethoden erstmals der Nachweis von PGE<sub>2</sub> in *O. volvulus* und *O. ochengi* sowie in Makrophagen von mit *O. volvulus* infizierten Personen erbracht. Mit Hilfe der Immunhistologie gelang die genaue Lokalisation von PGE<sub>2</sub> in verschiedenen Geweben und Zellen von *O. volvulus*.

## 6 Literaturverzeichnis

**Albiez, E.J.** 1985 : Effects of a single complete nodulectomy on nodule burden and microfilarial density two years later. Trop. Med. Parasitol. 36, 17-20.

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

**Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M., Trottein, F.** 2001: Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. J. Exp. Med. 193, 1135-1147.

**Bandi, C., Trees, A.J., Brattig, N.W.** 2001: *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet. Parasitol. 98, 215-238.

**Belley, A., Chadee, K.** 1995: Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? Parasitol. Today 11, 327-334.

**Betz, M., Fox, B.S.** 1991: Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits production of Th<sub>1</sub> lymphokines but not of Th<sub>2</sub> lymphokines. J. Immunol. 146, 108-113.

**Bianco, A.E., Mustafa, M.B., Ham, P.J.** 1989: Fate of developing larvae of *Onchocerca lienalis* and *Onchocerca volvulus* in micropore chambers implanted into laboratory hosts. J. Helminthol. 63, 218-226.

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

**Brune, K., Reinke, M., Lanz, R., Peskar, B.A.** 1985: Monoclonal antibodies against E- and F-type prostaglandins. High specificity and sensitivity in conventional radioimmunoassays. *FEBS Lett.* 186, 46-50.

**Büttner, D.W., Albiez, E.J., von Essen, J., Erichsen, J.** 1988 : Histological examination of adult *Onchocerca volvulus* and comparison with the collagenase technique. *Trop. Med. Parasitol.* 39, 390-417.

**Chavasse, D.C., Davies, J.B.** 1990: In vitro effects of ivermectin on *Onchocerca volvulus* microfilariae assessed by observation and by inoculation into *Simulium damnosum* sensu lato. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 707-708.

**Dadzie Y., Neira M., Hopkins D.** 2003: Final report of the Conference on the Eradicability of Onchocerciasis. *Filaria J.* 2. 2.

**Dauguschies, A., Joachim, A.** 2000: Eicosanoids in parasites and parasitic infections. *Adv. Parasitol.* 46, 181-240.

**Duke, B.O.L.** 1990: Human onchocerciasis – an overview of the disease. *Acta Leidensia* 59, 9-24.

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

**Duke, B.O.L., Marty, A.M., Peet, D.L., Gardon, J., Pion, S.D.S., Kamgno, J., Boussinesq, M.** 2002: Neoplastic change in *Onchocerca volvulus* and its relation to ivermectin treatment. *Parasitology* 125, 431-444.

**Figueroa Marroquin** 1974: Research and control of onchocerciasis in the western hemisphere. *Pan Am. Health Org., Scient. Publ.* 298, 100-111.



---

**Fischer, P., Kipp, W., Bamuhiga, J., Binta-Kahwa, J., Kiefer, A., Büttner, D.W.** 1993: Parasitological and clinical characterization of *Simulium neavei*-transmitted onchocerciasis in western Uganda. Trop. Med. Parasitol. 44, 311-321.

**Fogel-Petrovic, M., Long, J.A., Knight, D.A., Thompson, P.J., Upham, J.W.** 2004: Activated human dendritic cells express inducible cyclo-oxygenase and synthesize prostaglandin E<sub>2</sub> but not prostaglandin D<sub>2</sub>. Immunol. Cell Biol. 82, 47-54.

**Franz, M.** 1988: The morphology of adult *Onchocerca volvulus* based on electron microscopy. Trop. Med. Parasitol. 39, 359-366.

**Frey, J., Janes, M., Engerhardt, W., Afting, E.G., Geerds, C., Moller, B.** 1986: Fc gamma-receptor-mediated changes in the plasma membrane potential induce prostaglandin release from human fibroblasts. Eur. J. Biochem. 158, 85-89.

**Fukushima, T., Isobe, A., Hojo, N., Shiwaku, K., Yamane, Y., Torii, M.** 1993: The metabolism of arachidonic acid to prostaglandin E<sub>2</sub> in plerocercoids of *Spirometra erinacei*. Parasitol. Res. 79, 634-38.

**Gajewski, T.F., Schell, S.R., Fitch, F.W.** 1990: Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by TH1 and TH2 clones. J. Immunol. 144, 4110-4120.

**Goerdts, S., Orfanos, C.E.** 1999: Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. Immunity 10, 137-142.

**Gordon, S.** 2003: Alternative activation of macrophages. Immunology 3, 23-35.

**Gratchev, A., Schledzewski, K., Guillot, P., Goerd, S.** 2001: Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14, 272-279.

**Guderian, R.H., Proano, R., Beck, B., Mackenzie, C.D.** 1987: The reduction in microfilariae loads in the skin and eye after nodulectomy in Ecuadorian onchocerciasis. *Trop. Med. Parasitol.* 38, 275-278.

**Gutiérrez-Peña, E.J., Büttner, D.W., Müller, S.** 1997: *Onchocerca volvulus*: immunohistochemical and immunoelectron microscopical distribution of a polyamine oxidizing enzyme. *Trop. Med. Int. Health* 2, 472-481.

**Haffner, A., Guilavogui, A.Z., Tischendorf, F.W., Brattig, N.W.** 1998: *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastinolytic and matrix metalloproteinase serine and metalloproteases. *Exp. Parasitol.* 90, 26-33.

**Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R.P.** 2002: Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144-150.

**Hasler, F., Bluestein, H., Zvaifler, N., Epstein, L.B.** 1983: Analysis of the defects responsible for the impaired regulation of EBV-induced B cell proliferation by rheumatoid arthritis lymphocytes. II. Role of monocytes and the increased sensitivity of rheumatoid arthritis lymphocytes to prostaglandin E. *J. Immunol.* 131, 768-772.

**Heinen, E., Corman, N., Braun, M., Kinet-Denoel, C., Vanderschelden, J., Simar, L.J.** 1986: Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. VI. Analysis of prostaglandin secretion. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 137D, 369-382.

**Hoerauf, A., Brattig, N.,** 2002: Resistance and susceptibility in human onchocerciasis - beyond Th1 vs Th2. *Trends Parasitol.* 18, 25-31.

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

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

**Hoerauf, A., Mand, S., Volkmann, L., Büttner, M., Marfo-Debrekyei, Y., Taylor, M., Adjei, O., Büttner, D.W.** 2002: Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microb. Infect.* 5, 261-273.

**Hoerauf, A., Kaifi, A., Büttner, D.W.** 2003: TGF-Beta and suppression of the Th2-mediated hyperreactivity in a chronic human helminth infection (onchocerciasis). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 3, 566.

**Kanesa-thasan, N., Douglas, J.G., Kazura, J.W.** 1991: Diethylcarbamazine inhibits endothelial and microfilarial prostanoid metabolism in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 11-19.

**Kapsenberg, M.L., Kalinski, P.** 1999: The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunol. Lett.* 69, 5-6.

**Kapsenberg, M.L., Hilkens, C.M., Wierenga, E. A., Kalinsky, P.** 1999: The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2, 33-36.

**Kilian, H.D.** 1988: Deep onchocercomata close to the thigh bones of a Liberian patient. *Trop. Med. Parasitol.* 39, 247-348.

**Kirkwood, B., Smith, P., Marshall, T., Prost, A.** 1983: Relationships between mortality, visual acuity and microfilarial load in the area of the Onchocerciasis Control Programme. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76, 862-868.

**Koolmann, J., Röhm, K.H.** 1998: Taschenatlas der Biochemie, Thieme Verlag, Stuttgart, 368-369.

**Kurland, J.I., Bockman, R.** 1978: Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 147, 952-957.

**Liu, L.X., Weller, P.F.** 1989: *Brugia malayi*: microfilarial polyunsaturated fatty acid composition and synthesis. Exp. Parasitol. 69, 198-203.

**Liu, L.X., Weller, P.F.** 1990: Arachidonic acid metabolism in filarial parasites. Exp. Parasitol. 71, 496-501.

**Liu, L. X., Serhan, C. N., Weller, P. F.** 1990: Intravascular filarial parasites elaborate cyclooxygenase-derived eicosanoids. J. Exp. Med. 172, 993-996.

**Liu, L.X., Buhlmann, J.E., Weller, P.F.** 1992: Release of prostaglandin E<sub>2</sub> by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 520-523.

**Longworth, D.L., Foster, D.W., Dvorak, A.M., Weller, P.F.** 1985: Incorporation of arachidonic acid by microfilariae of *Brugia malayi*. J. Infect. Dis. 152, 1317-1323.

**Longworth, D.L., Monahan-Earley, R.A., Dvorak, A.M., Weller, P.F.** 1988: *Brugia malayi*: arachidonic acid uptake into lipid bodies of adult parasites. Exp. Parasitol. 65, 251-257.

---

**Maizels, R.M., Denham, D.A.** 1992: Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology* 105, 49-60.

**Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M.** 2003: Immunoregulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Immunology* 3, 733-744.

**Maizels, R.M., Bundy, D.A.P., Selkirk, M.E., Smith, D.F., Anderson, R.M.** 1993: Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365, 797-805.

**McMahon, J.E., Simonsen, P.E.** 1996: Filariases. In: Manson's tropical diseases. G.C. Cook (ed.), 20 ed, W.B. Saunders; London, 1321-1368.

**Mosmann, T.R., Coffman, R.L.** 1989: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.

**Muñoz, E., Beutner, U., Zubiaga, A., Huber, B.I.** 1990 a: IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *J. Immunol.* 144, 964-969.

**Muñoz, E., Zubiaga, A., Merrow, M., Sauter, N.P., Huber, B.T.** 1990 b: Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 172, 95-103.

**Neafie, R.C.** 1972: Morphology of *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Clin. Pathol.* 57, 574-586.

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

**Neves, M.F., Rezende, S.A., Goes, A.M.** 1999: Nitric oxide-mediated immune complex-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production by peripheral blood mononuclear cells of humans infected with *Schistosoma mansoni*. Cell. Immunol. 195, 37-42.

**Norgauer, J., Ibig, Y., Gmeiner, D., Herouy, Y., Fiebich, B.L.** 2003: Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in human monocyte-derived dendritic cells. Int. J. Mol. Med. 12, 83-86.

**Novak T.J., Rotherberg, E.V.** 1990: cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9353-9357.

**Ottesen, E.A.** 1995: Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. J. Infect. Dis. 171, 659-671.

**Phipps, R.P., Illig, K., Schad, V., Bhimani, K.** 1988: Differential presentation of tolerogenic immunoglobulin in vivo by macrophages and by a lymphoid dendritic cell-like tumor line. J. Leuk. Biol. 43, 271-278.

**Phipps, R.P., Roper, R.L., Stein, S.H.** 1990: Regulation of B-cell tolerance and triggering by macrophages and lymphoid dendritic cells. Immunol. Rev. 117, 135-158.

**Phipps, R.P., Stein, S.H., Roper, R.L.** 1991: A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol. Today 12, 349-352.

**Ramaswamy, K., Kumar, P., He, Y.X.** 2000: A role for parasite-induced PGE<sub>2</sub> in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. 165, 4567-4574.

**Roper, R.L., Phipps, R.P.** 1992: Prostaglandin E<sub>2</sub> and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. J. Immunol. 149, 2984-2991.

**Roper, R.P., Conrad, D.H., Brown, D., Warner, G., Phipps, R.P.** 1990: Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *J. Immunol.* 145, 2644-2651.

**Salazar Mallén** 1974: Research and control of Onchocerciasis in the western hemisphere. *Pan Am. Health Org., Scient. Publ.* 298, 112-115.

**Schulz-Key, H.** 1990: Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. *Acta Leidensia* 59, 27-43.

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

**Snijders, A., Van der Pouw Kraan, T.C., Engel, M., Wormmeester, J., Widjy, P., Zonneveld, I.M. Bos, J.D.** 1998 : Enhanced prostaglandin E<sub>2</sub> production by monocytes in atopic dermatitis (AD) is not accompanied by enhanced production of IL-6, IL-10 or IL-12. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 472-476.

**Sommer, A., Rickert, R., Fischer, P., Steinhart, H., Walter, R.D., Liebau, E.** 2003: A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D<sub>2</sub>. *Infect. Immun.* 3603-3606.

**Song, E., Ouyang, N., Horbelt, M., Antus, B., Wang, M., Exton, M.S.** 2000: Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 204, 19-28.

**Strote, G., Bonow, I.** 1991: Morphological demonstration of essential functional changes after in vitro and in vivo transition of infective *Onchocerca volvulus* to the post infective stage. *Parasitol. Res.* 77, 526-535.

---

**Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S.** 1998: Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395, 281-284.

**Wildenburg, G., Liebau, E., Henkle-Dührsen, K.** 1998: *Onchocerca volvulus*: ultrastructural localization of two glutathione S-transferases. *Exp. Parasitol.* 88, 34-42.

**WHO** 1987: Expert Committee on Onchocerciasis. Third report. *Wld. Health Org. Tech. Rep. Ser.* 752, 1-167.

**WHO** 1995: Onchocerciasis and its control. *Wld. Health Org. Tech. Rep. Ser.* 852, 1-96.

**Yoshikai, Y.** 2001: Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 257-263.



---

## 7 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. F. W. Tischendorf (vorm. Leiter der Abteilung für Klinische Chemie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin) für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Ich danke Herrn PD Dr. N. W. Brattig. Er hat mir mit seiner Erfahrung und Geduld sehr geholfen und hat immer Zeit für meine Fragen gehabt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. D. W. Büttner, der mich an seinem Wissen über die Immunhistologie teilhaben ließ und durch seine gezielten Fragen der Arbeit immer neuen Schwung verlieh.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Rainer Rickert für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Massenspektrometrie.

Ich danke weiterhin Frank Geisinger, Marlies Badusche und Wilfried Groenwoldt für ihre Hilfe im Labor.

## **8 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Arline Schwohl  
Geburtsdatum und -ort 22.03.1975 in Hamburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schule und Studium**

1985-1994 Gymnasium Neuwiedenthal, Hamburg;  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife  
1996-2000 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Hamburg  
März 1998 Ärztliche Vorprüfung  
März 1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
März 2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Juni 2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### **Ärztliche Tätigkeit**

08/02-02/04 AIP am Universitätsklinikum Schleswig Holstein  
Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
04/04-08/04 Assistenzärztin am Lubinus Klinikum, Abteilung für  
Anästhesiologie  
Seit 08/04 Assistenzärztin an der Ostholsteinklinik Eutin,  
Abteilung für Pädiatrie

### **Berufliche Tätigkeiten**

Praktisches Jahr 04-08/2001; Altonaer Kinderkrankenhaus  
08-10/2001; Padhar Hospital, Betul, Indien,  
10-12/2001; Westmead Hospital, Sydney,  
Australien  
12/01-03/2001, Tygerberg Hospital,  
Stellenbosch, Südafrika

## 9 Erklärung

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

Kiel im Dezember 2004