

Aus dem Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Zelluläre Immunreaktionen und
immunregulatorische Zusammenhänge
im Verlauf der experimentellen
Lymphatischen Filariose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Mareike Saunders

Gießen 2002

Aus dem Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Zelluläre Immunreaktionen und
immunregulatorische Zusammenhänge
im Verlauf der experimentellen
Lymphatischen Filariose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Mareike Saunders

Tierärztin aus Frankfurt /Main

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

2. Berichterstatter: PDr. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2002

The Secret Sits

We dance round in a ring and suppose,
But the Secret sits in the middle and knows.

Robert Frost
A Witness Tree, 1942

meinen Eltern und Rob

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Literaturübersicht	3
2.1 Filariosen	3
2.2 Lymphatische Filariosen des Menschen	4
2.2.1 <u>Entwicklungszyklus der Lymphatischen Filarien</u>	4
2.2.2 <u>Einteilung der Krankheitsformen</u>	5
2.2.2.1 Einteilungsschema der WHO	6
2.2.2.2 Einteilung unter Berücksichtigung der Immunreaktionen	8
2.2.2.3 Einteilung nach Freedman	8
2.3 Immunologische Reaktionen im Verlauf der Lymphatischen Filariose	11
2.3.1 <u>Humorale Reaktionen</u>	11
2.3.2 <u>Zelluläre Reaktionen</u>	13
2.3.3 <u>Theorien zur Ursache der zellulären Hyporesponsivität</u>	17
2.4 Immunität	20
2.5 Tiermodelle	21
2.5.1 <u>Bedeutung von Tiermodellen</u>	21
2.5.2 <u>Mäuse als Modell-Wirte</u>	24
2.5.3 <u><i>Mastomys coucha</i> als Modell-Wirt für <i>B. malayi</i></u>	26
2.6 Therapie der Lymphatischen Filariosen	28
2.6.1 <u>Chemotherapie bei Menschen</u>	28
2.6.2 <u>Therapiestudien an Modellwirten</u>	29
2.6.3 <u>Einfluß einer filariziden Behandlung auf Immunreaktionen des Wirtes</u>	31
2.7 Technik der semi-quantitativen PCR	33
2.7.1 <u>Quantifizierung ohne Einsatz von Standards</u>	34
2.7.1.1 Titrationsanalysen	34
2.7.1.2 Kinetische Analysen	34
2.7.2 <u>Quantifizierung mit Hilfe interner Standards</u>	35
2.7.2.1 Endogene Sequenzen als interne Standards	35
2.7.2.2 Exogene Sequenzen als interne Standards	35
2.7.3 <u>Kompetitive PCR</u>	36

2.8	Markierung und Quantifizierung der PCR-Produkte	36
3.	Material und Methoden	39
3.1	Versuchstiere	39
3.2	Haltung von <i>B. malayi</i>	39
3.2.1	<u>Mückenzucht</u>	39
3.2.2	<u>Blutmahlzeit und Infektion der Mücken</u>	40
3.2.3	<u>Isolierung der Larven 3 (L3)</u>	41
3.2.4	<u>Infektion der Endwirte</u>	42
3.3	Blutentnahme, Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut und Gewinnung von Seren	43
3.3.1	<u>Blutentnahme</u>	43
3.3.2	<u>Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut</u>	43
3.3.3	<u>Gewinnung von Serum</u>	44
3.4	Chemotherapeutische Behandlung	44
3.5	Sektion zur Kontrolle des Infektionserfolgs und Therapieeffekts	45
3.6	Isolierung der verschiedenen Stadien von <i>B. malayi</i> und Infektion der Endwirte	46
3.6.1	<u>Isolierung der Larven 3 (L3)</u>	46
3.6.2	<u>Isolierung adulter Parasiten</u>	46
3.6.3	<u>Isolierung der Mikrofilarien</u>	47
3.7	Antigengewinnung und Bestimmung des Proteingehaltes	48
3.7.1	<u>Antigengewinnung</u>	48
3.7.2	Bradford-Assay zur Bestimmung des Proteingehaltes	48
3.8	Gewinnung und Stimulation peripherer Blutlymphozyten	49
3.8.1	<u>Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)</u>	49
3.8.2	<u>Proliferationsassay</u>	50
3.9	Gewinnung von RNA aus Lymphozyten	51
3.10	Fluorometrische Messung der RNA	52
3.10.1	<u>Etablierung der Messkonditionen</u>	53
3.10.2	<u>Messung der RNA-Proben</u>	53
3.11	Reverse Transkription	54
3.12	Synthese des Standardplasmids für die RT-PCR	54
3.12.1	<u>Enzymatisches Schneiden und Reinigen der Zwischensequenz</u>	54
3.12.1.1	Enzymatisches Schneiden der Sequenz	54

3.12.1.2	Reinigen des geschnittenen Teilstückes	55
3.12.2	<u>Spezifische Primer</u>	56
3.12.2.1	Die Sequenz der Primer	56
3.12.2.2	Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide	58
3.12.3	<u>Synthese und Amplifikation des Zwischensequenz-Primer-Komplexes</u>	59
3.12.3.1	Dephosphorylierung der Zwischensequenz	59
3.12.3.2	Ligation der Zwischensequenz mit den hybridisierten Oligonukleotiden	60
3.12.3.3	Amplifikation des Ligationproduktes aus 3.12.3.2	60
3.12.3.4	Reinigung des PCR-Produktes	61
3.12.4	<u>Klonierung des Zwischensequenz-Primer-Komplexes in die Vektoren</u>	62
3.12.4.1	Enzymatisches Schneiden der PCR-Produkte und der Vektoren	62
3.12.4.2	Reinigen der Vektoren und des PCR-Amplifikates mit der Freeze-and-Squeeze Methode	62
3.12.4.3	Ligation des Zwischensequenz-Primer-Komplexes mit den Vektoren	63
3.12.5	Transformation der Vektoren in XL-1-Blue-Bakterien	63
3.12.6	Analyse der Klone mittels PCR	64
3.12.6.1	Vermehrung und Reinigung der positiven Klone	65
3.12.6.2	Analyse der Klone über Einsatz von spezifischen Primern	66
3.12.7	<u>Transkription und reverse Transkription der Standard-DNA</u>	67
3.12.7.1	Transkription der Standard-DNA in RNA	67
3.12.7.2	Reverse Transkription der Standard-RNA	67
3.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	68
3.13.1	<u>Etablierung der PCR</u>	68
3.13.1.1	Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur	68
3.13.1.2	Bestimmung der Zykluszahlen	69
3.13.1.3	Bestimmung der MgCl ₂ -Konzentrationen und des Reaktionspuffers	69
3.13.1.4	Verdünnungsassays	69
3.13.1.5	Untersuchung der Amplifikationskonstanz	70
3.13.1.5.1	Untersuchung der Variationen zwischen Gefäßen eines PCR-Laufes (tube-to-tube variations)	70
3.13.1.5.2	Untersuchung der Variationen zwischen verschiedenen PCR-Läufen (run-to-run variations)	70
3.13.2	<u>Durchführung der PCR</u>	70

3.14	Auftrennung der Amplifikate in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
3.15	Quantifizierung der PCR-Amplifikate	73
3.15.1	<u>Auswertung der Gele</u>	73
3.15.2	<u>Berechnung der relativen DNA-Mengen</u>	73
3.16	Southern Blot-Analyse	75
3.16.1	<u>Auswahl und Vorbereitung der Sonden</u>	75
3.16.2	<u>Gelelektrophorese und Transfer der DNA auf eine Nylonmembran</u>	76
3.16.3	<u>Hybridisierung und Nachweis der Produkte</u>	77
3.17	Statistische Analysen	79
4.	Versuchsaufbau	80
4.1	Vorversuche	80
4.2	Hauptversuche	81
5.	Ergebnisse	83
5.1	Etablierung der Bedingungen für die Stimulation von PBL	83
5.1.1	<u>Bestimmung der geeigneten Con A-Konzentration</u>	83
5.1.2	<u>Bestimmung der geeigneten <i>B. malayi</i>-Antigen-Konzentration</u>	84
5.2	Gewinnung und Quantifizierung der mRNA	84
5.2.1	<u>Gewinnung der mRNA</u>	84
5.2.2	<u>Quantifizierung der mRNA</u>	84
5.2.2.1	Etablierung der Messkonditionen des Fluorometers	84
5.2.2.1.1	Standardkurven	85
5.2.2.2	Messung der Proben-RNA	86
5.3	Etablierung der semiquantitativen RT-PCR	86
5.3.1	<u>Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription</u>	86
5.3.2	<u>Das Standardplasmid</u>	86
5.3.3	<u>Southern-Blot Analyse</u>	88
5.3.4	<u>Etablierung und Optimierung der PCR</u>	91
5.3.4.1	Optimierung der Annealingtemperatur und der Zykluszahl	91
5.3.4.2	Konzentration des Standardplasmids	92
5.3.4.3	Vergleich verschiedener Taq-Polymerase-Puffer	93
5.3.4.4	MgCl ₂ -Assay	93

5.3.4.5	Ergebnisse der cDNA Titrationsstudien	94
5.4	Mikrofilariämie	96
5.4.1	<u>Unbehandelte Tiere</u>	96
5.4.2	<u>Behandelte Tiere (Gruppen ZCGP, PCGP, ZFlub, PFlub, ZBay, PBay)</u>	96
5.5	Wurmbürde	98
5.6	Ergebnisse der Proliferationsstudien	99
5.7	Transkription unterschiedlicher Zytokingene im Verlauf der Infektion von <i>M. coucha</i> mit <i>B. malayi</i>	106
5.7.1	<u>IL-2-Gen-Transkription</u>	106
5.7.2	<u>IL-4-Gen-Transkription</u>	113
5.7.3	<u>IL-5-Gen-Transkription</u>	119
5.7.4	<u>IL-10-Gen-Transkription</u>	125
5.7.5	<u>IFNγ-Gen-Transkription</u>	130
6.	Diskussion	135
6.1	Die semi-quantitative RT-PCR zur Erfassung von Zytokintranskripten im Verlauf der Infektion von <i>M. coucha</i> mit <i>B. malayi</i>	135
6.2	Mikrofilarienzahlen und Wurmbürde	140
6.3	Proliferationsstudien	142
6.4	Transkription unterschiedlicher Zytokingene im Verlauf der Infektion	147
7.	Zusammenfassung	154
8.	Summary	157
9.	Literaturverzeichnis	159
10.	Anhang	175

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ADL	Adenolymphangitis
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAG	zirkulierendes Antigen
cDNA	complementary DNA
Con A	Concavalin A
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPM	Decay per minute
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay
ES	exkretorisch-sekretorisch
fg	Femtogramm
h	Stunde
IFN	Interferon
IgE, IgG, IgM	Immunglobuline der Typen E, G und M
IL	Interleukin
int OD	integrierte optische Dichte
L3	Drittlarve
L4	Larve 4
LB	Luria Broth Base
LT	Leukotriene
<i>M. coucha</i>	<i>Mastomys coucha</i>
Mf	Mikrofilarien
min	Minute
mM	milli Molar
mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBL	Periphere Blut Lymphozyten

PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PEC	Peritoneal-Exsudatzellen
pg	Pikogramm
p.i.	post infektionem
PPD	mycobacterial purified protein derivatives
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Kombination aus reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s.c.	sub cutan
Tab	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	tumor growth factor
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
TPE	Tropische Pulmonale Eosinophilie
UV-Licht	Ultra Violett-Licht
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Filariosen, insbesondere die von *Wuchereria bancrofti* und *Brugia*-Arten verursachte Lymphatische Filariose des Menschen, zählen mit zu den wichtigsten Tropenkrankheiten. In den endemischen Gebieten [Afrika, Mittel- und Südamerika sowie Süd-Ostasien (Storey, 1993)] sind schätzungsweise 80 Millionen Menschen infiziert (WHO, 1992). *W. bancrofti* ist in allen Endemiegebieten verbreitet, das Vorkommen von *B. malayi* und *B. timori* ist dagegen auf Süd-Ostasien beschränkt.

Der Infektionszyklus der Lymphatischen Filariose verläuft über Stechmücken. Diese nehmen die im Blut des Wirtes zirkulierenden Erstlarven, sog. Mikrofilarien, bei der Blutmahlzeit auf. Im Arthropoden entwickeln sich die Larven bis zu der für den Menschen infektiösen Larve 3, die wiederum beim Blutsaugen übertragen wird. Die adulten Parasiten siedeln sich in den Lymphgefäßen an und entlassen lebende Erstlarven, die anschließend in die periphere Blutbahn gelangen.

Das klinische Erscheinungsbild der Lymphatischen Filariosen ist sehr vielschichtig und reicht von leichten grippeähnlichen Symptomen bis zu massiven Obstruktionen der Lymphgefäße, insbesondere in den Extremitäten. Alle Krankheitsformen zeichnen sich jedoch durch komplexe immunregulatorische Vorgänge aus, die bis heute trotz intensiver Forschung noch viele Fragen aufwerfen. Besonders die Bereiche Immunpathologie und Regulation der Immunantwort sind noch weitgehend unverstanden.

Die Möglichkeiten zur Krankheitsbekämpfung sind zur Zeit auf die Chemotherapeutika Diethylcarbamazin (DEC) und Ivermectin beschränkt. DEC ruft jedoch häufig starke Nebenwirkungen hervor und das besser verträgliche Ivermectin wirkt ausschließlich auf Mikrofilarien (Shenoy *et al.*, 1993). Außerdem setzen epidemiologisch sinnvolle Maßnahmen eine flächenmäßige Bekämpfung voraus, die wiederum eine funktionierende Infrastruktur erfordern. Diese ist in vielen endemischen Gebieten nicht im nötigen Maß gegeben. Eine Immunprophylaxe als beste Kontrollmöglichkeit der Lymphatischen Filariosen ist derzeit noch nicht möglich und ohne genaue Kenntnisse der immunologischen Vorgänge im Wirt nicht zu entwickeln.

Versuche, die vielschichtigen Zusammenhänge im Modell zu analysieren, waren im wesentlichen aufgrund der ausgeprägten Wirtsspezifität der Erreger unbefriedigend. So läßt sich aus der Gruppe der humanpathogenen Arten ausschließlich *B. malayi* in Labortieren halten (Petrányi, 1975), wobei die wenigen Wirtstierarten, die zur Verfügung stehen [Gerbils, (*Meriones unguiculatus*); Frettchen, (*Mustela putorius*) und Spezies der afrikanischen

Vielzitzenmäuse, (*Mastomys spp.*) (vergl. Lok und Abraham, 1992; Petrányi et al, 1975)], immunologisch schlecht charakterisiert sind. Als Folge waren bisher Untersuchungen der immunologischen Reaktionen, z. B. auf Zytokinebene, nicht möglich. Alternative Systeme, wie mit Parasitenstadien implantierte Mäuse, lieferten widersprüchliche Daten (vergl. Lawrence *et al.*, 1995; MacDonald *et al.*, 1998; Babu *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollten erstmals bei einem für *B. malayi* voll empfänglichen Wirt detaillierte Analysen der zellulären Immunantwort im Verlauf der Infektion durchgeführt werden. Zwar ist auch das verwendete Versuchstier, *Mastomys coucha*, immunologisch noch relativ schlecht definiert, doch konnten die ansonsten mangels geeigneter Reagenzien bestehenden Probleme bei der Bestimmung von Zytokinspiegeln, z.B. mit der ELISA-Technik, durch den Einsatz einer RT-PCR, die die Zytokine auf der Transkriptionsebene erfaßt, umgangen werden. Des weiteren gilt die Methode der RT-PCR im Vergleich zu den ELISA-Techniken als bedeutend sensitiver (Kozbor et al, 1993).

Die verschiedenen Formen der Lymphatischen Filariose können sich unter anderem mit Verschiebungen auf T-Helferzell-Ebene und daraus resultierender Zytokinmuster erklären lassen (z.B. Mahanty, 1995). Um solche Verschiebungen untersuchen zu können, wurden *M. coucha*-spezifische Primer für IL-2 und IFN γ als Th1-assoziierte Zytokine sowie für IL-4, IL-5 und IL-10 als Th2-assoziierte Zytokine aus einer cDNA-Bank von *M. coucha* entwickelt. Periphere Lymphozyten dienten als Ausgangszellen, damit Material von lebenden Tieren gewonnen werden konnte und so eine echte Verlaufsuntersuchung am individuellen Tier gewährleistet war. Diese Zellen wurden mit *B. malayi*-Antigenen aus Larven 3 (L3), adulten Weibchen, Männchen und Mikrofilarien sowie Con A, einem T-Zell-Mitogen, das als Positivkontrolle diente, stimuliert. Mittels der RT-PCR wurden die Transkriptionsraten für die verschiedenen Zytokingene semiquantitativ bestimmt. Zum Vergleich wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen anhand des Einbaus von ^3H -Thymidin überprüft. Die Untersuchungen erfassten im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen einen Zeitraum von ca. 230 Tagen post infectionem (p. i.) und berücksichtigten zeitlich besonders die wichtigen Entwicklungsschritte der Parasiten (Häutungen, Beginn der Mikrofilarienproduktion). Weitere Gruppen wurden nach Beginn der Parasitämie chemotherapeutisch so behandelt, daß die Mikrofilarien, die adulten Parasiten oder beide Stadien eliminiert wurden, um zusätzliche Informationen zur Rolle dieser Stadien im Immungeschehen zu erhalten.

2. Literaturübersicht

2.1 Filariosen

Filariosen sind vor allem in den Tropen und Subtropen weit verbreitete Nematodeninfektionen. Bei Menschen sind die Erreger der Lymphatischen Filariosen, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* und *Brugia timori* sowie *Onchocerca volvulus* und *Loa loa* von großer klinischer Bedeutung. Das Krankheitsbild der Lymphatischen Filariosen ist bereits seit ca. 70 v. Chr. dokumentiert. Es wurde erstmals von dem indischen Arzt und Chirurgen Sushruta als *slipada* (*Sli*: Elefant, *pada*: Bein) beschrieben. Der berühmte persische Arzt Rhazes erwähnte die Krankheit im 10. Jahrhundert zum ersten Mal im arabischen Sprachraum. Abecenna notierte, daß sie im 13. Jahrhundert in Alexandria endemisch war (Rajan, 1999). Heute leben weltweit ca. 751 Mio Menschen in den Endemiegebieten (Scott, 1999). Von ihnen sind nach Erhebungen von Michael *et al.* (1996) etwa 128 Mio. Menschen in 76 Ländern mit den Erregern der Lymphatischen Filariosen infiziert. 90 % der Infektionen verursacht *W. bancrofti*, 10 % sind auf *B. malayi* und *B. timori* zurückzuführen.

Endemische Gebiete finden sich in Süd-Ostasien, Afrika, im West-Pazifik und östlichen Mittelmeerraum sowie in einigen Ländern von Mittel- und Südamerika. *B. malayi* kommt nur in Süd-Ostasien und im südlichen China vor (Michael, 1999).

Die Lymphatischen Filariosen werden als eines der komplexesten Infektionsgeschehen des Menschen betrachtet (Piessens, 1981a). Bis heute gibt es weder zur Pathologie und Entwicklung der Immunität noch zu der, im Verlauf der Infektion zu beobachtenden, Hyporesponsivität der T-Zellen und zu den Mechanismen der Parasitenelimination eine übereinstimmende Lehrmeinung.

In der Veterinärmedizin haben Filarieninfektionen vergleichsweise geringe Bedeutung. Hier steht vor allem *Dirofilaria immitis*, die die "Herzwurmkrankheit" der Hunde hervorruft, im Vordergrund. Daneben kommen bei Einhufern und Wiederkäuern u. a. Filarien der Gattungen *Parafilaria* und *Stephanofilaria* vor. Sie verursachen die sog. Sommerwunden der Pferde und das "Sommerbluten" der Rinder.

2.2 Lymphatische Filariosen des Menschen

2.2.1 Entwicklungzyklus der Lymphatischen Filarien

Lymphatische Filarien benötigen zu ihrer Entwicklung einen Zwischenwirt. Dies sind bei allen Arten Mücken verschiedener Gattungen. Die infektiöse Larve 3 (L3) gelangt bei der Blutmahlzeit des Zwischenwirtes in den Endwirt (Mensch). Sie dringt an der Stichstelle in die Dermis des Wirtes ein und wandert in die Lymphbahnen. Zwischen dem 9. und 14. Tag nach der Infektion häuten sich die L3 zu Larven 4 (L4). In den folgenden sechs bis zwölf Monaten entwickeln sich die Larven von *W. bancrofti* zu Adulten wobei sie ein starkes Längenwachstum und eine weitere Häutung durchmachen (Ash und Schacher, 1971; Cross *et al.*, 1979). Bei den *Brugia*-Arten ist dieser Entwicklungsschritt in etwa drei bis vier Monaten abgeschlossen. Die Adulten siedeln sich vorzugsweise in den Lymphbahnen der unteren Extremitäten an. Die Weibchen sind vivipar und können bis zu fünf Jahre fertil bleiben (Vanamail *et al.*, 1996). Die Mikrofilarien gelangen aus den Lymphbahnen in das periphere Blut, von wo sie bei der Blutmahlzeit des Zwischenwirtes wieder aufgenommen werden. Es gibt unter den Lymphatischen Filarien sog. periodische und subperiodische Stämme. Bei den periodischen Stämmen schwankt das Vorkommen von Mikrofilarien im peripheren Blut im Tagesverlauf erheblich. Die höchste Dichte erreichen sie nachts zwischen 22 und 2 Uhr. Während des Tages ziehen sie sich vor allem in die Lungenkapillaren zurück (Spencer, 1973). Bei subperiodischen Stämmen dagegen sind die Mikrofilarien auch tagsüber im peripheren Blut vorhanden. Periodische und subperiodische Stämme scheinen aber der gleichen Spezies anzugehören (Scott, 1999).

Nach der Aufnahme durch den Zwischenwirt verlieren die Mikrofilarien in Minuten bis wenigen Stunden ihre Scheide und wandern später in den Flügelmuskel ein, wo sie sich zur Larve 2 (L2) entwickeln. In weiteren zwei Wochen wachsen sie zur L3 heran und werden damit für den Menschen infektiös (Rajan und Gundlapalli, 1997).

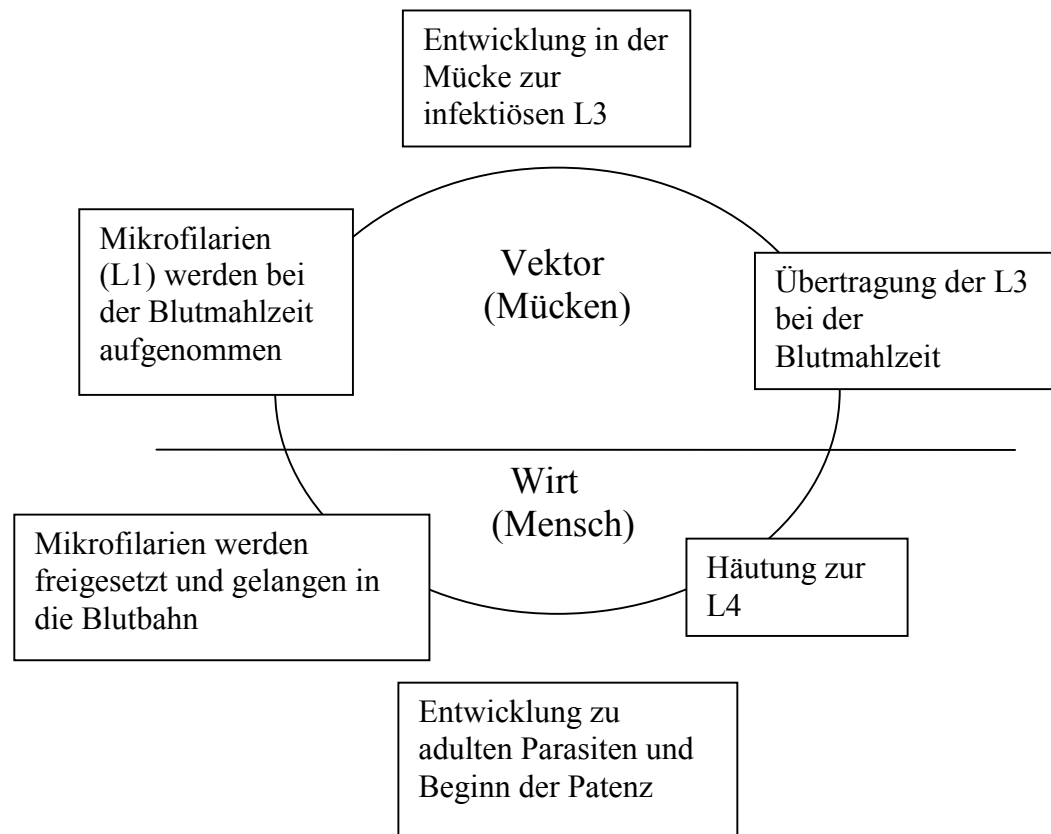


Abb. 2.1.: Entwicklungszyklus von *Brugia* spp. im Menschen, L3= Larve 3, L4= Larve 4

2.2.2 Einteilung der Krankheitsformen

Aufgrund der vielen unterschiedlichen Manifestationsformen der Lymphatischen Filariosen ist es nicht möglich, eine einfache Einteilung nach infizierten und nicht infizierten Personen eines endemischen Gebietes vorzunehmen. Daher entwickelten unterschiedliche Arbeitsgruppen verschiedene Einteilungsschemata, die mit zunehmender Kenntnis des Krankheitsbildes und verbesserten diagnostischen Möglichkeiten immer wieder verändert wurden.

Die WHO (1992) unterscheidet die verschiedenen Manifestationsformen anhand der Symptomatik und der Mikrofilarien im Blut. Daraus ergeben sich vier Hauptgruppen:

1. Die asymptomatisch amikrofilarämische Form
2. Die akute Lymphatische Filariose
3. Die asymptomatische mikrofilarämische Form
4. Die chronische Lymphatische Filariose

(siehe auch Kap. 2.2.1.1)

Bei dieser Einteilung muß allerdings beachtet werden, daß vor allem die Zahl der Mikrofilarien im Blut sowohl im Tagesverlauf, als auch saisonal stark schwankt (Sartono *et al.*, 1999). Weiterhin gibt es Übergangs- und Mischformen, die sich nicht klassifizieren lassen.

Ein zweites Schema basiert auf der Korrelation von Mikrofilarien im Blut und der Reaktivität der T-Zellen. Die Autoren unterscheiden hier vor allem zwei wichtige Gruppen: Die mikrofilariämisch-asymptomatische und die amikrofilariämisch-chronische Krankheitsform. Dabei stehen sich hohe Mikrofilarienspiegel (bis zu 1000 Mikrofilarien/ml Blut) ohne erkennbare Krankheitszeichen verbunden mit einer Hyporesponsivität der T-Zellen und z. T. äußerst schwere Krankheitsbilder, Hyperresponsivität der T-Zellen ohne Mikrofilariämie gegenüber.

Dem dritten Schema liegen die neusten apparativen und immunologischen Methoden der Diagnostik zugrunde. Ausgehend vom Vorhandensein spezifischer Filarien-Antigene, der Zytokinantwort des Patienten auf spezifisches Filarien-Antigen sowie der subklinischen und klinischen Veränderungen ergeben sich nach Freedman (1998) drei Gruppen :

1. Die asymptomatische Infektion
2. Die klinische Filariose mit aktiver Infektion
3. Die klinische Filariose ohne aktive Infektion

2.2.2.1 Einteilungsschema der WHO

Asymptomatisch amikrofilariämische Bewohner von Endemiegebieten werden häufig auch als „endemisch Normale“ bezeichnet; sie haben weder Mikrofilarien im Blut noch zeigen sie Anzeichen der Erkrankung. Diese Bezeichnung ist jedoch sehr allgemein, da hierzu unter anderem auch immune, nicht infizierte, subklinisch infizierte oder monogeschlechtlich infizierte Patienten zählen (Day, 1991). Über den Anteil, den diese Gruppe innerhalb der Bevölkerung eines Endemiegebietes ausmacht, gehen die Meinungen auseinander. Rajan und Gundlapalli (1997) sprechen von etwa 60-70 %. Wohingegen Day (1991) postuliert, daß bei genauer Untersuchung (mit den richtigen Methoden), der endemisch Normale „ein seltenes Individuum“ ist. Tatsächlich gibt es nur eine Studie, die den Status des „endemisch Normalen“ vollständig charakterisiert (Day, 1991), obwohl diese Einteilung in vielen Studien verwendet wird (z.B. Ottesen, 1989).

Charakteristisch für die akute Lymphatische Filariose sind rezidivierende Fieberschübe, verbunden mit einer Entzündung der Lymphknoten (Adenitis) und/oder der Lymphgefäße (Lymphangitis), oft bezeichnet als Adenolymphangitis (ADL). Weitere Symptome sind Ödeme, allgemeines Unwohlsein und z. T. Abszesse der Haut, die besonders in Gegenden, in denen *Brugia*-Arten endemisch sind, auftreten. Zu den am häufigsten betroffenen Lymphknoten gehören die der Inguinal-Axillar-und Epitrochlear-Region sowie die der männlichen Genitalregionen (Kumaraswami, 1999). Oft berichten Erkrankte davon, daß eine Lymphadenitisattacke durch schwere körperliche Arbeit ausgelöst wurde. Die akuten Symptome können einige Tage, aber auch vier bis sechs Wochen bestehen bleiben, was zu längerem Ausfall der Arbeitsfähigkeit führen kann. Eine in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung ist, daß die Häufigkeit der akuten Attacken in direktem Zusammenhang mit dem Schweregrad der Lymphödeme steht (Pani *et al.*, 1995). Heute unterteilen viele Autoren zudem die akute Lymphatische Filariose in zwei Formen: die erste wird ausschließlich von Filarien ausgelöst und stellt sich durch die oben beschriebenen Symptome dar, die zweite zeichnet sich zusätzlich durch bakterielle Sekundärinfektionen aus (Kumaraswami, 1999).

Die asymptomatische, mikrofilariämische Form ist durch hohe Mikrofilarienspiegel im Blut gekennzeichnet, ohne daß klinische Symptome nachweisbar wären. Von dieser Manifestationsform der Lymphatischen Filariose ist ein hoher Prozentsatz der Bevölkerung in den endemischen Gebieten betroffen.

Im Gegensatz dazu leiden vergleichsweise wenige Menschen in den Endemiegebieten unter der chronischen Form der Lymphatischen Filariose. Ausprägungen dieser Form entwickeln sich selten vor dem 15. Lebensjahr. Es sind unter anderem: Hydrozoele, Chyluria, Lymphödeme und Elefantiasis. Handelt es sich bei den Erregern der Filariose um *Brugia*-Arten, so ist charakteristischerweise ein Bein, unterhalb des Knies und z. T. ein Arm unterhalb des Ellenbogens betroffen. Sieht man Hydrozoele, geschwollene Hoden, Elefantiasis des gesamten Beines, des Skrotums und des gesamten Armes, so handelt es sich meist um eine Infektion mit *W. bancrofti* oder um Mischinfektionen (Kumaraswami, 1999).

Wie es zu dem Übergang von der mikrofilariämisch-asymptomatischen- in diese Form kommt, ist unklar. Allerdings scheinen Menschen, die aus einem nicht endemischen in ein endemisches Gebiet umziehen, viel schneller diese Symptomatik auszubilden, zum Teil schon innerhalb weniger Jahre (Partono, 1987).

Eine besondere Form, von der ebenfalls nur wenige Menschen eines Endemiegebiets betroffen sind, ist die Tropische Pulmonale Eosinophilie (**TPE**). Sie ist durch Husten, Dyspnoe, Bronchitis, Fieber, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit charakterisiert. Sie kann jedoch auch

symptomfrei verlaufen, wobei die Eosinophilie ein Zufallsbefund ist. Wahrscheinlich provozieren abgestorbene Mikrofilarien die Krankheit, da diese in entzündlichen Herden in der Lunge, Leber und Lymphknoten nachweisbar sind, jedoch nicht im Blut zirkulieren (Spry, 1982). Die Patienten weisen Antikörper gegen Mikrofilarien und extrem hohe IgE-Spiegel auf (Spry, 1982; Ottesen und Nutman, 1992).

2.2.2.2 Einteilung unter Berücksichtigung der Immunreaktionen

Das zweite Schema wurde entwickelt, als mehrere Gruppen (z. B. Ottesen, 1992; King *et al.*, 1991, 1993; Maizels *et al.*, 1995; Mahanty *et al.*, 1996a) unabhängig voneinander entdeckten, daß die T-Zellen asymptomatisch-mikrofilarämischer Patienten *in vitro* sehr viel schwächer auf Filarien-Antigen reagierten als die Zellen anderer Patientengruppen.

Studien, nach denen sich die Proliferationsleistung der Zellen stark besserte, wenn die Patienten mit DEC als mikrofilarizider Substanz behandelt worden waren (Lammie und Katz, 1981; Sartono *et al.*, 1995a) weisen darauf hin, daß die Hyporesponsivität der T-Zellen in engem Zusammenhang mit den Mikrofilarienspiegeln im Blut stehen könnte.

Aufgrund immunologischer Reaktionen, deren Wesen bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist, geht bei einem Teil der Patienten die mikrofilarämisch-asymptomatische Form in das meist mit obstruktiven Veränderungen verbundene amikrofilarämisch-chronische Bild über. Mit dem Wandel in diese Form steigert sich die T-Zell-Aktivität dieser Patienten zur Hyperreaktivität (zusammenfassend bei King und Nutman, 1991; Maizels *et al.*, 1995).

Diese Einteilung hatte jahrelang große Bedeutung und bildete die Grundlage für ausgedehnte immunologische Studien, sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene (vergl. z.B. King *et al.*, 1992; Kurniawan *et al.*, 1993; Lawrence *et al.*, 1994; Gimbartolomei *et al.*, 1998; MacDonald *et al.*, 1998).

2.2.2.3 Einteilung nach Freedman

Viele Untersuchungen zeigen allerdings auch, daß es sich bei den Patienten mit chronischer Lymphatischer Filariose um eine sehr heterogene Gruppe handelt (King *et al.*, 1992; Yanzdanbakhsh *et al.*, 1993a; Dimock *et al.*, 1994; Maizels *et al.*, 1995). Lammie *et al.* (1993) fanden in der von ihnen untersuchten Population mikrofilarämische Patienten mit Hydrozoelle und amikrofilarämische Patienten mit Hydrozoelle im Verhältnis von 50 : 55. Die Proliferation

der peripheren Blutlymphozyten (PBL) von mikrofilariämischen Patienten mit Hydrozoelle nach Stimulation mit Filarien-Antigen war im Vergleich zu amikrofilariämischen Patienten vermindert. Daher gehen die Autoren davon aus, daß nicht von der Hydrozoellebildung, als einem der Merkmale der chronischen Erkrankung, auf verstärkte Zellreaktion geschlossen werden kann.

Auch Maizels *et al.* (1995) erweitern die Theorie zur Entstehung der chronischen Form über eine rein pathologische T-Zellreaktion hinaus und sehen drei mögliche Ursachen: die direkte Auswirkungen der Parasiten auf Lymphgefäße/-knoten, immunologische Einflüsse und mikrobiologische Komponenten (Sekundärinfektionen). Sie verweisen auf eine signifikante Anzahl von Elefantiasis-Patienten, deren Immunantwort (hyporesponsive T-Zellen, hohe Spiegel von IgG4) der von mikrofilariämischen Patienten gleicht.

1994 zeigten Micheal *et al.* in einem Vergleich von 21 Einzelstudien, die im Zeitraum zwischen 1944 und 1982 durchgeführt worden waren, daß mikrofilariämische und amikrofilariämische Patienten mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zur Ausprägung der chronischen Krankheitsbilder neigen. In nur drei der analysierten Studien zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem Auftreten von Mikrofilarien im Blut und chronischen Krankheitsformen. Bei 10-40 % der chronisch Erkrankten ließen sich Mikrofilarien im Blut nachweisen. Auch die neuen Methoden der Lymphoszintigraphie führten zu bemerkenswerten Erkenntnissen. So zeigten nicht nur die Lymphgefäße von chronisch Erkrankten die erwarteten Veränderungen, auch bei 69 % der mit der sog. statischen Lymphszintigraphie untersuchten und 100 % der mit der dynamischen Lymphszintigraphie untersuchten asymptomatisch-mikrofilariämischen Patienten ließen sich Veränderungen an den Gefäßen nachgewiesen (Freedman, 1994, 1995; Dissanayake, 1995).

Ein weiteres Merkmal der Infektion ist das Vorhandensein von CD3+-Zellen als perivaskuläres Infiltrat im subkutanen Bindegewebe und in den Bereichen mit Lymphödemen. Sie kommen bei nicht Infizierten und in Lymphödemen, die nicht durch Filarien verursacht werden, selten vor, konnten aber in einer Studie von Freedman *et al.* (1995) sowohl bei mikrofilariämisch Infizierten (55 %) als auch bei chronisch Erkrankten (73 %) nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Resultate ist es nicht mehr möglich, die alten Schemata, die Mikrofilariämie mit Symptomfreiheit und Amikrofilariämie mit chronischer Veränderungen verbinden, aufrecht zu erhalten, da Infizierte, unabhängig von einer Mikrofilariämie, sowohl pathologische Veränderungen als auch immunpathologische Reaktionen zeigen. Als Grundlage für ein neues Einteilungsschema entwickelten Weil *et al.* (1997) einen Antigentest (CAg-assay), mit dem sich zirkulierende Antigene und damit lebende adulte Filarien im Patienten nachweisen lassen.

Der Test erwies sich als bedeutend sensitiver beim Nachweis von akuten Infektionen als die alte Methode der Mikrofilarienbestimmung im Blut.

Freedman (1998) schlägt in Anlehnung an die Ergebnisse von Weil *et al.* (1997) eine Einteilung nach dem Vorhandensein von zirkulierendem Filarien-Antigen (CAg), d.h. lebender adulter Parasiten, vor und teilt die Bewohner von Endemiegebieten in drei Gruppen ein.

- Asymptomatisch infiziert, CAg positiv
- Klinische Filariose, CAg positiv
- Klinische Filariose, keine aktive Infektion, CAg negativ

Vergleichend sind das neue und das alte Schema in Abb. 2.2 dargestellt.

Chronisch infizierte Patienten lassen sich nach diesem Schema anhand ihrer Immunreaktionen in die entsprechenden Gruppen einordnen. Die Hyporesponsivität der T-Zellen sowie die spezifischen Zytokinmuster stehen demnach in engem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von CAg. Somit kommen klinische Ausprägungsformen der Lymphatischen Filariose in unterschiedlichen Patienten oft mit und ohne Vorhandensein von CAg vor. Eine herabgesetzte Reaktivität der T-Zellen ist dabei korreliert mit dem Vorhandensein von CAg. So zeigte Addis (1995), daß in einer Gruppe von Patienten mit Hydrozoole bei denjenigen eine signifikant niedrigere Antigen-spezifische T-Zell-Proliferation zu verzeichnen war, die CAg positiv waren. Die oben angesprochene Heterogenität der Ergebnisse von Studien mit chronisch Infizierten ist laut Freedman (1998) darauf zurückzuführen, daß bei einigen dieser Patienten trotz der klassischen Symptome einer chronischen Infektion und Amikrofilariämie noch Antigen im Blut zirkulierte.

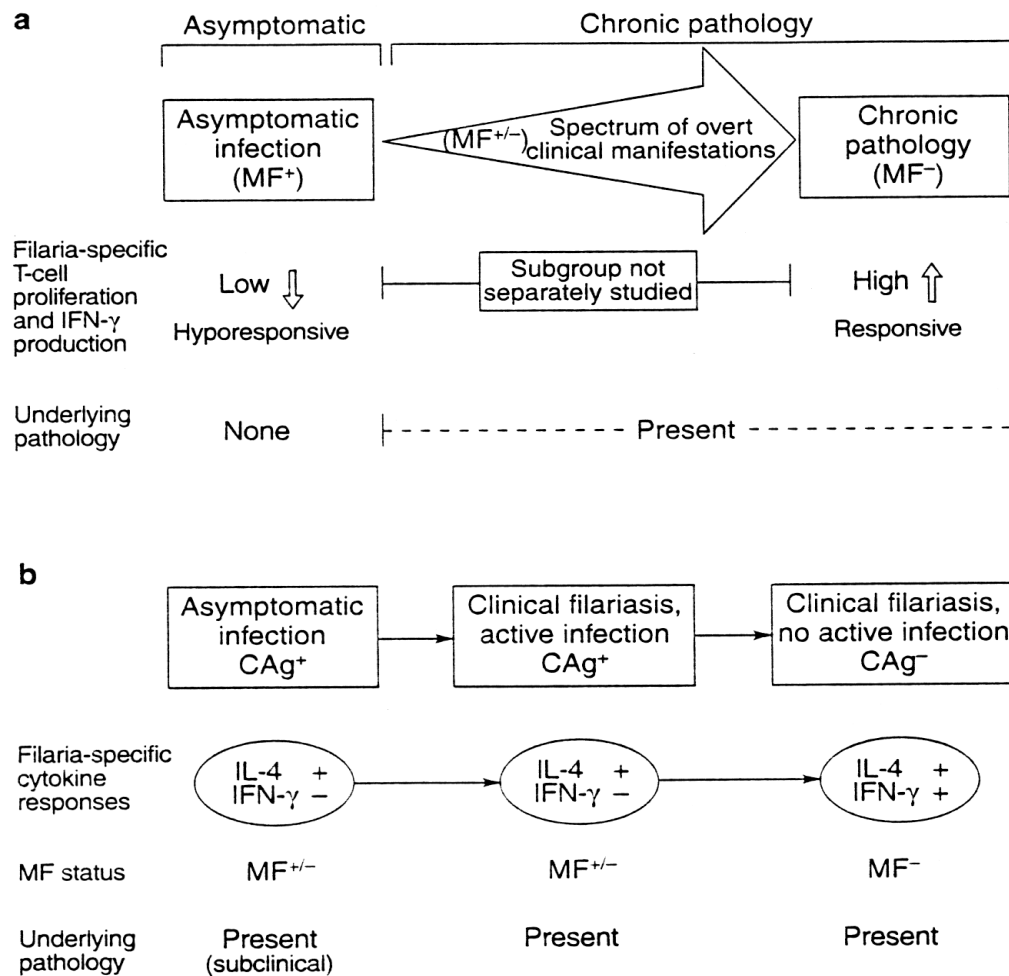


Abb. 2.2: Vergleich des alten Schemas der Einteilung der Lymphatischen Filariose nach mikrofilariämisch-asymptomatischen und amikrofilariämisch-symptomatischen Ausprägungsformen und dem Schema nach Freedman (1998) auf Grundlage von zirkulierendem Antigen (CAg). Nach Freedman (1998), verändert.

2.3 Immunologische Reaktionen im Verlauf der Lymphatischen Filariosen

2.3.1 Humorale Reaktionen

Bereits in den frühen 80er Jahren wurden Studien zur humoralen Immunantwort von Patienten mit Lymphatischer Filariose initiiert. So beschreibt Ottesen bei allen Infizierten außer bei den mikrofilariämischen Patienten erhöhte filarienspezifische Antikörperspiegel und vermutet bei dieser Patientengruppe eine spezifische humorale Immunsuppression durch „blocking antibodies“ vom IgG4-Typ (Ottesen, 1984). Ottesen *et al.* (1985) fanden diese Theorie bestätigt, als sie zeigen konnten, daß vor allem mikrofilariämische Patienten und Patienten mit TPE extrem hohe IgG4-Spiegel aufweisen. Einige Autoren schreiben IgG4-Antikörpern eine

modulierende Funktion auf die IgE-Antwort zu, und vermuten eine Konkurrenz der beiden Isotypen um dieselben Epitope (Ottesen, et al., 1985; Maizels *et al.*, 1991). Kwan-Lim *et al.* (1990) zeigten, daß hohe IgG4-Spiegel mit hohen Mikrofilarienzahlen korrelieren. Lal und Ottesen (1988) und Kwan-Lim *et al.* (1990) schlugen deshalb hohe Filarien-Antigen-spezifische IgG4-Spiegel als Diagnose-Kriterium für patente Infektionen vor. Kurniwan *et al.* (1993) zeigten in einer Studie mit *B. malayi*-Infizierten, daß mikrofilarämische Patienten dreifach höhere IgG4-Spiegel aufweisen, als chronisch Erkrankte, wohingegen bei der ersten Patientengruppe alle anderen IgG-Subklassen supprimiert sind. Bei chronisch Erkrankten dagegen überwiegen IgG2- und IgG3-Antikörper (Kurniwan *et al.*, 1993; Maizels *et al.*, 1995). IgG3 ist nach Maizels *et al.* (1995) wahrscheinlich an der Entstehung der obstruktiven Veränderungen beteiligt. Es ist der Isotyp, für den humane Fc-Rezeptoren von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten die höchste Affinität besitzen. Außerdem ist er Hauptvermittler für die Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III (van de Winkel, 1993). Bei der Hypersensitivitätsreaktion vom Typ III bilden sich Komplexe zwischen Antigenen und Antikörpern. Als Folge dessen kommt es zu Nekrosen und Entzündungen oder, bei Antigenüberschuß, zur Serumkrankheit mit Urtikaria, Fieber und Gelenkentzündungen. Bei Patienten mit Onchocerciasis sind hohe spezifische IgG3-Spiegel mit der sog. Sowda assoziiert. Dabei handelt es sich um eine Form der Onchocercose bei der die Patienten trotz niedriger Parasitenbürde unter starken Gewebsreaktionen leiden. Eine solche Reaktion deutet auf eine Immunkomplex-vermittelte Hypersensitivität vom Typ III hin (Cabrera *et al.*, 1988). Hussain *et al.* (1987) vermuten eine ähnliche Funktion dieser Subklasse bei der chronischen Form der Lymphatischen Filariose.

Die Ausbildung von IgE-Antikörpern variiert ebenfalls mit dem Krankheitsverlauf. Kurniwan *et al.* (1993) fanden in der von ihnen untersuchten Population bei chronisch Kranken im Schnitt vierfach höhere IgE-Werte als bei asymptomatischen Probanden. Maizels *et al.* (1991) sprechen sogar von 30fach höheren IgE-Spiegeln im Verhältnis zu IgG4 bei Patienten mit symptomatischen im Vergleich zu asymptomatischen Krankheitsverläufen. King *et al.* (1990) belegten in einer Studie mit Onchocercose- und Loa-loa-Patienten, daß nicht nur die spontane IgE-Produktion der Lymphozyten dieser Personen im Vergleich zu nicht Erkrankten *in vitro* erhöht ist, sondern sie sich durch Zugabe von Filarien-Antigen weiter dosisabhängig verstärken läßt.

Werden diese Befunde zusammengefaßt, so scheint eine aktive Infektion mit der Ausbildung hoher spezifischer IgG4-Konzentrationen und der Verminderung der IgE-Spiegel einherzugehen. IgG2 und IgG3 werden dabei nur in geringem Maß produziert. Die chronische

Infektion, verbunden mit der Elimination der Parasiten, ist mit höheren IgE-Spiegeln im Verhältnis zu IgG4, sowie der Bildung von IgG2- und IgG3-Antikörpern assoziiert. Als Ursache für die verstärkte IgG4- und IgE-Produktion kommt eine Verschiebung der T-Helferzellantwort in Richtung Th2 in Frage (Finkelman *et al.*, 1991; Romagnani *et al.*, 1991) Es ist bekannt, daß beim Menschen die Produktion von IgG4 und IgE durch IL-4 vermittelt werden (Gascan *et al.*, 1991). Zudem läßt sich die Bildung von IgE nach Stimulation mit Filarien-Antigen in vitro durch Zugabe von Antiserum gegen IL-4 komplett unterbinden (King *et al.*, 1990) und die IgE-Bildung durch Zugabe von externem IFN γ nahezu vollständig hemmen (King *et al.*, 1990). Wie es jedoch zu der Stimulation von IgG4 bei gleichzeitiger Hemmung von IgE kommt, ist unklar.

2.3.2 Zelluläre Reaktionen

Die verschiedenen Formen der humanen Lymphatischen Filariose sind mit sehr unterschiedlichen T-Zell-Reaktionen der jeweils betroffenen Patienten vergesellschaftet. Wie zahlreiche Studien belegen (Ottesen *et al.*, 1977; Piessens *et al.*, 1980b, 1982; Ottesen, 1984, 1992b; King *et al.*, 1992; Mahanty und Nutman, 1995; Mahanty *et al.*, 1996a; 1996b; Ravichandran *et al.*, 1997; Nutman, *et al.*, 1987), ist die verminderte Proliferation der T-Zellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen das wichtigste Merkmal der mikrofilariämisch-asymptomatischen Form der Lymphatischen Filariose. Nach einer Darstellung von Maizels *et al.* (1995) ist das Vorkommen von Mikrofilarien im Blut eng mit einer stark verminderten Reaktivität der T-Zellen auf Filarien-Antigen verbunden. Werden die Mikrofilarien eliminiert (durch Therapie oder durch immunologische Reaktionen wie bei der chronischen Form der Lymphatischen Filariose), normalisiert sich die Proliferationsleistung oder steigert sich zur Hyperreaktivität.

Verschiedene Studien lieferten unterschiedliche Hinweise auf die Ursache dieses Phänomens. So postulieren Piessens *et al.* (1980a, 1982), daß es bei klinisch infizierten Personen eine an Kunststoff adherierende Suppressorzellpopulation sowie nicht adherierende T-Suppressorzellen gibt, die die Proliferation der mononukleären Zellen spezifisch hemmen. Nutman *et al.* (1987) schlossen Makrophagen und CD8 $^{+}$ -Zellen als mögliche Suppressoren aus, da sich die Proliferationsleistung der Zellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen auch dann nicht wieder herstellen ließ, wenn diese Zellgruppe entfernt wurde. Bis heute konnte diese Hypothese beim Menschen nicht durch die genaue Identifizierung einer Suppressorzellpopulation bestätigt werden. Sie wird jedoch durch Ergebnisse aus Studien im Mausmodell gestützt. Allen *et al.*

(1996) zeigten, daß adherierende Peritonealexsudatzellen (PEC) aus mit *B. malayi* infizierten Mäusen in vitro spezifisch T-Zellproliferation hemmen können.

Durch welche Faktoren diese Hemmung vermittelt wird, ist jedoch nicht bekannt.

In den Versuchsreihen von King *et al.* (1992) hatten mikrofilariämische Patienten im Vergleich zu chronisch Kranken sehr viel niedrigere Spiegel antigenreaktiver T-Zellen. Allerdings proliferieren diese Zellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen oft genauso stark oder stärker als die von Vergleichsgruppen mit vielen reaktiven T-Zellen. Bei den Suppressorzellen mußte es sich daher nach King *et al.* (1992) um verschiedene, interagierende Populationen von CD4+-Zellen handeln, die die Reaktivität der anderen Zellarten beeinflussen.

1986 beschrieben Mosman *et al.* zwei Typen unterschiedlicher T-Helfer Zellen: Th1- und Th2-Zellen. Die Einteilung in die unterschiedlichen Typen richtet sich nach der Produktion verschiedener Zytokine:

IL-2, LT und IFN γ sind nach diesen Untersuchungen typische Th1-Zellprodukte, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 werden von Th2-Zellen produziert. Weiterführende Studien zeigten, daß CD4+-Zellen nach Erststimulation IL-2 produzieren und sich dann zu einem undifferenzierten Th0-Stamm entwickeln. Abhängig von der Anwesenheit von IL-12, IFN γ oder TGF β differenzieren sie dann zu Th1-Zellen oder in Abwesenheit der genannten Zytokine verbunden mit IL-4 zu Th2 Zellen (Mosman, 1991, 1995).

Obwohl die Funktionen der einzelnen Th-Zelltypen und deren Interaktion zu komplex sind, als daß sie sich hier vollständig darstellen ließen, kann man doch einige, stark vereinfachte, Grundsätze formulieren:

Th1-Reaktionen werden mit zellvermittelter Zytotoxizität und Hyperreaktivität vom verzögerten Typ in Verbindung gebracht, wobei IFN γ eine wichtige Rolle spielt. Th2-Zellen interagieren mit B-Zell-Klonen und unterstützen die Bildung von Antikörpern. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei Allergien. IFN γ ist in der Lage, Th2-Zellen zu inhibieren, IL-10 unterdrückt die Th1-Reaktion insgesamt (Mosman, 1995).

Scott *et al.* (1988) und Heinzl *et al.* (1989) übertrugen diese Erkenntnisse zum ersten Mal auf Infektionen parasitären Ursprungs. Sie zeigten am Modell der *Leishmania major*-Infektion in Mäusen, daß genetisch resistente Mäuse auf die Infektion mit einer starken Th1-Antwort reagieren, gekennzeichnet durch hohe Spiegel von IFN γ , aber geringe Antikörperproduktion. Empfängliche Mäuse neigen dagegen zu einer Th2-Reaktion, die die Infektion nicht kontrollieren kann.

Für die Lymphatische Filariose konnten mehrere Autoren (Nutman, 1989; King *et al.*, 1993; Maizels *et al.*, 1993) über das Profil der aus stimulierten Lymphozyten freigesetzten Zytokine

demonstrieren, daß die T-Zell-Hyporesponsivität bei asymptomatisch-mikrofilariämischen Patienten in erster Linie den Th1-Typ betrifft. Maizels *et al.* (1995), King *et al.* (1993), Ravichandran *et al.* (1997) und Yazdanbakhsh *et al.* (1993b) zeigten, daß sich die IL-4-mRNA Synthese, die Sezernierung von IL-4 und das Vorhandensein von IL-4 und IL-5-sezernierenden Zellen bei asymptomatisch-mikrofilariämischen und symptomatisch-chronischen Krankheitsformen nicht signifikant unterscheiden. Die Synthese von IFN γ -mRNA und das Vorhandensein von IFN γ -produzierenden Zellen ist jedoch bei Patienten mit asymptomatischer Mikrofilariämie signifikant erniedrigt (King *et al.*, 1993; Maizels *et al.*, 1995; Mahanty *et al.*, 1996a; 1997; Ravichandran *et al.*, 1997; Lawrence und Devenay, 2001). In einer Studie von King *et al.* (1993) wiesen alle Patienten mit Mikrofilariämie hohe Spiegel von IL-10 auf, während bei chronisch Kranken dieses Zytokin kaum nachweisbar war. Daher scheinen die zugunsten von IL-4 verschobenen Zytokinpiegel eher Zeichen für eine Hemmung der Th1-Reaktion zu sein, als für eine Dominanz der Th2-Reaktion. Yazdanbakhsh *et al.* (1993b) fanden im Gegensatz dazu allerdings, daß PBL von mit Filarien infizierten Patienten größere Mengen von IL-4 produzierten als die europäischen Kontrollen, also unter Umständen doch eine verstärkte Th2 Antwort vorliegt. Im Mausmodell scheint IL-4 ein essentieller Faktor für die Induktion der Hyporesponsivität zu sein, allerdings ist es selber nicht direkt wirksam (Mac Donald, *et al.*, 1998). Dies zeigte sich in mehreren Studien, in denen die Zugabe von Anti-IL-4-Antikörpern die Hyporesponsivität von PBL nach Stimulation mit Filarien-Antigen nicht aufheben konnte (Mac Donald, *et al.*, 1998; Sartono *et al.* 1995b). Die Zugabe von exogenem IL-2 hob die Hyporesponsivität in einigen Fällen auf, so daß die Vermutung nahe liegt, daß zu geringe Spiegel von IL-2 zumindest zum Teil zu der verminderten Reaktivität der T-Zellen beitragen könnten (Sartono *et al.*, 1995b). Die Wirkungsweise von IL-2 auf die Bildung von suppressiven Zytokinen sowie dessen Rolle bei der Ausdifferenzierung von Th1 und Th2-Zellen ist jedoch nach wie vor umstritten (Horwitz, 1997; Mosman, 1995).

Eine weitere Theorie beruht auf der Tatsache, daß PBL mikrofilariämischer Patienten spontan sowie auf spezifische Stimulation mit Filarien-Antigen mit der Synthese von IL-10 reagierten, PBL von chronisch Erkrankten jedoch kaum IL-10 synthetisierten (King *et al.*, 1993; Mahanty *et al.*, 1996b). Mahanty *et al.* (1996b) vermuteten deshalb, daß IL-10 direkt für die Hemmung der Th1-Reaktion verantwortlich ist. Auch hatten bereits King *et al.* (1993) berichtet, daß sich die Proliferationsleistung der Lymphozyten mikrofilariämischer Patienten nach Zugabe eines Antiserums gegen IL-10 ebenso erhöhen läßt, wie die Sekretion von IFN γ und IL-2 (Mahanty und Nutman, 1995). Dimock *et al.* (1994), Sartono *et al.* (1995b), und Maizels (1995) kamen in ähnlichen Studien am Menschen jedoch nicht zu diesem Ergebnis. Die Proliferation der Lymphozyten blieb von Anti-IL-10 unbeeinflusst. Osborne und Devaney (1999) demonstrieren

allerdings im Tiermodell, daß dort eine aktive Suppression der Th1-Fraktion durch IL-10 vorliegt und bestätigten somit die Befunde von King *et al.* (1993) und Mahanty und Nutman (1995).

Bereits 1995 entwarfen Mahanty und Nutman in Anlehnung an die von Mosman (1991, 1995) postulierte Differenzierung der Th1/Th2-Subklassen aus Th0-Vorläuferzellen ein Modell zur antigenspezifischen Verschiebung der Th-Subklassen, das zur Erklärung dieser Befunde herangezogen werden kann. Demnach hemmen die bei asymptomatisch-mikrofilariämischen Patienten vorhandenen hohen IL-10 Spiegel die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen, wodurch es allmählich zu einer starken Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Th2 kommt. Das verstärkt sezernierte IL-10 wirkt nach Mahanty und Nutman (1995) und Mahanty *et al.* (1997) direkt auf CD4⁺-Zellen, wodurch die Produktion von IL-2 und zelluläre Proliferation verhindert werden. IL-10 verändert außerdem die MHC II-Expression auf antigenpräsentierenden Zellen und vermindert damit die Effektivität der Antigenpräsentation. Schließlich wird auch die Fähigkeit von Makrophagen zur Produktion von NO sowie die Induktion von Co-Stimulantien bei der T-Zell-Aktivierung gehemmt.

Ob die Hyporesponsivität der Zellen ausschließlich die filarienspezifischen T-Zellen betrifft oder eine generelle Hemmung der T-Zellen [deutlich durch verminderte Proliferation nach Stimulation mit Mitogenen wie Concavalin A oder PPD (mycobacterial purified protein derivatives)] oder nicht parasitären Antigenen darstellt, ist strittig. Während beim Menschen eine spezifische Hemmung vorzuliegen scheint (Piessens, 1980a, b, 1982; Nutman *et al.*, 1987; King *et al.*, 1993; Ravichandran *et al.*, 1997), zeigen Untersuchungen an Modelltieren auch unspezifische Suppression (Portaro *et al.*, 1976; Lammie und Katz, 1983a, b, 1984 a, b; Mistry und Subrahmanyam, 1985).

Es ist nicht geklärt, wodurch es im Verlauf der Lymphatischen Filariosen zu den Veränderungen der Zytokinantwort kommt. Mahanty *et al.* (1993) vermuten, daß Parasiten-Antigene selber für die Verschiebung der Th-Reaktionen verantwortlich sind. Steel *et al.* (1994), Osborne und Devany (1998), Lawrence (1994) und Lawrence und Denham (1993) konnten in Anlehnung daran tatsächlich zeigen, daß verschiedene Stadien von *Brugia spp.* sowohl im Menschen, als auch im Tiermodell unterschiedliche Zytokinmuster hervorrufen (siehe auch Kap. 2.5.2).

Bekannt ist, daß die Mikrofilarienzahlen im Blut saisonal schwanken. In der Zeit niedriger Übertragungsraten von L3 (Trockenzeit) sinken die Mikrofilarienwerte im Blut der Patienten (Sartono *et al.*, 1999). Die Ergebnisse aus Proliferationsversuchen mit Zellen von mikrofilariämischen und amikrofilariämischen Personen desselben Endemiegebietes deuten darauf hin, daß zu Zeiten niedriger Mikrofilarienzahlen im Blut der mikrofilariämischen

Patienten die Proliferation von Zellen amikrofilariämischer Patienten in Reaktion auf Filarien-Antigen ansteigt, und zwar umgekehrt proportional zur Mikrofilariendichte (Sartono *et al.*, 1999). Die Spiegel von IFN γ stiegen bei amikrofilariämischen Patienten proportional mit den Proliferationsraten an, wohingegen die IL-4-Spiegel dieser Patienten keine Veränderungen zeigten. Daraus ergibt sich, daß IFN γ der Parameter ist, der am empfindlichsten auf die Änderungen der Mikrofilariendichte reagiert.

Sartono *et al.* (1999) folgern daraus, daß Änderungen im Infektionsdruck das fragile Gleichgewicht der T-Zell-Antwort beeinflussen können. Sinkt der Infektionsdruck, wurden verstärkt Th1-assoziierte Reaktionen (Anstieg der IFN γ -Spiegel, zunehmende Proliferation in Reaktion auf Filarien-Antigen) beobachtet. Erkennbar wurde dies aber nur bei leicht infizierten, amikrofilariämischen Patienten, da mikrofilariämische Patienten mit hohen Wurmbürden einer stärkeren Suppression ausgesetzt sind. Obwohl in dieser Studie die Korrelation von Mikrofilarienbürde und Immunantwort deutlich gezeigt werden konnte, ist nicht klar, ob Veränderungen in der Immunantwort dazu führen, daß die Mikrofilarienspiegel schwanken oder umgekehrt.

2.3.3 Theorien zur Ursache der zellulären Hyporesponsivität

Zu Beginn der intensiven Erforschung der immunologischen Vorgänge bei der Lymphatischen Filariose, die etwa zeitgleich mit einem besseren Verständnis der T-Zell-Reaktionen einherging (Mosman *et al.*, 1986; 1991; 1995; Cherwinsky *et al.*, 1987; Del Prete *et al.*, 1991), war es naheliegend, das Th1/Th2-Schema auch auf diese Infektion anzuwenden. Die Befunde, daß asymptomatisch-mikrofilariämische Patienten stark verminderte Th1-Reaktionen mit geringer IFN γ -Produktion zeigen, während die Th2-Reaktionen relativ stark ausgeprägt sind, schien zunächst das Infektionsgeschehen zu erklären (vergl. Ottesen, *et al.*, 1985). Allerdings ist die Produktion von IL-5, einem Zytokin, das von Th2-Zellen produziert wird, in Patienten mit Mikrofilariämie ebenfalls vermindert. IL-10 wird von Mahanty und Nutman (1995) und King *et al.* (1993) als Ursache für die Hemmung der Th1-Antwort gesehen, jedoch wird IL-10 beim Menschen von beiden Zelltypen produziert (Del Prete *et al.*, 1993). Mac Donald *et al.* (1998) zeigten am Tiermodell, daß IL-4 und nicht IL-10 für die Hyporesponsivität der T-Zellen verantwortlich ist, konnten jedoch den genauen Wirkmechanismus nicht darstellen. Die komplexen Vorgänge der Hyporesponsivität der T-Zellen lassen sich also nicht mit einer einfachen Verschiebung in Richtung Th2-Reaktion erklären.

Mehrere Ansätze, die über das Th1/Th2-Schema hinausgehen, versuchen das Phänomen der Anergie der T-Zellen zu erklären:

Die immunologische Toleranz wird als Prozeß definiert, bei dem durch sog „klonale Deletion“ in der prä-oder neonatalen Phase alle gegen den eigenen Organismus gerichteten T-Zellen des Thymus eliminiert werden (Maizels und Lawrence, 1991). Eine zweite Stufe der Toleranz, ohne Beteiligung von Thymusgewebe, setzt später im Leben ein und ist primär durch Inaktivierung der T-Zellen gekennzeichnet. Man spricht von „klonaler Anergie“ (Schwartz, 1990). 1991 argumentierten Maizels und Lawrence, daß im immunkompetenten Organismus Toleranz gegenüber Filarienantigenen auftritt, so daß die beobachtete Form der Toleranz bei der Lymphatischen Filariose eher auf klonale Anergie, als auf klonale Deletion zurückzuführen ist. Ein einfaches Gedankenmodell beschreibt klonale Anergie als einen Zustand, in dem Lymphozyten zwar einem Antigen ausgesetzt werden, aber ein zusätzlich notwendiges Signal ausbleibt, so daß sie nicht reagieren. Es gibt bis heute nur Hypothesen, um welche Faktoren oder Bindungsreaktionen es sich im Falle von Filarien-Infektionen bei diesen kostimulatorischen Signalen handeln könnte und wie sie reguliert werden (Maizels und Lawrence, 1991).

Persistierende Spiegel von Mikrofilarienantigenen könnten für die Anergie der T-Zellen verantwortlich sein (Ottesen, 1992). In Anlehnung an die Theorie von Maizels und Lawrence (1991) wäre es denkbar, daß hohe Antigenspiegel die Anlagerung von Kostimulationsfaktoren verhindern. Tatsächlich haben Versuche an Mäusen gezeigt, daß hohe Antigenspiegel zu Anergie der T-Zellen führen und diese erst dann wieder reagieren, wenn die Antigenspiegel sinken (Ramsdell und Fowlkes, 1992, Fowlkes und Ramsdell, 1993). Dies würde erklären, warum die T-Zellen nach Chemotherapie wieder auf Filarien-Antigen reagieren (vergl. Piessens *et al.*, 1981b; Sartono *et al.*, 1995a).

Die Mimikry von Zytokinmolekülen durch Infektionserreger ist ein weiteres Prinzip, das das Immunsystem beeinflussen kann und so das Überleben der Erreger im Wirt ermöglicht. Alcamí und Smith (1995) beschrieben mehrere Gene von Pockenviren, die für Zytokinanaloga kodieren, welche die Aktivität der wirtseigenen Zytokine blockieren. Dies kann geschehen, indem Zytokinrezeptoren sezerniert werden, die die wirtseigenen Zytokine binden und damit inhibieren oder, wie im Fall von Epstein-Barr-Viren, Homologe von wirtseigenem IL-10 produziert werden, welche die zytotoxische Immunreaktion unterdrücken. Gomez-Escobar *et al.* (1997) gelang es, ein Gen aus *B. malayi* und *B. pahangi* zu klonieren, welches ein Homolog zu TGF β , einem proliferationshemmendem Zytokin, kodiert. Sie vermuten, daß dieses Homolog evtl. für die Hyporesponsivität der Zellen verantwortlich ist.

Serum von infizierten Patienten und Tieren übt ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation aus (Piessens *et al.*, 1980a; Lammie *et al.*, 1984). Es gibt also wahrscheinlich einen Bestandteil von exkretorisch-sekretorischen Produkten (ES-Produkten) der Parasiten, der die Immunantwort beeinflusst. Lal *et al.* (1990) untersuchten Phosphorylcholderivate von *B. malayi* und zeigten, daß diese in der Lage waren, die T-Zell-Proliferation zu hemmen. Harnett und Parkhouse (1995) identifizierten Phosphorylcholin (PC) in allen bis dahin untersuchten ES-Produkten Lymphatischer Filarien. Weiterhin beobachteten Harnett *et al.* (1999a), daß ES-Produkte Lymphatischer Filarien vor allem im Blut von mikrofilariämischen Patienten nachgewiesen werden können, so daß eine Beziehung zwischen der Hyporesponsivität mikrofilariämischer Patienten und ES-Produkten vermutet wird. Harnett *et al.* (1999b) konnten zeigen, daß ES-62, ein ES-Produkt der Nagerfilarie *Acanthocheilonema viteae* die Proliferation muriner B-Zellen nach spezifischer Stimulation um bis zu 60 % hemmen kann. Dabei machten sie in gesonderten Experimenten deutlich, daß diese Effekte durch das in ES-62 enthaltene PC hervorgerufen werden. Über den genauen Mechanismus mit dem PC auf die B-Zellen wirkt, herrscht noch Unklarheit. Es wird aber vermutet, daß PC die Signaltransduktion in den Zellen, die die Proliferation auslöst, beeinflusst. 1998 beobachteten Harnett *et al.*, daß ES-62 auch die Proliferation humaner T-Zellen inhibieren kann. Dies scheint, ebenso wie bei den B-Zellen, eine Folge von Entkopplungen in der Signaltransduktion zu sein, die durch PC ausgelöst wird. Mit diesem Experiment liefern Harnett *et al.* (1998) eine Erklärung für das bereits 1990 von Lal *et al.* beschriebene Phänomen der Proliferationshemmung von T-Zellen durch Serum Filarien-infizierter Patienten.

Eine weitere Theorie stützt sich auf die indirekte Hemmung der T-Zellen durch Beeinträchtigung der Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Allen *et al.* (1996) führten Experimente am Mausmodell durch und fanden, daß APC von Tieren, denen adulte *B. malayi* implantiert worden waren, bei Co-Kultivierung mit Th2-Zellen deren Proliferation nach Stimulation mit Conalbumin hemmten, nicht aber die antigen-spezifische IL-4-Synthese. In Fortführung dieser Experimente wurde ein von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC) der infizierten Tiere sezernierter Faktor oder Zytokin gefunden, der die Lymphozytenproliferation hemmt. Die genaue Identifikation dieses Faktors ist bis jetzt noch nicht geglückt (Mac Donald *et al.*, 1998). Verschiedene Autoren vermuten, daß genetische Faktoren die Empfänglichkeit für eine Filarien-Infektion beeinflussen können. Fanning und Kazura (1983) untersuchten diesen Aspekt in einer Studie mit verschiedenen Mausstämmen. Tatsächlich konnten sie signifikante Beziehungen zwischen einzelnen Mausstämmen und der Dauer und Höhe der Mikrofilariämie nach Injektion von Mikrofilarien zeigen. Ottesen *et al.* (1981) beobachteten familiäre Häufungen Filariosekranker, konnte dieses Phänomen aber weder HLA-A, noch HLA-B-

Klassen zuordnen. Maizels *et al.* (1995) postulierten in diesem Zusammenhang, daß es eine Beziehung zwischen HLA-Klasse I und der chronischen Krankheitsform sowie HLA Klasse II und der asymptomatischen-mikrofilariämischen Form gibt, so daß sie vermuten, daß nicht nur die Empfänglichkeit für die Krankheit, sondern auch der Krankheitsverlauf genetisch bedingt sein könnte.

Zusammenfassend gibt dieses Kapitel lediglich einen Überblick über die Vielfältigkeit der Theorien mit denen versucht wird, das Immungeschehen im Verlauf der Lymphatischen Filariose zu erklären und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die z.T. sehr verschiedenen Gedankenansätze heben jedoch die Komplexität der Erkrankung und ihre Auswirkungen auf das Immunsystem deutlich hervor.

2.4 Immunität

Day *et al.* (1991) zeigten in einer Verlaufsstudie über mehrere Jahre, daß die Wurmbürden bei Erwachsenen über den Versuchszeitraum gleich blieben, während sie bei Kindern kontinuierlich anstiegen. Patienten in endemischen Gebieten, die älter waren als 20 Jahre, besaßen außerdem mehrheitlich Antikörper gegen die Oberfläche von L3, wohingegen nur zwei von zehn Kindern diese Antikörper aufwiesen (Day *et al.*, 1991; Kurniwan-Atjmada *et al.*, 1998). Da schon Wong und Guest (1969) zeigen konnten, daß sich Antikörper gegen L3 deutlich von denen gegen adulte Parasiten unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, daß die immunologische Erkennung der L3 eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung einer Immunität spielt (Day, 1991; Maizels und Lawrence, 1991). Darauf basierend beschreiben Maizels *et al.* (1991) und Day *et al.* (1991) das Prinzip der „concomitant imunity“, wonach Patienten im Laufe der Infektion eine Immunität gegen L3 aufbauen, die eine Ansiedlung weiterer Parasiten verhindert, ohne jedoch die vorhandenen Adulten zu schädigen. Diese Vorgänge konnten im Tiermodell bestätigt werden (Denham *et al.*, 1992). Tatsächlich sind anti-L3-Oberflächen-Antikörper beim Menschen vor allem vom IgM- und in geringem Maße vom IgG1-Typ, nicht jedoch vom IgG4-Typ, wie er bei mikrofilariämischen Patienten gefunden wird (Kurniwan-Atjmada *et al.*, 1998; s. Kap. 2.3.1). Die Ausprägung von IgG4-Antikörpern steht in engem Zusammenhang mit einer Th-2-dominierten-Immunantwort (s. Kap. 2.3.1). Da jedoch das Eindringen von Larven 3 keine IgG4-Antikörper induziert, scheint die TH2-Antwort bei der von Maizels und Lawrence (1991) beschriebenen „concomitant imunity“ keine Rolle zu spielen.

2.5 Tiermodelle

2.5.1 Bedeutung von Tiermodellen

Experimentelle Studien mit Filarien werden durch die ausgeprägte Wirtsspezifität der Parasiten erschwert. So entwickelt sich *W. bancrofti* nur in Primaten (Palmieri *et al.*, 1982). *B. malayi* ist die einzige Art der Lymphatischen Filarien, deren Entwicklungszyklus mit Nagern wie Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) (McCall *et al.*, 1973; Ash und Riley, 1970), der afrikanischen Vielzitzenmaus *Mastomys coucha* (Petrányi *et al.*, 1975) und Frettchen (*Mustela putorius furo*) (Hines *et al.*, 1989) etabliert werden kann. Viele Versuchsreihen stützen sich auf Modellparasiten wie *B. pahangi*, eine den menschlichen Filarien nahe verwandte Art, deren Wirt Katzen (Grenfell *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1992) und Hunde (Miller *et al.*, 1991) sind, oder auf die Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis* (erstmalig beschrieben durch Williams und Brown, 1945).

Viele der zur Verfügung stehenden Modelltiere sind immunologisch schlecht charakterisiert oder haben keinen syngeneten Hintergrund. Trotz der Nachteile konnten mit Hilfe dieser Systeme grundlegende Erkenntnisse zum Verständnis der Lymphatischen Filariosen gewonnen werden, die sich dann auch beim Menschen bestätigen ließen.

So fanden Portaro *et al.*, 1976 in ersten Studien an Milzzellen von *M. unguiculatus*, die mit *B. pahangi* infiziert worden waren, einen Zelltyp, der die Proliferation von Milzzellen nach Stimulation mit T-Zell-Mitogenen *in vitro* hemmte. Die genaue Identifikation dieser Suppressorzellen gelang jedoch nicht. Piessens *et al.* (1980a, 1982), identifizierten dann bei mikrofilariämischen Patienten eine Fraktion von T-Suppressor-Zellen sowie eine adhärenente T-Zellpopulation, die *in vitro* die Immunantwort auf parasitenspezifisches Antigen unterbindet und bestätigten so die von Portaro *et al.* (1976) erhaltenen Ergebnisse im Prinzip auch für den Menschen.

Lammie und Katz (1983a; 1983b; 1984a; 1984b) nutzen ebenfalls das Modell *M. unguiculatus*/*B. pahangi* für Zell-Proliferationsstudien. Sie analysierten die Reaktionen der B- und T-Zell-Subpopulationen und zeigten, daß sich abhängig vom Infektionsstadium zunächst die B-Zell-Reaktivität auf Stimulation mit *B. pahangi*-Weibchen-Antigen abschwächt. Die filarienspezifische T-Zell-Reaktivität wird erst mehr als 20 Wochen p.i. (in der Phase der ansteigenden Parasitämie) beeinflußt (Lammie und Katz, 1983b). Es scheint daher zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige, supprimierende Zelltypen zu geben, die durch die Infektion induziert werden (Lammie und Katz, 1984b). Die Autoren vermuteten, daß bei einer Antigenexposition zunächst antigenspezifische "regulatory" Zellen aktiviert werden, die

wiederum unspezifische Suppressorzellen aktivieren. Weiterführende Untersuchungen führten schließlich zu der Annahme, daß drei Zellkomponenten für eine vollständige Hemmung der Lymphozyten- und Milzzellproliferation nach Stimulation mit Filarien-Antigen notwendig sind: Spezifische Antigen-reaktive- oder „inducer“-Zellen, eine unspezifische T-Suppressorzellfraktion und eine Plastik-adherierende Fraktion. Die genaue Identifizierung dieser Zelltypen gelang nicht. Eventuell besteht aber ein Zusammenhang zwischen der Antigen-induzierten Suppression der T-Zellreaktivität und den von Mikrofilarien induzierten Milzzellgranulomen. In diesen Granulomen kommt es zur Anhäufung von Cyclophosphamid-sensitiven Zellen. Die Injektion von Cyclophosphamid in infizierte *M. unguiculatus* stellt die Reaktivität deren Milzzellen auf Mitogene *in vitro* wieder her, so daß die Autoren vermuten, daß die Zellen der Mikrofilarien-induzierten Milzzellgranulome die Fraktion der unspezifischen Suppressorzellen darstellen könnte (Lammie und Katz, 1984a).

Ein weiterer wichtiger Punkt zum Verständnis der Infektion sind die unterschiedlichen immunologischen Reaktionen der Patienten auf verschiedene Parasitenstadien. Für den Menschen zeigten Steel *et al.* (1994), daß Kinder mikrofilariämischer Mütter, die *in utero* der Infektion ausgesetzt waren, im Vergleich zu Kindern amikrofilariämischer Mütter deutlich anders reagierten. Die Unterschiede waren nur bei der zellulären Immunreaktion nachweisbar (Proliferationsstudien und Zytokinanalysen) und ließen sich ausschließlich nach Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen beobachten. Antigen adulter Filarien hatte keinen Einfluß. Vergleichbare Reaktionen wurden in verschiedenen Modellsystemen nachgewiesen. Auf T-Zell-Ebene zeigten Osborne und Devaney (1999), daß die Implantation verschiedener Parasitenstadien in Mäuse unterschiedliche Zytokinmuster hervorruft. In Proliferationsassays mit Milzzellen von *M. coucha* und Wistarratten hatten bereits Mistry und Subrahmanyam (1985) eine stadien- und infektionszeitpunktabhängige Proliferationskurve beobachtet. So proliferierten Lymphknoten- und Milz-Zellen von Wistarratten, die mit *L. sigmodontis* infiziert waren, während der Präpatenz nach Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen deutlich, zeigten aber bei Stimulation mit Adulten-Antigen keine Reaktion. Nach Beginn der Patenz führte keines der beiden Antigene zu einer Proliferation. Mistry und Subrahmanyam (1986) nutzten das Modell *M. coucha/L. carinii* für Studien nach Therapie mit Diethylcarbamazin (DEC). DEC wirkt in diesem Fall ausschließlich mikrofilarizid. Nach Elimination der Mikrofilarien aus dem Blut war die Hyporeaktivität der untersuchten Lymphknoten- und Milzzellen auf Mikrofilarien-Antigen aufgehoben. Die Behandlung wirkte sich ebenfalls positiv, jedoch nicht signifikant, auf die Reaktion auf Adulten-Antigen aus. Die Autoren bestätigten damit Befunde von Piessens *et al.* (1981b) bei Menschen. Auch dort hatte sich nach Elimination der Mikrofilarien durch eine Behandlung mit DEC die Proliferationsleistung der Lymphozyten dieser Patienten *in vitro* in

Reaktion auf Filarien-Antigen deutlich gebessert. Keine Veränderung trat bei Stimulation mit unspezifischem Antigen oder bei Patienten ein, die trotz Therapie mikrofilarämisch geblieben waren.

Eines der besten Modelle für die menschliche Infektion mit *W. bancrofti* und *Brugia*-Arten ist die mit *B. pahangi* infizierte Katze. Katzen reagieren individuell unterschiedlich auf die Infektion mit L3 und zeigen in allen Ausprägungsformen der Krankheit Parallelen zum infizierten Menschen (Grenfell *et al.*, 1991).

Eine der wichtigsten Fragen zum Verständnis der Lymphatischen Filariose beim Menschen ist, wie es zum Übergang der asymptomatisch-mikrofilarämischen in die chronisch-amikrofilarämische Form kommt. Maizels und Lawrence (1991) argumentieren, daß Menschen in den endemischen Gebieten tolerant gegenüber den Lymphatischen Filarien sind (s. 2.3.3). Nach der Theorie von Maizels und Lawrence (1991) bricht die Toleranz mit zunehmendem Alter der Patienten immer häufiger zusammen, aufgrund der daraus resultierenden veränderten Immunabwehr kommt es zu Bildung von Antikörpern gegen Mikrofilarien und Adulte und den bekannten pathologischen Erscheinungsbildern der Krankheit. Grenfell *et al.* (1991) beobachteten, daß einmalig infizierte Katzen die Mikrofilarien zwischen den Tagen 110 und 300 p.i. eliminieren, aber nur 20 % von mehrfach infizierten Katzen zum selben Zeitpunkt mikrofilarienfrei waren. Die meisten mehrfach infizierten Katzen konnten die Mikrofilarien erst sehr viel später im Verlauf der Infektion aus dem Blut eliminieren. Diese Katzen zeigten in Folge vorübergehende oder dauerhafte Lymphödeme. Die Autoren vermuten eine Parallele zu der Theorie von Maizels und Lawrence (1991), also einen Zusammenbruch der Toleranz nach längerer Infektionsdauer, verbunden mit pathologischen Veränderungen der Lymphgefäße und Bildung von Antikörpern gegen adulte Stadien und Mikrofilarien.

Interessant ist, daß ein geringer Teil der Katzen in der Lage ist, die Parasitenbürde spontan zu beseitigen. Ponnudurai *et al.* (1974) fanden in diesen Katzen sehr viel höhere Antikörperspiegel gegen adulte Filarien, als in mikrofilarämischen Tieren. Grenfell *et al.* (1991) vermuten nach eigenen ähnlichen Beobachtungen genetische Hintergründe. Könnten die Autoren die These festigen, daß die Empfänglichkeit für die Krankheit sowie der Infektionsverlauf genetisch beeinflußt werden, so wäre dies ein guter Ausgangspunkt für weiterführende Studien beim Menschen. Bei der Erforschung der genetisch determinierten Immunität konnten beim Menschen erst wenige, z.T. kontroverse Ergebnisse erzielt werden (Ottesen, 1981; Maizels *et al.*, 1995).

Katzen zeigen außerdem eine erworbene Immunität nach mehrfacher Infektion, die die Ansiedlung weiterer Larven 3 verhindert (Grenfell *et al.*, 1991). Studien in endemischen Gebieten zeigten ähnliche Reaktionen bei Menschen (Maizels und Lawrence, 1991). Über einen

Zeitraum von mehreren Jahren erwerben die Patienten die sog. „concomitant immunity“, die sie zwar nicht vor der Krankheit schützt, aber das Ansiedeln weiterer Parasiten verhindert. Diese Immunität richtet sich gegen die L3 und findet Ausdruck in der Tatsache, daß bei Kindern und Jugendlichen die Wurmbürden kontinuierlich steigen, Erwachsene aber eine gleichbleibenden Zahl von Parasiten aufweisen.

Grenfell *et al.* (1991) sehen aufgrund der vielen Ähnlichkeiten in der Entwicklung und den Ausprägungsformen der Krankheit bei Menschen und Katzen das Katzenmodell vor allem als Modell für die Dynamik des Infektionsgeschehens der Lymphatischen Filariose des Menschen.

2.5.2 Mäuse als Modell-Wirte

Wie in Kap. 2.5.1 angesprochen, sind die für Filarien voll empfänglichen Wirte immunologisch nur unzureichend charakterisiert. Eine Alternative sind für bestimmte Fragestellungen mit *Brugia*-Arten infizierte Mäuse. Zwar sind immunologisch kompetente Mäuse nicht empfänglich für die Infektion, doch überleben einzelne Stadien nach Implantation für einen begrenzten Zeitraum: Adulte Weibchen und Männchen nach Implantation in die Peritonealhöhle persistieren ca. 90 Tage (Suswillo *et al.*, 1980), Mikrofilarien nach Inokulation in die Peritonealhöhle ca. 28 Tage (Rajasekariah *et al.*, 1988). Nach Injektion in die Blutbahn zirkulieren sie sogar für ca. 65 Tage (Fanning und Kazura, 1983).

Vorteile des Mausmodells sind die gute immunologische Charakterisierung dieser Tiere und das Vorhandensein vieler Mutanten [z. B. severe combined immunodeficiency mice (SCID-Mäusen), athymischer Mäuse und Zytokinmangelmutanten].

Anhand des Maus-Modells fanden Lawrence *et al.* (1994), daß verschiedene Stadien von *B. malayi* nach Implantation sowohl in BALB/c als auch in zwei anderen Mausstämmen unterschiedliche T-Zell-Reaktionen auslösen. So bewirken Mikrofilarien nach Inokulation in die Peritonealhöhle eine starke Th1-Antwort mit Produktion von IFN γ . Milzzellen von Tieren, denen adulte Filarien implantiert worden waren, produzieren dagegen große Mengen IL-4, aber vernachlässigbare Mengen an IFN γ .

Entscheidend für die Art der Immunantwort ist auch die Häufigkeit der Immunisierung.

Einmalige Immunisierung mit Mikrofilarienextrakt (sowohl intraperitoneal als auch subkutan) resultiert in einer Antwort vom Th1-Typ mit ausschließlicher Produktion von IFN γ .

Wiederholte Immunisierung jedoch induziert eine Antwort vom Th2-Typ mit Bildung von IL-4 und IL-5 und bis um das 10-fache erhöhten IgE-Werten (Pearlman, 1993a). Eine andauernde Exposition mit Mikrofilarien führt demnach, nach Überschreiten eines Schwellenwertes, zur

Ausprägung von Th2-Reaktionen. Diese Tiere sind in der Lage, im Gegensatz zu den einfach immunisierten Tieren, die inokulierten Mikrofilarien zu eliminieren (Pearlman, 1993b). Im Gegensatz zu Mikrofilarien stimulieren Adulte und L3 ausschließlich Th2-Reaktionen mit hohen Spiegeln an IL-4 (Lawrance *et al.*, 1994, 1995). Ein signifikanter Unterschied zeigt sich bei der Reaktion auf adulte Weibchen und Männchen. Die Induktion der Th2-Reaktion durch adulte Weibchen ist so stark, daß sie offensichtlich die Th1-Reaktion aufhebt, die auf die von den Weibchen kontinuierlich produzierten Mikrofilarien zu erwarten gewesen wäre. Bei IL-4-Mangelmutanten initiiert die Stimulation mit Weibchen-Antigen (aber nicht mit Männchen- oder L3-Antigen) die Produktion von IFN γ (Lawrance *et al.*, 1995). Rekombinantes IL-12, das entweder vor oder nach der Immunisierung mit Mikrofilarien gegeben wurde, reduziert die Th2-Reaktion und regt gleichzeitig die Produktion von IFN γ an (Pearlman *et al.*, 1995). Zudem resultierte eine Behandlung mit Antikörpern gegen IL-10 in Zellen von mit Mikrofilarien immunisierten Tieren die in *vitro*-Produktion von IFN γ (Pearlman *et al.*, 1993a). Allerdings konnten Lawrence *et al.* (1996) in einem ähnlichen Modell keine Produktion von IL-10 nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen klar, daß verschiedene Stadien von *B. malayi* verschiedene Immunantworten hervorrufen. Die teilweise gegensätzlichen Ergebnisse unterschiedlicher Autoren zeigen aber auch deutlich, daß die Mechanismen der Regulation noch weitgehend unverstanden sind und häufig keine klare Trennung der Reaktion nach Th1 und Th2 vollzogen werden kann.

Eine auf völlig anderen immunologischen Grundlagen basierende Theorie wurde erstmals von Babu *et al.* (1998) aufgestellt. Bei Versuchen mit verschiedenen Knock-out-Mäusen beobachteten sie, daß Tiere ohne natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gegenüber Infektionen mit *B. malayi* deutlich weniger empfänglich sind. Zudem verringert die Blockade von NK-Zellen in NK-kompetenten Mäusen die Wurmbürde, die Substituierung mit NK-Zellen in der NK-Mangelmutante (NOD/LtSz-scid/scid) läßt sie ansteigen (Rajan *et al.*, 1999; Babu *et al.*, 1999). Aus diesen Befunden formulieren die Autoren zwei Theorien:

- 1) NK-Zellen haben hemmenden Einfluß auf eine (unbekannte) Komponente des Immunsystems, die natürlicherweise für die Elimination der Parasiten verantwortlich ist.
- 2) NK-Zellen sezernieren einen oder mehrere Nähr- oder Botenstoffe, die die Parasiten zum Überleben bzw für ihre Entwicklung benötigen.

Sie stützen diese zweite Theorie auf die Tatsache, daß Filarien auch in Fehlwirten, wie z. B. der Maus, in den lymphatischen Geweben anzutreffen sind. Vermutlich sind bestimmte Stoffe, die von lymphoiden Zellen sezerniert werden, für die Entwicklung der Parasiten von Bedeutung.

Zudem gibt es eine weitere Zellpopulation, CD4+TCR β +Zellen, die die Entwicklung früher Larvenstadien von *B. malayi* in TCR $\alpha\beta$ -Knock-out Mäusen fördert (Babu *et al.*, 1999). Wahrscheinlich handelt es sich bei der entwicklungsfördernden Substanz um dieselbe, die die NK-Zellen in SCID-Mäusen abgeben. Babu *et al.* (1999) vermuten ein Zytokin. Im Verlauf der beschriebenen Untersuchungsreihen fanden Rajan *et al.* (1999), daß die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen an Mäusen meist auf Grundlage des Mausstammes (126XC57BL/6J) F₂ basierten. In diesem Stamm ist die Wurmbürde zwei Wochen nach der Infektion sehr niedrig, eine Beobachtung, die auch Lawrence *et al.* (1995) machten. Dies ist jedoch der Zeitrahmen vor dem Aktivwerden adaptiver Immunität. Die Autoren vermuten deshalb, daß die beobachteten Effekte an diesem Modell nicht die Vorgänge der adaptiven Immunität beschreiben, sondern die geringe Permissivität dieses Mausmodells für *B. malayi* ausdrücken.

2.5.3 *Mastomys coucha* als Modell-Wirt für *B. malayi*

Vielzitzenmäuse der Gattung *Mastomys* finden als Versuchstiere weltweit Verwendung. Ursprünglich aus Südafrika stammend, gliedert sich die Gattung *Mastomys* in drei Arten: *M. erythroleuceus* (Petter, 1957), *M. coucha* und *M. natalensis* (Green *et al.*, 1978). Eine in der experimentellen Filarienforschung häufig verwandte Art ist *M. coucha*, mit dem Stamm Gießen „GRA“ (Zahner *et al.*, 1980; Sänger *et al.*, 1981; Mistry und Subrahmanyam, 1985; 1986). Sänger *et al.* (1981) zeigten, daß *M. coucha* für zahlreiche Filarienarten (*L. sigmodontis*, *B. malayi*, *B. pahangi* und *Dipetalonema vitae*) voll empfänglich ist. In Abb. 2.3 ist der Entwicklungszyklus von *B. malayi* dargestellt. Nach der Infektion mit L3 befindet sich ab Tag 8 p. i. im Wirt die L4, ab Tag 35 p. i. sind die letzten Häutungen der Parasiten abgeschlossen, sie haben das Stadium der Pradulten erreicht. Ab Tag 90 p. i. beginnt die Patenz (Ash und Riley, 1970). Im Gegensatz zu Infektionen in Wistarratten (Mistry und Subrahmanyam, 1985) fallen die Mikrofilarienspiegel in *M. coucha* nicht nach einer gewissen Zeit ab; es gibt daher keine Periode der Postpatenz im eigentlichen Sinn.

Die Mikrofilariendichte der Lymphatischen Filarien im peripheren Blut ist tageszeitlichen Schwankungen ausgesetzt (Scott 1999). Einzelne Stämme, sowohl von *W. bancrofti* als auch von *B. malayi*, weisen in verschiedenen endemischen Gebieten unterschiedliche Periodizitäten auf, wobei es streng periodische aber auch subperiodische Stämme gibt (Scott, 1999).

Laborstämme von *B. malayi* sind meist subperiodisch (Petranyi *et al.*, 1975; Zahner *et al.*, 1987), wobei die Parasitamien tagsüber zwischen 8 Uhr und 12 Uhr am höchsten liegen (Reddy *et al.*, 1984).

Erste immunologische Studien am Modell *M. coucha*/*B. malayi* wurden von Zahner *et al.* (1987) vorgenommen. Mit Hilfe des „passive cutaneous anaphylaxis“ (PCA) Tests untersuchten die Autoren die Antwort homozytrophes IgGs von *M. coucha* nach Infektion mit verschiedenen Filarien, u.a. auch *B. malayi*. Dabei zeigten sich für die Infektion mit *B. malayi* sechs Wochen nach der Infektion Gipfelwerte. Danach sanken die Spiegel ab bis am Tag 110 p.i. kein homozytrophes IgG mehr nachzuweisen war.

Eine gute Grundlage für Arbeiten mit *M. coucha* bieten weiterhin zahlreiche Studien, die mit *Litomosoides sigmodontis*-infizierten *M. coucha* vorgenommen wurden. In diesen Arbeiten wurden Erkenntnisse zur T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit *L. sigmodontis*-Antigenen (Mistry und Subrahmanyam, 1985, 1986; Schönfeld, 1998) und zu humoralen Immunreaktionen im Verlauf der Infektion gewonnen werden (Schaes, 1992; Zahner und Schaes, 1993).

Es konnten jedoch keine weiterführenden immunologischen Studien, z.B. zur Zytokin-expression im Verlauf der Infektion, durchgeführt werden, da keine Reagenzien für *M. coucha* zur Verfügung standen.

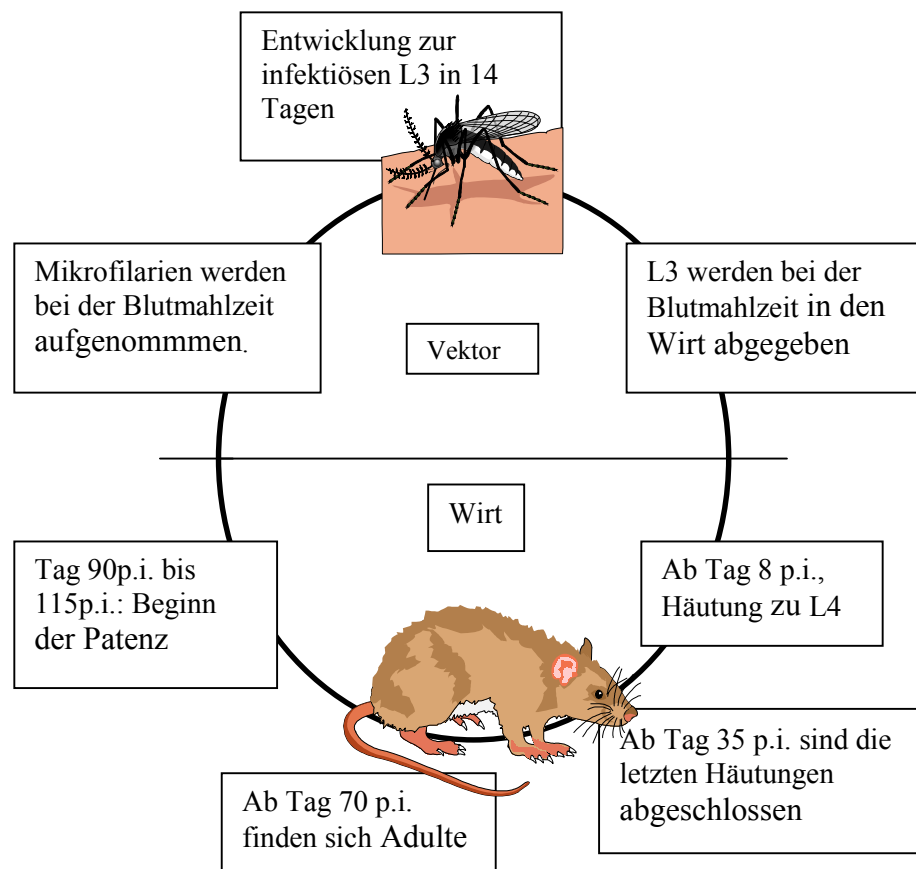


Abb. 2.3 Entwicklungszyklus von *B. malayi* in *M. coucha*

2.6 Therapie der Lymphatischen Filariosen

2.6.1 Chemotherapie bei Menschen

1993 setzte die „International Task Force for Disease Eradication“ die Lymphatischen Filariosen auf die Liste der Krankheiten, die prinzipiell mit bereits vorhandenen Medikamenten und Kontrollmechanismen ausgerottet werden können (CDC, 1993). Nach Ottesen (1999) wären hierfür zwei Ansätze denkbar: Die Bekämpfung des Vektors oder die Minimierung der Mikrofilariämie im peripheren Blut des Wirtes. Da die Ausrottung des Vektors teuer, umweltschädlich und wenig erfolgversprechend ist, konzentrieren sich derzeit die Bemühungen auf die Behandlung der Mikrofilariämie im Endwirt. Hoffnungen, daß diese Strategie Erfolg hat, stützen sich unter anderem auf die Tatsache, daß 91 % der Lymphatischen Filariosen von *W. bancrofti* hervorgerufen werden, für die der Mensch der alleinige Endwirt ist. Im Gegensatz dazu haben *B. malayi* und *B. timori* ein natürliches Reservoir in Primaten und Katzen (Ottesen, 1999).

Seit Diethylcarbamazin (DEC) 1947 von Santiago-Stevenson *et al.* erstmals erfolgreich zur Therapie von *W. bancrofti*-Infektionen eingesetzt worden war, galt es lange als die einzige wirksame Substanz zur Bekämpfung der Lymphatischen Filariosen. Nach der Applikation kommt es zur Elimination der Mikrofilarien innerhalb von 12 Stunden (Shenoy *et al.*, 1993). Die Autoren fanden heraus, daß der mikrofilarizide Effekt von DEC verstärkt werden konnte, wenn die therapeutische Dosis auf zwei Gaben im Abstand von 4 Tagen aufgeteilt wurde. 12 h nach der zweiten Behandlung war eine Reduktion der Mikrofilarien im peripheren Blut der Patienten um 98 % zu verzeichnen. Das Medikament bewirkt eine langanhaltende Reduktion der Mikrofilarienspiegel, so daß auch ein Jahr nach der Behandlung die Parasitenbürde noch um 90 % gegenüber den Ausgangswerten verringert ist (Shenoy *et al.*, 1993; Ottesen, 1999).

W. bancrofti- und *B. malayi*-infizierte Personen, die mit DEC behandelt werden, zeigen häufig unerwünschte Nebenwirkungen, vor allem Fieber, Myalgie, Kopfschmerzen, Husten und gastro-intestinale Beschwerden (Shenoy *et al.*, 1993). Die Nebenwirkungen sind positiv korreliert zu der Mikrofilariendichte bei Therapiebeginn und fallen bei Patienten mit *B. malayi*-Infektionen stärker aus als bei *W. bancrofti*-Infizierten (WHO, 1984). Die Nebenwirkungen führten u.a. in Indien dazu, daß Behandlungen verweigert wurden, so daß 1984 die Zahl der gefährdeten Menschen auf über 300 Millionen angewachsen war (Shenoy *et al.*, 1993).

Bereits 1969 beschrieb Oomen 7 Todesfälle bei Onchozerkosepatienten als Folge einer Behandlung mit DEC. Die Patienten waren nach DEC-Gabe in ein irreversibles Koma verfallen und kurz danach verstorben. Es bestand daher ein verstärkter Druck, ein Medikament zu finden, daß bei gleicher Effektivität weniger Nebewirkungen verursachte und in Gebieten eingesetzt

werden kann, in denen auch Onchozerkose endemisch ist. Ein solches Medikament ist Ivermectin, ein makrozyklisches Lakton.

Shenoy *et al.* (1993) zeigten, daß Mikrofilariendichten im peripheren Blut der Patienten bereits 12 Stunden nach der Verabreichung von Ivermectin deutlich gesunken waren. In einem direkten Vergleich mit DEC beobachteten sie, daß die initiale Reduktion nach der Gabe von DEC zwar stärker war, vier Tage nach der Behandlung die Mikrofilarienwerte der mit Ivermectin behandelten Patienten aber unter denen der DEC-Vergleichsgruppe lagen. Ein Jahr nach Behandlung waren die Mikrofilarienwerte der mit DEC behandelten Gruppe niedriger als die der mit Ivermectin behandelten Gruppe, d.h. der Langzeiteffekt von Ivermectin ist schwächer als der von DEC (Shenoy, *et al.*, 1993; Addis *et al.*, 1993).

1997 zeigten Cao *et al.*, daß eine Kombination aus den Medikamenten DEC und Ivermectin die mikrofilarizide Wirkung noch einmal um bis zu 9 % steigert, damit also Reduktionsraten von 98-99 % gegenüber den Ausgangswerten erreicht werden können. Diese Kombination konnte aber in den Regionen, in denen *O. volvulus* endemisch ist, nicht verwendet werden.

Albendazol, ein Benzimidazol, wurde erstmals von Addis *et al.* (1997) und Ismail *et al.* (1998) in Kombination sowohl mit Ivermectin als auch mit DEC eingesetzt. Alle drei Kombinationsmöglichkeiten ergaben eine nahezu 100 %ige Reduktion der Mikrofilarienspiegel gegenüber den Ausgangswerten. Die Therapie der Lymphatischen Filariose setzt sich demnach heute aus einer Kombination von entweder DEC und Ivermectin oder Albendazol und Ivermectin (Verabreichung einmal jährlich) zusammen. Ottesen (1999) ist überzeugt, daß die Lymphatischen Filariosen auf diese Weise eliminiert werden können. Alternativ zu der jährlichen Medikation wird vor allem in China und Indien mit DEC versetztes Kochsalz zur langfristigen Reduktion der Mikrofilarienburden eingesetzt (Gelband, 1994)

2.6.2 Therapiestudien an Modellwirten

1993 beschrieben Zahner und Schares die Wirkung verschiedener Gruppen filarizider Substanzen in *M. coucha*, die mit unterschiedlichen Filarienarten (*L. carinii*, *A. viteae*, *B. malayi* und *B. pahangi*) infiziert waren. Sie verglichen dabei vorwiegend mikrofilarizide Substanzen wie DEC, Levamisol, Ivermectin, Nitrofurane, Organophosphate und Aminophenylamide, vorwiegend makrofilarizide Substanzen wie Suramin, Benzimidazole und Arsenverbindungen und sowohl mikro- als auch makrofilarizide Substanzen wie Benzazole und Nitrodiphenylamine. Aus der Klasse der Benzimidazole ist nach diesen und anderen Studien Flubendazol die Substanz mit der stärksten Wirkung gegen adulte Filarien (Denham *et al.*, 1978, 1979, 1980, 1981; Surin und Denham 1990; Zahner und Schares, 1993). Der

makrofilarizide Effekt von Flubendazol tritt abhängig von Art und Geschlecht der Filarien dosisabhängig ein (Zahner und Schares, 1993). 100 %ige Reduktion gegenüber den nicht behandelten Tieren konnte bei *L. carinii*, *A. viteae* und *B. malayi* erreicht werden, wohingegen bei *B. pahangi* nur eine 97 %ige Reduktion möglich war.

Aus der Gruppe der Benzazole galt vor allem CGP 20376, ein 6-dithiocarbamic-S-(2-carboxylethyl)-Ester, lange Zeit als vielversprechendes Medikament für die Behandlung der lymphatischen Filariosen (Zahner und Schares 1993). CGP 20376 erwies sich allerdings als toxisch für den Menschen.

CGP 20376 hat mikro- und makrofilarizide Wirkung (Zahner und Schares, 1993). Werden die Versuchstiere mit einer Medikamentendosis behandelt, die die Anzahl der adulten Stadien deutlich reduziert aber nicht vollständig eliminiert, so ist drei Tage nach dieser Behandlung auch die Elimination der Mikrofilarien nur unvollständig. Der Wiederanstieg der Mikrofilarienwerte geht sehr langsam vor sich, die Mikrofilariendichten, die vor der Behandlung ermittelt wurden, werden im allgemeinen nicht wieder erreicht.

Die mikrofilarizide Wirkung von CGP 20376 setzt, verglichen mit z.B. DEC, relativ langsam ein. Zahner und Schares (1993) zeigten in einem direkten Vergleich der beiden Medikamente, daß bereits innerhalb der ersten Stunde nach der Gabe von DEC eine Reduktion der Mikrofilarien um 90-95 % eintritt. Nach der Behandlung mit CGP 20376 beginnt dagegen die Reduktion der Mikrofilarien erst vier Stunden nach der Behandlung, eine vollständige Elimination ist nach 24 Stunden erreicht. Die langsame Reduktion der Mikrofilarien hat den Vorteil, daß pharmakologisch aktive Stoffe von abgestorbenen/ sterbenden Mikrofilarien protrahiert in den Wirtsorganismus abgegeben werden und es damit nicht, wie nach Gabe von DEC, bei der große Mengen dieser Stoffe in sehr kurzer Zeit frei werden, zu Schock-ähnlichen Zuständen kommt, die tödlich verlaufen können (Zahner und Müller, 1989). Zahner (1995) zeigte in einer Studie, daß die Überlebensrate behandelter Tiere negativ zu der Mikrofilariendichte bei Behandlung und der Geschwindigkeit der Elimination korreliert war. Im Vergleich mit anderen 5-Methoxybenzothiazolen besitzt CGP 20376 die stärkste adultizide Wirkung (vergl. Zahner und Schares, 1993). Dabei war auffällig, daß verschiedene Filarienarten unterschiedlich sensitiv auf die Behandlung reagierten. *A. viteae* erwies sich, verglichen mit *Brugia spp.* und *L. carinii*, als bis zu vier Mal resistenter.

Die Gruppe der Benzazole (zu der auch CGP 20376 gehört) ist darüberhinaus auch wirksam gegen die Entwicklungsstadien der Parasiten (L3 und Präadulte) (Zahner *et al.*, 1990). Die Gruppe dieser Medikamente könnte damit somit sowohl einen Schutz vor Neuinfektionen bieten, als auch vorhandene Infektionen behandeln und das Übertragungsrisiko durch die Reduktion der Mikrofilarien vermindern.

Ein weiteres im Test befindliches Medikament ist Bay-44-4400, das sowohl mikroflarizid wirkt als auch durch Störung der Embryogenese eine anhaltende Reduktion der Parasitämie hervorruft (Zahner *et al.*, 2001a, 2001b). Der adultizide Effekt dieses Medikamentes ist jedoch auf *A. viteae* beschränkt, adulte Filarien der Arten *L. sigmodontis* und *B. malayi* konnten nur in erhöhten Dosen, bzw. gar nicht abgetötet werden (Zahner *et al.*, 2001b). Damit ist dieses die einzige bekannte Substanz, die bei *B. malayi* eine ausschließlich mikroflarizide Wirkung hat.

2.6.3 Einfluß einer filariziden Behandlung auf Immunreaktionen des Wirtes

Verschiedene Studien belegen, daß eine Beziehung zwischen Mikrofilarien im Blut der Patienten und Hyporesponsivität der T-Zellen eines Patienten gegenüber Filarien-Antigen besteht (Ottesen *et al.*, 1977; Piessens *et al.*, 1979, 1980b). Nach der Behandlung mit DEC verstärkt sich die T-Zell-Aktivität von Patienten, deren Zellen zuvor nicht auf Filarien-Antigen reagierte hatten (Piessens *et al.*, 1981b; Lammie *et al.*, 1988; Sartono *et al.*, 1995b). Piessens *et al.* (1981b) führen dies auf ein Absinken der mikrofilarien-assoziierten Antigenpiegel zurück, die spezifische Suppressorzellen aktivieren. Sie hypothetisieren, daß in erfolgreich behandelten Patienten entweder die Zahl oder der Grad der Aktivierung von Suppressor-Zellen zurückgegangen war. Mistry und Subrahmanyam (1986) bestätigten die Befunde von Piessens *et al.* (1981b) im Modell *M. coucha*/*L. carinii*. Sie gehen davon aus, daß exkretorisch-sekretorische Produkte der Parasiten für die Hyporesponsivität der T-Zellen verantwortlich sind, welche nach dem Tod der Parasiten nicht mehr gebildet werden. Zusätzlich beobachteten Tygai *et al.* (1986) in mit *B. malayi*-infizierten *M. coucha* nach DEC-Behandlung eine Verringerung der Filarien-induzierten Makrophagen-Migrations-Hemmung. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in infizierten Tieren die Synthese des Makrophagen-Migrations-Faktors (MIF) vermindert ist. Nach Behandlung mit DEC normalisiert sich die Makrophagen-Migration. Daraus geht hervor, daß nicht nur die T-Zell-Proliferation durch Mikrofilarien gehemmt wird, sondern auch die Makrophagen-Migration.

Mit verstärkter Proliferation der T-Zellen nach mikroflarizider Therapie geht ein Anstieg spezifischer Zytokine einher (Limaye *et al.*, 1993; Sartono *et al.*; 1995a). Limaye *et al.* (1993) beobachteten nach Behandlung mit DEC einen starken Anstieg der IL-5-Spiegel im Blut der Patienten, wobei ein Maximalwert durchschnittlich nach zwei Tagen erreicht wurde. Die Autoren vermuten, daß nach der Therapie mit DEC die spezifische parasiteninduzierte Anergie der T-Zellen (vergl. auch King *et al.*, 1992) aufgehoben wird, und es zur Produktion von IL-5 kommt. Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigten Sartono *et al.* (1995a), daß nach der Behandlung vor allem die IFN γ -Produktion der T-Zellen anstieg, wobei die IL-4-Produktion

dieser Zellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen unbeeinflusst blieb. Sie postulieren, daß eine DEC-Therapie vor allem die Reaktivität der Th1-Zellen (vergl. auch Nutman, 1989; King *et al.*, 1993; Maizels *et al.*, 1993) wieder herstellt.

Therapiestudien mit Ivermectin werden vor allem an *O. volvulus*-Patienten vorgenommen, da DEC bei dieser Patientengruppe kontraindiziert ist. Vergleichbar mit *Brugia*- und *W. bancrofti*-Infektionen ist die in vitro-Reaktion der T-Zellen bezüglich Proliferation und Produktion von IL-2 und IFN γ nach Stimulation mit *O. volvulus*-Antigen vermindert (Freedman *et al.* 1991). In vivo äußert sich die Hyporesponsivität der T-Zellen dadurch, daß nach s.c. Injektion von *O. volvulus*-Antigen eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH-Reaktion) sehr schwach ausfällt (Ngu, 1978). Nach Therapie mit Ivermectin verstärkt sich die Aktivität der T-Zellen in Reaktion auf Filarien-Antigen und Mitogen (Freedman *et al.*, 1991; Soboslay *et al.*, 1992). Freedman *et al.* (1991) und Soboslay *et al.* (1992) beobachteten einen Anstieg sowohl der IL-2- als auch der IL-4-Expression nach Therapie. Freedman *et al.* (1991) gehen davon aus, daß die ebenfalls signifikant erhöhten CD4+HLA-DR+-Zellen für den starken Anstieg der IL-2-Produktion verantwortlich sind. Soboslay *et al.* (1992) verzeichneten eine Verdoppelung der CD4+-Zellen innerhalb eines Monats nach der Therapie und vermuten, daß die Hyporesponsivität der PBL bei infizierten Patienten u. a. durch die geringe Zahl der zirkulierenden CD4+-Zellen verursacht wird. Nach der Theorie von Soboslay *et al.* (1992) führt die Therapie dazu, daß verstärkt IL-1 β und TNF α produziert werden, wodurch T-Zellen zur Produktion von IL-2 und IL-4 angeregt werden. Diese Studien stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von Sartono *et al.* (1995a), die nach Therapie keinen Einfluß auf die Th2-Reaktionen und damit die IL-4-Produktionen beobachten konnten. Soboslay *et al.* (1992) sehen jedoch ebenfalls auf grund eines erhöhten IL-4/IFN γ -Verhältnisses eher Anzeichen für eine verstärkte Th2-Reaktion als Folge der Therapie. Steel *et al.* (1994) beobachteten im Gegensatz zu Limaye *et al.* (1993), daß PBL infizierter Personen vor der Therapie in Reaktion auf *O. volvulus*-Antigen IL-5 produzieren. Dagegen war die Produktion von IL-10 und TNF α inhibiert. Nach der Therapie kam es vorübergehend zu einer verstärkten Produktion von IL-2, IL-4, IL-5 und IFN γ in Reaktion auf T-Zell-Mitogen und zu einem Anstieg der Produktion von IL-10 und granulocyte-macrophage-stimulating-factor (GM-CSF) in Reaktion auf *O. volvulus*-Antigen.

2.7 Die Technik der semi-quantitativen PCR

1984 entwickelte Kary B. Mullis eine Technik, um geringe Mengen DNA zu vervielfältigen und damit nachweisen zu können. Seitdem hat sich die Technik der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR) rapide weiterentwickelt und ist zu einem Standardverfahren mit breit gefächerten Anwendungsgebieten geworden. Bei dieser Technik werden zunächst die Bindungen von DNA-Doppelsträngen durch Erhitzen gespalten. Im nächsten Schritt lagern sich kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, sog. Primer, an die jeweils komplementären Regionen der gespaltenen DNA-Stränge an. Die Sequenzen der Primer werden vor der Reaktion bestimmt und synthetisiert, so daß nur gesuchte Bereiche der Ausgangs-DNA erfaßt werden. Nach der Anlagerung an das zu ihnen komplementäre DNA-Stück bilden diese Primer den Startbereich für eine hitzestabile Polymerase, die den durch die Anlagerung der Primer begonnenen DNA-Doppelstrang weiter verlängert. Somit verdoppelt sich die Anzahl der gesuchten Moleküle. Theoretisch ist daher jede PCR-Reaktion ein exponentielles Geschehen, bei dem in jedem Zyklus ein Amplifikat Ausgangspunkt für ein weiteres ist. Dies läßt sich mit der Formel $N=N_0 2^n$ beschreiben, wobei N die Anzahl der amplifizierten Moleküle, N_0 die Ausgangsmolekülzahl und n die Anzahl der Amplifikationszyklen ist. Die Effektivität der Amplifikation ist jedoch in der Praxis nicht hundert-prozentig. Daher beschreibt die Formel $N=N_0 (1+E)^n$ die Menge der bei der PCR tatsächlich erhaltenen Moleküle, wobei E für die Effektivität der PCR steht. Unter idealen Bedingungen würde demnach die Menge der erhaltenen Ziel-DNA exponentiell ansteigen. In der praktischen Anwendung zeigt sich aber der sog. Plateau-effekt, der nach einer bestimmten (für jede Sequenz und jedes Primerpaar individuellen) Zykluszahl eintritt. Von diesem Zeitpunkt an stagniert die Vermehrung des Amplifikats. Dieses Phänomen hat mehrere Ursachen: das Produkt akkumuliert, das Polymerase-Template-Verhältnis sinkt ab, steigende Mengen von z. B. Pyrophosphaten im Reaktionsgemisch inhibieren die Polymerase oder notwendige Reaktionskomponenten verbrauchen sich. Auch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz, die Sequenz der Primer oder der Reinheitsgrad der Probe beeinflussen die Effektivität der PCR. Kommt es bei zu langen oder fehlerhaft ausgewählten Primern zur Bildung von Sekundärstrukturen, so kann dies die Primerbindung an die DNA-Vorlage beeinflussen, Unreinheiten können die Polymerase inhibieren, um Primerbindungsstellen konkurrieren, Konformationsänderungen in der Ziel-DNA bewirken und vieles mehr.

Um eine quantitative Aussage treffen zu können muß daher sichergestellt sein, daß die Amplifikatmenge nicht in der Plateauphase, sondern im Bereich der exponentiellen Vermehrung ermittelt wird. Daher ist es notwendig, die idealen Zykluszahlen für jedes

Primerpaar zu bestimmen. Trotzdem kommt es oft zu Unterschieden zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen, so daß die Menge an amplifizierten Sequenzen bei gleicher Zykluszahl und gleichen Ausgangsbedingungen variiert. Die Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, sind zum großen Teil noch unbekannt (Gilliland, *et al.*, 1990; Kellogg *et al.*, 1990). Daher ist es bei der (semi)-quantitativen PCR unumgänglich, Methoden einzusetzen, die diese Variationen ausgleichen und es erlauben, die Menge der Zielsequenz zu bestimmen. Die am häufigsten verwendete Methode ist der Einsatz von internen Standards; daneben kommen exogene Standards und Verfahren ohne Standards zum Einsatz:

2.7.1 Quantifizierung ohne den Einsatz von Standards

Diese Methoden können nur angewendet werden, wenn die Effektivität der zu quantifizierenden Reaktionen sehr hoch ist und die Unterschiede zwischen einzelnen Reaktionsgefäßen gering sind. Wenn dies gilt, steht der Logarithmus der Menge der Ausgangssequenz zu dem Logarithmus der Menge des Amplifikates in einer linearen Beziehung.

2.7.1.1 Titrationsanalysen

Ausgehend von einer linearen Beziehung zwischen der Anzahl der Ausgangsmoleküle und den Amplifikaten werden die Proben titriert und die Titrationsergebnisse in einen logarithmischen Graphen eingetragen. Von einem beliebigen Ausgangswert auf der X-Achse kann dann die Menge des Amplifikates auf der Y-Achse abgelesen werden. Vergleicht man zwei Proben, so geben die unterschiedlichen Steigungen der Kurven Auskunft über die Ausgangsmengen des fraglichen mRNA-Äquivalents (Singer-Sam, *et al.*, 1990).

2.7.1.2 Kinetische Analysen

Bei dieser Methode wird für zwei unterschiedliche Proben nach mehreren aufeinander folgenden Zyklen die Amplifikatmenge bestimmt. Diese Werte werden als Logarithmus der Amplifikatmenge gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Als Messpunkt wird ein Punkt auf dem Graphen ausgewählt, an dem die beiden Kurven parallel zueinander verlaufen, da hier davon ausgegangen werden kann, daß die Effektivität für die Amplifikation der einzelnen Proben gleich ist. An dieser Stelle sind die extrapolierten Werte für den Logarithmus der Amplifikatwerte direkt proportional dem Logarithmus der Ausgangsmenge an cDNA oder mRNA. Der Unterschied in den Amplifikatwerten der einzelnen Proben ist damit proportional zu den Ausgangsmengen. Mit dieser Methode können allerdings nur die relativen Unterschiede

zweier Proben zueinander gemessen werden - eine absolute Quantifizierung ist nicht möglich (Salomon *et al.*, 1992; Dallman *et al.*, 1991).

2.7.2 Quantifizierung mit Hilfe interner Standards

2.7.2.1 Endogene Sequenzen als interne Standards

Als endogene interne Standards eignen sich Gene, die unabhängig vom Stimulationsstatus der Zelle in konstanten Mengen transkribiert werden, sog. „Housekeeping-Gene“ oder Gene, die mit der Proben-mRNA strukturell oder funktionell verwandt sind (Sivitz *et al.*, 1991). Weiterhin kommen endogene single-copy-Gen-Sequenzen (Chamberlain *et al.*, 1988; Kellogg *et al.*, 1990; Neubauer *et al.*, 1991) sowie ribosomale RNA (Khan *et al.*, 1992) in Frage. Die endogenen Standards können entweder in demselben Reaktionsansatz oder in einer getrennten Reaktion amplifiziert werden. Über die Bildung des Verhältnisses vom gesuchten Amplifikat zum Amplifikat des endogenen Standards kann dann indirekt auf die Menge des gesuchten Moleküls in der Ausgangsprobe geschlossen werden. Einer der größten Vorteile dieser Methode ist, daß die Proben meist gemeinsam bearbeitet werden können (z. B. bei der m-RNA-Gewinnung und der reversen Transkription), so daß in der Folge Standard und Probe in der Regel nur gering variieren. Die Methode basiert auf der Annahme, daß das Gen des endogenen Standards in den Ausgangsgeweben gleichmäßig transkribiert wird und dies auch durch eventuelle Einflüsse der Experimente nicht verändert wird. Hierin liegt gleichzeitig der Nachteil der endogenen internen Standards: Nur wenige Gene werden tatsächlich so gleichförmig transkribiert, daß sie für diese Methode zu gebrauchen sind (Elder *et al.*, 1988; Prendergast *et al.*, 1992). Zudem müssen auch hier die Amplifikatmengen vor Erreichen der Plateauphase gemessen werden. Setzt man z. B. β -Actin oder β_2 -Mikroglobulin als endogenen Standard ein, so ist deren Ausgangsmenge an mRNA möglicherweise viel größer als die der zu messenden mRNA, so daß die Plateauphase bereits erreicht wird, bevor die eigentlich gesuchten Amplifikate detektierbar sind (Murphy *et al.*, 1990). Dieser Problematik kann jedoch durch zeitlich verzögerte Zugabe der Standard-Primer oder durch getrennte Reaktionsansätze entgangen werden (Kinoshita *et al.*, 1992). Werden keine getrennten Reaktionsansätze verwendet, können die unterschiedlichen Primerpaare in einer Reaktion miteinander interagieren und somit das Ergebnis verfälschen. So beobachteten Murphy *et al.* (1990), daß nach Zugabe von Standard- und Probenprimern in einem Reaktionsansatz die Mengen eines oder beider Amplifikate abnahmen.

2.7.2.2 Exogene Sequenzen als interne Standards

Exogene Standards sind entweder synthetische RNA-Moleküle, die bereits vor der reversen Transkription zur Probe gegeben werden, oder cDNA-Moleküle, die entsprechend vor der PCR zugefügt werden. Die eigentliche Amplifikation erfolgt dann in demselben Reaktionsgefäß. Da bei dieser Methode die Ausgangsmenge an Standard-mRNA bekannt ist, kann sie dazu verwendet werden, die absolute Menge der amplifizierten, gesuchten cDNA-Moleküle zu ermitteln. Hier liegt der Vorteil dieses Verfahrens (Wang *et al.*, 1989). Voraussetzung ist jedoch, daß die Effektivität der PCR für Standard- und Ziel-cDNA gleich ist. Dies ist möglich, wenn Standard und Zielsequenz identische Primerbindungsstellen besitzen. Eine Differenzierung der Standard- und Ziel-Amplifikate kann z.B. dadurch ermöglicht werden, daß in den Standard ein zusätzliches Sequenzstück integriert wird, so daß sich die Produkte in der Größe voneinander unterscheiden - und über Gelelektrophorese trennen lassen. Darüber hinaus ermöglichen verschiedene Enzymschnittstellen die Unterscheidung ebenso wie unterschiedliche Sequenzabschnitte zwischen den Primern, die eine Hybridisierung ermöglichen (Becker-André und Hahlbrock, 1989; Gilliland *et al.*, 1990; Ballagi-Pordány *et al.*, 1991).

2.7.3 Kompetitive PCR

Die Methode der kompetitiven PCR verwendet ebenfalls exogene interne Standards. Bei dieser Art der Quantifizierung konkurrieren Standard- und Ziel-Sequenz um dieselben Primerpaare. Bei der kompetitiven PCR wird eine Verdünnungsreihe von entweder der Standard- oder der Ziel-Sequenz angefertigt und eine konstante Menge der jeweils anderen Komponente zu jeder Reaktion dazugegeben. Die Quantifikation wird erst dann vorgenommen, wenn die kompetitiven Amplifikationen aller Verdünnungsstufen abgeschlossen sind. Die beiden Amplifikationsprodukte werden dabei anhand von z. B. Größenunterschieden oder Enzymschnittstellen unterschieden. Anhand der Bandenstärken kann auf die Menge Ziel-Sequenz geschlossen werden.

Da das Verhältnis von Standard- zu Ziel-Sequenz im Verlauf der Reaktion gleich bleibt, ist es nicht unbedingt notwendig, die Quantifikation vor Erreichen der Plateauphase vorzunehmen.

2.8. Markierung und Quantifizierung der PCR-Produkte

Um eine Quantifizierung von PCR-Produkten zu ermöglichen, müssen diese auf direktem Wege „sichtbar“ gemacht werden. Bei indirekten Verfahren werden z.B. Antikörper verwendet, die ihre Antigene an zuvor markierten Proben erkennen (Mazza *et al.*, 1991; Lüneberg *et al.*, 1993;

Wages *et al.*, 1993). Bei direkten Verfahren werden die Amplifikate selbst über die Verwendung markierter Nukleotide (Robinson und Simon, 1991; Duplaa *et al.*, 1993) oder Primer (Lüneberg *et al.*, 1993; van der Vliet *et al.*, 1993; Wages *et al.*, 1993) einer Quantifizierung zugänglich gemacht.

Neue Techniken streben zunehmend die Markierung und Erfassung der Amplifikate während des PCR-Laufes an, da die Daten somit auf jeden Fall direkt in der exponentiellen Phase der PCR, z. B. über Fluoreszenzmessung erhoben werden können (real time PCR). Dies erspart zum einen teilweise die aufwendige Etablierung (vergl. Kap. 2.7) der Systeme, zum anderen die arbeitsintensive quantitative Erfassung der Amplifikate über Gele etc.

Eine elegante Methode ist der Einsatz der sog. molecular beacons (Tyagi *et al.*, 1996), die eine Quantifizierung sowohl am Ende der Reaktion (endpoint-analysis), als auch während der Reaktion (realtime analysis) erlaubt. Das Prinzip beruht auf dem Einsatz von kurzen Oligonukleotiden, die zu einem Stück des zu amplifizierenden Produktes komplementär sind. Sie tragen an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff, am anderen Ende einen Quencher desselben. In nicht gebundener Form liegt der "beacon" in einer gekrümmten Struktur vor, so daß Farb- und Hemmstoff so nah beieinander liegen, daß kein Signal entsteht. Bindet der "beacon" im Verlauf der PCR-Reaktion an die entsprechende Sequenz, streckt er sich und die Hemmung wird aufgehoben. Der Nachweis erfolgt dann mit einem Fluoreszenzmessgerät. Werden verschiedene Fluoreszenzmarker eingesetzt, so können gleichzeitig mehrere Parameter untersucht werden (Marras *et al.*, 1999).

Für die Markierung der Amplifikate stehen weiterhin radioaktive und nicht radioaktive Systeme zur Verfügung. Die Amplifikate lassen sich z.B. mit Hilfe radioaktiv markierter Nukleotide bereits während des PCR-Laufes markieren (Kellogg *et al.*, 1990). Allerdings erschwert die relativ große Zahl ungebundener Nukleotide die Quantifizierung. Besser ist deshalb die Verwendung von radioaktiv markierten Primern oder Sonden. Die Quantifizierung erfolgt dann z. B. nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben durch densitometrische Messung der Blotbande nach Belichten eines Röntgenfilmes, durch Szintillationsmessung nach Herauslösen der Blotbande oder durch Blotting in Lösung, wobei radioaktiv markierte Sonden an denaturiertes PCR-Produkt binden. Die Auswertung erfolgt dann ebenfalls im Szintillationszähler (Kellogg *et al.*, 1990).

Jalava *et al.* (1993) beschreiben eine Vorgehensweise, mit der man Southern-Blotting umgehen kann: Unter Verwendung von biotinylierten Primern wurde ein System entwickelt, das die Biotin-markierten Amplifikate auf einer Streptavidin-beschichtete Elisa-Platte bindet. Eine radioaktiv markierte Nukleotid-Sonde, die an die biotinylierte Region bindet wurde dann für die Quantifizierung verwendet. Niemeyer *et al.* (1997), Nagata *et al.* (1985) und Fritz *et al.* (1995)

entwickelten ähnliche Systeme, sie ersetzen allerdings die radioaktive Sonde durch enzymatische Reaktionen.

Ein einfaches System ist das Auftrennen der PCR-Produkte in Acrylamid- oder Agarose-Gelen mit nachfolgender Färbung der DNA mit Ethidium-Bromid und anschließender densitometrischer Auswertung der Bandenstärke mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems und spezieller Software (Rottman *et al.*, 1996; Babu *et al.*, 1993; Singer-Sam *et al.*, 1990).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die afrikanische Vielzitzenmaus *M. coucha* diente als Endwirt für die Stammhaltung von *B. malayi*. Zwischenwirt war die tropische Stechmücke *Aedes togoi*.

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche *M. coucha*, Stamm GRA, Gießen, aus der Zucht des Instituts für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet, da sich mit männlichen Tieren bessere Infektionsergebnisse erzielen lassen (Erfahrungswerte aus dem Institut für Parasitologie, JLU-Gießen). Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Tiere drei Wochen alt. Die Unterbringung dieser Tiere erfolgte in klimatisierten Räumen bei 22 °C und 50 % relativer Luftfeuchte. Sie wurden gruppenweise in Makrolon[®]-Käfigen auf Hobelspaneinstreu gehalten. Als Futter erhielten die Tiere eine Mischung aus 40 % Hafer, je 13 % Weizen und Gerste, je 11 % Mais und Sonnenblumenkerne, 9 % Hühnervollkorn und 3 % Garnelen (Angaben in Gewichtsprozenten). Trinkwasser stand ab libitum zur Verfügung.

3.2 Haltung von *Brugia malayi*

3.2.1 Mücken-zucht

Material:

6-8 Plastikwannen,

H₂O_{dest} mit 31 g NaCl/25 l (Sigma Deisenhofen, S 9888)

Trockenhefe (7 g/Päckchen, Dr. Oetker)

Hundekuchen („drei Leckerle“, Spillers Latz, Euskirchen)

Feinmaschiges Aquariennetz

Moskitokäfige

Haushaltszucker

Große Rundfilter (Durchm. 240 mm, Schleicher&Schuell, Dassel, 311620)

Vorgehensweise:

Die Plastikwannen wurden etwa zur Hälfte mit der zuvor angesetzten Kochsalzlösung gefüllt und in einem Raum, in dem Temperaturen von 26-28°C und ca. 80 % Luftfeuchtigkeit herrschten, aufgestellt. Die Eiablage von *Ae. togoi* war zuvor auf Filterpapier erfolgt (vergl. 3.2.2). In die Wannen wurden nun Filterpapiere mit 4-6 Wochen alten Eiern gegeben. Anschließend wurden auf die Wannen zwei Päckchen Trockenhefe verteilt und kräftig verrührt. Noch am selben Tag schlüpften aus den Eiern die Larven von *Ae. togoi*. In den darauffolgenden Tagen wurde das Wasser in den Wannen wiederholt umgerührt. Am dritten Tag wurden in jede Wanne zwei Hundekuchen gegeben. Weitere drei Tage später hatten sich ca. 80-90 % der Mückenlarven verpuppt. Die Puppen wurden mit dem Netz gefischt und auf vier Glasschalen verteilt. Davon wurden je zwei in einen Moskitokäfig gestellt. Die Moskitokäfige bestanden aus einem Metallgestell, in das ein Boden eingelassen war. Ein Moskitonetz mit Eingriffschlauch wurde so über das Metallgestell gezogen, daß es unter dem Boden mit Klebeband fixiert werden konnte. Die aus den Puppen geschlüpften Mücken wurden mit Zuckerlösung gefüttert. Dazu wurde in jeden Käfig ein 200 ml-Erlenmeyerkolben gestellt, der mit einer 20%igen Zuckerlösung gefüllt war. Ein Filterpapier wurde aufgerollt, die obere Kante umgelegt und mit einer Heftklammer verschlossen, so daß das dünn aufgerollte Ende in der Zuckerlösung stand und das obere Ende eine breite Anflugfläche bot. Nach ca. drei Tagen wurden die Glasschalen aus den Käfigen entfernt, da die meisten Mücken geschlüpft waren. Nach weiteren drei Tagen wurde die Zuckerlösung gewechselt.

3.2.2 Blutmahlzeit und Infektion der Mücken**Material:**

Pentobarbital, (Sigma, Euskirchen, P 3761)

Glaspetrischalen

Haushaltswatte

Kleine Rundfilter (Durchm. 90 mm, Schleicher und Schuell, 311609)

Vorgehensweise:

Von den Mückenpopulationen in den beiden Käfigen (s. 3.2.1) wurden je eine für die Zucht und eine für die Infektion bestimmt. In den „Zuchtkäfig“ wurden zwei mit Pentobarbital (50 mg/kg KG, intraperitoneal) narkotisierte und rasierte, nicht infizierte *M. coucha* gelegt und zwei Stunden dort belassen. Für die Infektion wurden *M. coucha* ausgewählt, deren Mikrofilariämie ca. fünf Mikrofilarien/ µl Blut (vergl. 3.3) betrug. Drei solcher Tiere wurden wie oben beschrieben behandelt, und ebenfalls für zwei Stunden den Mücken ausgesetzt. Aufgrund der Periodizität des Parasitenstammes (die höchste Mikrofilariendichte tritt in den Nachtstunden auf) waren die Infektionsergebnisse am besten, wenn die Infektion vor 9.00 Uhr morgens erfolgte. Nach Entfernen der Spendertiere erhielten die Mücken neue Zuckerlösung. Zur Eiablage wurde drei Tage nach der Blutmahlzeit eine Petrischale mit in Leitungswasser angefeuchteter Haushaltswatte, die durch ein Filterpapier bedeckt war, in den Käfig gestellt. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Zuckerlösung gewechselt. Nach vier Tagen konnten die mit Eiern bedeckten Filterpapiere herausgenommen werden. Sie wurden mit Datum versehen im gleichen Raum aufbewahrt. Die für die Eiablage verwendeten Mücken wurden im Käfig in einen Kühlraum (4°C) verbracht, und dort zum Abtöten ca. eine Woche belassen, wonach sie aus dem Käfig entfernt wurden. Die infizierten Mücken erhielten ein weiteres Mal neue Zuckerlösung.

3.2.3 Isolierung der Larven 3 (L3)**Material:**

B. malayi-infizierte Mücken (s. 3.2.2)

Ethanol 70 %, vergällt

Gaze

Glasplatte

Glastrichter, Gummischlauch, Reagenzglas, Schlauchverschluß

1 ml Spritzen

Pasteurpipetten (Länge: 15 cm)

0.7X30 mm Kanülen

Tyrodelösung:

Tyrode I-Stammlösung: 40 g NaCl (Sigma, Deisenhofen, S 9888),

1 g KCl (Merck, Darmstadt, 104935), 0,5 g MgCl • 6 H₂O, (Sigma, Deisenhofen, M 0250) mit H₂O_{dest} auf 500 ml aufgefüllt.

Tyrode II-Stammlösung: 0,25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, 106346), 5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, 106580) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 500 ml aufgefüllt.

Für 500 ml Tyrode-Gebrauchslösung wurden 50 ml der Tyrode I-Stammlösung mit 400 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ versetzt, 50 ml der Tyrode II- Stammlösung zugegeben und zusammen ad 500 ml aufgefüllt.

Vorgehensweise:

Die Hälfte der Tyrode-Gebrauchslösung wurde bei 4°C gelagert, die andere auf 37°C erwärmt. Die infizierten Mücken wurden am Tag 12 p.i. ca. 15 min im Käfig im Kühlraum bei 4°C immobilisiert, in einem Sieb gesammelt, mit 70 % Ethanol kurz besprüht und mit kalter Tyrode-Lösung gewaschen. Danach wurden sie, verpackt in einem Gazestreifen, auf einer Glasplatte zerquetscht. Das Gazebündel konnte dann in einen Trichter eingesetzt werden, dessen Auslauf durch einen Gummischlauch mit einem Reagenzglas verbunden und so verschlossen war. Trichter und Schlauch wurden vorsichtig mit 37°C warmer Tyrode-Lösung gefüllt und stehen gelassen. Nach ca. 1 Stunde waren die L3 aus den Mücken ausgewandert, durch die Gaze gelangt und hatten sich am Boden des Reagenzglases angesammelt. Sie konnten nun mit einer Pasteurpipette entnommen werden, und in eine mit frischer Tyrode-Lösung gefüllte Petrischale überführt werden.

3.2.4 Infektion der Endwirte

Material:

3 Wochen alte *M. coucha*
Einmalspritzen (1 ml) und Kanülen
Stereomikroskop

Vorgehensweise:

Unter einem Stereomikroskop wurden die L3 gezählt und in eine Spritze aufgezogen. Jeweils 85 Larven 3 wurden jeder *M. coucha* subkutan in den Nackenbereich injiziert.

3.3 Blutentnahme, Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut und Gewinnung von Seren

3.3.1 Blutentnahme

Material:

Infizierte und nicht infizierte *M. coucha*

Pasteurpipetten (autoklaviert)

Mikrohämatokritröhrchen

1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) oder 10 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc)

Vorgehensweise:

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus im inneren Augenwinkel. Abhängig von dem benötigten Volumen geschah dies entweder mit einer autoklavierten Pasteurpipette (s. 3.3.3 und 3.8) oder für die Bestimmung der Mikrofilarienwerte mit einem Mikrohämatokritröhrchen (s.3.3.2). Für die Gewinnung peripherer Blutlymphozyten wurde das Blut in 10 ml Zentrifugenröhrchen gegeben (s. 3.8); sollte Serum gewonnen werden, wurde es in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen verbracht (s. 3.3).

3.3.2 Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut

Material:

Mikrohämatokritröhrchen

Leukopipetten

Essigsäure 3 %

Nagotte-Zählkammern

Vorgehensweise:

Das Blut (s. 3.3.1) wurde in einer Leukopipette bis zur Markierung "1" aufgezogen und mit der bis zur Endmarkierung aufgezogenen Essigsäure auf einem Rotator gemischt. Eine Nagotte-Zählkammer wurde mit 20 µl des Blut-Essigsäure-Gemisches gefüllt und die Zahl der Mikrofilarien im gesamten Zählfeld bestimmt. Die Mikrofilariendichte wurde anschließend als Mikrofilarien/ 20µl Blut angegeben.

3.3.3 Gewinnung von Serum

Material:

Nicht infizierte *M. coucha*

Pasteurpipetten

1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf)

2 µm Sterilfilter (Renner, Darmstadt, 06001)

Vorgehensweise:

Von nicht infizierten adulten *M. coucha* wurden mit einer Pasteurpipette ca. 1 ml Blut entnommen (s. 3.3.1) und in je ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach ca. 2 h Wartezeit wurden die Röhrchen mit 800 X g 10 min zentrifugiert. Das Serum wurde abgesaugt, in frische Zentrifugenröhrchen gegeben und dann nach einer weiteren Zentrifugation gepoolt, sterilfiltriert und portioniert bei -20°C eingefroren.

Zur Verwendung des Serums siehe 3.8.2.

3.4. Chemotherapeutische Behandlung

Material:

Medikamente:

CGP 20376 (6-dithiocarbamic-S (2-carboxyethylester), Ciba Geigy Ltd, Basel, Schweiz

Bay 44-4400 (zyklisches Depsipeptid, semisynthetisches Derivat von PF 1022A), Bayer, Leverkusen

Flubendazol (Benzimidazol), Janssen, Beerse, Belgien

CGP 20376 und Flubendazol lagen als Reinsubstanzen vor. Bay 44-4400 wurde als Spot-on-Formulierung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Harder, Business Group Animal Health, Bayer AG, D 51368 Leverkusen-Bayerwerk) eingesetzt.

2 %ige Tylose-Lösung (Tylose=Hydroxyethylcellulose H 300) aus der Apotheke in H₂O

Solvent für Bay 44-4400 (Bayer AG)

H₂O_{bidest}

Mörser

Spritzen

Spatel

Schermaschine

Vorgehensweise:

CGP 20376 wurde einmalig in einer Dosis von 25 mg/ kg oral, Flubendazol einmalig in einer Dosis von 50 mg/ kg subkutan verabreicht. Zur Applikation wurden diese Substanzen in Tylose-Lösung suspendiert: Die erforderlichen Substanzmengen wurden in wenig (etwa 0,5 ml) 2 %iger Tylose-Lösung im Mörser homogenisiert. Durch Zugabe von Wasser wurden die Konzentrationen so eingestellt, daß 1 ml/ 100g Körpergewicht gegeben werden konnten. CGP 20376 wurde per os mittels einer Schlundsonde verabreicht. Die subkutane Applikation von Flubendazol erfolgte im Inguinalbereich. Bay 44-4400 wurde in einer Dosis von 25 mg/kg mit dem speziellen Solvent auf eine Gebrauchskonzentration von 4 % verdünnt, die auf eine vorher geschorene Stelle von etwa 5-Markstückgröße im Rückenbereich der Tiere aufgetragen und mit dem Spatel verrieben wurde.

Mit den Behandlungen sollten eine mikro-und makrofilarizide Wirkung (CGP 20376), ein rein makrofilarizider Effekt (Flubendazol) oder eine mikrofilarizide Wirkung, verbunden mit einer durch Störung der Embryogenese bedingten langanhaltenden Reduktion der Parasitämie (Bay 44-4400) erreicht werden. Medikamente und Dosiswahl wurden nach Zahner und Schares (1993) bzw. für (Bay 44-4400) nach Zahner *et al.* (2001a) vorgenommen.

3.5 Sektion zur Kontrolle des Infektionserfolgs und Therapieeffekts**Material:**

Korkbretter mit Aluminiumfolienbespannung

Sezierbesteck

Petrischalen

Schwarze Plastikfolie

Kompressorium

Stereomikroskop

Glasbehälter (21 cm X 29 cm X 23 cm)

CO₂

Vorgehensweise:

Die Tiere wurden in einem Glasbehälter mit CO₂ betäubt. Anschließend wurden sie dekapitiert, entblutet und in Rückenlage mit Nadeln auf einem mit Aluminiumfolie bespannten Korkbrett

befestigt. Nach einem Schnitt in der Medianen wurde die Haut bis zum Rücken vorsichtig abpräpariert und ebenfalls mit Nadeln befestigt. Daraufhin wurden die an der Haut verbliebenen Lnn. axillares und die anhängenden Lymphgefäße sowie die Lnn. inguinales superficiales isoliert und in eine Schale mit physiologischer Kochsalzlösung verbracht. Im Anschluß wurde die Brusthöhle eröffnet, das Herz und die Lunge präpariert und in separate Petrischalen mit Kochsalzlösung gegeben. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Hoden, die Lnn. renales, mesenteriales und illiaci med. entnommen und in Kochsalzlösung verbracht.

Die Organe wurden mit Hilfe zweier spitzer Pinzetten so weit wie möglich zerkleinert, 0,5 h bei Raumtemperatur belassen und über einer schwarzen Plastikfolie (die Hoden unter dem Stereomikroskop) auf adulte Filarien untersucht. Diese wurden nach Geschlechtern getrennt gezählt. Die Lymphknoten und-gefäße wurden in einem Kompressorium gequetscht und bei Lupenvergrößerung auf lebende oder abgekapselte Filarien untersucht.

3.6 Isolierung der verschiedenen Stadien von *B. malayi* und Infektion der Endwirte

3.6.1 Isolierung der Larven 3 (L3)

siehe 3.2.3

3.6.2 Isolierung adulter Parasiten

Material:

B. malayi infizierte *M. coucha* (s. 3.2.1.1)

Glaspetrischalen

H₂O_{dest} mit 0.9 % NaCl (Sigma, Deisenhofen, S 9888)

Glasbehälter (21 cm X 29 cm X 23 cm)

CO₂

Mit Aluminiumfolie bedecktes Korkbrett

Sektionsbesteck

Schwarze Plastikfolie

Vorgehensweise:

Der mit CO₂ gefüllte Glasbehälter diente zur Betäubung der infizierten *M. coucha*. Im Anschluß wurden die Tiere durch Dekapitieren getötet und das austretende Blut für die Isolierung der Mikrofilarien (s. 3.6.3) aufgefangen.

Die *M. coucha* wurden in Rückenlage auf dem Korkbrett fixiert. Nach Eröffnung der Brusthöhle wurden die Lunge und das Herz entnommen und jeweils in eine mit ca. 10 ml physiol. NaCl-Lösung gefüllte Petrischale gegeben. Das Unterlegen einer schwarzen Plastikfolie erleichterte später das Isolieren der Parasiten aus dem Gewebe und das Differenzieren nach Geschlecht. Die Organe wurden mit zwei spitzen Pinzetten vorsichtig zerpfückt und zum Auswandern der Parasiten ca. zwei Stunden stehen gelassen.

Nicht ausgewanderte Parasiten aus dem Gewebe wurden mit einer Federstahlpinzette herausgezupft. Nach wiederholtem Waschen wurden die Würmer nach Geschlechtern getrennt in Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren.

3.6.3 Isolierung der Mikrofilarien**Material:**

50 ml Plastikzentrifugenröhrchen (Nunc, 73687)

10 ml Glaszentrifugenröhrchen (Duran)

Na-Citrat

PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl (Sigma, Deisenhofen, S 9888), 4,3 mM Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, 103095), 2,7 mM KCL (Merck, Darmstadt, 104938), 1,4 mM KH₂P0₄ (Merck, Darmstadt, 112034) in 1l H₂O _{bidest.} pH 7,2

NaCl- Lösung: 1,5 M und 0,15 M

Percoll Stammlösung: 90g Percoll (Amersham, Uppsala, 17-0891-01) und 10 g 1,5 M NaCl-Lösung

Lösungen für den Gradienten: 52%ig: 12,97 g Stammlösung mit 12 g 0,15 M NaCl mischen

62%ig: 62 g Stammlösung mit 38 g 0,15 M NaCl mischen

Pasteurpipetten

Filter: 2 µm, 25 mmØ, (Costar, Bodenheim, 110611)

Vorgehensweise:

20 ml Blut wurden mit 3,8%iger Na-Citratlösung gemischt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. In 10 ml Glaszentrifugenröhrchen wurden zunächst jeweils 1 ml der 52%igen Gradientenlösung gegeben, 5 ml der 62%igen Lösung darunter geschichtet und der Gradient mit 3,2 ml

verdünntem Blut bedeckt. Nach Zentrifugation (45 min, 1950 X g) waren die Mikrofilarien als weißer Ring sichtbar, der mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden konnte. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Mikrofilarien (10 min, 1200 X g) mit PBS (Methode nach Chandrashekar *et al.*, 1984).

3.7 Antigengewinnung und Bestimmung des Proteingehaltes

3.7.1 Antigengewinnung

Material:

Gesammelte Parasiten verschiedener Stadien

PBS (s. 3.2.3)

Glashomogenisator

50 ml Plastikzentrifugenröhrchen (s. 3.2.2)

1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf)

Vorgehensweise:

Die Parasitenstadien wurden portionsweise mit PBS im Homogenisator zerkleinert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die Lösung trüb erschien und keine sichtbaren Parasitenanteile mehr vorhanden waren. Das Material wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint und ca. 60 Mal für je 1 s auf Eis ultrabeschallt. Im Anschluß wurde die Suspension 30 Minuten bei 4°C und 10000 X g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, das Pellet erneut in PBS suspendiert und wie oben zentrifugiert. Der Proteingehalt der vereinten Überstände wurde mit dem Bradford Assay (s. 3.7.2) gemessen. Das Antigen wurde portioniert bei –80°C aufbewahrt.

3.7.2 Bradford-Assay zur Bestimmung des Proteingehaltes

Material:

Protein Assay (BIO-RAD, München, 500-0006)

Bovines Serum-Albumin (BSA, FraktionV, Roth, Karlsruhe, 8076.2)

H₂O_{dest.}

96-Loch-Zellkulturplate (MAGV, Rabenau-Londorf 163320)

Vorgehensweise:

Die Stammlösung des Proteinassays wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ im Verhältnis 1:5 zur Gebrauchslösung verdünnt. BSA, als Referenzwert, wurde in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ angesetzt. In einer 96-Loch Platte wurde eine Verdünnungsreihe, bestehend aus jeweils der Farblösung und 1, 2, 5, 7,5, und $10 \mu\text{l}$ BSA-Lösung, zu einem Endvolumen von $200 \mu\text{l}$ im Doppelansatz pipettiert. Die Antigenproben wurden jeweils in einem Volumen von 1, 3, 5 und $10 \mu\text{l}$ mit der entsprechenden Menge an Farbreagenz aufgetragen. Die Proteinkonzentration des Antigens konnte dann durch Vergleich der Farbtintensitäten ermittelt werden.

3.8 Gewinnung und Stimulation peripherer Blutlymphozyten**3.8.1 Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)****Material:**

LymphoSep™ Lymphocyte Separation Medium (ICN, Eschwege, 1692254)

RPMI Medium 1640 (Life Technologies, GIBCO BREL, Karlsruhe, 51800-035)

Penicillin/ Streptomycin Solution, Hybri-M (Sigma, Deisenhofen, P 7539)

L-Glutamin 200 (Life Technologies, GIBCO BREL, 043-05030)

Lysis-Puffer ACK: 8,29 g NH_4Cl (0.15M), (Sigma, Deisenhofen, A4514); 1 g KHCO_3 (1,0 mM) (Caesar und Loretz GmbH, Hilden, 2302); 37,2 mg EDTA (0,1 mM), (Sigma, Deisenhofen, ED2SS) ad 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und mit HCl 1N (Merck, Darmstadt, 109057) auf pH 7,2-7,4 eingestellt. Dann mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1000 ml ergänzt. Durch einem $0,2 \mu\text{m}$ -Filter filtriert.

Heparin: Liquemin®N 25000 (Hoffmann LaRoche, Gernach Wyhler)

Trypan-Blau (Sigma, Deisenhofen, T 8154)

Glaszenrifugenröhrchen mit Deckel

10 ml Plastikzentrifugenröhrchen (Nunc 347880); 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf)

Pasteurpipetten (autoklaviert)

Neubauer-Zählkammer

Vorgehensweise:

Blut von infizierten Tieren und nicht infizierten Kontrolltieren (ca. 1 ml/ Tier) wurde mit autoklavierten Pasteurpipetten retroorbital entnommen und in einem Plastikzentrifugenröhrchen mit ca. 100 µl Liquemin® gut gemischt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an RPMI-Medium wurde das Gemisch im Verhältnis 1:2 vorsichtig auf das Separationsmedium geschichtet und 30 min bei Raumtemperatur und 500 X g zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation erscheinene weiße Ring enthielt die PBL. Er wurde mit einer autoklavierten Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches, mit Medium gefülltes 10 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 minütiger Zentrifugation mit 400 X g war das Zellpellet am Boden sichtbar; der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert und 5 min schlagend geschüttelt. Im Anschluß folgte ein dreimaliges Waschen mit Medium (je 10 min, 500 X g). Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet in Medium mit 4 % *M. coucha*-Serum aufgenommen. Ein Aliquot wurde in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen mit Trypan-Blau im Verhältnis 1:10 gemischt und 5 min stehen gelassen. Nach der Färbung mit Trypan-Blau erschienen lebende Zellen durchsichtig mit einem kräftigen glatten Rand. Abgestorbene Zellen waren blau mit unterbrochenem Rand. Nur die lebenden Zellen wurden beim Zählen in einer Neubauer-Zählkammer berücksichtigt. Sie wurden dann auf eine Konzentration von 10^6 / ml Medium eingestellt.

3.8.2 Proliferationsassay**Material:**

Concavallin A (Biochrom Berlin, M5050)

Filarientigen (s. 3.7.1)

Rundboden-96- Loch Platten (steril) (MAGV, Rabenau-Londorf, 163320)

³H-Thymidin (Amersham, Uppsala, TRK.637) gelöst in Medium ohne Zusatz, 10 µCi/ml

Zellerntegerät Titertek (Skatron 7020, Norway) und Filter (Laborbedarf Malar, 78-115-05)

Szintillationsflüssigkeit rotiszint, eco-plus (Roth, Karlsruhe, 0016.1)

Szintillationsgefäße 20 ml (MAGV Rabenau-Londorf, 5810100)

Vorgehensweise:Vorbereitung:

Das RPMI-Medium wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin versetzt und auf Eis aufbewahrt. Ein Teil des Mediums wurde zudem mit 4 % Serum von *M. coucha* versetzt. Medium ohne Penicillin und Streptomycin wurde zum Verdünnen der Antigene und von Con A verwendet. Die Antigenlösungen von adulten Weibchen, Männchen, Mikrofilarien und L3 wurden auf einen Proteingehalt von 20 µg/ml (s. 3.7) eingestellt.

Durchführung:

In den Inkubationsplatten wurden in 0,1 ml RPMI-Medium Antigen (20 µg Protein/ml) oder Con A (4 µg/ml) vorgelegt. Kontrollansätze blieben ohne Zusatz. Hinzu kamen pro Vertiefung 10^5 Zellen in 0,1 ml Medium (RPMI). Alle Ansätze erfolgten doppelt.

Nach einer Inkubation (37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre) von 48 h (Con A) oder 96 h (Antigen und RPMI-Kontrollen) wurde pro Vertiefung 50 µl ³H-Thymidin zugegeben. Die Inkubation wurden danach für weitere 16 h fortgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät, das die Zuordnung der einzelnen Vertiefungen auf dem Filterpapier erlaubte, geerntet. Nach Trocknen der Filter (4 h bei 37° C oder über Nacht bei Raumtemperatur) wurden die den jeweiligen Vertiefungen entsprechenden Filterplättchen in je ein 10 ml fassendes Szintillationsröhrchen gegeben und mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

3.9 Gewinnung von RNA aus Lymphozyten**Material:**

LymphoSep™ Lymphocyte Separation Medium (ICN, Eschwege, 1692254)

RPMI Medium 1640 (Life Technologies, GIBCO BREL, Karlsruhe, 51800-035)

Penicillin/ Streptomycin Solution, Hybri-M (Sigma, Deisenhofen, P 7539)

L-Glutamin 200 (Life Technologies, GIBCO BREL, 043-05030)

Lysis-Puffer ACK (s. 38.1)

Heparin: Liquemin®N 25000 (Hoffmann LaRoche, Gernach Wyhler)

Trypan-Blau (Sigma, Deisenhofen, T 8154)

Glaszentrifugenröhrchen mit Deckel

10 ml Plastikzentrifugenröhrchen (Nunc 347880); 1,5 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf)

Pasteurpipetten (autoklaviert)
Neubauer-Zählkammer
Concavallin A (Biochrom Berlin, M5050)
Filarientantigen (s. 3.7)
Rundboden-96- Loch Platten (steril) (MAGV, Rabenau-Londorf, 163320)
Oligotex-Suspension (Qiagen, Hilden, 79002)
QIAshredder (Qiagen, Hilden, 79654)
Oligotex Buffer Set (Qiagen, Hilden, 79210)
2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, 28625)
1,5 ml Zentrifugenröhrchen, frisch autoklaviert (Eppendorf)

Vorgehensweise:

Die Zellen wurden wie in 3.8.1 und 3.8.2 beschrieben gewonnen und stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurden sie in sterile 1,5 ml Zentrifugenröhrchen geerntet, wobei je ein Doppelansatz vereint wurde. Die Zellen wurden bei 500 X g in einer Tischzentrifuge für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Buffer OL1 mit 0,3 % 2-Mercaptoethanol resuspendiert und bei –80°C eingefroren. Die Gewinnung der mRNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers. Dazu wurden die Zellysate in je einen Qiashredder überführt, durch Zentrifugation (1 min, 10.000 X g) homogenisiert und anschließend in 800 µl Dilution-Buffer (ODB) resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (3 min, 10000 X g) zur Abtrennung von evtl. vorhandenem Protein, danach die Zugabe des Überstandes zu 15 µl der Oligotexlösung. Diese Suspension wurde nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur für 5 min bei 12.000 X g zentrifugiert und das Pellet anschließend zwei Mal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen (je 1 min, 10.000 X g). Die mRNA wurde zwei Mal mit je 20 µl Elutionspuffer, der auf 70°C erhitzt worden war, eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei –80°C gelagert.

3.10 Fluorometrische Messung der RNA

Material:

Ascent Flouroskan Typ 374, (Labsystems, Finnland)
Cliniplate, schwarz (Labsystems, Finnland, 9502867)
Ribo-Green™ RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Leiden, R-11490)
TE-Puffer, 10 mM Tris HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), autoklaviert.

3.10.1 Etablierung der Messkonditionen

Ribo-Green ist ein Farbstoff, der an RNA bindet. Im ungebundenen Zustand fluoresziert er nicht. Werden die Moleküle jedoch an RNA gebunden, so fluoreszieren sie mit einer Stärke, die proportional zu der Menge der gebundenen RNA-Moleküle ist.

Die Standardkurve wurde nach dem Protokoll des Herstellers für "low range assays" aus der mit dem „Ribo-Green™ RNA Quantitation Kit“ gelieferten rRNA angesetzt. Dazu wurden Verdünnungen der rRNA in TE-Puffer erstellt, die eine Endkonzentration von 50, 25, 5 und 1 ng/ ml hatten. Sie wurde für jede Platte neu erstellt, da aus Vorversuchen ersichtlich war, daß die Messunterschiede, die auf die Hintergründe verschiedener Platten zurückzuführen waren, größer waren, als die Unterschiede einzelner Pipettierschritte des Standards.

Als Proben-RNA diente eine Mischung aus verschiedenen mRNA-Präparationen aus mit Con A stimulierten PBL von *M. coucha*, die in Vorversuchen angefertigt worden waren.

Für die Standardkurve wurden je 100 µl der Verdünnungen im Doppelansatz pipettiert. Jeweils 5 µl der Proben-DNA wurde mit TE auf 100 µl aufgefüllt und in die vorgesehene Vertiefung gegeben. Die Verteilung des Farbstoffes, nach Angaben des Herstellers 1:2000 in TE verdünnt, erfolgte automatisch durch das Gerät in einem Volumen von 100 µl. Ein Schüttelschritt von 10 sec bei 1200 U (Einstellung am Fluorometer) schloß sich an. Die Inkubationsdauer von zwei min nach der Zugabe des Farbstoffes bis zur Messung der Fluoreszenzwerte ergab sich aus eigenen Vorversuchen, in denen das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz bestimmt wurde. Zur Auswertung wurden die Rohwerte als Exel-Datei gespeichert und in diesem Programm weiter bearbeitet. Es wurden dabei der Leerwert und der Verdünnungsfaktor der Proben berücksichtigt.

3.10.2 Messung der RNA-Proben

Für die Messung der Proben wurde eine Verdünnung von 1:20 in TE gewählt. Die Verdünnung war notwendig geworden, da ein Volumen von weniger als 200 µl/ Messansatz gerätebedingt zu Ungenauigkeiten bei den Ergebnissen führte.

Die Messung wurde 35 sec nach Beendigung des Dispensiervorganges gestartet, die Integrationszeit zwischen den einzelnen Messpunkten betrug 1 sec, so daß beim Messen einer voll belegten Platte (96 Vertiefungen) eine Inkubationszeit von zwei min für alle Messpunkte gegeben war.

Die Auswertung erfolgte wie oben angegeben.

Die vollständigen Tabellen der Messergebnisse befinden sich im Anhang I, Tab. A1

3.11 Reverse Transkription

Material:

MMLV Reverse Transkriptase [inkl. Puffer und Dithiotreitol (DTT)] Life Technologies, GIBCO BREL, 28025-013)

dNTP Mix 10 mM (Fermentas, Leon Roth, RO 181 in einer Konzentration von je 10 mM verdünnt in TE Puffer)

Hexanukleotid-Mix 10X (Böhringer Mannheim, Mannheim, 1277081)

Ribonuklease-Inhibitor (Fermentas, Leon Roth, E00312), 40 U/ μ l

Vorgehensweise:

Nach den Ergebnissen der Konzentrationsmessungen der mRNA (s. 3.6) wurde die Menge der umzuschreibenden mRNA auf 650 pg festgelegt. Dies entsprach in einem Gesamtansatzvolumen der reversen Transkription von 45 μ l einem Minimalwert von 25 pg mRNA/ μ l.

Die entsprechende Menge mRNA wurde zunächst mit Wasser auf ein Volumen von 26,5 μ l verdünnt und 5 min bei 70°C erhitzt, um unerwünschte Bindungen der RNA-Stränge untereinander zu lösen. Anschließend wurden

9 μ l 5X Reverse-Transkriptase-Puffer,

4,5 μ l DTT,

1 μ l Hexanukleotide (1:20 verdünnt),

1 μ l Reverse Transkriptase (entspricht 200 U),

2 μ l dNTP Mix und

1 μ l Ribonuklease Inhibitor (entspricht 40 U)

zu den auf Eis gekühlten mRNA-Proben gegeben. Diese Proben wurden eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, auf Eis abgekühlt und dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.12 Synthese des Standardplasmids für die RT-PCR

3.12.1 Enzymatisches Schneiden und Reinigen der Zwischensequenz

3.12.1.1 Enzymatisches Schneiden der Sequenz

Material:

cDNA als Platzhaltersequenz für evtl. spätere Einschübe

ApaI- Restriktionsenzym, 10 U/ μ l, (New England Biolabs, Schwalbach, 114S)

SpeI - Restriktionsenzym, 3 U/ μ l (New England Biolabs, Schwalbach, 133S)

Puffer 2 (New England Biolabs, Schwalbach)

BSA-Fraktion V (Roth, Karlsruhe, 8076.1)

Agarose, Life Technologies, GIBCO BREL, Eggenstein, 15510-019)

TAE-Puffer: 242 g Trishydrochlorid (ICN, Aurora, USA, 103133); 57,1 g Eisessig (Merck, Darmstadt, 1.00056); 37,2 g Na₂ EDTA • 2 H₂O (Sigma, Deisenhofen, ED2SS) in 1 l H₂O bidest

Ethidiumbromid-Lösung 1 μ g Ethidiumbromid (Sigma Deisenhofen, E7637) in 1 l H₂O bidest

DNA-Marker: Gene Ruler, Ladder Mix (Fermentas, Leon Roth, SM 0242)

Vorgehensweise:

Ein beliebiges Stück cDNA (es wird später als Zwischensequenz oder Insert bezeichnet) sollte als Platzhalter für evtl. später einzubauende Sequenzen in das Plasmid dienen. 20 μ g der ausgewählten cDNA wurden in einem 100 μ l Ansatz mit 35 U ApaI und 35 U SpeI in 10-fach Puffer geschnitten. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C.

Zur Reaktionskontrolle wurde 1 μ l des Reaktionsproduktes auf 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte in 40 min bei 120 V. Durch Markierung der DNA mit Ethidiumbromid konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.12.1.2 Reinigen des geschnittenen Teilstückes**Material:**

Parafilm „M“ (American National Can™, Chicago, USA)

Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt, 100979)

Phenol-Chloroform: Phenol (Roti®-Phenol, Roth, Karlsruhe, 6340.2) in einer Mischung von 1:1 mit Chloroform (Roth, Karlsruhe, 0038.1)

Isopropanol (Merck, Darmstadt, 109634), gelagert bei -20°C

Ethanol (Merck, Darmstadt, 100983) 70%, gelagert bei -20°C

Agarose, (s 3.12.1.1)

Ethidiumbromid Lösung, (s. 3.12.1.1)

TE-Puffer: 10mM Tris-HCL (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0), autoklaviert

Vorgehensweise:

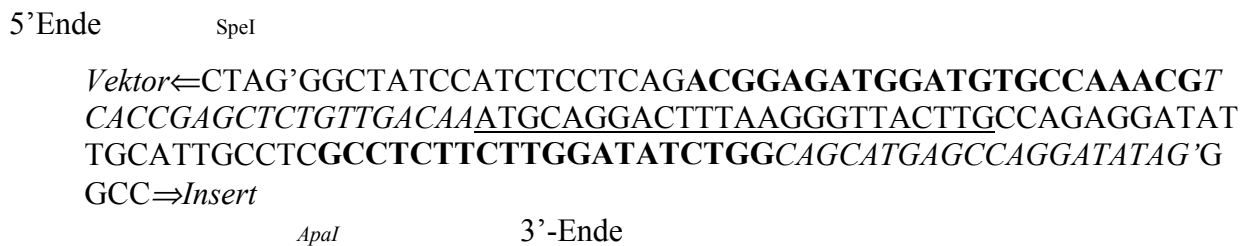
Das gesamte Reaktionsvolumen aus 3.12.1.1 wurde in einem 1%igen Agarose-Sammelgel elektrophoretisch (120V, 40 min) aufgetrennt. Nach Färbung der DNA mit Ethidiumbromid konnte die gesuchte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels der Freeze-and-Squeeze-Methode isoliert werden. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in einem Säckchen aus Parafilm für ca. 15 min bei -80°C tiefgefroren. Während des anschließenden Auftauens des Gels - das Säckchen wurde dazu in der Hand gehalten - konnte unter leichtem Druck die die DNA enthaltende Flüssigkeit ausgepreßt werden. Sie wurde abpipettiert und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zunächst wurde die Probe mit gleichem Volumen Isoamylalkohol zur Extraktion des Ethidiumbromids gewaschen, wobei die Phasen durch vortexen kräftig gemischt und nachfolgend abzentrifugiert (2 min, 12.000 X g) wurden. Weitere Waschungen erfolgten mit Phenol-Chloroform und Chloroform wie für Isoamylalkohol beschrieben. Danach wurden zu der organischen Phase ein gleiches Volumen Isopropanol und 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2), zugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach 15 minütiger Aufbewahrung bei -80°C erfolgte das Pelletieren der DNA durch Zentrifugation (30 min, 12.000 X g) bei 4°C . Eine weitere Waschung mit anschließender Zentrifugation (5 min, 12.000 X g) mit 70%igem Ethanol schloß sich an. Das gereinigte und im Wärmeschrank kurz getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 μl TE-Puffer aufgenommen. Ein Aliquot wurde entnommen und im Agarose-Gel auf Reinheit überprüft.

3.12.2 Spezifische Primer**3.12.2.1 Die Sequenz der Primer**

Die Sequenzen der Primer für die Interleukine 2, 4, 5, 10, 13 sowie für IFN γ und β 2-Mikroglobulin von *M. coucha* wurden von Dr. Anja Taubert (Gießen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Abb. 3.1 zeigt den Aufbau des zu synthetisierenden internen Standards. Die unterschiedlichen Schriftarten in Abb. 3.1 markieren die einzelnen Primer, wobei für die Forward-Primer die Upstream-Sequenz, und für die Reverse-Primer die Downstream-Sequenz angegeben ist. Es wurden die jeweils korrespondierenden Sequenzen erstellt und die vier so erhaltenen Sequenzen *Upstream "oben"*, *Upstream "unten"*, *Downstream "oben"* und *Downstream "unten"* genannt. *Upstream "oben"* enthielt demnach die Forward-Primer wie unter a) angegeben, *Downstream "unten"* die Reverse-Primer wie unter b) angegeben. Die beiden jeweils anderen Sequenzen enthielten die zu a) und b) korrespondierenden Stücke. Jede

der unter a) und b) aufgeführten Sequenzen wurde in fünf Teilstücke unterteilt, da die synthetisierende Firma bei Oligonukleotiden von mehr als 30 Basen Länge keine Garantie für Fehlerfreiheit geben konnte. Die Oligonukleotide (s. Tab. 3.1) wurden so ausgewählt, daß sich jeweils “oben” und “unten” der Teilsequenzen *Upstream* bzw. *Downstream* um mindestens sechs Basen überlappten, was für eine erfolgreiche Hybridisierung Voraussetzung war. Zusätzlich wurde am 5' Ende der *Upstream* “oben”-Sequenz eine Schnittstelle für SpeI eingefügt, am 3' Ende eine Schnittstelle für Apa I. Gleiches wurde am 3' Ende (SpeI) der *Downstream* “unten”-Sequenz und am 5' Ende (ApaI) der *Downstream* “oben” Sequenz vorgenommen.

a) Forward-Primer (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ , β 2-Mikroglobulin)



b) Reverse-Primer (β 2-Mikroglobulin, IFN γ , IL-13, IL-10, IL-5, IL4, IL-2)

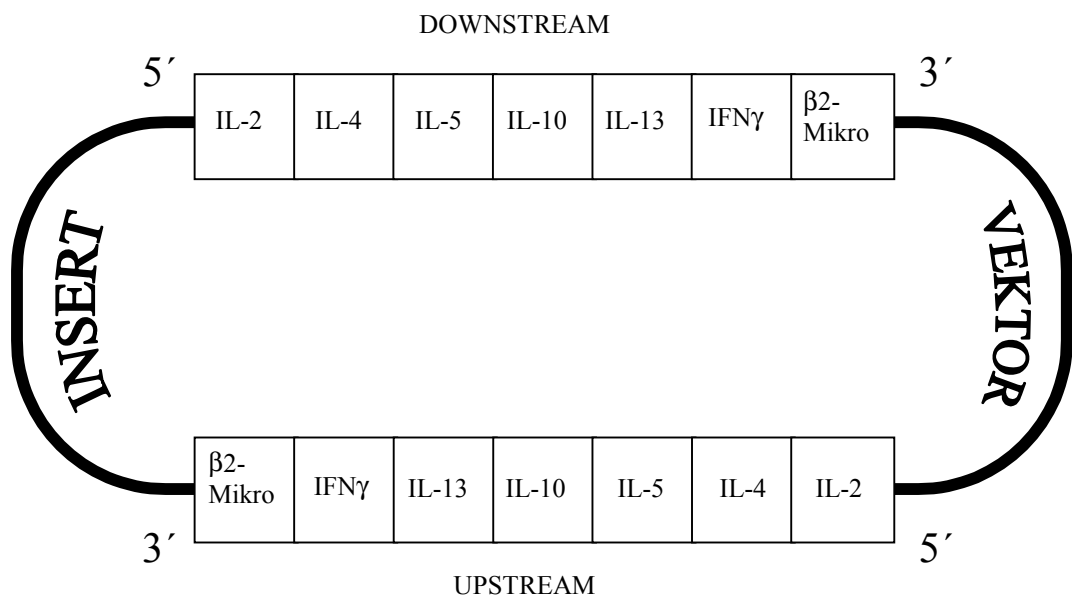
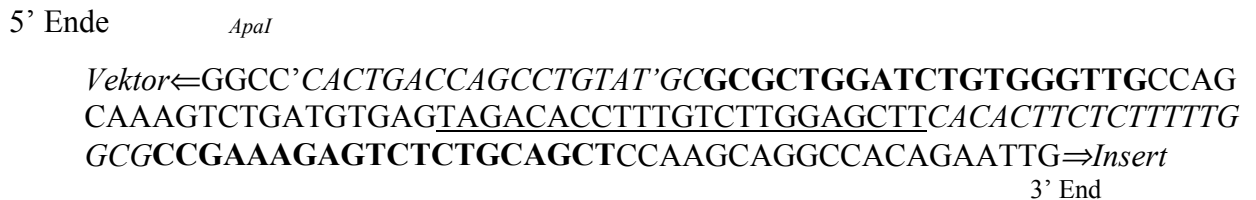


Abb. 3.1: Reihenfolge der Einzelstrangsequenzen der Primer in ihrer Anordnung im Vektor

Tab. 3.1 Übersicht über die zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide

Oligoname	Sequenz
Do-1	CTAGCAATTCTGTGGCCTGCTTGG
Do-2	AGCTGCAGAGACTCTTTCGGCGCCAAAAAG
Do-3	AGAAGTGTGGAAGCTCCAAGACAAAGGTG
Do-4	TCTACTCACATCAGACTTTGCTGGCAACCCACA
Do-5	GATCCAGCGCGCATAACAGGCTGGTCAGTGGGCC
Du-1	CACTGACCAGCCTGTATG
Du-2	CGCGCTGGATCTGTGGGTTGCCAGCAAAG
Du-3	TCTGATGTGAGTAGACACCTTTGTCTTGGA
Du-4	CTTCCACACTTCTCTTTTTGGCGCCGAAAG
Du-5	AGTCTCTGCAGCTCCAAGCAGGCCACAGAATTG
Uo-1	CTAGGGCTATCCATCTCCTCAGACGGAGATGGATGT
Uo-2	CCAAACGTCACCGAGCTCTGTTGACAAATGCAG
Uo-3	GACTTTAAGGGTTACTTGCCAGAGGATATTG
Uo-4	CATTGCCTCGCCTCTTCTTGGATATCTG
Uo-5	GCAGCATGAGCCAGGATATAGGGCC
Uu-1	CTATATCCTGGCTCATGCTGCCAGATATCCAAGAAGAG
Uu-2	GCGAGGCAATGCAATATCCTCTGGCAAGTAAC
Uu-3	CCTTAAAGTCCTGCATTTGTCAACAGAG
Uu-4	CTCGGTGACGTTTGGCACATCCATCTC
Uu-5	CGTCTGAGGAGATGGATAGCC

1

3.12.2.2 Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide

Material:

T4 Polynukleotidkinase 10 U/μl (Fermentas, LeonRoth, EK0031)

T4 DNA Ligase Hc. 20 U/μl (Fermentas, Leon Roth, EL 0017)

Ligase Puffer (Fermentas, Leon Roth, EL 0017)

KCL (10mM), Merck, Darmstadt, 104938)

¹ Do= Downstream “oben”, Du = Downstream “unten”, Uo = Upstream “oben”, Uu = Upstream “unten”

Vorgehensweise:**a) Phosphorylierung**

200 pmol/ μl jedes der Oligonukleotide [mit Ausnahme von Du1 und Uo1 (sie dienen später als Ligationsstellen mit dem Vektor)] wurden in einem 20 μl Reaktionsansatz mit 2 U T4 Polynukleotidkinase in Ligase-Puffer phosphoryliert (30 min, 37°C). Anschließend wurde das Enzym inaktiviert (15 min, 65°C).

200 pmol der Oligonukleotide Uo1 und Du1 wurden nach der Enzyminaktivierung in Konzentrationen von je 200 pmol zugegeben.

b) Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte in zwei getrennten Ansätzen für die Upstream- und die Downstream-Primer unter Verwendung von 10-fach Ligase-Puffer in einem 40 μl Ansatz. Die Salzkonzentration wurde mit 4 μl KCL (10 mM) eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 14°C.

Ansatz:

Upstream-Primer:

20 μl phosphorylierte Oligonukleotide
(vergl. 3.12.2.2a)
1 μl Uo1 (entspricht 200 pmol)
2 μl Ligase Puffer (10X)
0,4 μl KCL (entspricht 10 mM)
16,6 μl H₂O

Downstream-Primer:

20 μl phosphorylierte Oligonukleotide
(vergl. 3.12.2.2a)
2,3 μl Du1 (entspricht 200 pmol)
2 μl Ligase Puffer (10X)
0,4 μl KCL (entspricht 10 mM)
15,3 μl H₂O

3.12.3 Synthese und Amplifikation des Zwischensequenz-Primer-Komplexes**3.12.3.1 Dephosphorylierung der Zwischensequenz****Material:**

Alk. Phosphatase, Shrimp 1U/ μl (Böhringer Mannheim, 1758250)
Freeze-and-Squeeze-gereinigte DNA der Zwischensequenz
10-fach Ligase-Puffer

Vorgehensweise:

Um Ringbildungen in der Zwischensequenz zu vermeiden wurde diese dephosphoryliert:
Das Ansatzvolumen betrug 5 µl, die Konzentration der alkalischen Phosphatase 2 U im Ansatz.
Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Enzym bei 65°C für 15 min inaktiviert.

Ansatz:

0,5 µl Ligase Puffer (10X)

2 µl alkalische Phosphatase (1U/µl)

2 µl gereinigte Zwischensequenz (ca. 60 ng) (vergl. 3.12.1.2)

0,5 µl H₂O

3.12.3.2 Ligation der Zwischensequenz mit den hybridisierten Oligonukleotiden**Material:**

Je ein Aliquot der hybridisierten Upstream- und Downstream-Primer

Ein Aliquot der dephosphorylierten Zwischensequenz

10-fach Ligase Puffer

T4 DNA Ligase HC, 20 U/µl (Fermentas, Leon Roth, EL 0017)

Vorgehensweise:

Je 3,5 µl der hybridisierten Upstream- und Downstream-Primer (das entspricht einer Konzentration der Oligonukleotide von 17,5 pmol) wurden in einem Endvolumen von 10 µl mit 2 µl der dephosphorylierten Zwischensequenz (vergl. 3.12.3.1) und 0,25 U Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.12.3.3. Amplifikation des Ligationproduktes aus 3.12.3.2**Material:**

Primer für die Amplifikation: Forw.:CGGGATCCAAGCTTCTAGGGCTATCCATCTCC

Rev.: GCTCTAGAGAATTCGGCCCACTGACCAGCCTG

Die Primer wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Taq Polymerase, 4U/μl, (Hybaid-AGS; F00790M) mit 10-fach Puffer und MgCl₂

dNTP Mix: Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP in einer Konzentration von jeweils 2,5 mM, (Fermentas, Leon Roth, RO 181), verdünnt in TE-Puffer

Ein Aliquot der Ligation aus 3.12.3.2.

Vorgehensweise:

Um die Ausgangsmenge des Ligationsproduktes für die anschließende Klonierung zu erhöhen, wurde das Ligationsprodukt aus 3.12.3.2 mit der PCR vervielfältigt.

In einem 50 μl Ansatz wurden die Primer in einer Konzentration von 0,4 pmol eingesetzt, die Konzentration der Taq Polymerase betrug 2 U/Ansatz. Als Template lag 1/5 des Reaktionsansatzes aus 3.12.3.2 vor.

PCR-Programm:

95°C, 2 min		1X
95°C, 1 min	}	3X
52°C, 2 min		
72°C, 2 min		
95°C, 1 min	}	35X
60°C, 1 min		
72°C, 1 min		

72°C, 10 min		1X

Zur Reaktionskontrolle wurden 5 μl des Ansatzes auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden nach Etidiumbromid-Färbung unter UV-Licht beurteilt. Die PCR-Reaktion wurde mit identischem Ansatz einmal wiederholt, um die Menge des Ausgangsmaterials zu erhöhen. Das Endvolumen beträgt 100 μl.

3.12.3.4 Reinigung des PCR-Produktes

Material:

Qiagen PCR Purification Kit, (Qiagen, Hilden, 28140)

Vorgehensweise:

Der Doppelansatz der PCRs aus 3.12.3.3 wurde mittels des Qiagen-PCR-Purifikation-Kits gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach dem „Qiaquick PCR-Purifikation-Kit Protocol, using a micrcentrifuge“. Die Eluierung erfolgte mit 50 µl H₂O.

3.12.4 Klonierung des Zwischensequenz-Primer-Komplexes in die Vektoren**3.12.4.1 Enzymatisches Schneiden der PCR-Produkte und der Vektoren****Material:**

Gereinigte PCR-Produkte aus 3.12.3.4

Vektoren: pCRTMII, aus einem TA Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande, K 2000-01)

pBSK: pBluskript[®] II SK (+) (Stratagene, Heidelberg, 212205)

Restriktionsenzyme: *EcoRI*, 50 U/µl *Hind* III, 50 U/µl (Fermentas, Leon Roth, ER0273, ER0503) *EcoRI*

Restriktionspuffer (New England Biolabs, Schwalbach, 101)

BSA Fraktion V (Roth, Karlsruhe, 8076.2)

Vorgehensweise:

In einem 70 µl-Ansatz wurden 50 µl des gereinigten PCR-Produktes in *EcoRI*-Puffer mit 100 U *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. Der Reaktionsansatz enthielt 10 % BSA.

Die Vektoren, je 5 µg, wurden in 30 µl-Ansätzen mit den gleichen Enzymen geschnitten. Dabei betrug der Anteil der Vektoren ein Drittel des Gesamtvolumens. Die Inkubation dauerte 1 h bei 37°C. Die Reaktionskontrolle für das PCR-Amplifikat wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel vorgenommen, die für die Vektoren auf einem 0,7%igen Agarose-Gel.

3.12.4.2 Reinigen der Vektoren und des PCR-Amplifikates mit der Freeze-and- Squeeze Methode.**Material:**

s. 3.12.1.2

Vorgehensweise:

Es wurde ein 1%iges Agarose-(bzw. 0,7%iges Agarose- für die Vektoren-) präparatives Gel angefertigt und die geschnittenen Fragmente nach Markierung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit der Freeze-and-Squeeze Methode (s. Kap. 3.12.1.2.) Die Vektor-DNA wurde in 15 µl TE, die des Amplifikates in 10 µl TE resuspendiert. Die Kontrolle des Reinigungsschrittes wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel durchgeführt.

3.12.4.3 Ligation des Zwischensequenz-Primer-Komplexes mit den Vektoren**Material:**

T4-DNA Ligase (20 U/µl) und 10-fach Ligase-Puffer, (MBI Fermentas, Leon Roth, EL 0017)

Vorgehensweise:

Die Ansätze für die Ligation des Zwischensequenz-Primer-Komplexes mit den Vektoren wurden für jeden der Vektoren aus 3.12.4.1 einzeln pipettiert.

Unter Einsatz von 1 U Ligase erfolgte die Reaktion im Verhältnis des Zwischensequenz-Primer-Komplexes zu den Vektoren von 3:1 bei 16°C über Nacht.

3.12.5 Transformation der Vektoren in XL-1-Blue-Bakterien**Material:**

Glycerinkultur von XL-1-Blue-Bakterien

Luria Broth-(LB)-Medium (Life Technologies, Gibco, BRL, Eggenstein, 12795-027),

Medium gelöst in 1 l H₂O_{dest.} pH mit NaOH auf 7,2 eingestellt,
autoklaviert

Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, A 2804), Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O_{bidest.} sterilfiltriert, Aliquots bei -20°C
gelagert

LB/Amp-Medium: LB-Medium mit Ampicillin, Endkonzentration: 50 µg/ml, d.h. 1 ml Ampicillin-Stammlösung auf 1 l Medium, das Medium konnte danach bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert werden.

LB/Amp- Platten: LB-Medium wurde mit Zusatz von 12 g Agar (Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein, 30391-023) autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 50° C mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Anschließend wurde das Medium

sofort auf Platten (94 mm, Greiner, Solingen, 633102) gegossen und offen ca. 30 min unter einer Sterilbank getrocknet. Die Platten konnten danach bei 4°C aufbewahrt werden.

Vorgehensweise:

Von einer bei –80°C gelagerten Glycerinkultur der XL-1-Blue-Bakterien wurde mit einem Spatel eine Lage abgekratzt, in 5 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C über Nacht unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde in 50 ml LB-Medium unter identischen Bedingungen wachsen gelassen bis eine optische Dichte von 0,4 bei 600 nm erreicht wurde (Inkubationsdauer ca. 2-3 Stunden). Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 3000 X g, 4°C) und das Zellpellet in 20 ml 50 mM CaCl₂ suspendiert. Nach der folgenden 30-minütigen Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10 min, 3000 X g, 4°C) wurde das Pellet in 1,5 ml 50 mM CaCl₂ auf Eis suspendiert. 200 µl der Bakteriensuspension wurden dann zu dem Ligationsansatz aus 3.12.4.3. gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann auf 42°C erwärmt (1 min), und wiederum für 5-10 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden 500 µl LB-Medium (angereichert mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄) zugegeben. Die Suspension wurde unter Schütteln (200 rpm) 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (3000 X g 1 min), auf vorgewärmte LB/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.12.6. Analyse der Klone mittels PCR

Material:

Autoklavierte Zahnstocher

96-Loch-Platte (MAGV, Rabenau-Londorf, 163320)

LB/Amp-Medium (s. 3.12.5)

Taq Polymerase, 4 U/µl, 10-fach Puffer mit MgCl₂ (s. 3.12.3.3)

dNTP-Mix, (s. 3.12.3.3.)

Oligonukleotide: M13 forward: 5'd (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC)-3'
M13 reverse: 5'd(AGCGGATAACAATTTACACAGGA)-3'
(Synthetisiert von MWG Ebersberg)

Die Stammlösung von 100 pmol/µl in TE Puffer wurde bei –20°C eingefroren. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol verwendet.

spezifische Primer für β2-Mikroglobulin und IL-2 (s. 3.13)

Vorgehensweise:

Die Bakterienkolonien wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt, in je eine mit 100 µl LB/Amp-Medium versehene Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben und unter Schütteln bei 37° C inkubiert (2-3h), bis das Medium trüb wurde. Mit autoklavierten Zahnstochern wurde pro Vertiefung eine Probe entnommen und mit M13-Primern in einem 10 µl PCR Standardansatz amplifiziert. Dabei betrug die Konzentration der Taq-Polymerase 2 U/Ansatz, die des dNTP-Mixes 10 mM.

PCR- Programm:

95°C	2min	
95°C	1 min	} 35X
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

Die Reaktionsprodukte wurden zur Kontrolle auf 1%ige Agarose-Gele aufgetragen (s. 3.12.3.3). Positive Klone waren durch eine deutliche Bande bei 800 bp zu erkennen.

Unter Verwendung von spezifischen Primern für β2-Mikroglobulin und IL-2 (siehe 3.13) wurde mit 10 positiven Klonen eine PCR nach dem oben beschriebenen Programm vorgenommen (Primer: 20 pmol/ 100µl Ansatz, Taq-Polymerase: 2 U/ 100µl Ansatz) und der Erfolg der PCR wie oben beschrieben kontrolliert.

3.12.6.1 Vermehrung und Reinigung der positiven Klone**Material:**

LB/Amp-Medium (s. 3.12.5)

Qiagen Mini-Prep Kit (Qiagen, Hilden, 12123)

Reaktionskomponenten für die PCR (s. 3.12.3.3)

TE- Puffer (s. 3.12.1.2)

Vorgehensweise:

Die 5 Klone aus 3.12.6, die nach der Amplifikation mit spezifischen Primern im Kontrollgel die stärksten Banden gezeigt hatten, wurden in „Übernachtskultur“ erneut vermehrt. Dafür wurden 3 µl Bakterien in 5 ml LB/Amp-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Die anschließende Reinigung der DNA mit dem Qiagen Mini-Prep-Kit erfolgte nach dem „Qiaprep-Spin-Miniprep-Kit-Protokoll“. Die aufgereinigte DNA wurde in 40 µl H₂O eluiert.

3.12.6.2 Analyse der Klone über Einsatz von spezifischen Primern**Material:**

Reaktionskomponenten für die PCR (s 3.12.3.3)

Spezifische Primer für die Interleukine 2, 4, 5, 10, 13 und IFN γ (s. 3.13)

Gereinigte DNA (aus 3.12.6.1) in einer Verdünnung von 1: 20

Vorgehensweise:

Die Klone wurden mit den spezifischen Primern daraufhin getestet, ob mit allen Primerpaaren nach der Amplifikation und gelelektrophoretischen Auftrennung gleichmäßige Banden erhalten werden konnten. Die Annealing-Temperatur betrug bei allen Primerpaaren außer IL-4 58°C, für IL-4 wurden 54°C gewählt.

Der **PCR-Ansatz** sah wie folgt aus:

PCR Programm:

2,5 µl 10-fach Puffer (ohne MgCl ₂)	2 min	95°C	} 35 X
2,5 µl MgCl ₂	40 sec	94°C	
0,6 µl dNTP	1 min	54°C	
0,125 µl Taq (= 0,5 U)	1 min	72°C	
4 µl Primer (10 pmol /µl)	10 min	72°C	
1 µl DNA aus 3.12.6.1 , 1:20 verdünnt			
14,27 µl H ₂ O			

Für die spätere Sequenzierung der Klone war eine photometrische Ermittlung der Konzentration erforderlich. Dafür wurde die DNA im Verhältnis 1:60 in H₂O verdünnt und die

OD bei den Wellenlängen 260 und 280 bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte kommerziell im Institut für Med. Mikrobiologie der Justus-Liebig Universität Gießen.

Der Klon, dessen Sequenz zu 100 % mit der theoretischen Vorgabe übereinstimmte, wurde in späteren Versuchen als Standard verwendet.

3.12.7 Transkription und reverse Transkription der Standard-DNA

3.12.7.1 Transkription der Standard-DNA in RNA

Material:

DNA des Klons A4 aus 3.12.6.2

T7-Polymerase (20 U / μ l) (Fermentas, Leon Roth, EPO 111)

rNTP-Mix (rATP, rCTP, rGTP, rUTP, je 10 mM) (Böhringer Mannheim, Mannheim, 1277057) mit 5 X Reaktionspuffer

Vorgehensweise:

Die Klon-DNA wurde in RNA transkribiert, damit bei der späteren RT-PCR die Standard- und Proben-RNA den gleichen Bedingungen unterlagen. 2 μ l DNA wurden unter Verwendung von 2 μ l T7-Polymerase (entspricht 40 U), 2 μ l rNTP, 4 μ l 5 X Reaktionspuffer und 10 μ l H₂O 2 h bei 37°C in RNA umgeschrieben. Zur Reaktionskontrolle wurden 4 μ l der erhaltenen RNA auf ein 0,7%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Beurteilung erfolgte nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV.

3.12.7.2 Reverse Transkription der Standard-RNA

Material:

RNA aus 3.12.7.1

MMLV Reverse Transkriptase (inkl. Puffer und DTT) (s. 3.11)

dNTP-Mix (s. 3.11)

Hexanukleotid-Mix (s. 3.11)

Vorgehensweise:

Die in 3.12.7.1 synthetisierte RNA wurde photometrisch gemessen und die Konzentration auf 10 ng / μ l eingestellt. 50 ng RNA wurden wie unter 3.11 beschrieben in cDNA transkribiert.

3.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**Material:**

Robocycler Gradient 96, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Primer für die zu untersuchenden Zytokin-Gene und das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin, synthetisiert von MWG, Ebersberg:

IL-2 forw.: GGCTATCCATCTCCTCAG; rev: CCAAGCAGGCCACAGAATTG

IL-4 forw.: ACGGAGATGGATGTGCCAAACG; rev.: CCGAAAGAGTCTCTGCAGCT

IL-5 forw.: TCACCGAGCTCTGTTGACAA; rev.: CCACACTTCTCTTTTTGGCG

IL-10.forw.: ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG; rev.: TAGACACCTTTGTCTTGGAGCTTA

IL-13 forw.: CCAGAGGATATTGCATTGCCTC; rev.: CCAGCAAAGTCTGATGTGAG

IFN forw.: GCCTCTTCTTGGATATCTGG; rev.: GCGCTGGATCTGTGGGTTG

Micro forw.: CAGCATGAGCCAGGATATAG; rev.: CACTGACCAGCCTGTATGC

Primer-Stammlösung: 100 pmol in TE-Puffer gelöst.

Gebrauchslösung: 10 pmol in H₂O_{dest}

dNTP Mix (s. 3.11)

Taq Polymerase, Reaktionspuffer [(je zur Hälfte 10-fach Reaktionspuffer und (NH₄)₂SO₄.Puffer)] und MgCl₂ (Fermentas, Leon Roth, EP0404)

HotStarTaq™, Reaktionspuffer, MgCl₂ (Qiagen, Hilden, 203205)

3.13.1 Etablierung der PCR**3.13.1.1 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur**

Die optimale Reaktionstemperatur für jedes einzelne Primerpaar wurde mit dem im Gerät enthaltenen Gradientenprogramm ermittelt. Für jeweils drei Proben (Con A stimulierter PBL) wurden PCR-Ansätze bei 52, 54, 56, 58, 60 und 62°C durchgeführt. Anschließend wurde diejenige Temperatur ermittelt, bei der nach gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte, Färbung der DNA mit Ethidiumbromid und optischer Beurteilung des Amplifikates unter UV-Licht sowohl die spezifische Zytokinbande als auch die Standardplasmidbande (s.3.12) deutlich und möglichst ohne Fehlbanden sichtbar wurden.

3.13.1.2 Bestimmung der Zykluszahlen

Um eine quantitative Bestimmung der amplifizierten Zytokin-DNA durchführen zu können, muß die PCR in ihrer exponentiellen Phase analysiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurden für jedes Primerpaar für je drei Proben (wie unter 3.13.1.1 beschrieben) PCR-Läufe im Mehrfach-Ansatz vorgenommen, und die Reaktionen nach 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 und 44 Zyklen beendet. Die Anfangs- und Endzykluszahlen waren für die einzelnen Primerpaare verschieden und richteten sich nach in Vorversuchen gewonnenen Erkenntnissen. So wurde z.B. für β 2-Mikroglobulin der Bereich von 16 bis 32 (36) Zyklen gewählt, für IL-5 von 28 bis 44 Zyklen. Nach der densitometrischen Auswertung der Gele wurden die Werte in das Programm EXEL überführt und in eine logarithmische Skala eingetragen. Hier konnte dann diejenige Zykluszahl bestimmt werden, die sicher in der exponentiellen Phase der Reaktion lag (vergl. Tab. 3.2).

3.13.1.3 Bestimmung der $MgCl_2$ -Konzentrationen und des Reaktionspuffers

Zur Bestimmung der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration wurden verschiedene Proben mit je 1,25, 2,5 und 5 mM $MgCl_2$ im Reaktionsansatz amplifiziert. Die Ergebnisse für jedes Primerpaar wurden nach der densitometrischen Auswertung der Gele im Programm EXEL ermittelt. In Vorversuchen hatte sich weiterhin gezeigt, daß $(NH_4)_2SO_4$ -Puffer, im Gegensatz zu dem standardmäßig eingesetzten 10-fach Puffer, bei einigen Primerpaaren bessere Ergebnisse lieferte. Aus diesem Grund wurden alle Primerpaare mit beiden Puffern [$(NH_4)_2SO_4$ - und 10-fach Reaktionspuffer] getestet. Die getroffene Auswahl ergibt sich aus Tab. 3.2.

3.13.1.4 Verdünnungsassays

Die Menge der für die Amplifikation der einzelnen Primerpaare einzusetzenden cDNA ergab sich aus dem Volumen der Reversen Transkriptionsansätze (s. 3.11). Pro umgeschriebene Probe mußten 7 PCR-Reaktionen durchführbar sein. Aufgrund dieser Überlegungen wurden pro PCR-Ansatz je 5 μ l cDNA eingesetzt. Um sicher sein zu können, daß mit dieser Menge cDNA eine Quantifizierung möglich war, wurden Verdünnungsstudien durchgeführt. Dazu wurden für verschiedene cDNA-Proben eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 angefertigt. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurden mit den Primerpaaren der zu detektierenden Zytokine amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate und Färben

der Gele mit Ethidiumbromid wurden die Banden densitometrisch ausgewertet und die Korrelation der Bandenstärke zu der eingesetzten Verdünnungsstufe berechnet.

3.13.1.5 Untersuchung der Amplifikationskonstanz

Das Erfassen der Variationen zwischen einzelnen Reaktionsgefäßen eines PCR-Laufes (tube-to-tube variation) bzw. zwischen verschiedenen PCR-Läufen (run-to-run-variation) war notwendig, um bei der späteren Auswertung der Ergebnisse die geräte- oder pipettierbedingten Abweichungen mit einbeziehen zu können. Geringe Unterschiede zwischen den Amplifikaten ermöglichen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

3.13.1.5.1 Untersuchung der Variationen zwischen Gefäßen eines PCR-Laufes (tube-to-tube variations)

Es wurden verschiedene Proben mit den verschiedenen Primerpaaren in Dreifachansätzen amplifiziert, die Werte der Bandenstärken nach der densitometrischen Auswertung miteinander verglichen und die Standardabweichungen und der Variationskoeffizient berechnet.

3.13.1.5.2 Untersuchung der Variationen zwischen verschiedenen PCR-Läufen (run-to-run variations)

Es wurde wie unter 3.13.1.5.1 verfahren, nur wurden diesmal die Werte der Banden gleicher Proben aus verschiedenen PCR- Läufen miteinander verglichen.

3.13.2 Durchführung der PCR

Vorgehensweise:

Aus Vorversuchen war hervorgegangen, daß sich die Reaktionsmuster der einzelnen Primerpaare sowohl bezüglich der Annealingtemperatur als auch der optimalen Konzentration von $MgCl_2$ und dem verwendeten Puffer z.T. erheblich unterschieden. Da die Ergebnisse für die Zytokin-Gene IL-2 und IL-4 in den unter 3.13.1.1 bis 3.13.1.3 aufgeführten Experimenten teilweise inkonsistent waren, bzw. Fehlbanden auftraten, wurde für diese Primerpaare HotStarTaq™ verwendet, die erst nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 95°C aktiv wird und somit frühzeitige Entstehung von Fehlamplifikationen verhindert. Desweiteren gilt diese Polymerase als effektiveres Enzym, was vor allem bei den Amplifikationen von IL-4 wichtig

war. Aus diesem Grund wurde für jedes Primerpaar ein eigenes PCR-Schema entworfen (siehe Tab. 3.2).

Tab: 3.2 Reaktionsbedingungen für die eingesetzten Primerpaare

Primer für	Annealing Temp	Puffer	MgCl ₂ -Konz.	Zahl der Zyklen	Menge Plasmid
β2Mikroglobulin	54°C	10XPCR Puffer	2,5mM	28	60fg
IL-2	56°C	Hot-Star-Taq	1,25mM	36	200fg
IL-4	54°C	Hot-Star-Taq	1,25mM	36	5fg
IL-5	58°C	(NH ₄) ₂ SO ₄ Puffer	2,5mM	40	5fg
IL-10	60°C	(NH ₄) ₂ SO ₄ Puffer	2,5mM	36	1,5pg
IFNγ	58°C	(NH ₄) ₂ SO ₄ Puffer	2,5mM	34	20fg

Das für den Hauptversuch eingesetzte Reaktionsgemisch setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- H₂O variabel
- Puffer (Art je nach Primerpaar) 5 µl
- MgCl₂ (verschiedene Konzentrationen) 5 µl
- dNTP-Mix (10 mM) 1,2 µl
- Taq-Polymerase (verschiedene Arten) 1µl
- Primer (nach zu amplifizierendem Zytokin) 4 µl
- Plasmid-cDNA (verschiedene Konzentrationen) 1µl
- Proben-cDNA 5µl

Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl.

Das Basisprogramm der PCR sah wie folgt aus:

2 min 95°C	1 Zyklus
bzw. 15 min bei HotStarTaq	
1 min 95°C	}
1,5 min Annealing je nach Primer	
1,5 min 72 °C	
5 min 72 °C	1 Zyklus

3.14 Auftrennung der Amplifikate in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material:

7,5%ige Polyacrylamid Stamm-Lösung: 93,75 ml 40 X Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 50 ml 10X TAE-Puffer, ad 500ml H₂O_{dest.}

40 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: 40 g Acrylamid (Sigma, Deisenhofen, A 8887), 1,2 g Bisacrylamid (Sigma, Deisenhofen, M7279) ad 100 ml H₂O_{dest.}

50X TAE Puffer (s. 3.12.1.1)

10 % Ammonium Persulfat-Lösung (APS): 1 g APS (Biorad, München, 1610700) ad 10 ml H₂O_{dest.}. Die Lösung wurde in Aliquots von 200 µl bei –20°C aufbewahrt.

Tetramethylethyldiamin (TEMED), (Serva, Heidelberg, 35925)

Probenpuffer für DNA: 40 % Sucrose (Sigma, Deisenhofen, S0389), 0,25 % Bromphenol, 0,25 % Xylene Cyanol FF (Sigma, Deisenhofen, X4126)

DNA Gene Ruler Ladder Mix (Fermentas, Leon Roth, SM0331)

Ethidiumbromid Lösung (siehe 3.12.1.1)

Vorgehensweise:

Die Mischung aus 5 ml Polyacrylamid-Stammlösung, 50 µl 10 % APS und 5,7 µl TEMED (Angaben pro ein Gel) wurde in eine Gelgießkammer für Gele mit einer Stärke von 0,75 mm gegossen, mit einem Haartrockner kurz erwärmt, um das Polymerisieren zu beschleunigen und dann weitere 10 min zum endgültigen Auspolymerisieren bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Im Anschluß wurden die Gele in eine Gelapparatur eingesetzt und diese in eine mit 1X TAE-Puffer gefüllte Gelkammer (BIO-RAD, München, bzw. von Keuz, Reiskirchen) gestellt. Das Laden der Geltaschen mit den PCR-Proben erfolgte mit einer 50 µl Hammilton-Pipette. Dazu wurde der 50 µl PCR-Ansatz mit 5 µl 10-fach- Ladepuffer versetzt und je Geltasche und Probe 20 µl des Gemisches aufgetragen. Als Größenstandard wurden 1,5 µl DNA Gene Ruler Ladder Mix, versetzt mit 2-fach Ladepuffer 1:5 aufgezogen und 5 µl davon aufgetragen. Der Auftrennungsvorgang erfolgte bei 120 V und 293 mA für 50 min. Anschließend wurden die Gele für 15 min in Ethidiumbromidlösung inkubiert. Hierdurch färbten sich die DNA-Banden an und konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.15 Quantifizierung der PCR-Amplifikate

3.15.1 Auswertung der Gele

Material:

Videodokumentationssystem 2000i (MWG-Biotech, Ebersfeld)

Analysesoftware One-D-Scan (Scanalytics)

3,5"-Disketten

Vorgehensweise:

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht und das Bild mit Hilfe des Videodokumentationssystems auf Diskette gespeichert. Mit Hilfe der Analysesoftware konnten dann die Banden densitometrisch ausgewertet werden. Als Einheiten verwendet die Software die sog. Integrierte optische Dichte (Int.OD), die die in den gemessenen Banden enthaltene Menge der amplifizierten DNA direkt widerspiegelt.

Die Daten wurden mit dem Programm EXEL weiterverarbeitet.

3.15.2 Berechnung der relativen DNA-Mengen

Um die nach 3.15.1 erhaltenen Werte miteinander vergleichen zu können, mußte neben der eingangs erfolgten fluorometrischen Bestimmung der eingesetzten RNA-Menge (vergl. 3.10) ein weiterer Mengenstandard eingesetzt werden, mit dessen Hilfe die Proben aneinander angeglichen werden konnten. Hierzu diente das sog. Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin, das theoretisch unabhängig vom Stimulationsstatus in jeder Zelle gleichermaßen transkribiert wird. Aus den nach der densitometrischen Auswertung aller Gele erhaltenen Daten für die Ergebnisse von β 2-Mikroglobulin-DNA wurde willkürlich ein Wert herausgegriffen und dieser als sog. **Referenzwert** eingesetzt.

Das in 3.12 beschriebene Standardplasmid wurde in für die einzelnen Primerpaare spezifischen Mengen in jeder PCR-Reaktion mitamplifiziert, so daß später eine Aussage über die relativen Mengen der amplifizierten Proben cDNA möglich war. Auch für das Plasmid wurde ein willkürlicher Referenzwert aus den Ergebnissen der β 2-Mikroglobulin-DNA-Werte ausgesucht, so daß ein Proben-Referenzwert und ein Plasmid-Referenzwert vorlagen.

Zunächst wurden die Plasmidbanden von β 2-Mikroglobulin „normalisiert“, da davon ausgegangen werden konnte, daß in jeder Reaktion exakt die gleiche Menge Standard vorhanden war. Das Normalisieren der Plasmidbanden dient dazu, Schwankungen während der PCR-Läufe, Pipettierfehler, Fehler, die beim Auftragen auf die Gele entstanden u.s.w. auszugleichen. Hierzu wurde der

1. Angleichungsfaktor (Plasmid) gebildet:

β 2-Mikroglobulin Plasmid-Referenzwert / β 2-Mikroglobulin-Plasmidwert

Die Normalisierung der β 2-Mikroglobulin-Proben-Bande erfolgte dann durch Multiplikation des Angleichungsfaktors (Plasmid) mit den Werten der jeweiligen Probenbande.

2. Angleichen der β 2-Mikroglobulin-Proben-Bande an die Plasmid-Bande:

Angleichungsfaktor (Plasmid) * β 2-Mikroglobulin-Proben-Wert

Jetzt wurde der Angleichungsfaktor (Probe) gebildet, der die Messungenauigkeiten bei der RNA-Messung ausgleicht. Nach diesem Normalisierungsschritt sind theoretisch die Ausgangsmengen an RNA aller Proben gleich:

3. Angleichungsfaktor (Probe):

β 2-Mikroglobulin-Referenzwert / angegliche β 2-Mikroglobulin-Proben-Bande (s. 2)

Um auch bei den Probenbanden die Fehler innerhalb der PCR-Läufe auszugleichen wurde auch hier für jedes Zytokin ein Angleichungsfaktor (Plasmid) gebildet (s. 1), mit welchem alle Zytokinprobenwerte multipliziert wurden.

Mit Hilfe des Angleichungsfaktors (Probe) (s. 3.) konnten die Werte aller Zytokintranskriptbanden standardisiert werden. Dies diente dazu, die Fehler der reversen Transkription sowie beim Messen der RNA auszugleichen. In Anhang IV sind beispielhaft die Angleichungsfaktoren (Probe) für die Gruppe ZI dargestellt.

4. Angleichen des Zytokintranskriptwertes

Proben-Angleichungsfaktor * Zytokintranskript der einzelnen Proben.

Zur Bestimmung der relativen Menge des Transkriptes wurde der angegliche Probenwert durch die jeweilige Plasmidbande geteilt und mit der Menge an eingesetztem Plasmid (in fg) multipliziert. So konnte der **Endwert** (amplifizierte cDNA der Probe in fg relativ zum eingesetzten Standard) ermittelt werden.

- **Endwert:**

(normalisierter Probenwert /Plasmidwert) *eingesetzte Menge Plasmid (in fg)

3.16 Southern Blot-Analyse

Mit der Southern Blot-Analyse sollte die Spezifität der Amplifikate für jedes zu bestimmende Zytokin-Gen und dem Gen des β 2-Mikroglobulins überprüft werden. Dazu wurden Sonden aus den entsprechenden *M. coucha*-cDNA-Sequenzen ausgewählt und mit dem PCR-Amplifikat des jeweiligen Zytokins hybridisiert.

3.16.1 Auswahl und Vorbereitung der Sonden

Material:

Sonden von *M. coucha*, die Sequenzen wurden freundlicherweise von Dr. Anja Taubert, Gießen zur Verfügung gestellt.

IL-2: CCACAGTTACTGACTCATCATCGAATTG

IL-4: CTGTAGGGCTTCCAAGGTGCTTCGC

IL-5: AGACATACTGAAGAATCAAAGTGTCCG

IL-10: GCATCCTGAGGGTCTTCAGCTTCTCTCC

IL-13: TTCCACTGAGGAGAGACCAGCCCTGG

IFN CAACCAGGCCATCAGCAACATAAGCG

β 2-Mikroglobulin: GTGATACATAGCAGTTCAGGAAG

synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg

TE-Puffer, (s. 3.12.1.2)

DIG Oligonukleotide Tailing Kit (Boehringer Mannheim, 1417231)

Vorgehensweise:

Die Sonden wurden nach Angaben der synthetisierenden Firma mit TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 100 pmol verdünnt. Die Markierung mit Digoxigenin-dUTP erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die markierten Sonden wurden in je 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen.

3.16.2 Gelelektrophorese und Transfer der DNA auf eine Nylonmembran**Material:**

TAE-Puffer (s. 3.12.1.1)

1%ige Agarose-Lösung (s. 3.12.1.1)

DNA-Ladepuffer (s. 3.10)

Ethidiumbromid-Lösung (s. 3.12.1.1)

0,25 M HCL: 2,1ml 36%ige HCL (Merck, Darmstadt, 100317) in 97,9 ml H₂O_{bidest}

Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)

Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCL, pH 7,4 (ICN, Eschwege, 78218), 1,5 M NaCl)

20X SSC: 2 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat• 2H₂O (Sigma, Deisenhofen, S 4641), pH mit 1 M HCL auf 7.0 eingestellt, autoklaviert.

3 mm-Filterpapier (Whatman, Maidstone, UK, 3003931)

Nylonmembran, ungeladen (Nytran[®]; Porengröße 0,45 µm; Schleicher und Schuell, Dassel, 414594)

Vorgehensweise:

cDNA aus mit Con A stimulierten PBL (s. 3.8) wurde mit Primern für IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ und β 2-Mikroglobulin (s. 3.13) amplifiziert. 5 µl der Reaktionsprodukte wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 120 V für 40 min aufgetrennt. Nach Beendigung des Trennvorganges wurde das Gel für 15 min mit Ethidiumbromid gefärbt und neben einem Lineal fotografiert. Anschließend wurde das Gel zunächst 5 min in 0,25 % HCL-Lösung depuriniert, dann wurde es je zweimal 15 min in Denaturierungslösung und in Neutralisierungslösung unter Schwenken gewaschen. Ein 3 mm Filterpapier wurde auf die Größe der Fritten-Platte des Vakuum- Blotters zugeschnitten und mit 10 X SSC angefeuchtet. Die Nylonmembran wurde auf Größe des Gels zugeschnitten und mit 2 X SSC angefeuchtet. Nach Anordnung der einzelnen Komponenten lag das Filterpapier der Blotapparatur direkt auf, darauf wurde die Nylonmembran so plaziert, daß sie genau unter der 13,5 X 10,5 cm großen Aussparung einer Gummimatte lag. Auf diese Aussparung wurde das Gel gelegt, und die

Apparatur geschlossen. Nach Anlegen eines Unterdruckes von 0,5 bar wurde der Innenraum des Blotters mit so viel 10 X SSC aufgefüllt, daß das Gel bedeckt war. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte in 45 min bei gleichbleibendem Unterdruck. Nach Beendigung wurden die Taschen des Gels mit Kugelschreiber auf der Membran markiert, das Gel zur Kontrolle mit Ethidiumbromid rückgefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Die Nylonmembran wurde zunächst in 2 X SSC gewaschen, auf einem 3 mm Filter getrocknet und anschließend die enthaltene DNA kreuzvernetzt (1 h bei 80°C).

3.16.3 Hybridisierung und Nachweis der Produkte

Material:

- 50X Denhardt's Reagenz: 5 g Ficoll, Typ 400 (Sigma, Deisenhofen, F 4375)
 5 g Polyvinylpyrrolidon (Serva, Heidelberg, 33410)
 5 g BSA, Fraktion V (Roth, Karlsruhe, 8076.2) in 500 ml H₂O_{bidest},
- Prähybridisierungslösung: 6 X SSC (Stammlösung, s. 3.12.2)
 0,5 % SDS (Serva, Heidelberg, 20760), Stammlösung: 10 % in H₂O_{bidest}
 5 X Denhardt's Reagenz
 100 µl/ml Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim, Mannheim, 223646), 5 min
 in 95°C Wasser denaturiert
- Hybridisierungslösung: 5 ml Prähybridisierungslösung und 5 µl Sonde (DIC markiert, s. 3.16.1)
- „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Boehringer Mannheim, 1093657)
- Waschlösung 1: 2X SSC und 0,1% SDS (Serva, Heidelberg, 20760)
 SDS-Stammlösung: 10 % in H₂O_{bidest}, autoklaviert.
- Waschlösung 2: 0,1X SSC und 0,1 % SDS
- Maleinsäurepuffer: Stammlösung: 0,1M Maleinsäure (Sigma, Deisenhofen, M 0375), 0,15 M NaCl,
 angesetzt als fünf-fach Puffer mit NaCl-Plätzchen, auf pH 7,5 eingestellt,
 autoklaviert; 1:5 verdünnt in H₂O_{dest}.
- Blockierlösung: 10X Stammlösung: 10 % Blockierreagenz aus dem “DIG DNA Labeling und
 Detection Kit” in Maleinsäurepuffer, in der Mikrowelle aufgeköcht und autoklaviert.
- Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat aus dem “DIG DNA Labeling und Detection Kit”, 1:10.000 in Blockierlösung
 verdünnt
- “Circum Vent™ Phototope™ Kit” (New England Biolabs, Schwalbach)
- Waschlösung II aus dem “Circum Vent™ Phototope™ Kit”: 100mM Tris HCL, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH
 9,5, 1:10 verdünnt in H₂O_{dest}.
- Diluent Lumingen aus dem “Circum Vent™ Phototope™ Kit”
- Luminent PPD Reagent aus dem “Circum Vent™ Phototope™ Kit”
- Kommerzielle Folie
- Röntgenfilm

Vorgehensweise:Prähybridisierung

Die Prähybridisierungslösung wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt bis sie klar erschien. Dann erst wurde die denaturierte Heringssperma-DNA zugegeben. Die die DNA tragende Nylonmembran wurde den Spuren entsprechend in Streifen geschnitten. Jeder Streifen wurde in 15 ml der Lösung bei 45 °C 1 h inkubiert.

Hybridisierung

Je 5 ml frisch angesetzter Prähybridisierungslösung wurden 5 µl Sonde (s. 3.16.1) zugegeben. In dieser Mischung wurde die Blotstreifen über Nacht bei 50°C inkubiert.

Waschen

Die Blotstreifen wurden unter rotierender Bewegung 2 X 15 min mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur, 2 X 15 min mit Waschlösung 2 bei 50°C, 5 min mit Maleinsäurepuffer bei Raumtemperatur und 30 min mit Blockierlösung bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur in der Anti-Digoxigenin-AP-Konjugatlösung. Nach Beendigung der Reaktion wurde erneut gewaschen (bei Raumtemperatur, 2 X 15 min mit Maleinsäurepuffer und 2 X 5 min mit Waschlösung II aus dem "Circum Vent™ Phototope™ Kit).

Aus handelsüblicher Folie wurde eine Tasche geschweißt, in welcher die Blotstreifen zusammen mit einer Mischung aus 4,95 ml Diluent Lumingen und 50 µl Luminent PPD für ca. 5 min unter leichter Massage des Päckchens inkubiert wurden. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Flüssigkeit entfernt und die Tasche erneut verschlossen.

Die Detektion der Banden erfolgte durch Auflegen des Päckchens auf einen Röntgenfilm für 25 min.

3.17 Statistische Analysen

Die Auswertung der Daten erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes BMDP vorgenommen. Die graphischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm EXEL Version 2000 (Microsoft) erzeugt.

Alle Zytokindatensätze waren rechtsschief verteilt, d.h. sie mußten zur Ermittlung der Signifikanzen logarithmisch transformiert werden. Die Beschreibung dieser Daten erfolgte dann mit Hilfe der geometrischen Mittelwerte (x_g) und des Streufaktors (SF).

Für die statistische Auswertung der Zytokinassays wurden die Hauptversuche in zwei Gruppen unterteilt. In Gruppe 1 wurden infizierte, nicht behandelte Tiere und nicht infizierte Tiere miteinander verglichen, in Gruppe 2 wurden pro Rechnungsdurchgang jeweils eine der drei infizierten, behandelten Gruppen mit der infizierten, nicht behandelten Kontrollgruppe verglichen (zur Beschreibung der Gruppen, siehe Tab. 4.1). Die Prüfung erfolgte zunächst mittels dreifaktorieller Varianzanalyse (Meßwiederholungen im Faktor Zeit und Antigen). In einem zweiten Schritt wurde dann für jedes Zytokin und jedes Antigen einzeln eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen im Faktor Zeit vorgenommen. Die Signifikanzberechnungen erstreckten sich auf die Unterschiede der Gruppen (z. B. behandelt, nicht behandelt), den Einfluß der verschiedenen stimulierenden Antigene und den Stimulationstag. Weiterhin wurden Wechselbeziehungen zwischen Gruppe und Antigen, Gruppe und Tag sowie Antigen und Tag berechnet.

In Zahlen lassen sich die Signifikanzen wie folgt ausdrücken:

$P \leq 0,001$: hochsignifikant

$P \leq 0,01$: signifikant

$P \leq 0,05$: schwach signifikant

$P \geq 0,05$: nicht signifikant (n.s.)

4. Versuchsaufbau

4.1 Vorversuche

Da die Zytokingentranskription bei *M. coucha* in Reaktion auf verschiedene *B. malayi*-Antigene und Con A in einer echten Verlaufsuntersuchung studiert werden sollte, wurden periphere Lymphozyten als Ausgangszellen für die Analysen verwendet.

Es mußte daher zunächst eine Methode der Lymphozytenisolierung etabliert werden, die auf geringe Mengen Blut ausgerichtet war.

Als zweiter Schritt wurde ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt aus der relativ geringen Anzahl von Ausgangszellen genügend RNA für die RT-PCR zu gewinnen.

Weiterhin mußte eine Meßmethode gefunden werden, mit der diese geringen Mengen RNA genau bestimmt werden konnten, da für die semiquantitative RT-PCR die Menge der Ausgangs-RNA entscheidend ist.

Ausgehend von einer cDNA-Bank von *M. coucha* wurden Primer für die zu bestimmenden Zytokine und das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin entwickelt und die Konditionen für die RT-PCR etabliert. Dazu wurden von insgesamt über 50 Tieren zu verschiedenen Infektionszeitpunkten sowohl PBL als auch Milzzellen gewonnen und mit Con A oder *B. malayi*-Weibchen- und Mikrofilarien-Antigen stimuliert.

Zur Standardisierung und Quantifizierung der PCR wurde ein interner Standard in Form eines Plasmids mit den Sequenzen der „Zytokinprimer“ und der Primer für β 2-Mikroglobulin sowie einer Platzhaltersequenz verwendet. Letztere war notwendig, damit bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate die „Zytokinbande“ und die „Plasmidbande“ unterschiedliche Größen aufwiesen. Die Zahl der Standardplasmid- und Ziel-cDNA-Moleküle sollte laut Platzer und Blankenstein (1993) nicht zu weit voneinander abweichen, da es sonst zu Konkurrenz um Primerbindungsstellen kommen kann und eine Quantifizierung nicht mehr uneingeschränkt möglich ist. Optimal wäre ein Verhältnis von 1:1, die Bereiche von 0,1-10:1 sollten aber nicht über- oder unterschritten werden. Deshalb wurden im Anschluß die Reaktionsbedingungen des Plasmids untersucht sowie die für jeden Primer einzusetzende, individuelle Plasmidmenge bestimmt.

4.2. Hauptversuche

Im Verlauf der Hauptversuche sollten die Transkriptionsprofile für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IFN γ in Abhängigkeit von zur Stimulation eingesetzten Mitogenen und verschiedenen *B. malayi*-Antigenen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion und bei behandelten Tieren nach der Behandlung untersucht werden. Vergleichend dazu sollten die Proliferationsleistungen der Zellen in Reaktion auf die gleiche Stimulation bestimmt werden. Für die Zytokinanalysen und die Proliferationsassays wurden jeweils 5 Gruppen à 6 Tieren zusammengestellt (vergl. auch Tab. 4.1) und wie folgt benannt:

- a) nicht infiziert, nicht behandelt: ZK bzw. PK
- b) infiziert, nicht behandelt: ZI bzw. PI
- c) infiziert, behandelt mit CGP 20376: ZCGP bzw. PCGP
- d) infiziert, behandelt mit Flubendazol: ZFlub bzw. PFlub
- e) infiziert, behandelt mit Bay 44-4400: ZBay bzw. PBay

Die Analysezeitpunkte richteten sich nach der Entwicklung der Parasiten im Wirt:

Tag 18 p.i.: nach der ersten Häutung im Wirt findet sich die Larve 4;

Tag 35 p.i.: nach Abschluß der letzten Häutung;

Tag 60 p.i.: Präadulte finden sich;

Tag 90 p.i.: Beginn der Patenz;

Tag 130 p.i.: Anstieg der Mikrofilariämie;

Tag 230 p.i.: anhaltende Mikrofilariämie.

Die behandelten Gruppen und die zugehörigen infizierten Vergleichsgruppen ZI und PI wurden zusätzlich am Tag 172 (entspricht Tag 34 nach Behandlung) untersucht. Die isolierten Zellen wurden jeweils mit Antigen von adulten *B. malayi*-Weibchen und -Männchen, von -Mikrofilarien und -L3 stimuliert. Als Positivkontrolle diente Con A, als Negativkontrolle Medium ohne Zusätze.

Die Behandlung der Tiere erfolgte am Tag 129 in der Phase der ansteigenden Mikrofilariämie.

An jedem Stimulationstag und an den Tagen 3, 7, 14, 21, 28, 34, 42, 56, 70 und 84 nach Behandlung wurde die Mikrofilariendichte im Blut der Einzeltiere bestimmt.

Am Ende der Versuchsreihe wurden alle Tiere seziiert, die adulten Filarien nach Männchen und Weibchen sortiert, gezählt und die Lymphgefäße und Lymphknoten der Versuchstiere mit Hilfe eines Kompressoriums auf verkapselte Stadien untersucht.

Für die Zytokinanalysen wurden die Zellen nach der Stimulation lysiert und eingefroren. Die Isolierung der mRNA erfolgte fortlaufend in kleineren, labortechnisch praktikablen Probenmengen. Nach Abschluß des Versuches wurden alle mRNA-Proben gemessen und revers transkribiert. Die anschließenden PCR-Analysen erfolgten in der Art, daß jeweils alle cDNA-Proben mit den Primern eines der Zytokine und denen des Housekeeping-Gens für β 2-Mikroglobulin amplifiziert wurden, dann mit einem weiteren u.s.w. Pro Zytokin waren 9 PCR-Läufe notwendig. Die Reagenzien für diese Läufe wurden vorher aus einer Charge mengengenau aliquotiert und eingefroren, so daß die PCR-zu-PCR-Variationen möglichst gering blieben.

Aus 764 mRNA-Proben ergaben sich so 4584 PCR-Proben. Die gelelektrophoretische und densitometrische Auswertung der resultierenden 573 Polyacrylamid-Gele erfolgte nach Beendigung aller PCR-Läufe.

Die Zellen der Proliferationsassays wurden jeweils am Ende der Stimulationszeit mit dem Zellernter aus den Stimulationsplatten entnommen und in Szintillationsgefäße überführt. Die Messung erfolgte fortlaufend an der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Tab. 4.1: Übersicht über die in den Hauptversuchen eingesetzten Gruppen

Gruppe	Tierzahl	Blutentnahme Tage p.i.							Assay	
		18	35	60	90	130	172	230	Zytokin	Proliferation
ZK	6	X	X	X	X	X		X	X	
ZI	6	X	X	X	X	X	X	X	X	
ZCGP	6					X	X	X	X	
ZFlub	6					X	X	X	X	
ZBay	6					X	X	X	X	
PK	6	X	X	X	X	X		X		X
PI	6	X	X	X	X	X	X	X		X
PCGP	6					X	X	X		X
PFlub	6					X	X	X		X
PBayC	6					X	X	X		X

Die Gruppen ZCGP und PCGP wurden am Tag 129 mit einem Adultizid und Mikrofilarizid, die Gruppen ZFlub und PFlub mit einem Adultizid und die Gruppen ZBay und PBay mit einem Mikrofilarizid behandelt. Bei allen Gruppen wurden die Zellen mit *B. malayi*-Weibchen, -Männchen, -L3, und -Mikrofilarien-Antigen und dem T-Zell-Mitogen Con-A stimuliert.

5. Ergebnisse

5.1. Etablierung der Stimulationsassays mit PBL von *M. coucha*

5.1.1 Bestimmung der geeigneten Con A-Konzentration

Con A wurde in allen Stimulationsversuchen von PBL (vergl. 3.8 und 3.9) als Positivkontrolle verwendet, da es als potentes T-Zell-Mitogen wirkt.

Die optimal stimulierende Konzentration von Con A wurde durch mehrere Proliferationsassays ermittelt. Hierzu wurden Zellen von infizierten Tieren und von nicht infizierten Tieren herangezogen, um eventuelle Veränderungen der Proliferationsleistung der Zellen auch in Reaktion auf unspezifische Stimulantien nach der Infektion zu erfassen. Da in den vorgenommenen Experimenten die Proliferationsmaxima aller Tiere mit einer Ausnahme bei Con A-Konzentrationen zwischen 3 und 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lagen, wurden 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Con A für die Stimulation der PBL ausgewählt (s. Abb. 5.1 und Abb. 5.2).

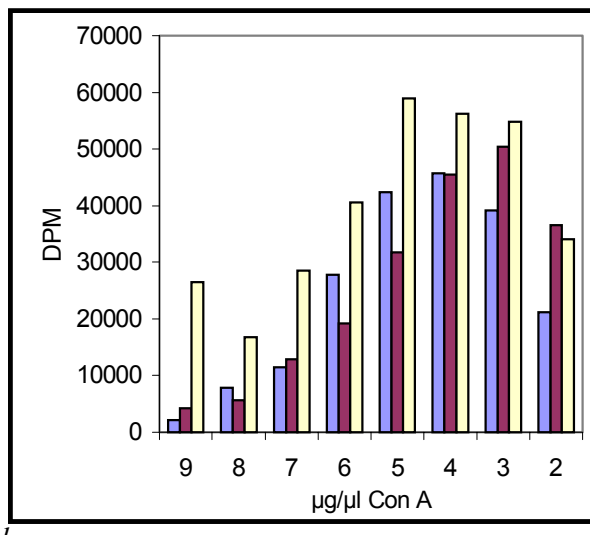


Abb. 5.1
Proliferation peripherer Blutlymphozyten von *M. coucha* (gemessen am Einbau von ^3H -Thymidin) nach Stimulation mit Con A in unterschiedlichen Konzentrationen (3 Spendertiere, vergl. Markierung der Säulen)

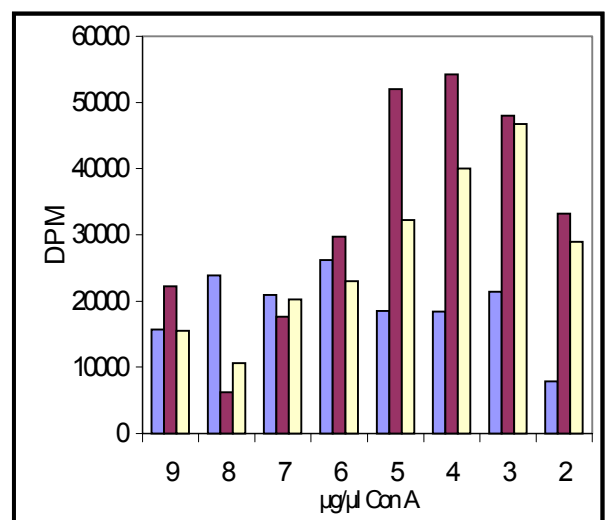


Abb. 5.2
Proliferation peripherer Blutlymphozyten von *B. malayi*-infizierten *M. coucha* [gemessen am Einbau von ^3H -Thymidin nach Stimulation mit Con A in unterschiedlichen Konzentrationen (3 Spendertiere)]

¹ DPM = decay per minute

5.1.2 Bestimmung der geeigneten *B. malayi*-Antigen-Konzentrationen

In Proliferationsversuchen mit *B. malayi*-Weibchen-, Männchen-, Mikrofilarien- und L3-Antigenen wurden zum einen starke tierspezifische Unterschiede beobachtet, zum anderen erwiesen sich die Zellen infizierter Tiere als sehr hyporesponsiv (ohne Abbildung), so daß keine einheitliche Aussage getroffen werden konnte. Die Konzentrationen für die Stimulation wurden deshalb aus einer Kombination eigener Beobachtungen und Literaturangaben ausgewählt und einheitlich mit 20 µg/µl festgelegt (vergl. Schönfeld, 1998).

5.2 Gewinnung und Quantifizierung der mRNA

5.2.1 Gewinnung der mRNA

Mit der in 3.9 dargestellten Methode zur Gewinnung von mRNA aus isolierten und stimulierten PBL und deren anschließender reverser Transkription zu cDNA ließen sich zuverlässige Ergebnisse erzielen. Von 764 Proben war die mRNA nur in zwei Proben degradiert, d.h. bei anschließender PCR mit den β2-Mikroglobulin-Primern war kein Amplifikat nachweisbar.

5.2.2 Quantifizierung der mRNA

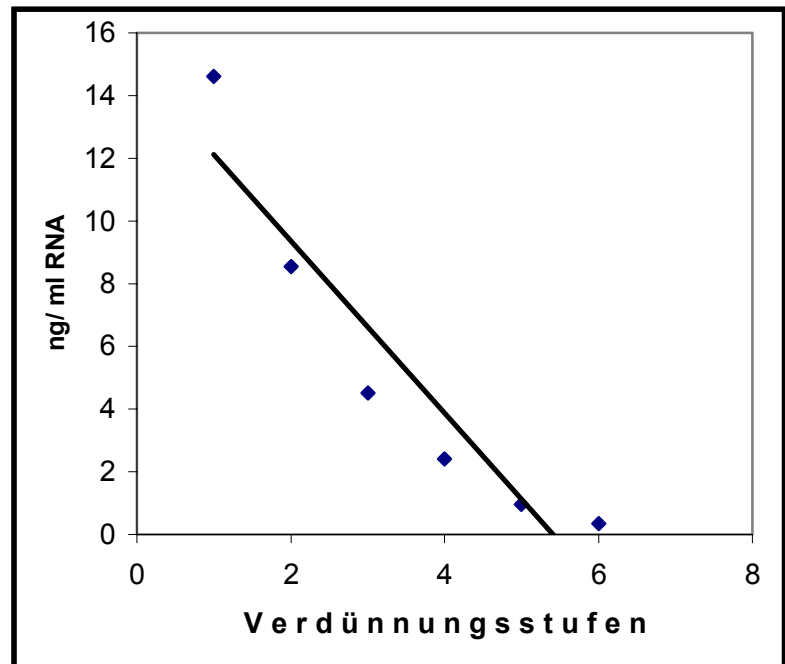
5.2.2.1 Etablierung der Messkonditionen des Fluorometers

Da die erhaltenen Mengen an mRNA für eine photometrische Bestimmung der Konzentration zu gering waren, wurde die Konzentrationsmessung mit Hilfe eines Fluorometers durchgeführt. Das System erwies sich als sensitiv genug, um Konzentrationen von bis zu 2 ng/ml sicher nachweisen zu können. In Verdünnungsstudien, in denen die mRNA bei jedem Schritt mit TE-Puffer 1:1 verdünnt wurde, zeigte sich für die ermittelten mRNA-Konzentrationen bis zu diesem Wert einen linearen Verlauf (Abb 5.3).

Die Standardabweichung der Meßwerte, bezogen auf ein Meßfeld (6 X 12 Vertiefungen, = 96 Werte), betrug durchschnittlich 0,11. Für den Variationskoeffizient² wurden 3,2 % errechnet, d. h., bei den Meßwerten mußte mit einer Abweichung von bis zu 3,2 % gerechnet werden.

² Der Variationskoeffizient errechnet sich aus dem Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert.

Abb. 5.3. Verdünnungsstudie von mRNA, in der die Ausgangsmenge bei jedem Schritt mit TE-Puffer 1:1 verdünnt wurde. Die Verdünnungsstufen sind als Funktion der mit dem Fluorometer ermittelten Konzentration der RNA dargestellt



5.2.2.1.1 Standardkurven

Die Standardkurve wurde aus mit dem Fluoreszenzfarbstoff mitgelieferter rRNA für jede Messung neu erstellt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Abweichungen der einzelnen Messplatten zueinander größer waren als der mittlere Pipettierfehler, so daß ein genaueres Messergebnis erreicht werden konnte, wenn die Standardkurven jeweils neu ermittelt wurden. Abb. 5.4. zeigt beispielhaft eine solche Standardkurve bei rRNA-Konzentrationen von 200, 100, 50, 25, 5 und 1 ng/ ml (jeweils zwei Messungen / Konzentration).

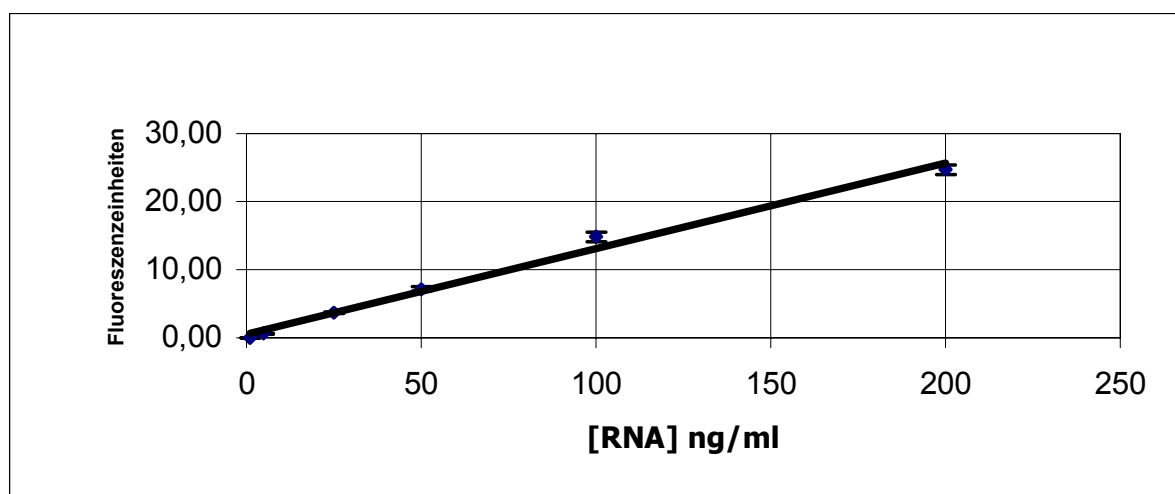


Abb.5.4: Beispiel einer Standardkurve (Eichkurve) zur fluorometrischen RNA-Bestimmung (Mittelwerte aus Doppelansätzen unter Verwendung von rRNA).

5.2.2.2 Messung der Proben-RNA

Mit der in 3.10.2 beschriebenen Methode ließen sich zuverlässige Ergebnisse erzielen. Die Meßergebnisse befinden sich im Anhang I, Tab. A1

5.3 Etablierung der semiquantitativen RT-PCR

5.3.1. Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription

cDNA wurde als Template für die semiquantitative PCR verwendet. Dazu wurde die mRNA revers transkribiert. Da der Ansatz für die reverse Transkription bei einem Gesamtvolumen von 45 µl eine Höchstmenge von 26,5 µl mRNA zuließ (siehe 3.11), wurde eine Menge von 650 pg/µl mRNA für die reverse Transkription festgelegt. Unter diesen Bedingungen lag der Schwellenwert, über dem eine reverse Transkription möglich war, bei 25 pg/µl. Von 764 gemessenen Proben erreichten 68 diesen Wert nicht.

5.3.2. Das Standardplasmid

Das Standardplasmid enthielt alle für die späteren Analysen verwendeten Primerpaare. Es wurde in jedem PCR-Ansatz mitamplifiziert und konnte aufgrund seiner bekannten Konzentration zur Quantifizierung der Proben-DNA eingesetzt werden.

Mit der in 3.12.1.1 beschriebenen Methode ließ sich die Zwischensequenz-DNA, die später im Plasmid als Platzhaltersequenz diente, exakt schneiden. Die Platzhaltersequenz war nötig, um nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte Plasmid- und Probenbanden anhand der Größe unterscheiden zu können. Ein 212 bp großes Stück wurde gereinigt (s. 3.12.1.2) und als Zwischensequenz verwendet. Diese Sequenz ist in Abb 5.5 zwischen den Pfeilen 2 und 3 abgebildet.

Die Hybridisierung der Primerteilstücke erbrachte die gewünschten Sequenzen in der zuvor festgelegten Reihenfolge der Einzelprimer. Die Sequenz der Forward-Primer in der Reihenfolge: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ und β 2-Mikroglobulin zeigt die Abb. 5.5 ab Pfeil 1. Pfeil 3 markiert den Beginn der komplementären Reverse-Primer in der Reihenfolge: β 2-Mikroglobulin, IFN γ , IL-13, IL-10, IL-5, IL-4, IL-2.

Nach der Ligation der Zwischensequenz mit den Primerkonstrukten entstand ein 376 bp großes Fragment, welches in die Vektoren (s. 3.12.4) kloniert wurde.

Abb. 5.5 zeigt die Sequenz des Klones A4, welcher sich nach Sequenzierung als fehlerfrei erwies und deshalb als Standardplasmid ausgewählt wurde.

Die Plasmid-DNA wurde transkribiert, so daß die Standardplasmid- und die Proben-RNA bei der anschließenden reversen Transkription denselben Bedingungen unterlagen. Die Transkription der Plasmid-DNA ergab 0,195 µg/µl RNA, die nach Auftrennung im Agarosegel nicht degradiert erschien. Sie wurde nach dem in 3.12.7.2 beschriebenen Verfahren revers transkribiert und als cDNA in die PCR eingesetzt. Nach der Amplifikation der Plasmid-DNA mit den Primerpaaren der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL13 und IFN γ und dem Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin zeigten sich bei allen Primerpaaren bis auf IL-2 im Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV eine deutliche Bande (Abb. 5.6). Für das Primerpaar von IL-2 wurde dieselbe DNA ein zweites Mal transkribiert. Abb. 5.7. zeigt das Produkt nach reverser Transkription und PCR-Amplifikation mit IL-2-Primern auf einem Polyacrylamid-Gel nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht.

```

1  TTAGGTGACA CTATAGAATA CTCAAGCTAT GCATCAAGCT ↓1 TCTAGGGCTA  upstream oben
      51  TCCATCTCCT CAGACGGAGA TGGATGTGCC AAACGTCACC GAGCTCTGTT
      101 GACAAAATGCA GGACTTTAAG GGTTACTTGC CAGAGGATAT TGCATTGCCT
      151 CGCCTCTTCT TGGATATCTG GCAGCATGAG CCAGGATATA GGGCCCGACG
      201 TCGCATGCTC CCGGCCGCCA TGGCCGCGGG ATTAATACCC TCTTCGGACA
      251 GGTTTTAGCA GACGACTACG GAAGGGAAAC AACAATGGAA GGTTTTGAAT
      301 ATTCTTATTT TGAAGCAGTG GATGATTTGT CACCCGATTT TAGTCTCTTC
      351 TTATACATTC GCAGGCTTAA CCCTGGTATC TATCGTGTTT GATCAGGAAT
      401 TGAATCACTA ↓3 GCAATCTGT  Downstream oben
      451 GCGCCAAAAA GAGAAGTGTG GAAGCTCCAA GACAAAGGTG TCTACTCACA
      501 TCAGACTTTT CTGGCAACCC ACAGATCCAG CGCGCATACA GGCTGGTCAG
      551 TGGGCCGAAT ↓4 TCTGCAGATA  Vektor
      601 ATCTAGAGGG CCAATTCGC CCTATAGTGA GTCGTATTAC AATTCCTGG
      651 CCGTCGTTTT ACRCGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT ACCCAACTTA
      701 ATCGCCTTGC AGCACATCCC CcTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
      751 GCCCGCACCG ATCGCCCTtC CCAACAGTTG CGCASCTGAA TGGCGAATGG
      801 ACGCGCCcTG TAGCGG

```

Abb. 5.5: Sequenz des Standardplasmids (Pfeil 1-2: Primerfolge (upstream) der Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ und β 2-Mikroglobulin; Pfeil 2-3 Zwischensequenz, Pfeil 3-4 Primerfolge (downstream) der Zytokine β 2-Mikroglobulin, IFN γ , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2, ab Pfeil 4: Vektor pBSK)

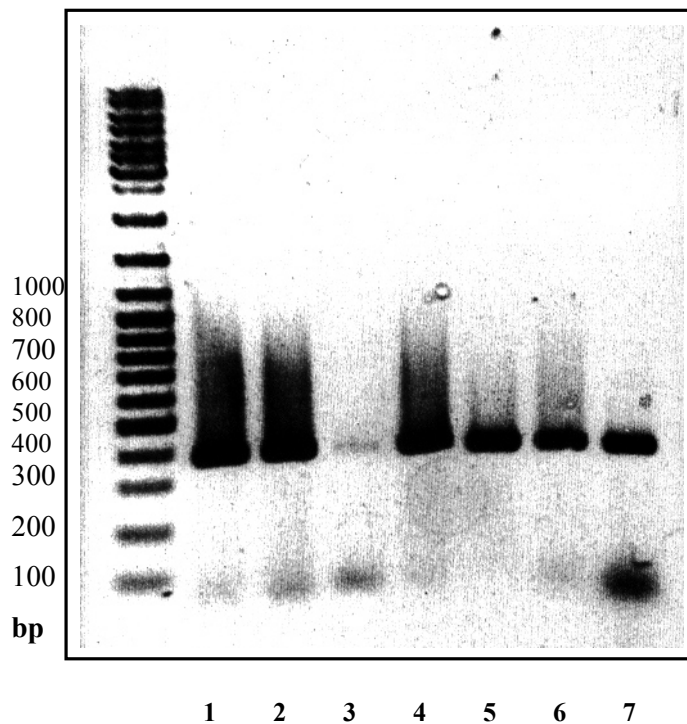


Abb. 5.6: Amplifikation der Plasmid-DNA mit Primerpaaren für β 2-Mikroglobulin (1), IFN γ (2), IL-2 (3), IL-4 (4), IL-5 (5), IL-10 (6) und IL-13 (7). Amplifikate nach Auftrennung auf einem 1 %igen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. (Gel als Negativ dargestellt)

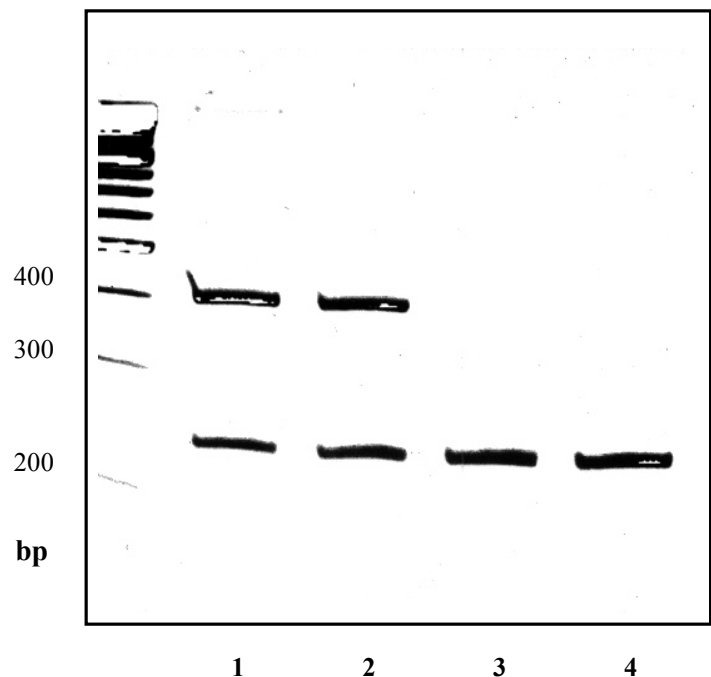
Abb. 5.7:

Amplifikation der Plasmid-DNA mit Primern von IL-2; Auftrag auf ein 7,5 % Polyacrylamid-Gel Reihen 1 und 2:

Amplifikate des Standardplasmids (oben) und IL-2-Produkten aus cDNA von *M. coucha*.

Reihen 3 und 4: IL-2-Amplifikate aus *M. coucha*-cDNA.

(Gel als Negativ dargestellt)



5.3.3. Southern-Blot Analyse

Die Spezifität der Zytokin-DNA-Amplifikate und des Amplifikates von β 2-Mikroglobulin-DNA wurde im Southern Blot bestätigt. Dazu wurden die PCR-Amplifikate mit Sonden aus der cDNA von *M. coucha* hybridisiert. Die Abbildungen 5.8-5.12 zeigen die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche.

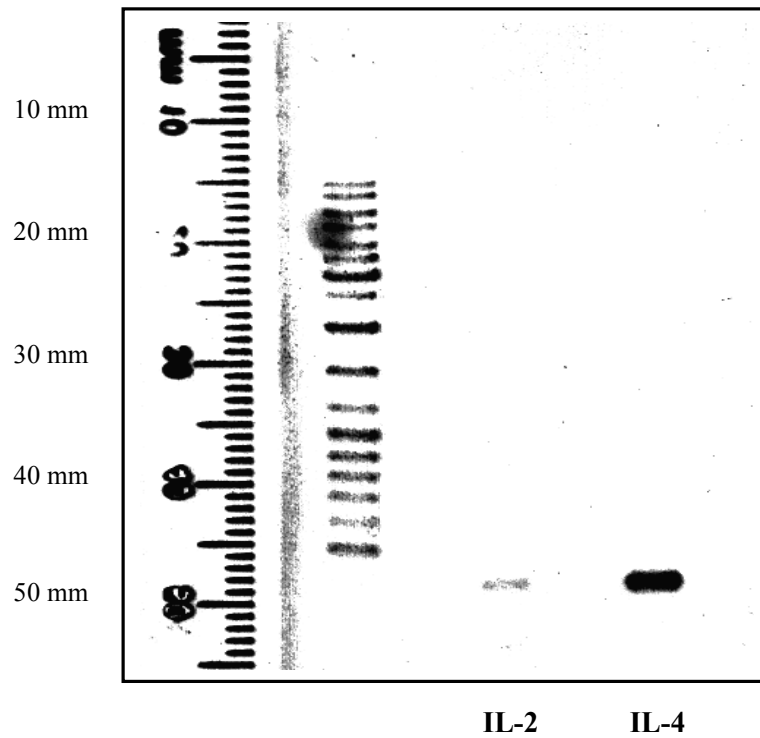


Abb. 5.8: Amplifikate der Zytokine IL-2 und IL-4 nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. Unter UV-Licht photographiert. Das Lineal diente zur späteren Identifizierung der Banden auf dem Gel. (Gel als Negativ dargestellt)

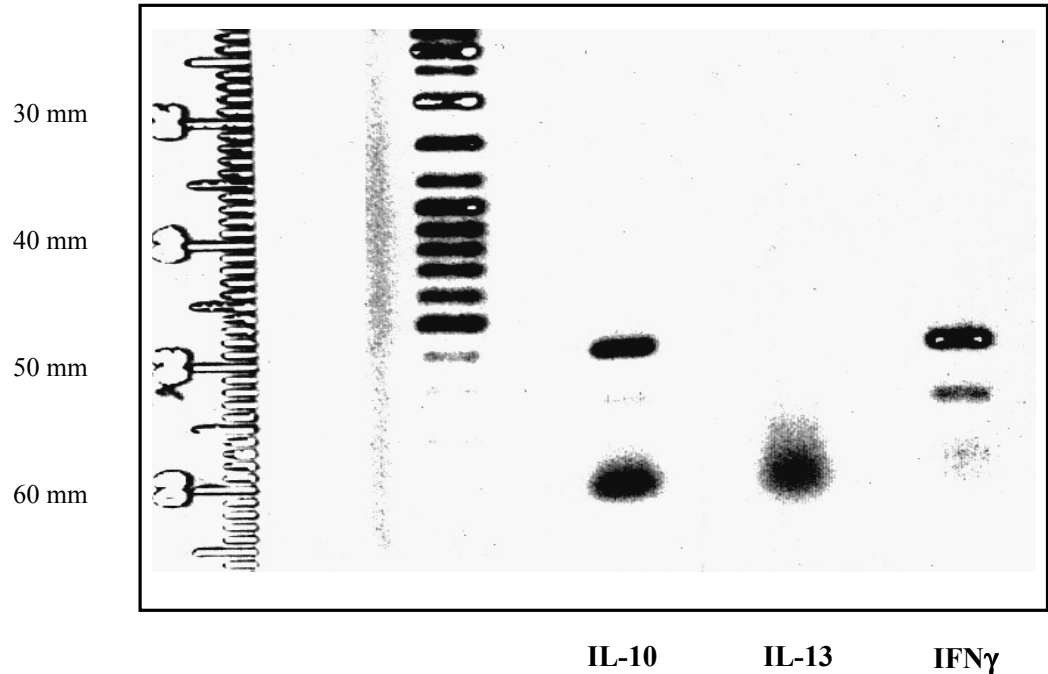
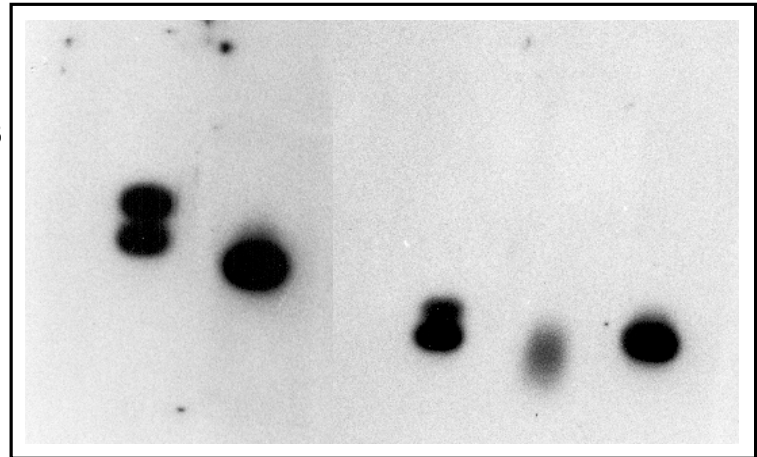


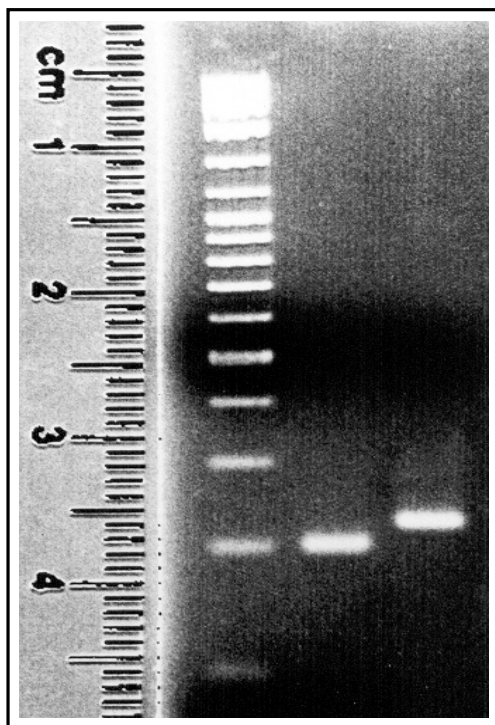
Abb. 5.9: Amplifikate der Zytokine IL-10, IL-13 und IFN γ nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. Unter UV photographiert. Das Lineal diente zur späteren Identifizierung der Banden auf dem Röntgenfilm. (Gel als Negativ dargestellt)

Abb. 5.10:

Southern Blot:
Röntgenfilm nach dem Blotten der
Amplifikate von IL-2, IL-4, IL-10, IL-13
und IFN γ
Die Sonden wurden mit DIC markiert
und das Amplifikat mit dem
Cicum Vent™- Phototope-Kit
nachgewiesen



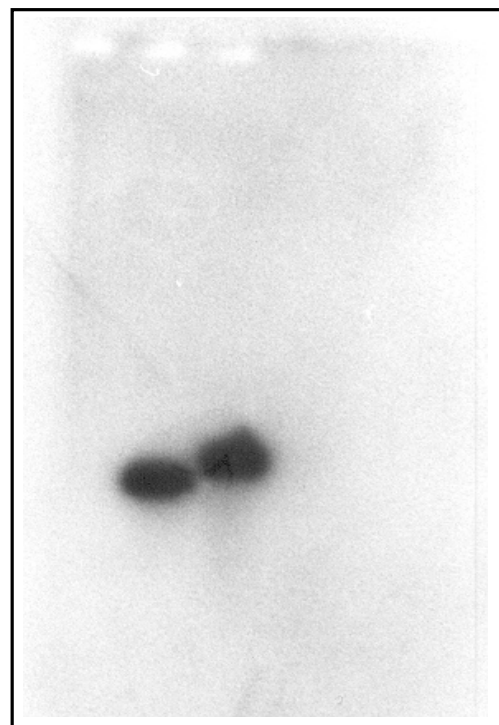
IL-2 IL-4 IL-10 IL-13 IFN γ



IL-5 β2-M

Abb. 5.11:

Amplifikate von IL-5 und β 2-Mikroglobulin
nach Auftrennung im 1 %igen Agarosegel und
Färbung mit Ethidiumbromid. Unter UV-Licht
photographiert. Das Lineal diente zur späteren
Identifizierung der Banden auf dem
Röntgenfilm.
 β 2-M = β 2-Mikroglobulin



IL-5 β2-M

Abb. 5.12:

Southern Blot:
Röntgenfilm nach Entwicklung.
Die Sonden wurden mit DIC markiert
und das Amplifikat mit dem Circum Vent™-
Phototope-Kit detektiert.

β 2-M = β 2-Mikroglobulin

5.3.4 Etablierung und Optimierung der PCR

5.3.4.1 Optimierung der Annealingtemperatur und der Zykluszahl

Für die semi-quantitative PCR ist es nach Siebert (1993) unbedingt notwendig, daß die Amplifikate im exponentiellen Bereich der PCR gemessen werden. Die Versuche zur Optimierung der Annealingtemperatur und der Zykluszahl wurden für jedes Primerpaar mit mit Con A stimulierten PBL von 15 verschiedenen Tieren durchgeführt. Dazu wurden die Amplifikatbanden nach Gelelektrophorese im 7,5 %igen Polyacrylamid-Gel und Anfärben mit Ethidiumbromid densitometrisch ausgewertet und verglichen. Zur Ermittlung der höchstmöglichen Zykluszahl, bei der bei allen Proben noch im Bereich der exponentiellen Phase der PCR gearbeitet wurde, wurden die Werte nach der densitometrischen Analyse in eine logarithmische Skala eingetragen. Diese Darstellungsform ermöglicht es, die Zykluszahl zu bestimmen, in der maximale Amplifikation erreicht wurde ohne in die „Sättigungsphase“ der PCR zu gelangen. Diese Phase stellt sich durch das allmähliche Abflachen der Kurve dar. Abb 5.13 und 5.14 zeigen beispielhaft die Vorgehensweise für β 2-Mikroglobulin-Primer bei drei *B. malayi*-infizierten *M. coucha*. In diesem Beispiel wäre die beste Annealingtemperatur für ein Tier 52 °C, für das zweite 54 °C und für das dritte 58°C. Bei spätestens 24 Zyklen beginnt die Amplifikationskurve des Tieres 1 abzuflachen, für die Tiere zwei und drei könnten 26 oder sogar 28 Zyklen gefahren werden, bevor die „Sättigungsphase“ erreicht wird.

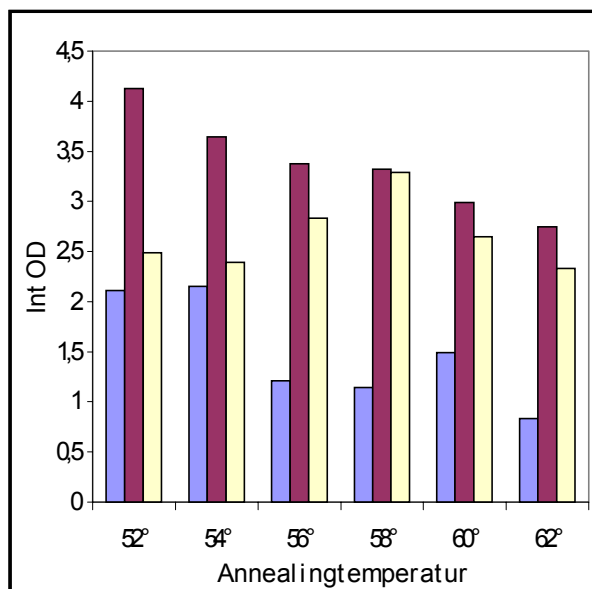


Abb.:5.13

Einfluß der Annealingtemperatur auf die Amplifikatmengen bei der Verwendung von β 2-Mikroglobulin-Primern. Untersuchungen anhand von Con A - stimulierten PBL von 3 *M. coucha* bei 24 Zyklen Temperaturangaben in °C

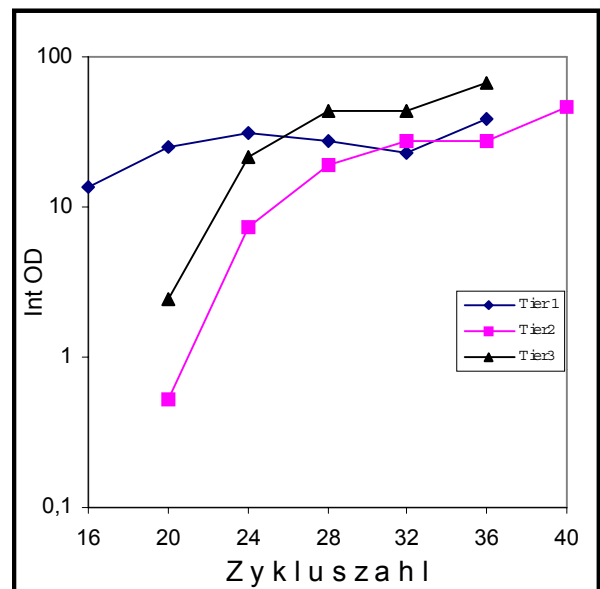


Abb.: 5.14

Einfluß der Zykluszahl auf die Amplifikatmenge bei Verwendung von β 2-Mikroglobulin-Primern. Untersuchungen anhand von Con A - stimulierten PBL von 3 *M. coucha* (Annealingtemperatur 54°C)

Die Werte der einzelnen in den Vorversuchen eingesetzten *B. malayi*-infizierten *M. coucha* unterlagen bei allen untersuchten Primerpaaren starken Schwankungen, die sowohl bei der Bestimmung der Zykluszahlen, als auch bei den Annealingtemperaturen deutlich wurden. Für den Hauptversuch wurde eine Kombination der Parameter gewählt, bei denen bei der überwiegenden Zahl der Tiere nach Auftrennung der Amplifikate in der Gelelektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid deutliche Banden erfasst werden konnten (vergl. Tab. 5.1)

5.3.4.2 Konzentration des Standardplasmids

Wird in der PCR ein Standardplasmid zur Quantifizierung der Zielmoleküle verwendet, so sollte die Anzahl der Standard- und Zielmoleküle nicht sehr weit auseinanderliegen. Andernfalls kann es zu Konkurrenz um Primerbindungsstellen kommen, so daß die Quantifizierung nicht mehr optimal möglich ist (vergl. Platzer und Blankenstein, 1993). Die Konzentrationen des Standardplasmids wurden deshalb für jedes Primerpaar einzeln ermittelt (vergl. Tab 5.1). Dies war insbesondere deshalb notwendig, da sich die Affinitäten des Plasmids zu den einzelnen Primerpaaren stark unterschieden. Ziel der Versuche war es, die Konzentration des Standardplasmids so zu wählen, daß die Auswertung der Banden sowohl der Ziel- als auch der Plasmid-cDNA im exponentiellen Teil der Verlaufskurve der PCR stattfinden konnte. Die Beurteilung erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte der Banden nach der Gelelektrophorese und anschließendem Vergleich der Bandenstärken von Plasmid- und Ziel-cDNA.

Tab.5.1: Geeignete Zykluszahlen, Annealingtemperaturen und Plasmidkonzentrationen für die Amplifikation und anschließende Quantifizierung verschiedener Zytokin-DNAs von *M. coucha*. (Ergebnisse der Vorversuche)

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	IFNγ	β2-Mikroglobulin
Zykluszahl	36	36	40	36	34	24
Annealingtemperatur	56	54	58	60	58	54
Plasmidkonzentration	200 fg	5 fg	5 fg	1,5 pg	20 fg	60 fg

5.3.4.3 Vergleich verschiedener Taq-Polymerase-Puffer

In Vorversuchen war deutlich geworden, daß die Amplifikation von IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 zum Teil zu inkonsistenten Ergebnissen führte, die auf die verwendeten Taq-Polymerase-Puffer und die $MgCl_2$ -Konzentrationen im Reaktionsgemisch zurückzuführen waren. Abb. 5.15 zeigt als Beispiel das Ergebnis einer Vergleichsstudie mit zwei unterschiedlichen Puffern für die PCR mit IL-4, IL-5 und IL-10-Primern. Für IL-5, IL-10 und $IFN\gamma$ wurde nach diesen Resultaten der $(NH_4)_2SO_4$ -Puffer gewählt. Die PCR-Reaktionen mit $\beta 2$ -Mikroglobulin-Primern erfolgten mit 10-fach-Puffer ohne $MgCl_2$. Die Amplifikation mit den IL-2- und IL-4-Primern stellte sich als besonders schwierig heraus, weshalb eine zweite Taq-Polymerase mit spezifischem Puffer verwendet wurde (s. 3.13.2).

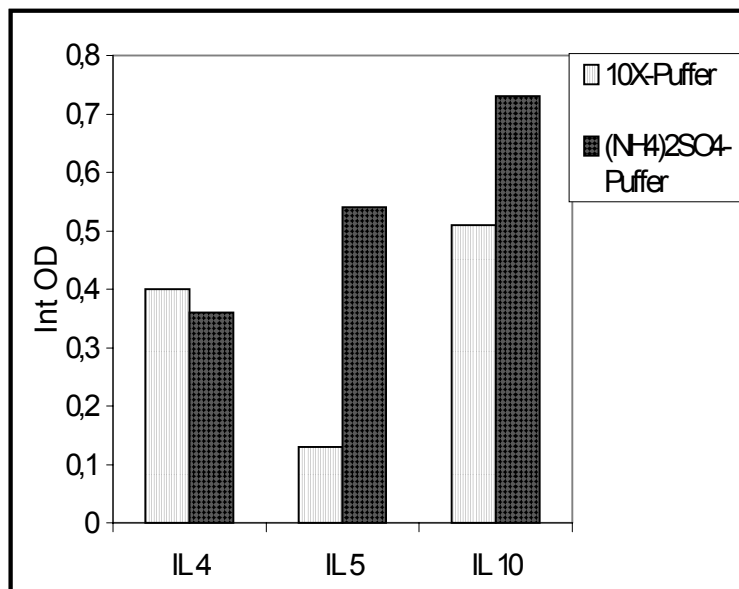


Abb. 5.15: Effekt unterschiedlicher Puffer auf die PCR-Ergebnisse mit *M. coucha*-cDNA und IL-4-, IL-5 und IL-10-Primern (die Amplifikate wurden anhand der optische Dichte (OD) der nach Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel erhaltenen DNA-Banden beurteilt)

5.3.4.4 $MgCl_2$ -Assay

Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die $MgCl_2$ -Konzentration des Reaktionsansatzes einen starken Einfluß auf die PCR-Reaktion und damit auf die Menge des Amplifikats hat. Daher wurde die PCR für alle Primerpaare sowohl mit 10-fach Puffer als auch mit $(NH_4)_2SO_4$ -Puffer und $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,25 mM, 2,5 mM und 5 mM getestet. Abb. 5.16 zeigt beispielhaft den Einfluß verschiedener $MgCl_2$ -Konzentrationen auf PCR-Ergebnisse bei Verwendung von $\beta 2$ -Mikroglobulin-, $IFN\gamma$ - und IL-5-Primern. Für den Hauptversuch wurden nach den Ergebnissen der Vorversuche für alle Primer außer den IL-4-Primern 2,5 mM $MgCl_2$ verwendet. Für den IL-4-Primer wurden 1,25 mM $MgCl_2$ eingesetzt (vergl. Tab. 3.2).

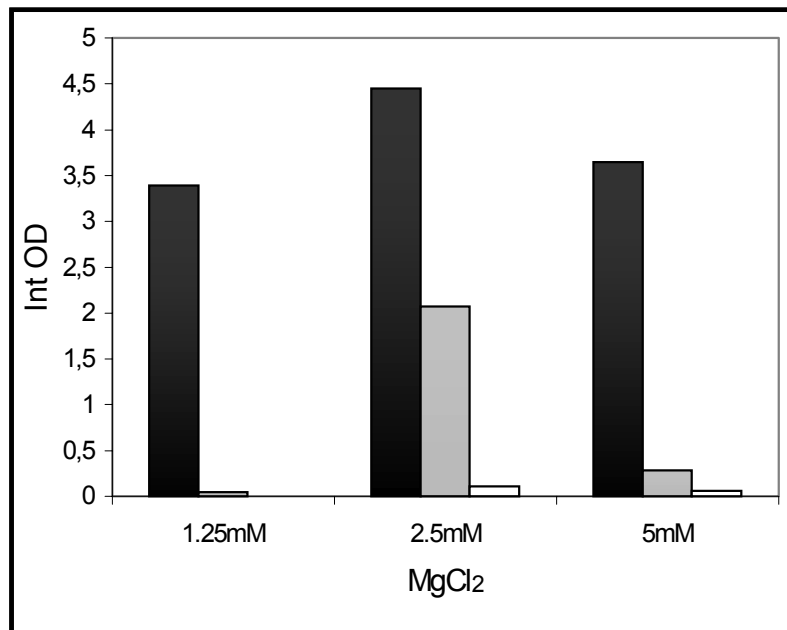
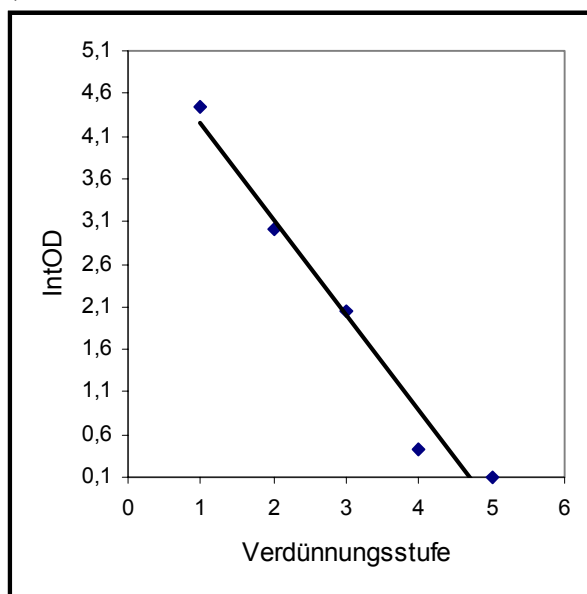


Abb. 5.16: Einfluß verschiedener MgCl₂-Konzentrationen auf die Amplifikatmengen nach PCR mit cDNA von *M. coucha* mit β2-Mikroglobulin-(schwarze Säule), IFNγ-(graue Säule) und IL-5-Primern (weiße Säule); die Amplifikate wurden anhand der optische Dichte (OD) der nach Elektrophorese im Polyacryamid-Gel erhaltenen DNA-Banden beurteilt

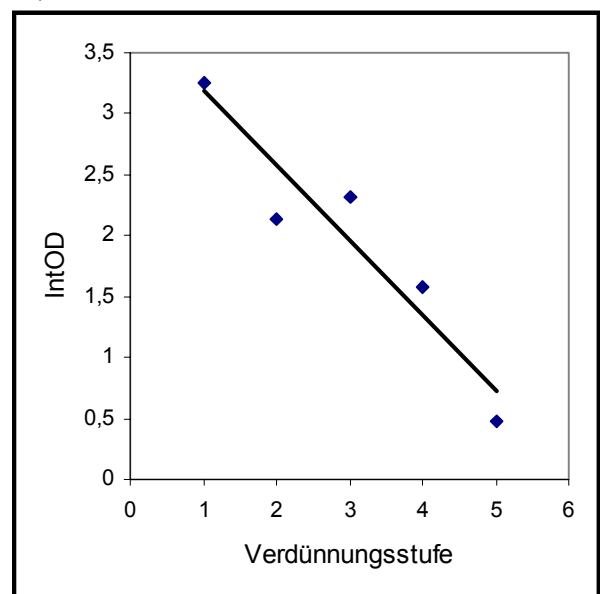
5.3.4.5 Ergebnisse der cDNA Titrationsstudien

Die Ergebnisse der Titrationsstudien zeigen eine deutliche Korrelation zwischen der eingesetzten cDNA-Menge und der resultierenden Bandenstärke im Gel. Diese Versuche waren besonders wichtig, da gezeigt werden konnte, daß auch bei den geringen Ausgangsmengen (650pg RNA/ RT-Ansatz) abnehmende Template-Mengen noch bis zu einer Verdünnung von 1:16 (Verdünnungsstufe 4 in den Abb 5.17a-e) sicher erfaßt werden konnten. Die Titrationsstudien wurden mit den Primern für β2-Mikroglobulin (Abb. 5.17a), IL-2 (Abb. 5.17b), IFNγ (Abb. 5.17c), IL-5 (Abb. 5.17d) und IL-10 (Abb. 5.17e) durchgeführt.

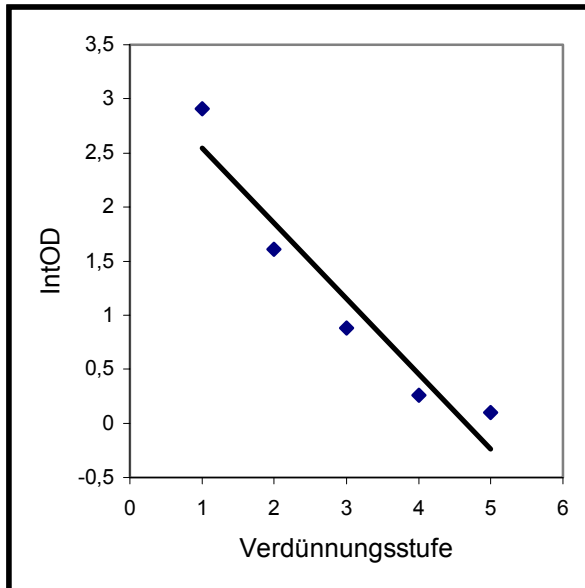
a)



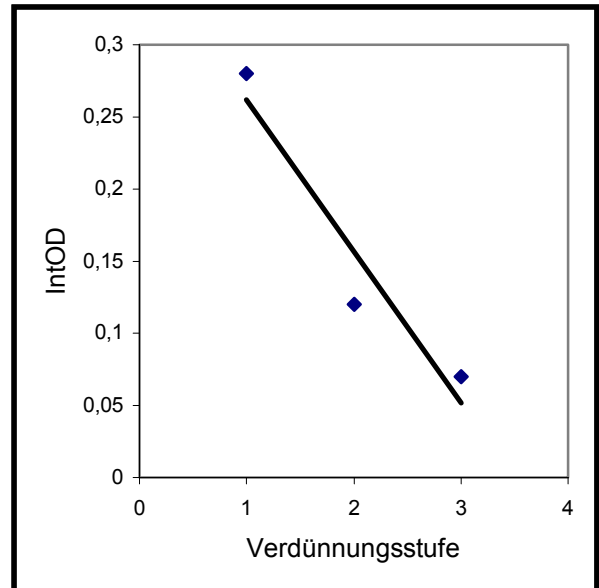
b)



c)



d)



e)

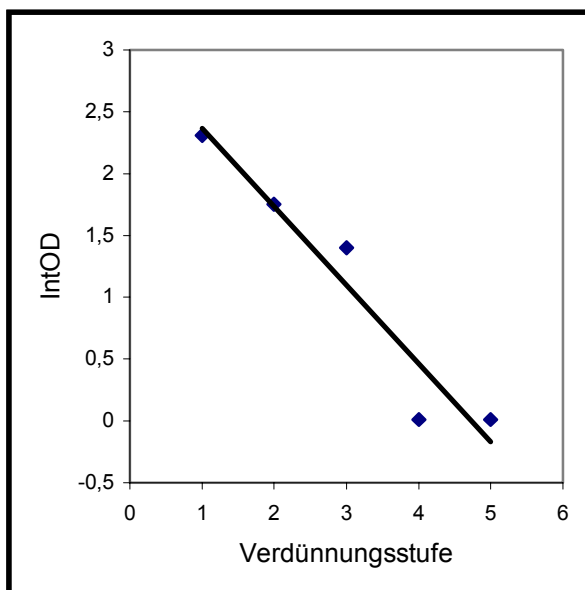


Abb. 5.17 .a-e): Verdünnungsstudie mit *M.coucha*-cDNA

Die cDNA-Proben wurden bei jedem Schritt mit TE-Puffer 1:1 verdünnt und die jeweils erhaltenen Aliquots mit Primern von a) β 2-Mikroglobulin, b) IL-2 c) IFN γ , d) IL-5 und e) IL-10 amplifiziert. Dargestellt sind die Int OD-Werte nach densitometrischer Auswertung der Gele als Funktion der Verdünnungsstufen

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels 5.3.4 findet sich in Tab. 3.2.

5.4 Mikrofilariämie

5.4.1 Unbehandelte Tiere

Die Mikrofilariämie begann, wie erwartet, um den Tag 90 p.i. Ab Tag 120 p.i. konnten dann bei allen Tieren Mikrofilarien im Blut nachgewiesen werden, d.h., daß die quantitative Infektion in allen Fällen erfolgreich verlaufen war. Die Mikrofilariendichten nahmen außer bei einem Tier bis zum Tag 230 p.i kontinuierlich zu. Die Einzelwerte an den unterschiedlichen Untersuchungstagen unterlagen jedoch einer großen Spannweite (Abb.5.18). Die Einzelwerte der Tiere finden sich im Anhang II (Tab. A2 und A3).

Aus den Tabellen im Anhang II und III geht außerdem hervor, daß keine Korrelation zwischen der Anzahl der Mikrofilarien oder der Länge der Präpatenz und der Anzahl der nach Sektion gefundenen adulten Filarien bestand.

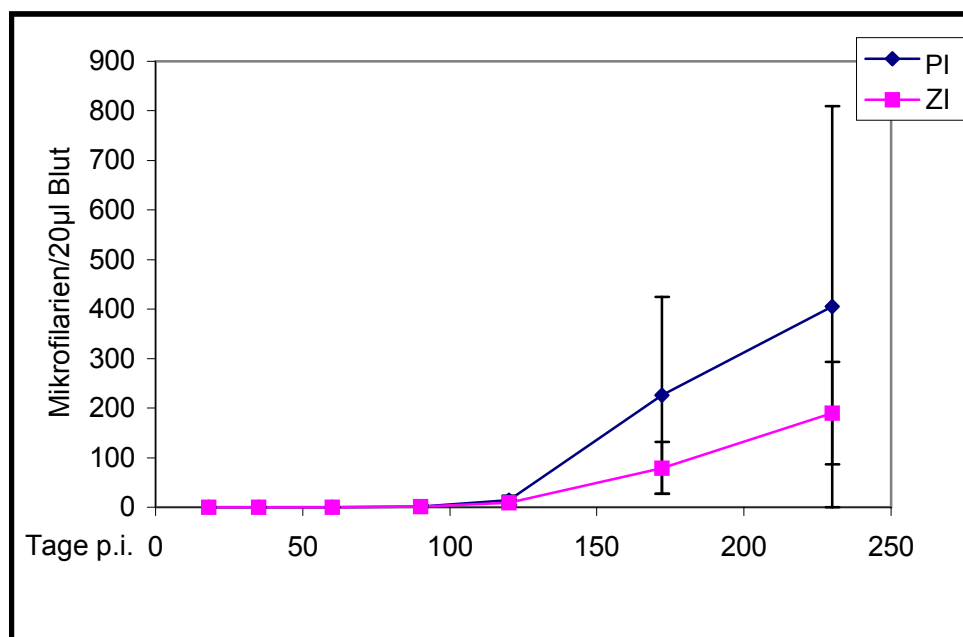


Abb.5.18:

Verlauf der Parasitämie bei mit *B. malayi*-infizierten *M. coucha* (je 80 L3 s.c.); unbehandelte Gruppen ZI und PI, jeweils n=6; dargestellt sind arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen

5.4.2 Behandelte Tiere (Gruppen ZCGP, PCGP, ZFlub, PFlub, ZBay, PBay)

Die Gruppen ZCGP und PCGP wurden mit CGP 20376, welches eine mikrofilarizide und eine makrofilarizide Wirkung besitzt, behandelt, die Gruppen ZFlub und PFlub erhielten das ausschließlich makrofilarizide Flubendazol und die Gruppen ZBay und PBay das Medikament Bay 44-4400 mit mikrofilarizider und die Embryogenese beeinträchtigender Wirkung. In den Gruppen ZCGP, PCGP, ZBay und PBay kam es nach Medikamentenapplikation zur raschen

Elimination der Mikrofilarien aus dem Blut (Abb. 5.19; 5.20). Bereits 3 Tage nach der Verabreichung waren bei diesen Gruppen die Werte auf Null zurückgegangen. In der Gruppe ZCGP konnten ab Tag 70, in der Gruppe PCGP ab Tag 50 nach Behandlung wieder vereinzelt Mikrofilarien nachgewiesen werden. Im Blut der Tiere der Gruppen ZBay und PBay konnte ab Tag 56 ein Wiederanstieg der Mikrofilarienzahlen beobachtet werden. In den Gruppen ZFlub und PFlub erfolgte der Abfall der Mikrofilarienwerte beginnend 14 Tage nach Behandlung langsamer, eine vollständige Elimination der Mikrofilarien aus dem Blut konnte allerdings nicht bei allen Tieren beobachtet werden. In der Gruppe ZFlub hatten am Tag 35 vier von sechs Tieren keine Mikrofilarien mehr im Blut; die Werte der noch parasitämischen Tiere sanken bis zu Tag 70 kontinuierlich auf Null ab, stiegen danach allerdings wieder leicht an. In der Gruppe PFlub zeigten 5 von 6 Tieren am Tag 35 keine Mikrofilarien mehr im Blut, die Werte blieben bis Ende des Versuchszeitraumes niedrig, erreichten aber nie bei allen Tieren Null. Als Kontrollgruppe dienten die infizierten, nicht behandelten Tiere der Gruppen ZI und PI (vergl. Abb. 5.18).

Im Anhang II (Tab. A4 und A5) sind die Einzelwerte der Tiere dargestellt.

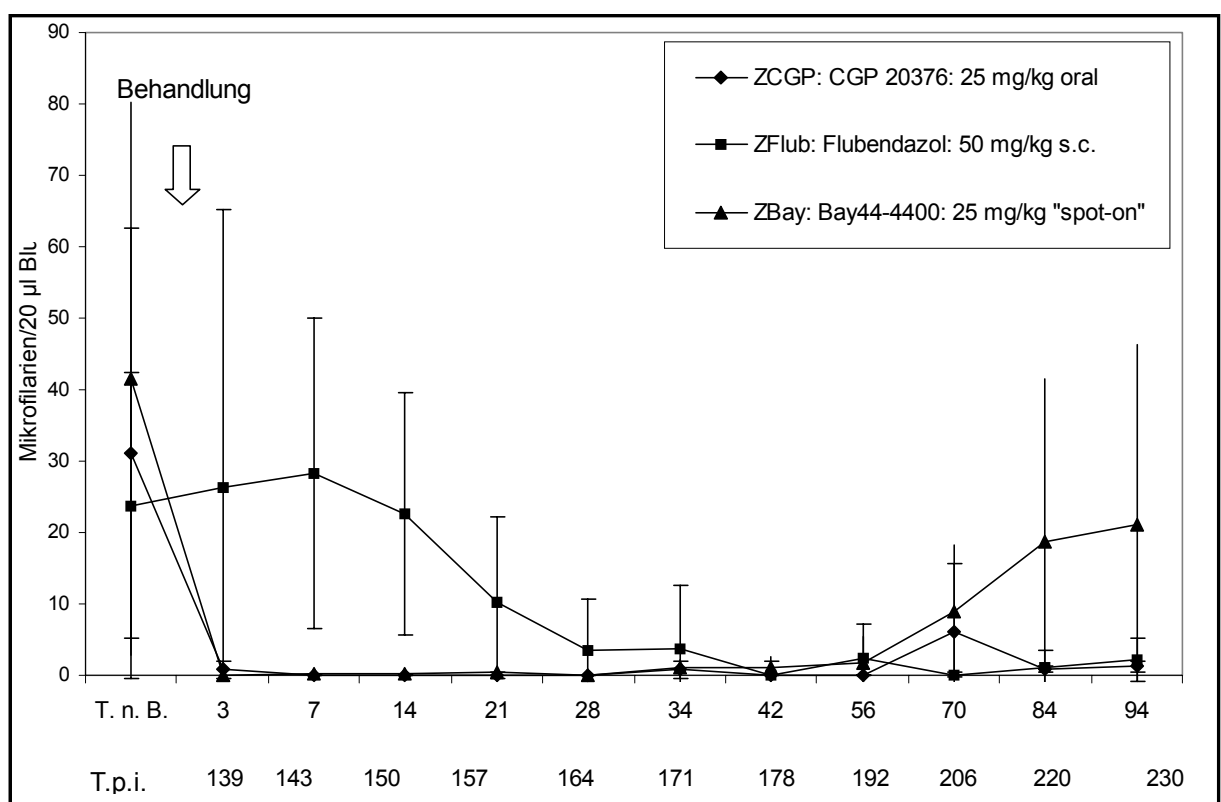


Abb.5.19: Verlauf der Parasitämie bei *B. malayi*-infizierten *M. coucha* nach chemotherapeutischer Behandlung (jeweils n=6); dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen.
(T.n.B.: Tage nach Behandlung, T. p.i.: Tage post infektionem)

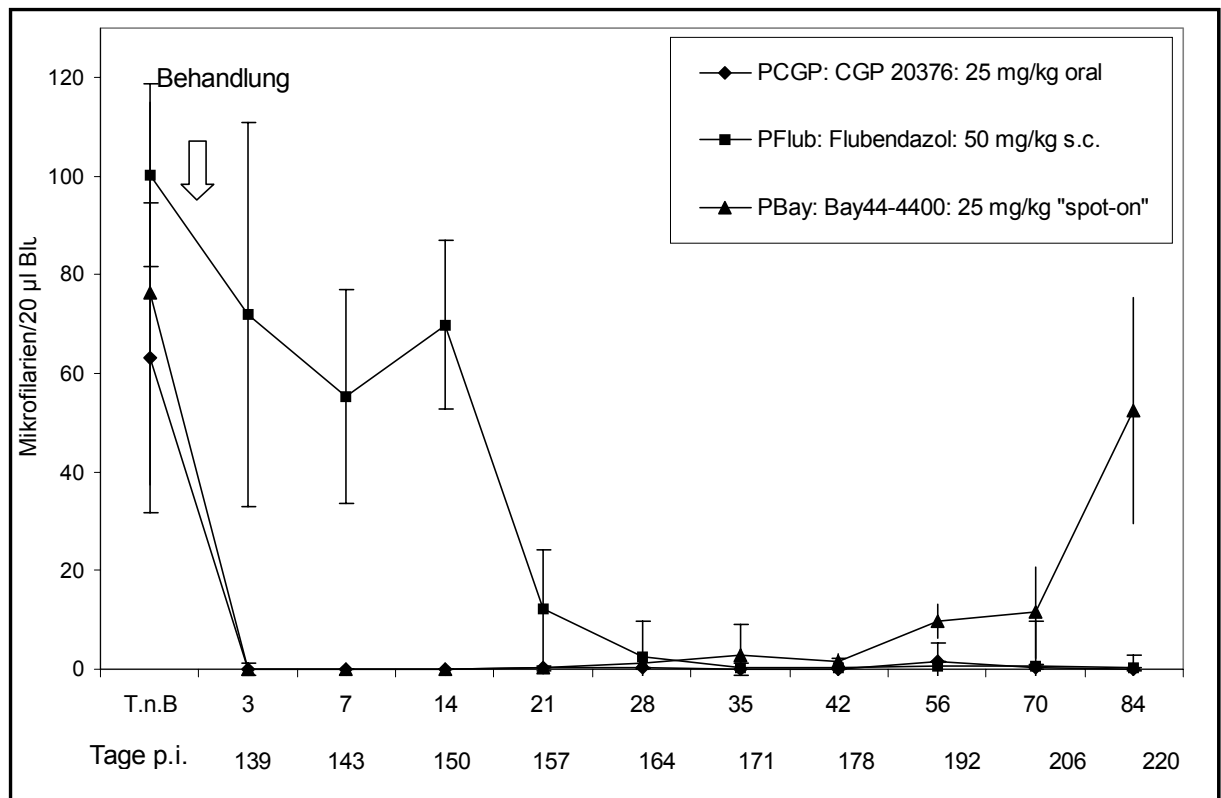


Abb. 5.20: Verlauf der Parasitämie bei *B. malayi*-infizierten *M. coucha* nach chemotherapeutischer Behandlung (jeweils n=6; dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen).

(T.n.B.: Tage nach Behandlung, T. p.i.: Tage post infektionem)

5.5 Wurmbürde

Am Ende des Versuchszeitraumes wurden alle Tiere getötet und sezziert. Die adulten Stadien von *B. malayi* wurden aus der Lunge, den Lymphknoten, dem Herz und den Hoden isoliert.

Tab. 5.2 zeigt die durchschnittlichen Wurmbürden in den einzelnen Gruppen. In Anhang III (Tab. A6-A9) findet sich die Aufschlüsselung der gefundenen Würmer nach Organen.

Eingekapselte, tote Parasiten sind getrennt aufgeführt.

Alle Tiere der nicht behandelten Gruppen und die Tiere der Gruppen ZBay und PBay, die mit der mikrofilariziden Substanz Bay 44-4400 behandelt worden waren enthielten lebende Filarien. Tiere der Gruppen ZCGP, PCGP, ZFlub und PFlub, denen CGP 20376 oder Flubendazol verabreicht worden war, enthielten keine lebenden Parasiten. In fünf Tieren der Gruppen ZCGP und PCGP und in 6 Tieren der Gruppen -ZFlub und PFlub fanden sich jedoch Kapseln mit abgestorbenen Parasiten in den Lymphgefäßen und -knoten.

Die Rückfindungsraten lagen nach einer Infektionsdosis von 85 L3 zwischen 11,7 % und 34 % in der Gruppe ZI, 12,9 % und 50,5 % in der Gruppe PI, 7,1 % und 29,4 % in der Gruppe ZBay und 30,5 % und 72,9 % in der Gruppe PBay.

Die meisten Parasiten wurden in den Lungen gefunden. So lag in der Gruppe ZI der Anteil der aus der Lunge gewonnenen Würmer bei durchschnittlich 58 %, in der Gruppe PI bei durchschnittlich 64 % und in den Gruppen ZBay und PBay bei 70,0 bzw. 70,8 %.

Tab.5.2 Durchschnittliche Anzahl adulter *B. malayi* in unbehandelten Gruppen (ZI und PI) und chemotherapeutisch behandelten Gruppen (ZCGP, PCGP, ZFlub, PFlub, ZBay, PBay) in *M. coucha* am Tag 230 p.i.

Gruppe		ZI	PI	ZCGP	PCGP	ZFlub	PFlub	ZBay	PBay
lebende Weib.	x	13,3	16	0	0	0	0,3	9,3	20,8
	s	3,9	12,1	0	0	0	0,8	4,4	11,0
lebende Männ.	x	7,8	10,6	0	0	0	0	4,5	21,1
	s	4,6	6,9	0	0	0	0	3,1	4,1

(x): Arithmetischer Mittelwert der Anzahl lebender adulter *B. malayi* in den einzelnen Gruppen
(s): Standardabweichungen

5.6 Ergebnisse der Proliferationsstudien

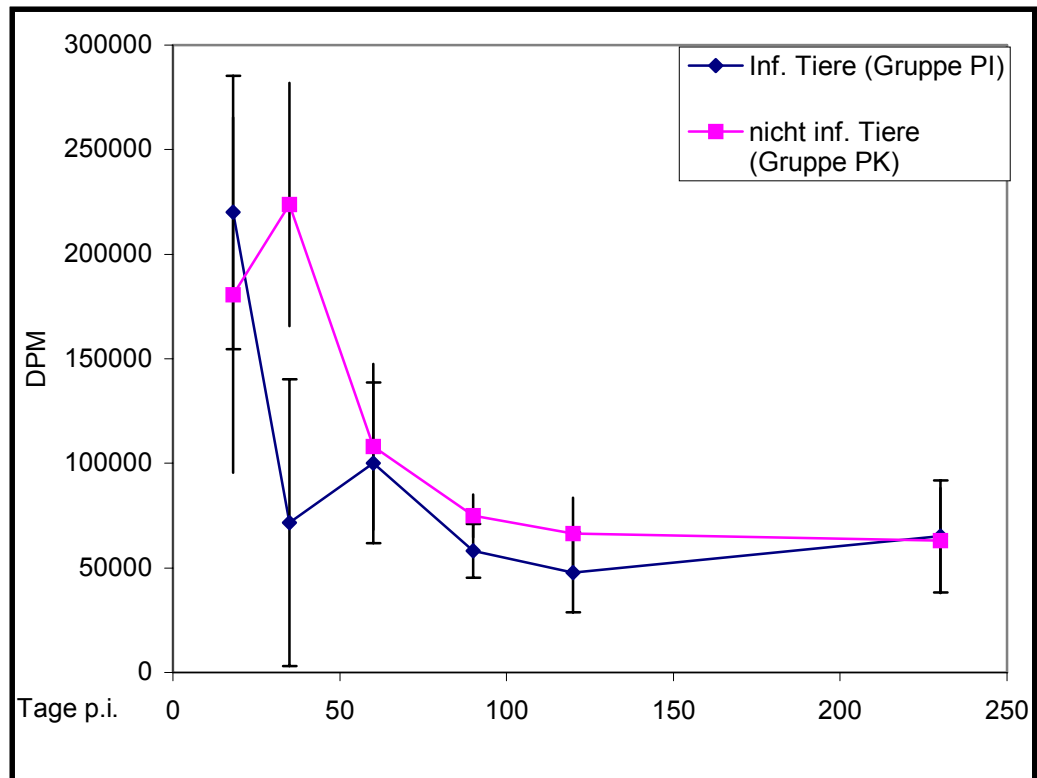
Die Proliferationsleistung der mit Con A als T-Zell-Mitogen stimulierten PBL ist in Abb. 5.21 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß im Verlauf des Untersuchungszeitraumes sowohl infizierte als auch nicht infizierte Tiere zunehmend geringer auf die Stimulation mit Con-A reagierten. Dabei war bei den infizierten Tieren mit Ausnahme des ersten Untersuchungstages im Durchschnitt eine geringere Proliferation festzustellen als bei den nicht infizierten Tieren ($p=0,0019$). Auffallend war bei den infizierten Tieren nach einem deutlichen Abfall am Tag 35 p.i. eine vorübergehende Steigerung der Proliferationsleistung am Tag 60 p.i. Nach filarizider Behandlung proliferierten die Zellen aller Tiere vorübergehend schlechter als die der unbehandelten Kontrollen (Abb. 5.21A). Am Tag 230 p.i. hatten sich die Niveaus wieder angeglichen.

Die Ergebnisse der Stimulation der Zellen mit Weibchen-(Abb. 5.22A), Männchen- (Abb. 5.23A), und Mikrofilarienantigen (Abb. 5.24A) zeigen, daß die Zellen der infizierten Tiere am ersten Untersuchungstag (Tag 18 p.i.) auf diese Antigene reagierten. Danach fiel die Proliferationsleistung stark ab und blieb bis zum Ende der Untersuchungen auf einem Niveau noch unterhalb der nicht infizierten Kontrollen (Weibchen- und Männchen-Antigen $p < 0,001$).

In Reaktion auf die Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen und L3-Antigen kam es bei den nicht infizierten Tieren am Tag 35 p.i. vorübergehend zu einem starken Anstieg der Proliferation (Abb. 5.24A, 5. 25). Bereits am Tag 60 p.i. war die Proliferationsleistung der Zellen dieser Gruppen jedoch wieder unter bzw. auf das Niveau der infizierten Gruppen gesunken. Der Gruppenunterschied zwischen der infizierten und der nicht infizierten Gruppe war in Reaktion auf Mikrofilarien-Antigen nicht signifikant, in Reaktion auf L3-Antigen nur wenig unterhalb der Signifikanzgrenzen ($p= 0,055$).

Bei den behandelten Gruppen (Abb. 5.21-24B; aus Materialgründen konnte keine Stimulation mit L3-Antigen vorgenommen werden) lag die Proliferationsleistung der der Zellen in Reaktion auf *B. malayi*-Antigen vor der Behandlung auf ähnlich niedrigen Niveau wie bei den Tieren der Gruppe PI. 34 Tage nach der Behandlung (entsprechend 172 Tage p.i.) war die Reaktion noch schwächer geworden. Zum Ende der Untersuchung (230 Tage p.i.) deutete sich bei der Gruppe PCGP in Reaktion auf *B. malayi*-Weibchen, -Männchen und -Mikrofilarien-Antigen eine gesteigerte Reaktion an. Zellen, die nur in Medium (RPMI) inkubiert wurden, proliferierten nicht.

A)



B)

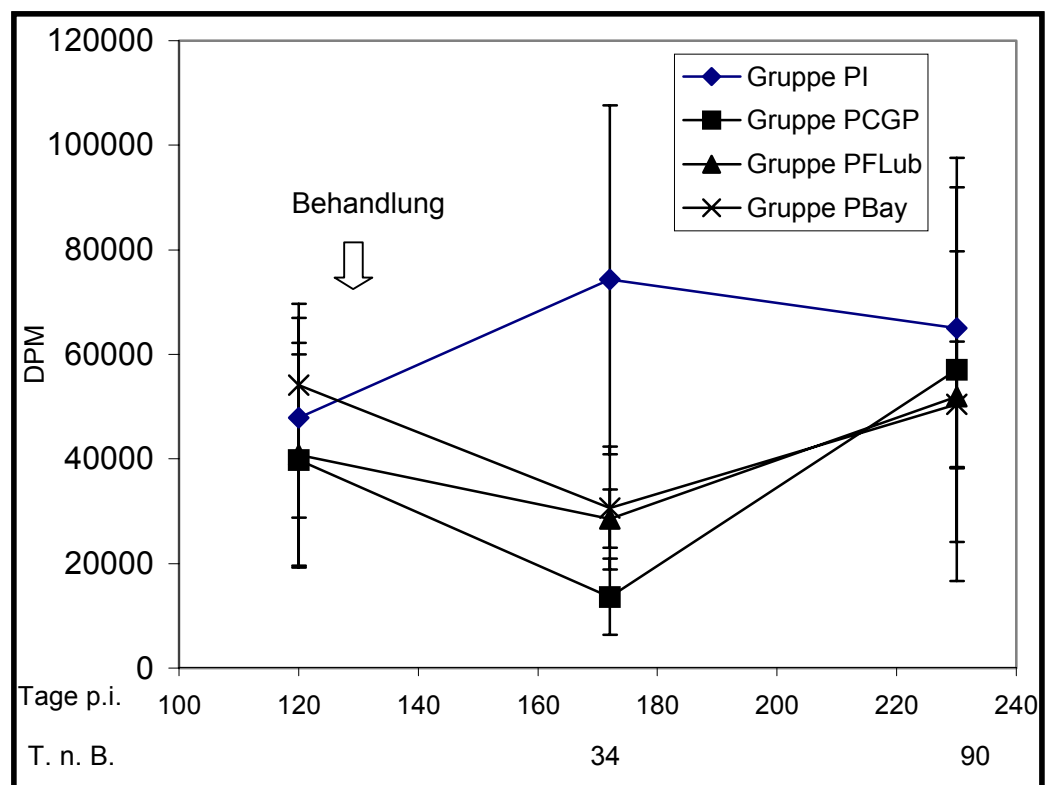
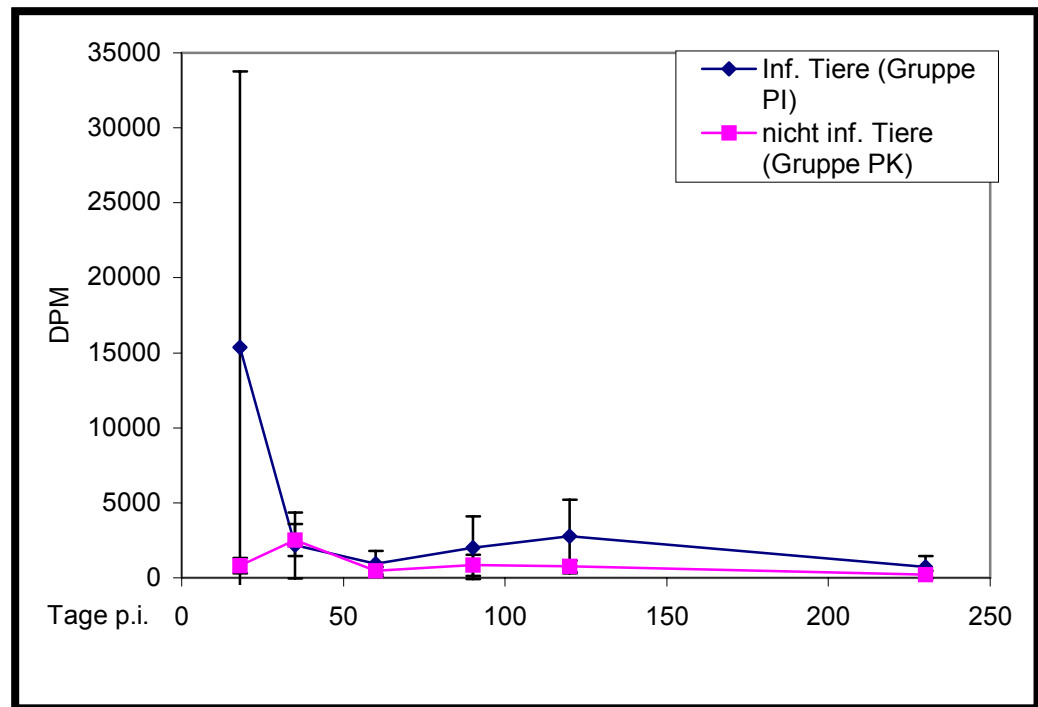


Abb. 5.21: Proliferationsleistung in Reaktion auf die Stimulation mit Con A von peripheren Blutlymphozyten *B. malayi*-infizierter *M. coucha* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (A) und infizierter am Tag 134 p.i. chemotherapeutisch behandelter *M. coucha* (Gruppen PCGP, PFLub, PBay) im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Tieren (Gruppe PI) (B). Die Proliferationsleistung wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Die Abbildungen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen als senkrechte Balken wieder.

T. n. B.: Tage nach Behandlung; DPM: decay per minute

A)



B)

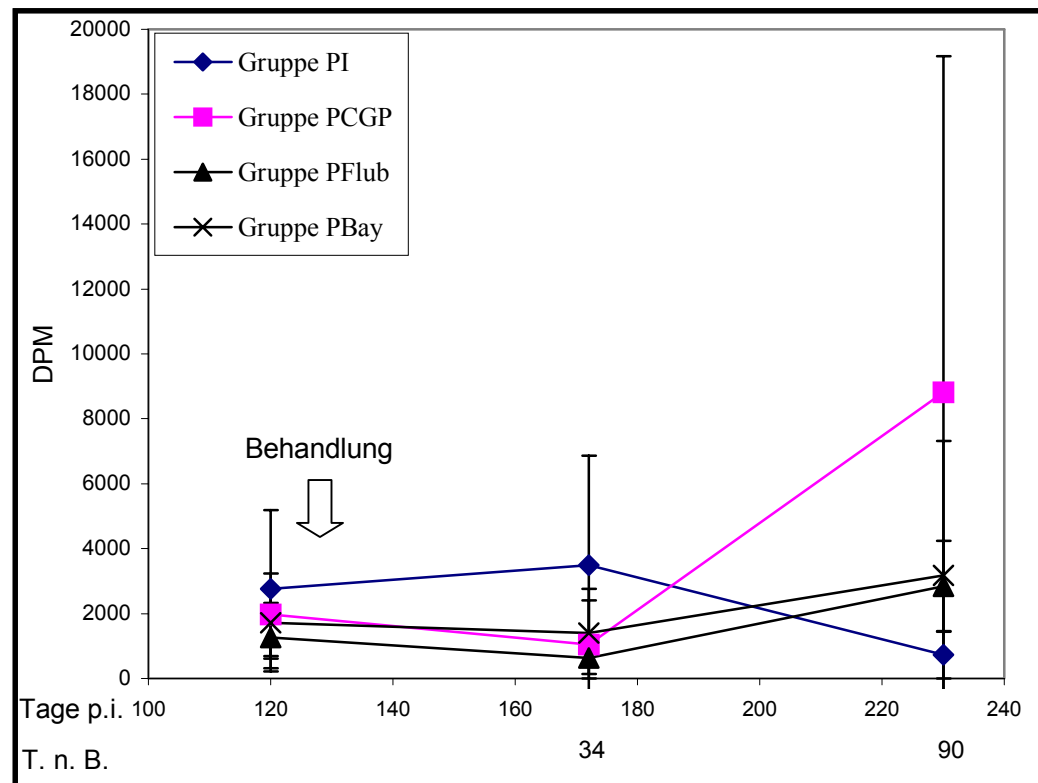
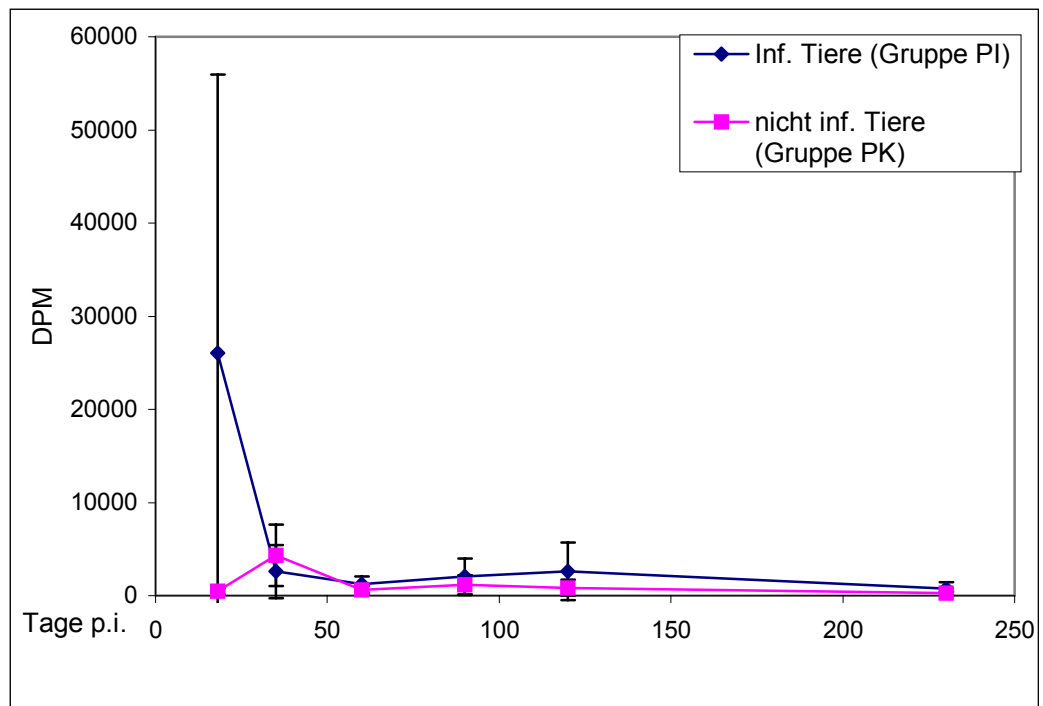


Abb. 5.22: Proliferationsleistung in Reaktion auf die Stimulation mit Weibchen-Antigen von peripheren Blutlymphozyten *B.malayi*-infizierter *M. coucha* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (A) und infizierter am Tag 134 chemotherapeutisch behandelter *M. coucha* (Gruppen PCGP, PFlub, PBay) im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Tieren (Gruppe PI) (B). Die Proliferationsleistung wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Die Abbildungen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen als senkrechte Balken wieder.
T. n. B.: Tage nach Behandlung; DPM: decay per minute

A)



B)

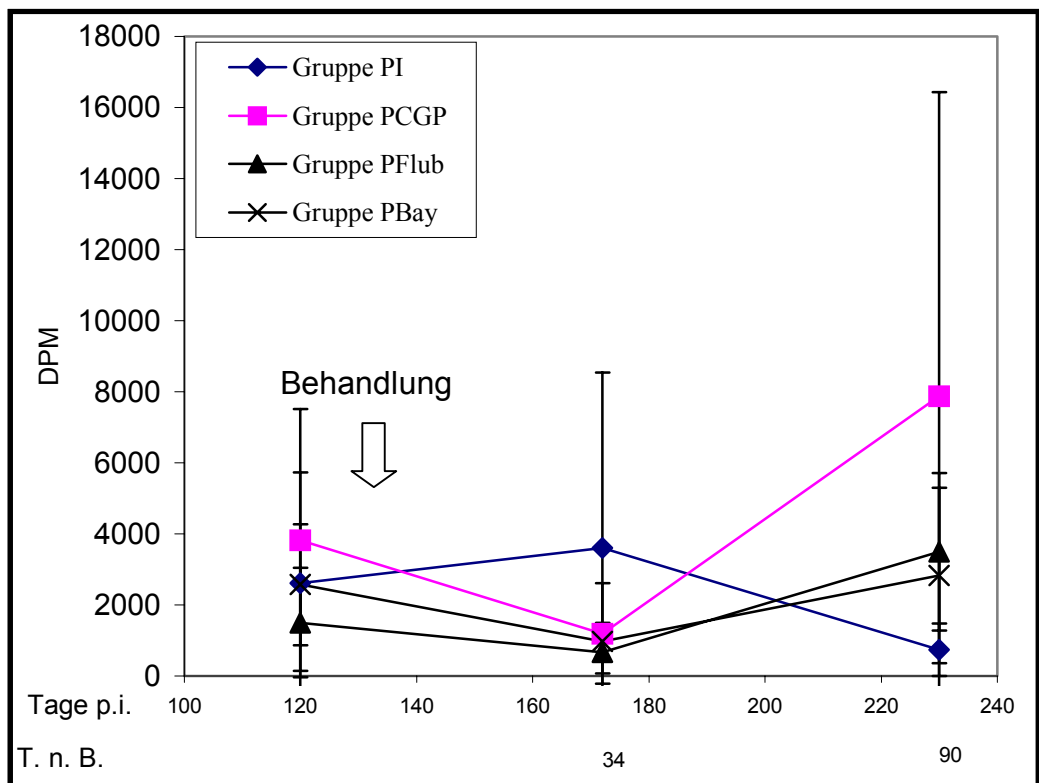
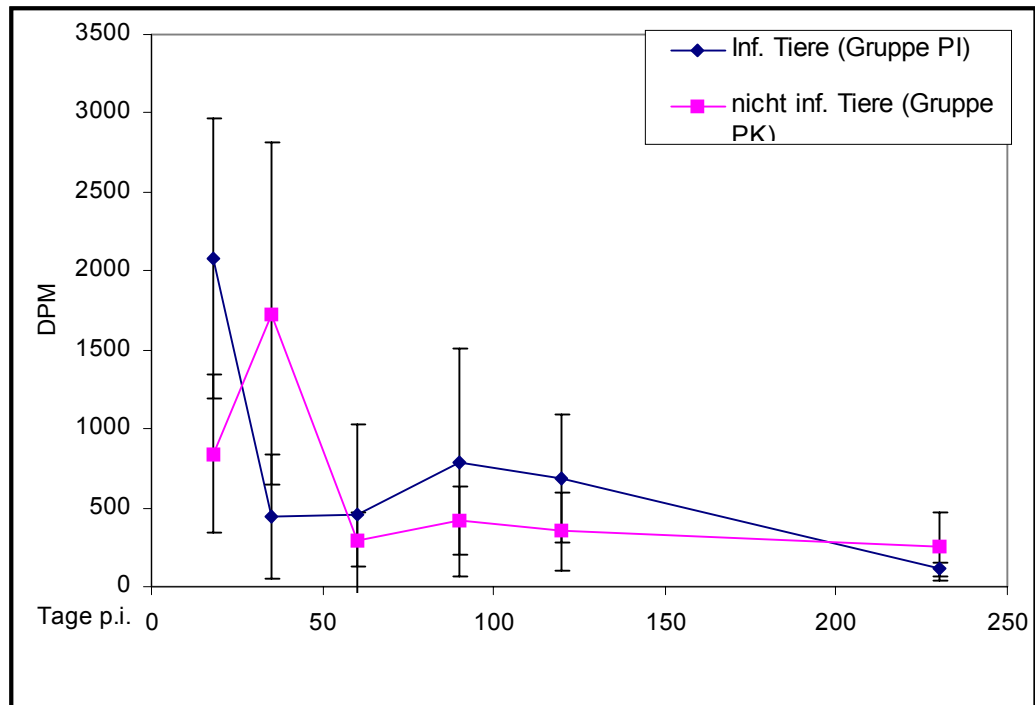


Abb. 5.23: Proliferationsleistung in Reaktion auf die Stimulation mit Männchen-Antigen von peripheren Blutlymphozyten *B. malayi*-infizierter *M. coucha* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (A) und infizierter am Tag 134 chemotherapeutisch behandelter *M. coucha* (Gruppen PCGP, PFlub, PBay) im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Tieren (Gruppe PI) (B). Die Proliferationsleistung wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Die Abbildungen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen als senkrechte Balken wieder.

T. n. B.: Tage nach Behandlung; DPM: decay per minute

A)



B)

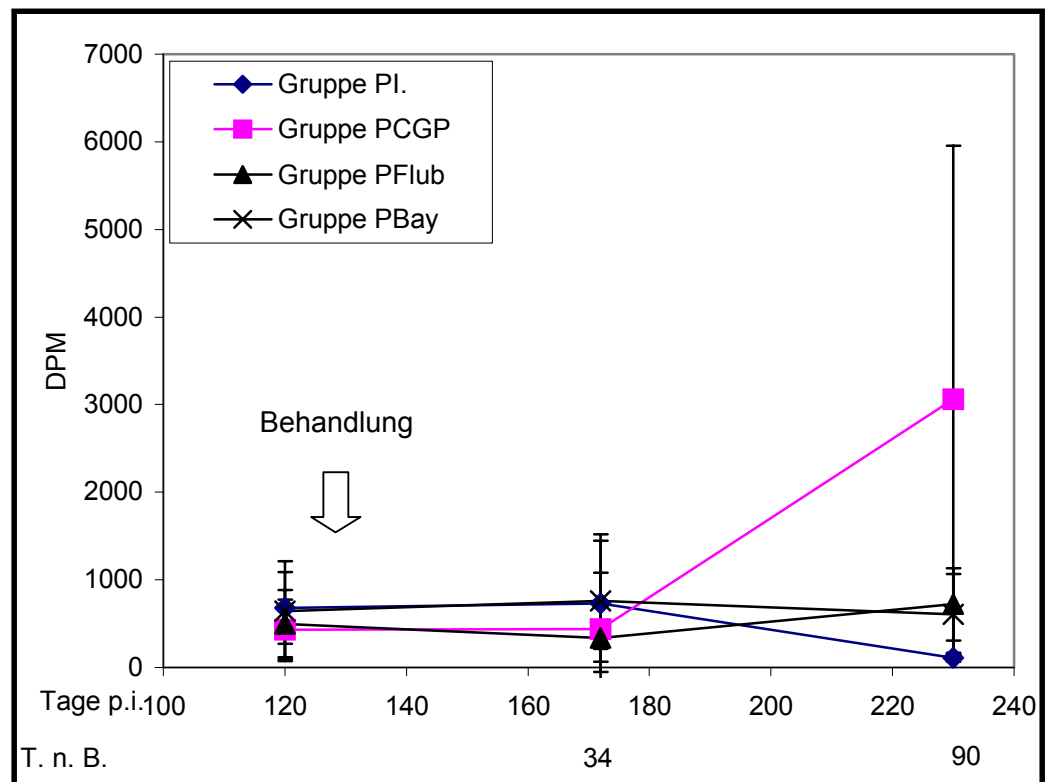


Abb. 5.24: Proliferationsleistung in Reaktion auf die Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen von peripheren Blutlymphozyten *B.malayi*-infizierter *M. coucha* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (A) und infizierter am Tag 134 chemotherapeutisch behandelter *M. coucha* (Gruppen PCGP, PFlub, PBay) im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Tieren (Gruppe PI) (B). Die Proliferationsleistung wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt. Die Abbildungen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen als senkrechte Balken wieder. T. n. B.: Tage nach Behandlung; DPM: decay per minute

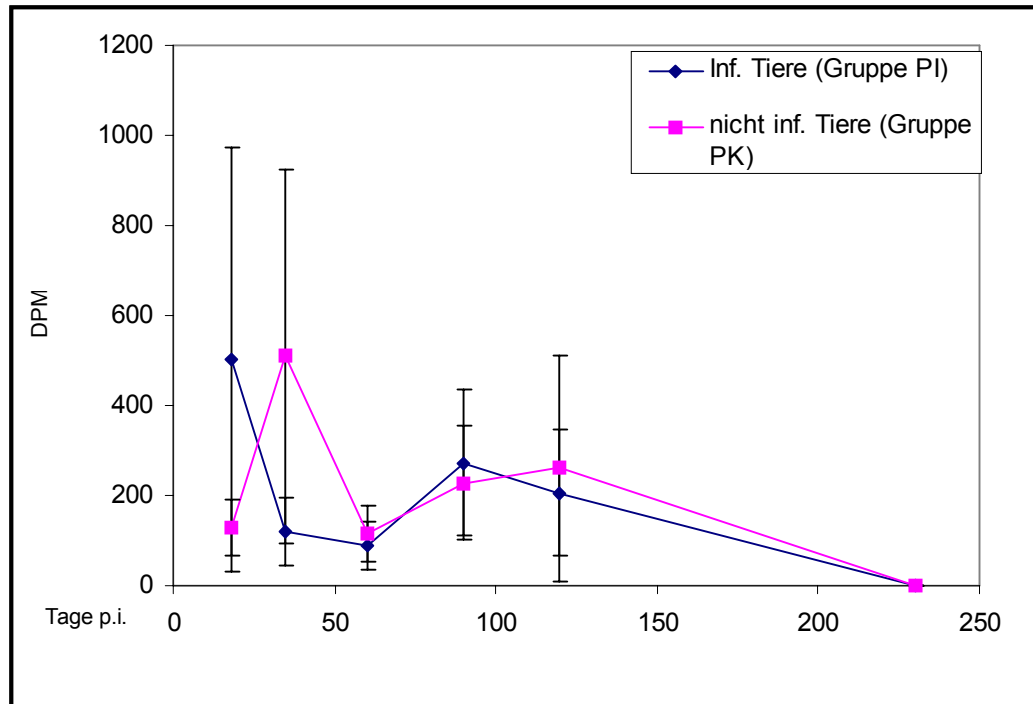


Abb. 5.25: Proliferationsleistung von peripheren Blutlymphozyten *B:malyi*-infizierter *M. coucha* in Reaktion auf die Stimulation mit L3-Antigen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen. DPM: decay per minute

5.7 Transkription der Zytokingene im Verlauf der Infektion von *M. coucha* mit *B. malayi*

Die Unterschiede zwischen den Transkriptionsraten der einzelnen Tieren einer Gruppe waren in allen Versuchsansätzen sehr groß. Die dadurch zustande kommende schiefe Verteilung der Daten wurde durch Logarithmieren aller Werte in eine näherungsweise normale Verteilung umgewandelt, so daß eine statistische Auswertung möglich war. In den Abb. 5.26-5.45 sind demzufolge die geometrischen Mittelwerte (x_g) und die Streufaktoren (SF) dargestellt. Eine Übersicht über die Signifikanzwerte der einzelnen Gruppen befindet sich im Anhang V.

Nachdem die densitometrische Auswertung abgeschlossen worden war, wurden anhand der Polyacryamid-Gele (s. 3.14) diejenigen Messungen aussortiert, zu denen entweder die β 2-Mikroglobulin-Plasmidbande oder die Proben-Plasmidbande fehlten oder nicht auswertbar waren. Bei β 2-Mikroglobulin traf dies für sechs von 762 Proben, für die Zytokinamplifikate für 71 von 3810 Proben zu.

Die Normalisierung der Int OD-Werte aller Proben erfolgte durch Angleichen an die willkürlich gewählte β 2-Mikroglobulin-Probe des infizierten Tieres 1 am Tag 18 nach Stimulation mit Con A mit dem IntOD-Wert 2,020 für die Zytokin-Banden und dem IntOD-Wert 0,840 für die Plasmid-Banden (vergl. 3.15.2.). Die Werte wurden als „arbitrary units“ angegeben.

Alle Untersuchungen wurden als echte Verlaufsuntersuchungen vorgenommen. In den Abb. 5.28, 5.29, 5.32, 5.33, 5.36, 5.37, 5.40, 5.41, 5.44 und 5.45 sind die einzelnen Datenpunkte allein aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht verbunden.

Die Ergebnisse der Positivkontrollen (die Zellen wurden mit dem T-Zell-Mitogen Con A stimuliert) und der Negativkontrollen (Inkubation der Zellen in RPMI ohne Stimulation) sind ohne Abbildung.

Die Endwerte nach Quantifizierung der PCR-Amplifikate wurden aber in die statistischen Analysen aufgenommen und finden sich im Anhang V.

5.7.1 IL-2-Gen-Transkription (vergl. Abb. 5. 26-5.29)

Die IL-2 Gentranskription zeigte starkte Abhängigkeiten vom Infektionsstatus. Bei fast allen eingesetzten Antigenen waren die Unterschiede zwischen den infizierten Tieren und den nicht infizierten Tieren hochsignifikant (s. Anhang V, Tab. A 11). Lediglich nach Stimulation mit L3-Antigen war der Gruppenunterschied mit $p=0,034$ nur schwach signifikant.

Dagegen war der Einfluß der einzelnen Untersuchungstage im Infektionsverlauf nur nach Stimulation mit Männchen-Antigen ($p = 0,0096$) signifikant.

Am ersten Untersuchungstermin-Tag 18.p.i.- reagierten die Zellen infizierter Tiere stärker auf eine Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen- und -Männchen-Antigen als die der Kontrollen (Abb. 5.26 A, B). Danach kam es bei den infizierten Gruppen zu einem kontinuierlichen Absinken der IL-2-Transkriptionsraten. Dabei wurde am Tag 60 p.i. bei beiden Antigenen das Transkriptionsniveau der nicht infizierten Kontrollen erreicht. Auffällig war danach eine Steigerung der Transkription am Tag 90 p.i., jedoch waren die Veränderungen im Vergleich zur infizierten Gruppe ZK lediglich nach Stimulation mit Männchen-Antigen über die Zeit mit $p = 0,0096$ signifikant. Nach dem Peak des Tages 90 p.i. erfolgte ein erneutes Absinken der Transkription, so daß die Werte der infizierten Gruppe am Tag 172 p.i. auf bzw. unter (nach Stimulation mit Männchen-Antigen) das Niveau der nicht infizierten Gruppe fielen. Ein nachfolgender Anstieg der Transkriptionsraten fiel nach Stimulation mit Weibchen-Antigen stärker aus, als nach Stimulation mit Männchen-Antigen, jedoch wurden in beiden Fällen Werte erreicht, die über denen des Tages 90 p.i. lagen. Der Gruppenunterschied zwischen den Gruppen ZI und ZK war nach Stimulation mit Weibchen- und Männchen-Antigen mit $p = 0,0003$ bzw. $p < 0,0001$ hochsignifikant.

Bei Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen kam es am Tag 18 p.i. sowohl bei den infizierten Tieren, als auch bei den Kontrolltieren zu einer deutlichen Transkription von IL-2 (Abb. 5.27A). Die Transkriptionsraten fielen bei beiden Gruppen parallel bis zum Tag 35 p.i. ab, beginnend mit Tag 60 p.i. zeigten die infizierten Tiere aber gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Werte, wobei Gipfelwerte am Tag 120 p.i. beobachtet wurden. Bis zu Tag 172 p.i. glichen sich die Werte der beiden Gruppen wieder an. Am Tag 230 p.i. wurde erneut ein leichter Anstieg der Transkriptionswerte in der Gruppe der infizierten Tiere beobachtet. Der Gruppenunterschied zwischen der infizierten - und der nicht infizierten Gruppe war mit $p < 0,0001$ hochsignifikant.

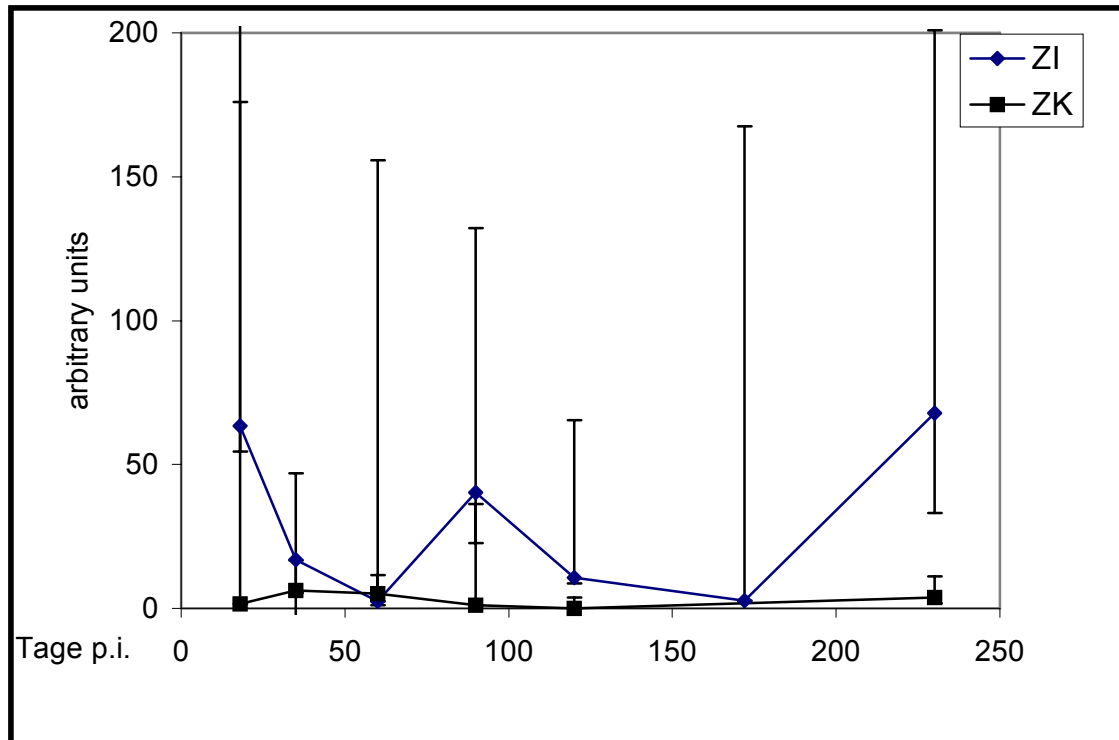
Mit L3-Antigen ließ sich nur bei einzelnen infizierten Tieren bis zum Tag 90 p.i. und ab Tag 172 p.i. eine schwache Transkription des IL-2-Gens induzieren (vergl. Abb. 5.27 B).

Die Behandlung der Tiere mit CGP 20376 hatte keinen eindeutigen Einfluß auf die Transkriptionsraten von IL-2 nach Stimulation mit Weibchen-Antigen. Zwar ließ sich für die behandelte Gruppe (ZCGP) mit $p < 0,0001$ ein hochsignifikanter Unterschied zu der nicht behandelten Gruppe (ZI) ermitteln, jedoch war dieser bereits vor der Behandlung aufgetreten (Abb. 5.28 A). In den Gruppen ZFlub und ZBay konnte ähnlich wie bei der nicht behandelten Gruppe ZI ein Anstieg der Transkription bis zum Tag 230 beobachtet werden, der in der letzteren Gruppe allerdings nur gering war. Nach Stimulation mit Männchen-Antigen zeigte

sich ein der Situation nach Stimulation mit Weibchen-Antigen ähnliches Bild. Die Werte der Gruppe ZCGP stiegen am Tag 230 jedoch stärker an als nach Stimulation mit Weibchen-Antigen, so daß sich auch für den Faktor Tag ein signifikanter ($p = 0,025$) Unterschied zu der nicht behandelten Gruppe ZI ergab (Abb. 5.28 B). Die zweithöchsten Werte wurden in Gruppe ZFlub beobachtet.

Nach der Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen konnte für die Tage 172 und 230 p.i. bei den Gruppen ZCGP und ZFlub, d.h. bei den Gruppen bei denen es nach Behandlung zu einer vollständigen Elimination aller Parasitenstadien gekommen war, ein Anstieg der Transkriptionsraten beobachtet werden, wobei die Wechselwirkung zwischen Gruppen und Tag signifikant ($p = 0,0284$ bzw. $p = 0,0171$) war. Dagegen hatte die Chemotherapie mit Bay 44-4400, die nicht zur Beseitigung der Wurmbürde geführt hatte, keinen positiven Einfluß auf die IL-2-Transkriptionsrate nach Stimulation der PBL mit Mikrofilarien-Antigen (Abb.5.29 A). Die Transkriptionsraten nach Stimulation mit L3-Antigen waren anfangs bei allen Gruppen sehr niedrig. Am Tag 230 konnte jedoch für die Gruppe ZCGP und ZFlub ein deutlicher Anstieg beobachtet werden (Abb. 5.29 B)

A)



B)

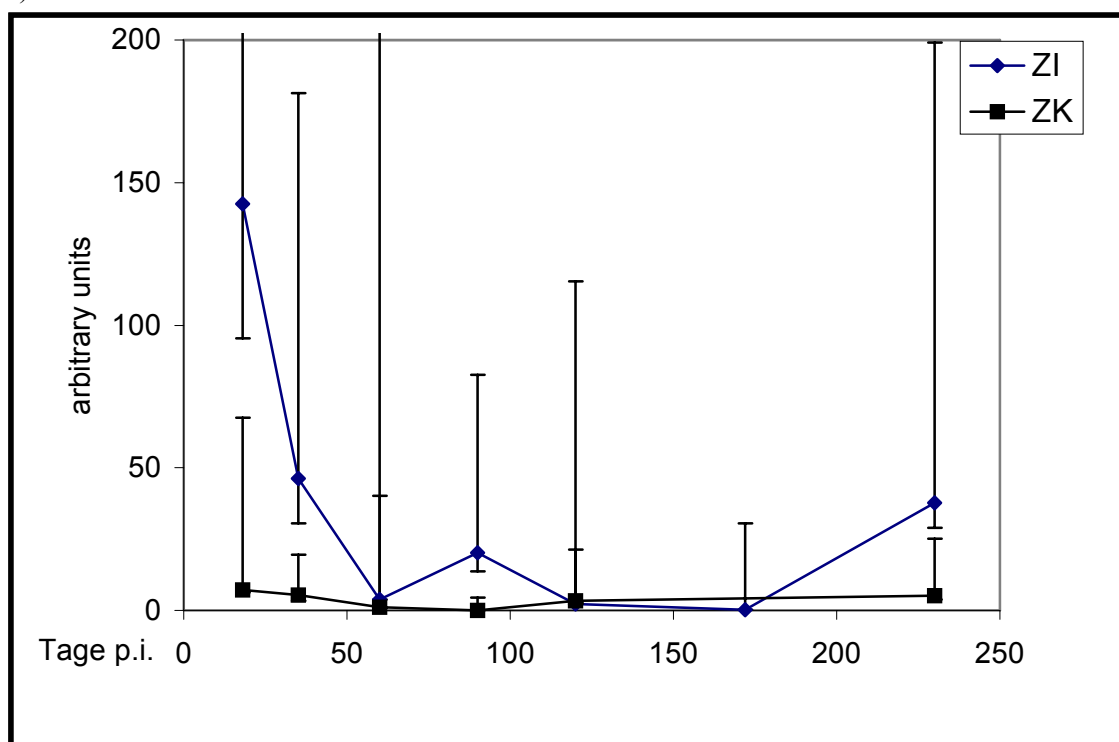
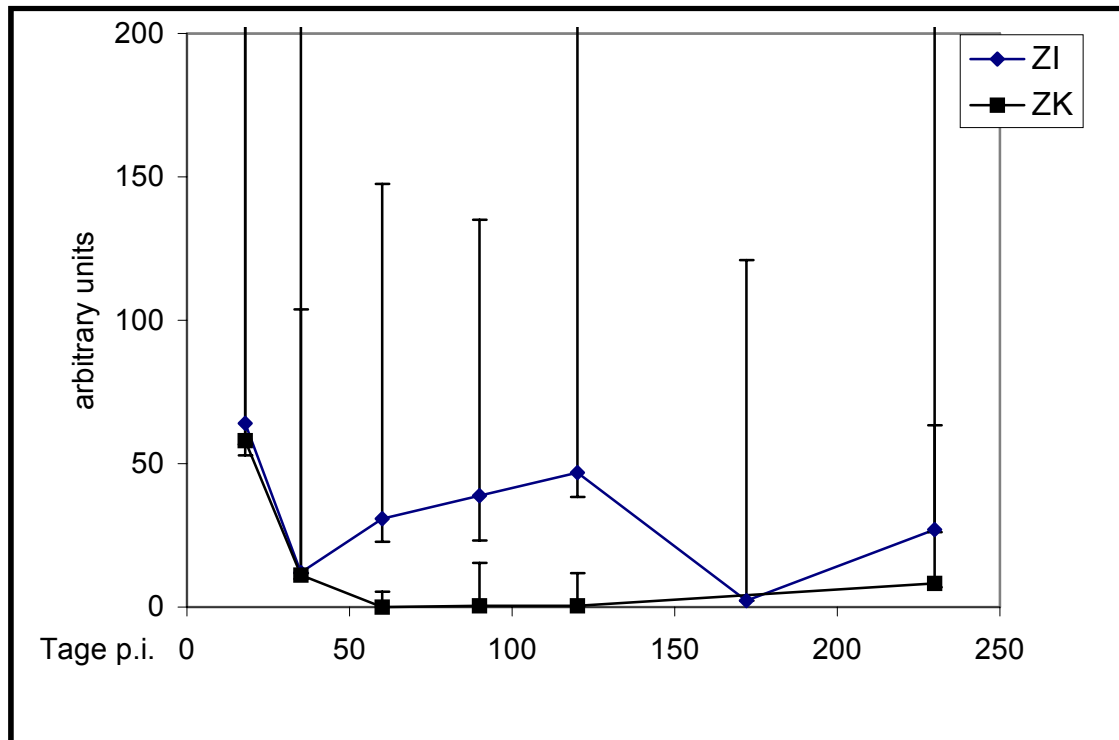


Abb. 5.26: Transkription des IL-2-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

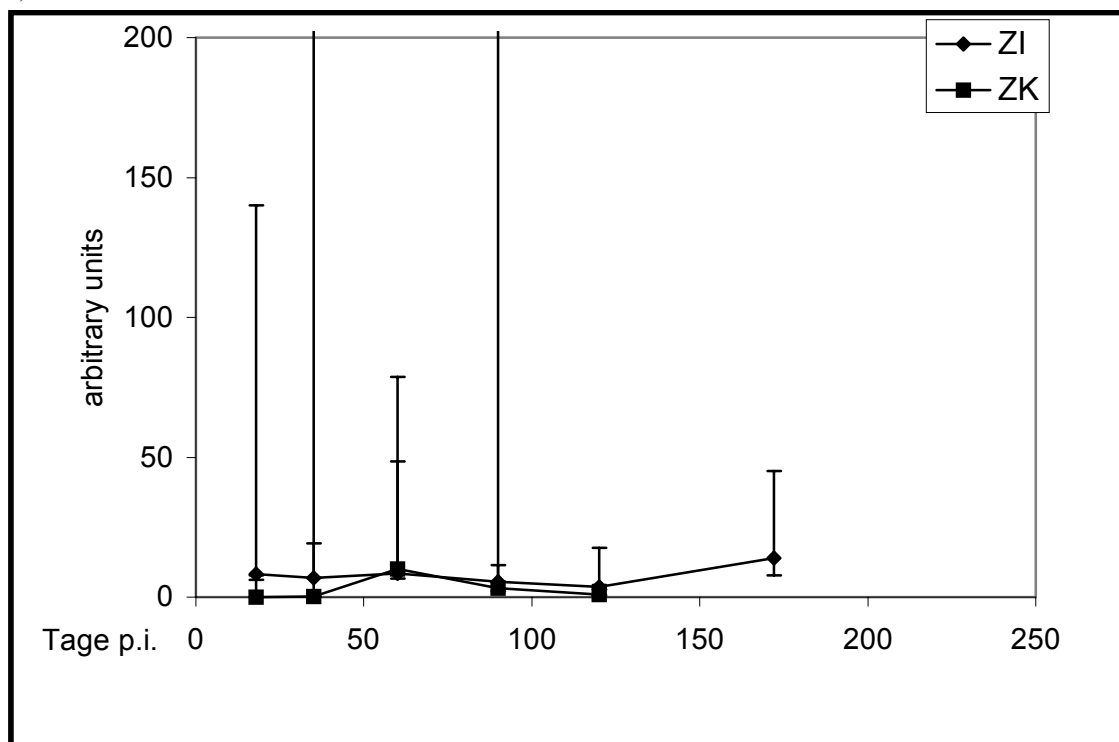
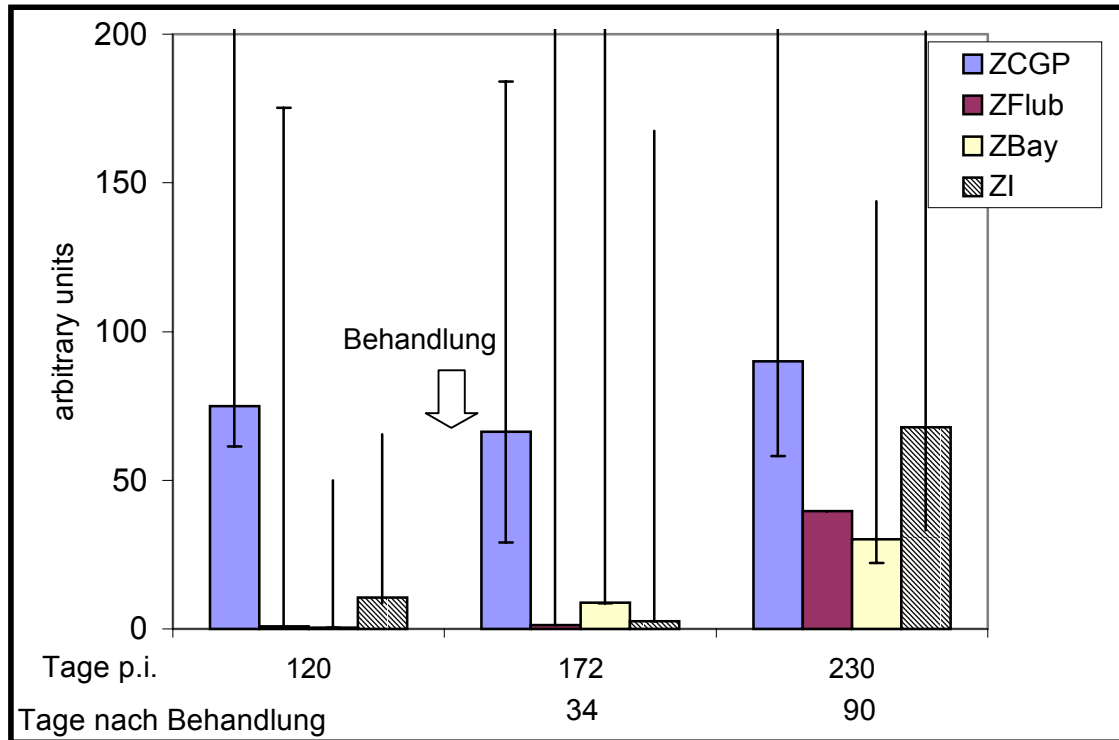


Abb. 5.27: Transkription des IL-2-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

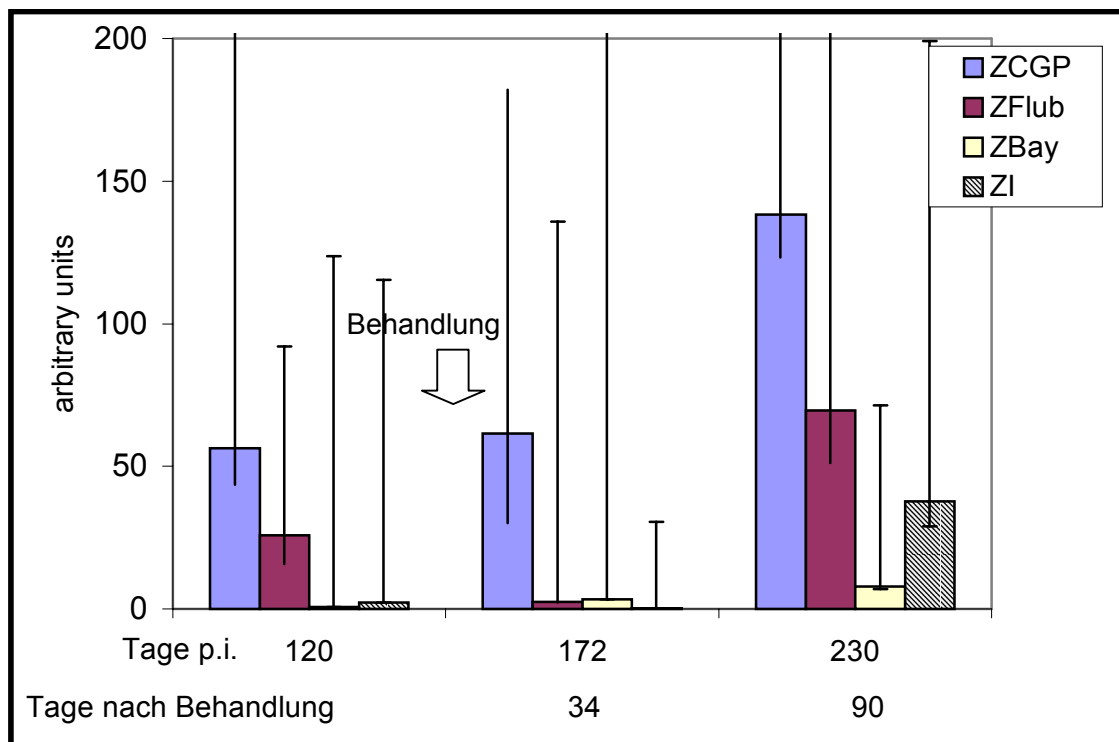
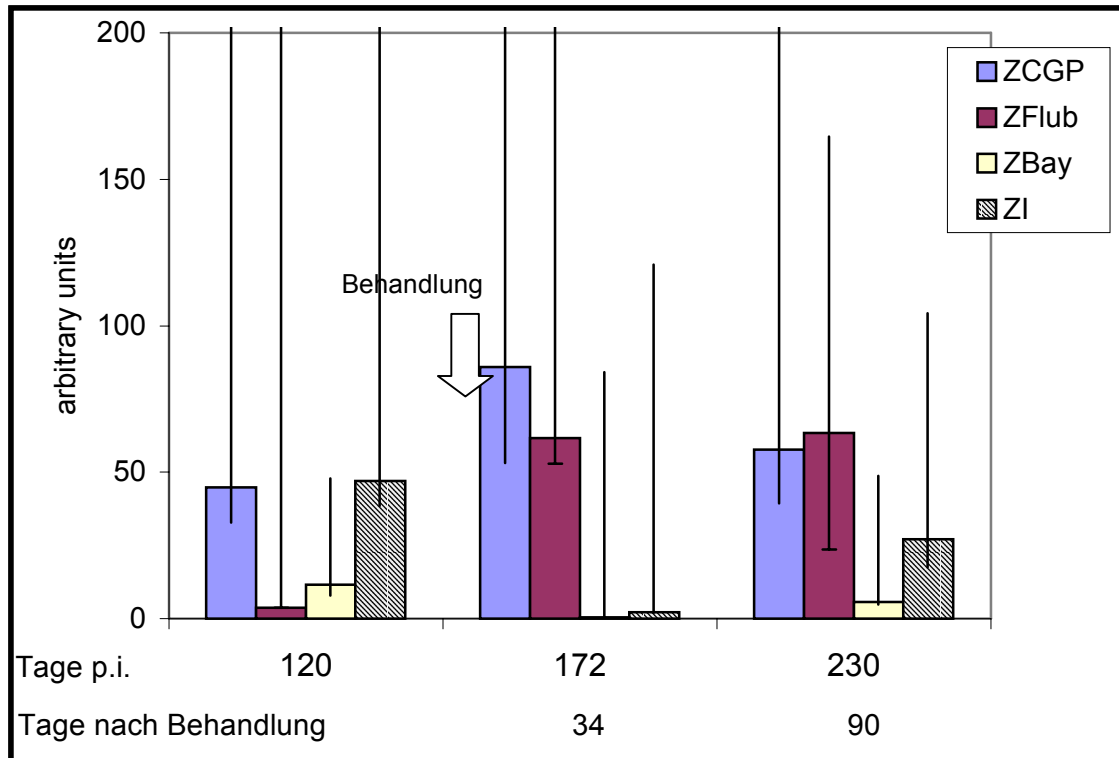


Abb. 5.28: Transkription des IL-2-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

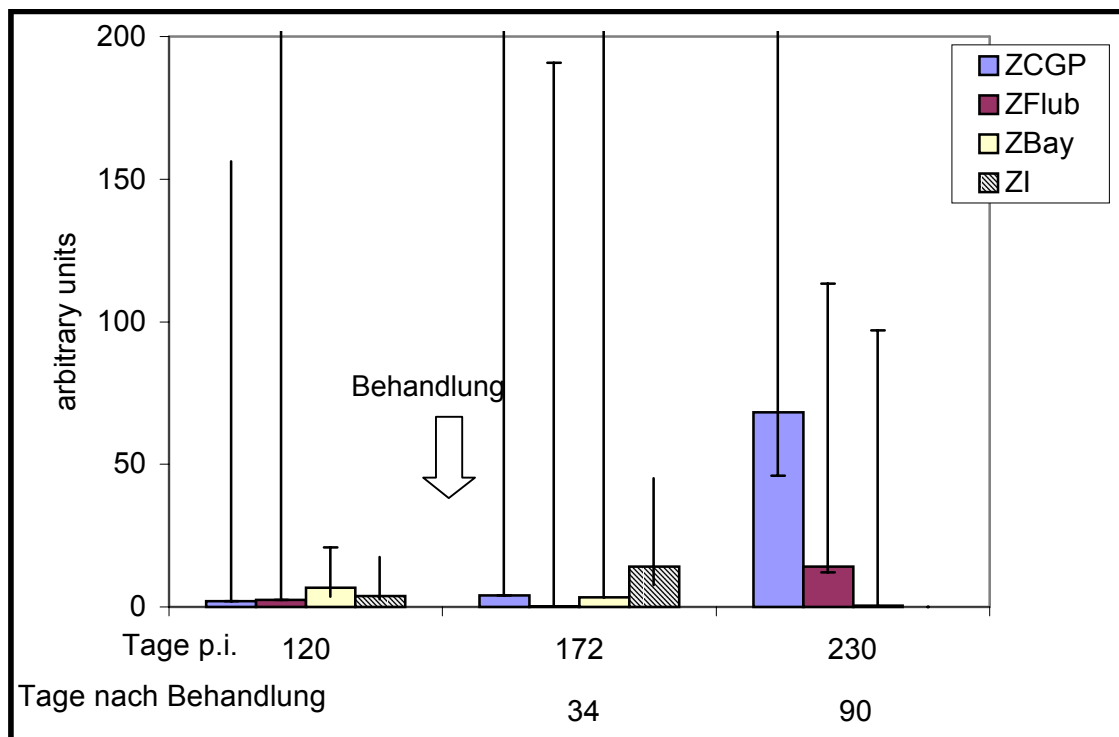


Abb. 5.29: Transkription des IL-2-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

5.7.2 IL-4-Gen-Transkription (vergl. Abb 5. 30-5.33)

Die IL-4-Gen-Transkription zeigte deutliche Abhängigkeiten sowohl von den stimulierenden Antigenen als auch vom Infektionstag. Die Gruppenunterschiede zwischen der infizierten und der nicht infizierten Gruppe waren nach Stimulation mit Weibchen- und L3-Antigen signifikant ($p = 0,0359$ bzw. $p = 0,0232$), nach Stimulation mit Männchen- und Mikrofilarien-Antigen hochsignifikant ($p < 0,0001$). Der Einfluß der Infektionstage auf die Transkription war bei Weibchen-, Mikrofilarien- und L3-Antigen ($p = 0,0063$; $p = 0,0002$; $p < 0,0001$) hochsignifikant.

In der Einzelbetrachtung der stimulierenden Antigene bewirkte die Stimulation mit Weibchen-Antigen nur eine schwache Steigerung der IL-4-Transkription. Die Kurve verlief parallel zu der der nicht infizierten Tiere, lediglich am Tag 172 p.i. wurde eine vergleichsweise deutlich stärkere Transkription beobachtet, jedoch bestanden große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Nach Stimulation mit Männchen-Antigen wurde eine gesteigerte Transkription gegenüber der nicht infizierten Gruppe (ZK) beobachtet, wobei es nach relativ hohen Werten von Tag 35 p.i. bis Tag 90 p.i. zu einem Abfall auf das Niveau der Kontrollwerte am Tag 120 p.i. kam. Nach einer erneuten Steigerung der Transkriptionswerte ab dem Tag 172 p.i. wurden die höchsten Werte am Tag 230 p.i. erreicht (Abb. 5.30 A, B).

Die Stimulation mit Mikrofilarien- und L3-Antigen führte in beiden Fällen zu einer kurzfristig massiv gesteigerten Transkription des IL-4-Gens am Tag 60 p.i. In der Folge bewirkte Mikrofilarien-Antigen bei den Zellen infizierter Tiere lediglich noch eine im Durchschnitt gegenüber Kontrollzellen leicht gesteigerte Transkription 172 und 230 Tage p.i. Im Falle des L3-Antigens zeigte sich bei infizierten Tieren ein erhöhter Wert am Tag 172 p.i. Für den weiteren Verlauf ist keine Aussage möglich, da die Werte des Tages 230 aus Materialgründen nicht ermittelt werden konnten (Abb. 5.31 A, B).

Die Behandlung der Tiere mit Flubendazol hatte keinen signifikanten Einfluß auf die IL-4-Transkriptionsraten nach Stimulation mit Weibchen-Antigen. Der Gruppenunterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren war nach Behandlung mit CGP 20 376 mit $p = 0,026$ zwar schwach signifikant, doch ergibt der Kurvenverlauf (Abb. 5.32 A) keine klare Tendenz. Nach Behandlung mit Bay 44-4400 stiegen dagegen die Transkriptionsraten vorübergehend stark an, so daß hier ein signifikanter ($p = 0,0031$) Gruppenunterschied auftrat. Am Tag 230 p.i. waren die Werte allerdings wieder auf das Niveau vor Behandlung abgesunken und lagen im Durchschnitt nur gering über denen der nicht behandelten Kontrollen (Abb. 5.32 A). Bei mit Männchen-Antigen stimulierten Zellen zeigten sich keine signifikanten gruppenabhängigen Veränderungen der IL-4-Transkriptionsraten nach

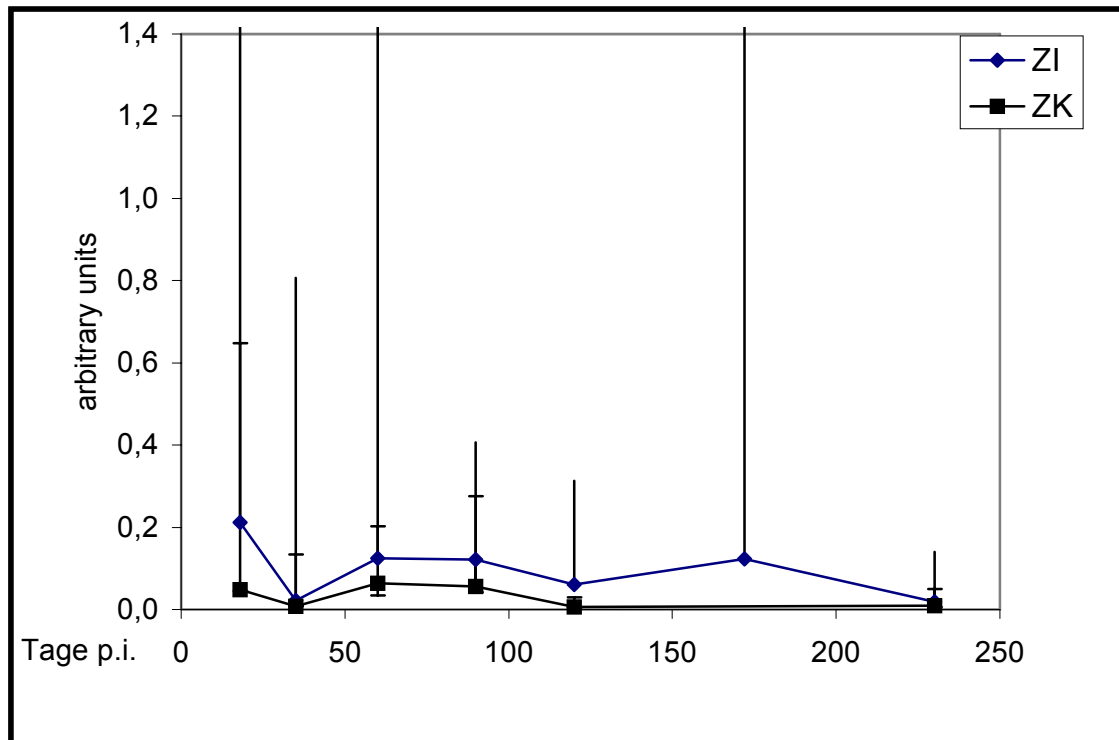
der filariziden Behandlung. Allerdings kam es auch nicht zu dem starken Anstieg der Transkriptionsraten zwischen den Tagen 172 p.i. und 230 p.i., der bei den nicht behandelten Tieren zu beobachten war (Abb. 5.32 B).

Die Verläufe der Transkriptionsraten nach Stimulation mit Mikrofilarienantigen unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen (Abb. 5.33 A).

Nach Stimulation mit L3-Antigen zeigte sich demgegenüber ein kontinuierliches Absinken der IL-4-Transkription im Anschluß an die Behandlung mit Bay 44-4400 (Abb. 5.33 B).

Der Unterschied zu der nicht behandelten Gruppe war mit $p=0,0096$ signifikant.

A)



B)

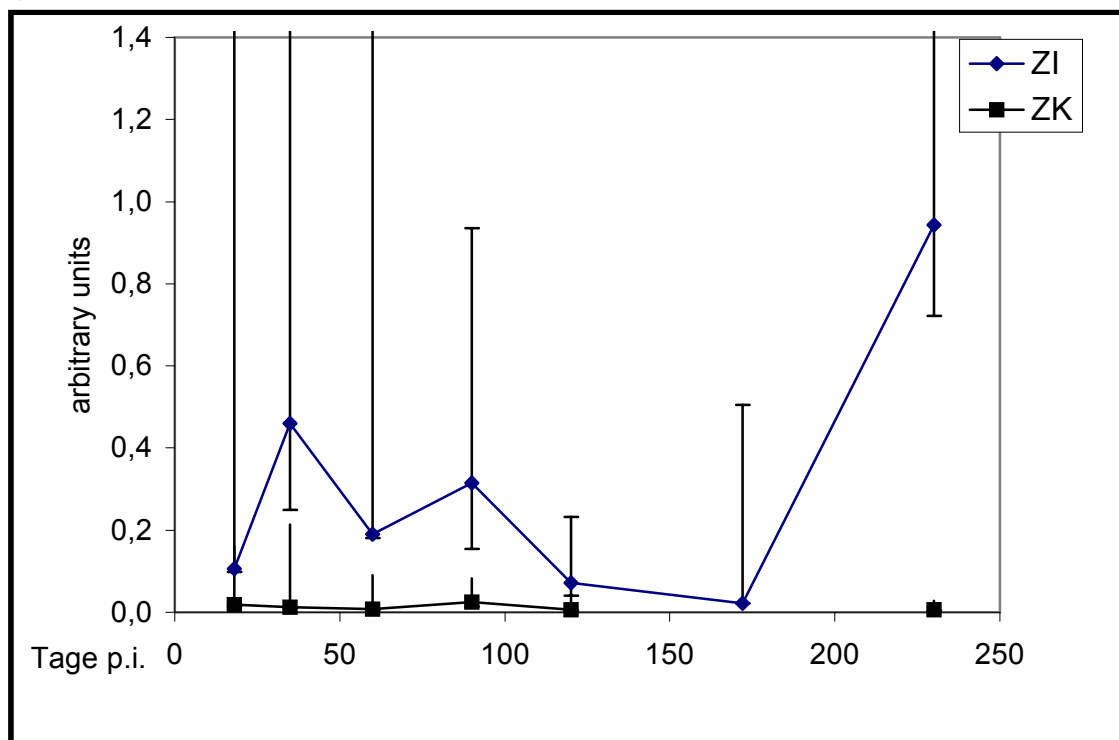
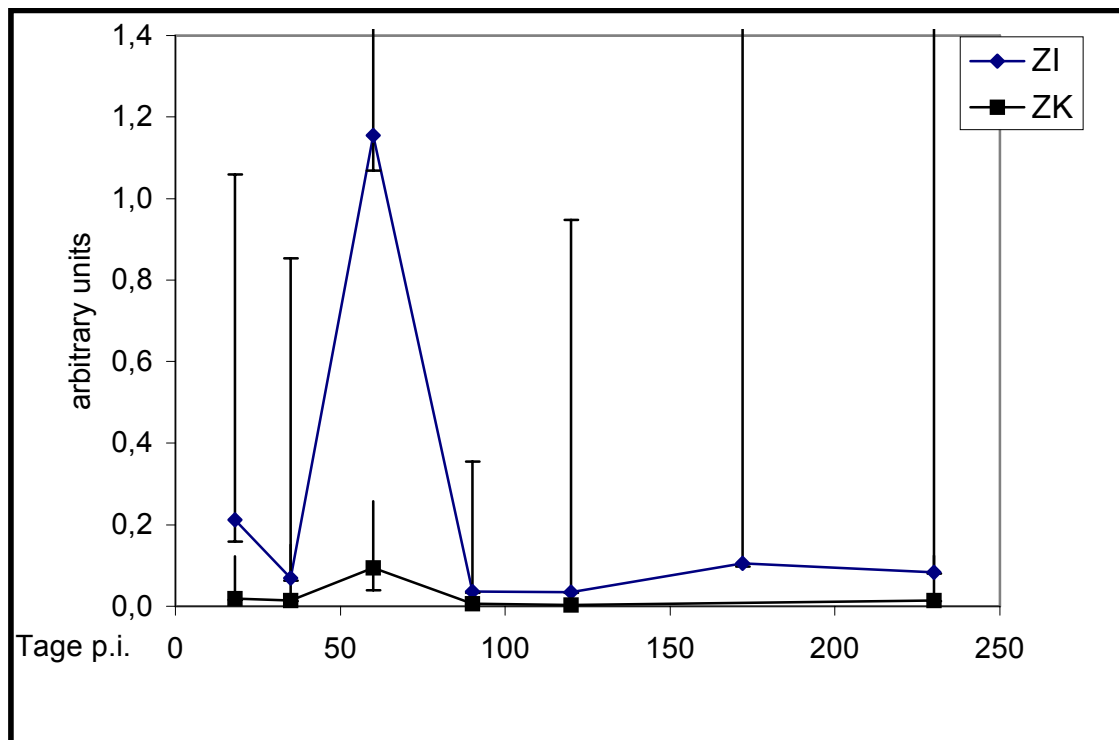


Abb. 5.30: Transkription des IL-4-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

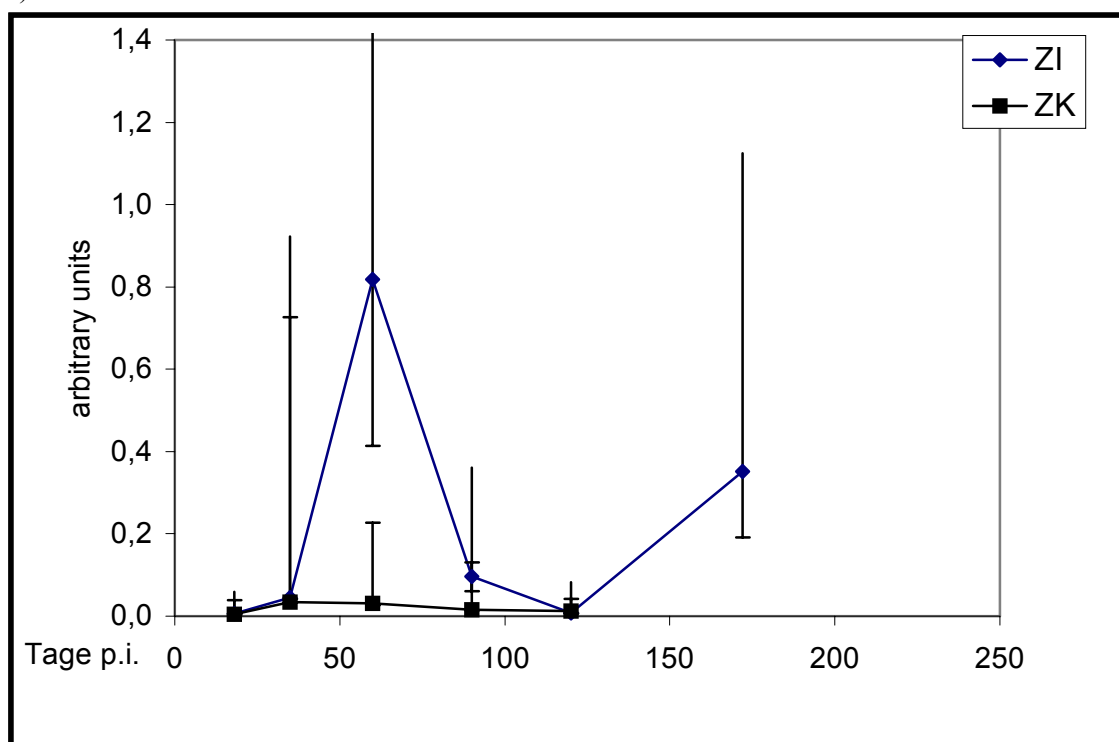
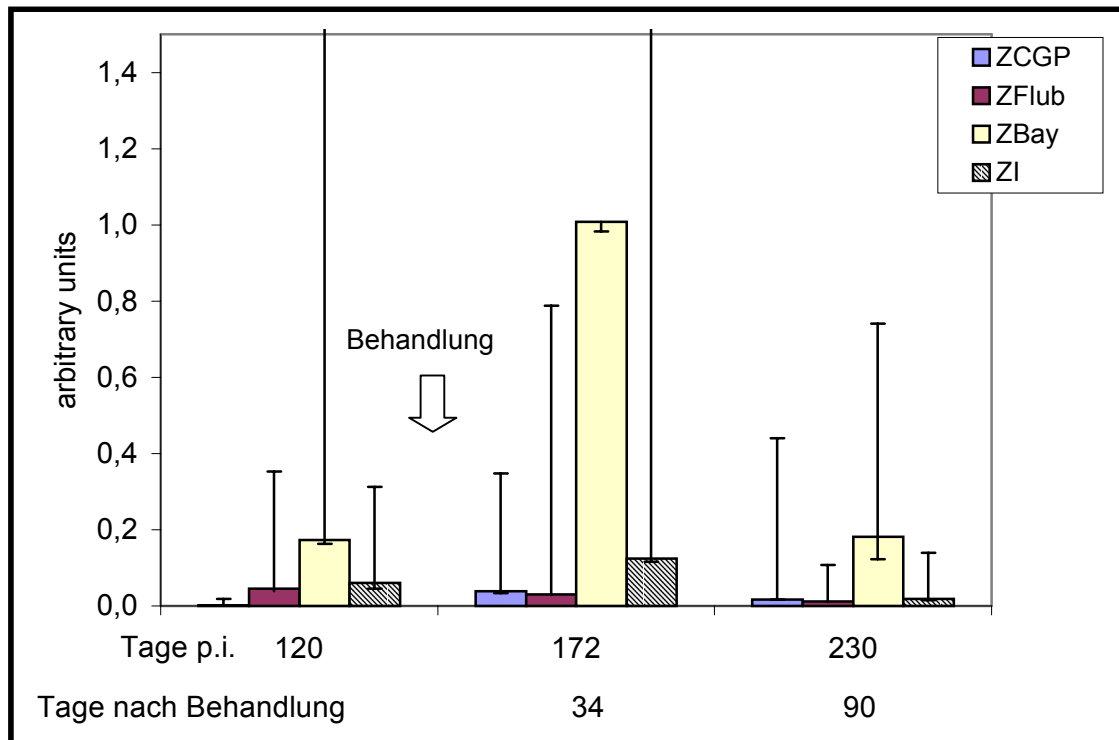


Abb. 5.31: Transkription des IL-4-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

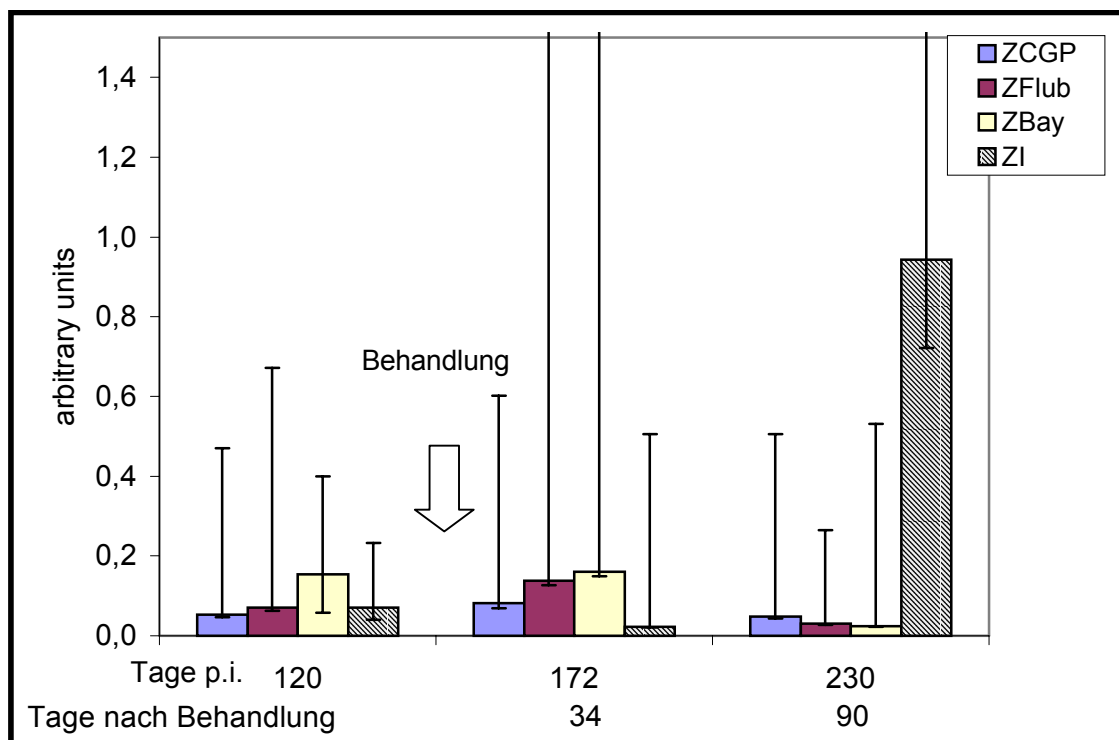
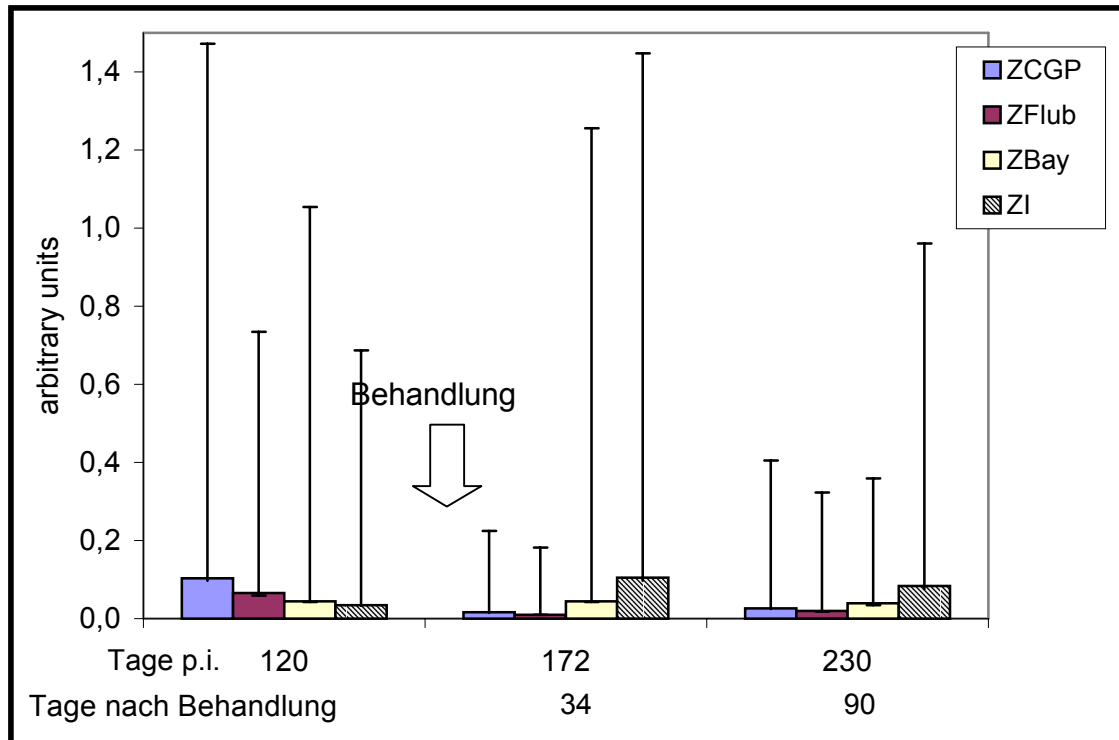


Abb. 5.32: Transkription des IL-4-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

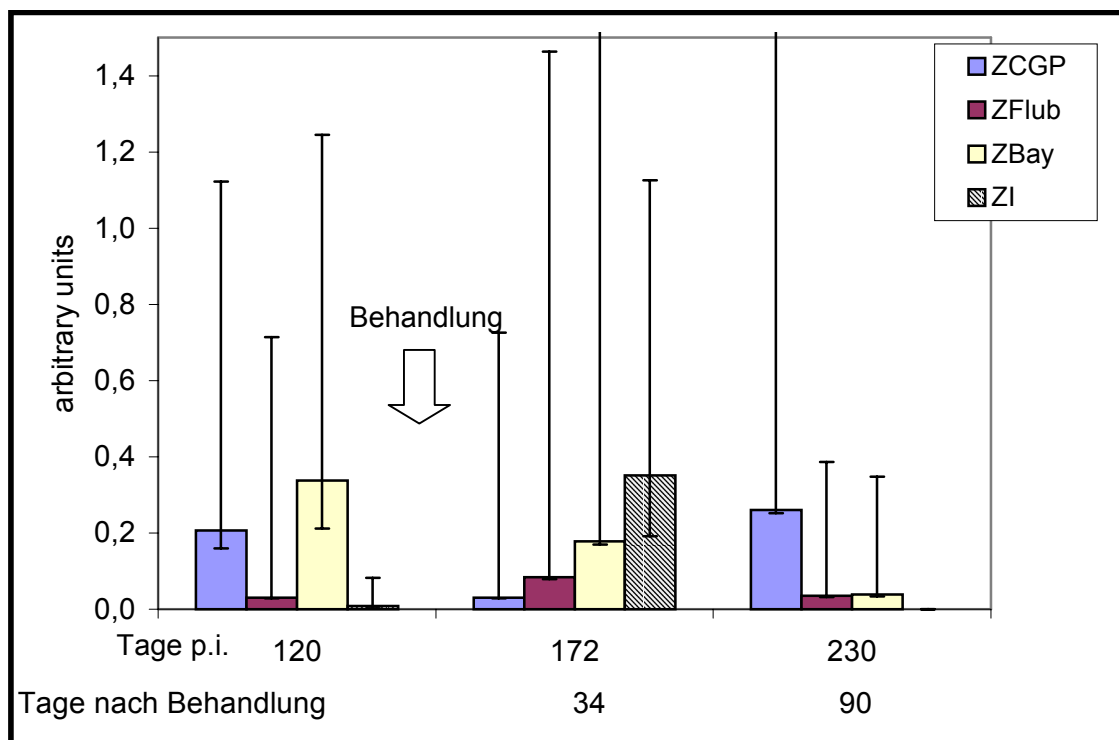


Abb. 5.33: Transkription des IL-4-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

5.7.3 IL-5-Gen-Transkription (vergl. Abb 5. 34- 5.37)

Die IL-5-Gen-Transkription zeigte wie bei den zuvor besprochenen Zytokinen IL-2 und IL-4 eine starke Abhängigkeit vom Infektionsstatus der Tiere. Bei allen eingesetzten Antigenen mit Ausnahme von Mikrofilarien-Antigen war der Gruppenunterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren hochsignifikant (Tab. A 11). Bei Mikrofilarien-Antigen konnte dagegen keine Signifikanz ermittelt werden. Der Einfluß der Untersuchungstage auf die Gen-Transkription war dagegen mit Ausnahme von L3-Antigen ($p=0,007$) nicht signifikant. Weibchen-Antigen induzierte in 18 Tage p.i. isolierten PBL eine gegenüber den Zellen von nicht infizierten Kontrollen deutlich gesteigerte IL-5-Gen-Transkription. Danach sanken die Transkriptionsraten zunächst bis zum Tag 60 p.i. ab, gefolgt von einem erneuten Anstieg der Transkription, der am Tag 90 p.i. seinen Höhepunkt erreichte. Im Anschluß fielen die Werte bis zu Tag 172 p.i. erneut auf das Kontrollniveau, wonach sie wieder anstiegen (Abb. 5.34 A). Nach Stimulation mit Männchen-Antigen waren die Transkriptionswerte der infizierten Tiere am Tag 18 p.i. im Durchschnitt zunächst gegenüber den Kontrollwerten erhöht, bereits am Tag 34 p.i. waren sie jedoch auf Kontrollniveau abgesunken. Nach dem 60. Tag p.i. zeigte sich ein starker Anstieg mit Maximalwerten am Tag 90 p.i. 120 und 172 Tage p.i. lagen die Werte wieder auf Kontrollniveau, doch trat ähnlich dem Weibchen-Antigen bei den infizierten Tieren am Tag 230 wieder eine Steigerung auf. (Abb. 5.34 B).

Die Stimulation von PBL mit Mikrofilarien-Antigen hatte dagegen weder bei infizierten *M. coucha* noch bei den Kontrollen einen signifikanten Einfluß auf die Transkriptionsraten. Allenfalls zeigten sich bei einzelnen Tieren am Tag 60 p.i. und nach dem Tag 120 p.i. erhöhte Werte (Abb.5.35A).

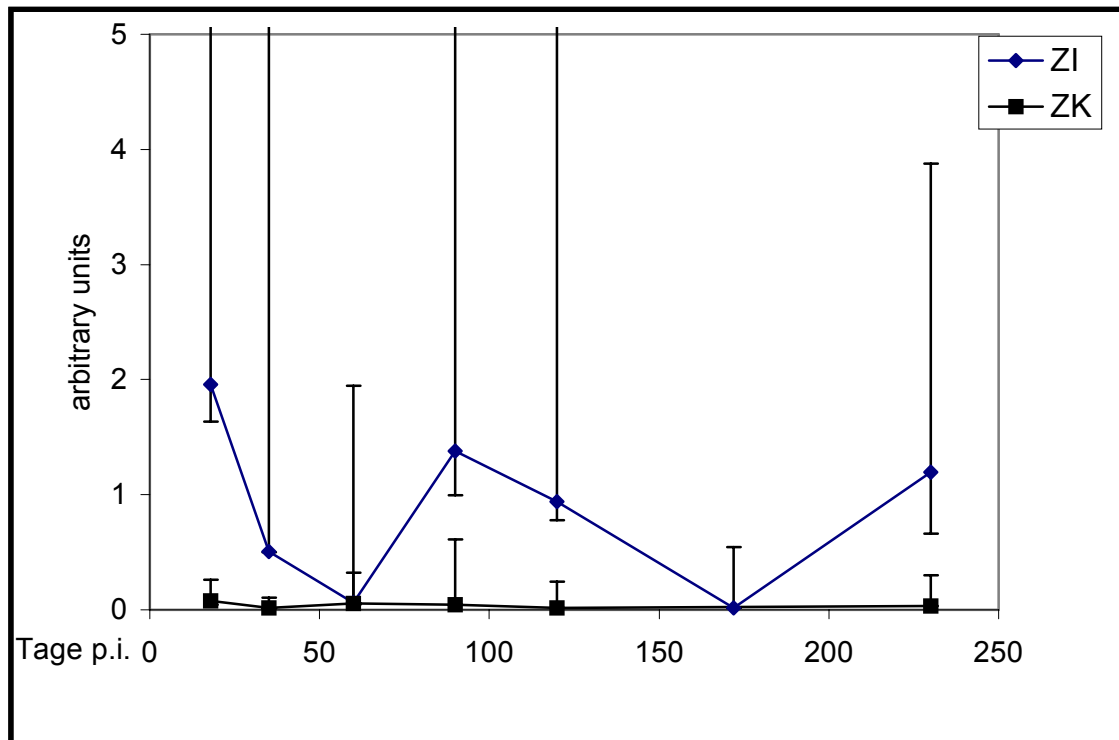
L3-Antigen induzierte in PBL infizierter Tiere in der Präpatenz (bis Tag 90 p.i.) eine gegenüber den Kontrollen gesteigerte Transkription des IL-5-Gens (Abb. 5.35 B). Eine eventuelle Steigerung zum Ende der Untersuchungsperiode wie sie bei den anderen Antigenen auftrat, konnte aus Materialgründen nicht untersucht werden.

Die Behandlung infizierter Tiere mit der makro- und mikrofilariziden Substanz CGP 20376 resultierte in Steigerungen der IL-5-Gen-Transkription nach Antigen-Stimulation (Abb. 5.36, 5.37). Die deutlichsten Effekte zeigten sich für Weibchen- und Mikrofilarien-Antigen mit einer bereits am Tag 34 nach Behandlung (172 Tage p.i.) stark vermehrten Transkription, gefolgt von einer weiteren Steigerung bis Versuchsende. Bei Männchen-Antigen war die Transkriptionsrate zum Ende zwar gleichfalls massiv erhöht doch war der meßbare Effekt 34 Tage nach der Behandlung verglichen mit den Steigerungen bei Weibchen und Mikrofilarien-Antigen geringer. Bei L3-Antigen kam es lediglich zu einer schwachen Steigerung.

Deutliche Veränderungen waren auch nach Behandlung mit dem ausschließlich makrofilariziden Medikament Flubendazol zu beobachten, sie beschränken sich jedoch vorwiegend auf eine gegenüber den Werten vor der Behandlung und gegenüber den nicht behandelten Kontrollen gesteigerte Transkriptsynthese am Tag 230 p.i.

Nach Bay 44-4400-Behandlung traten dagegen keine eindeutigen therapiebedingten Effekte auf. Die Werte entsprachen weitgehend denen der nicht behandelten Kontrollen.

A)



B)

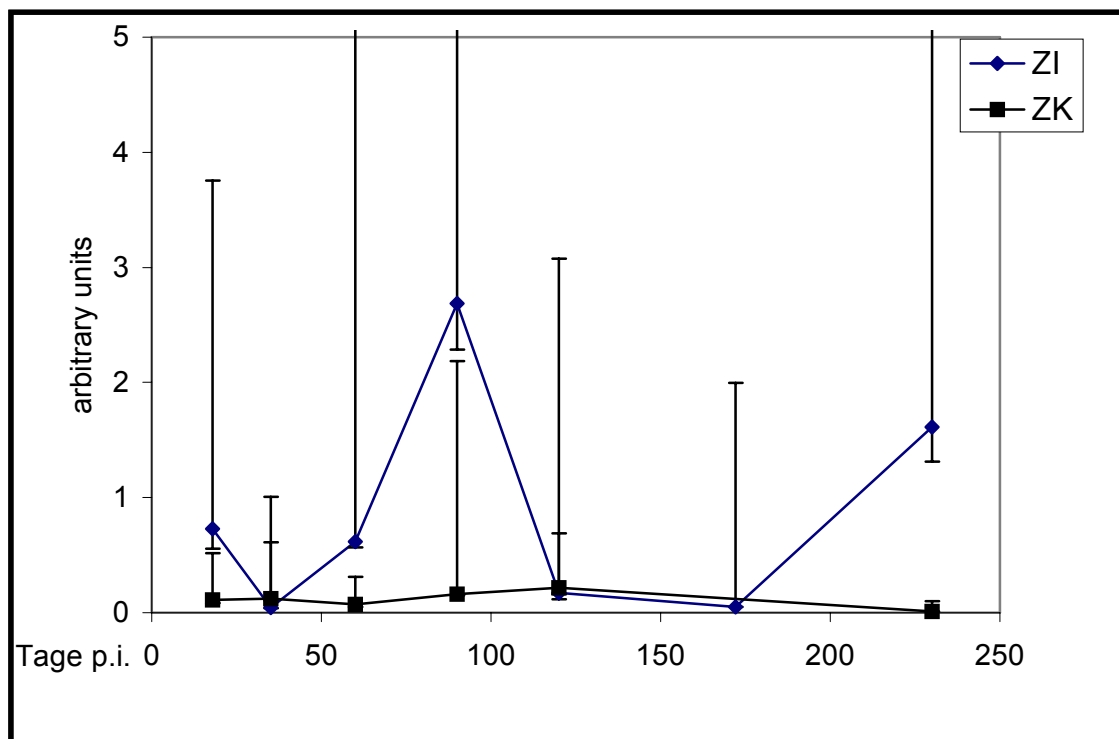
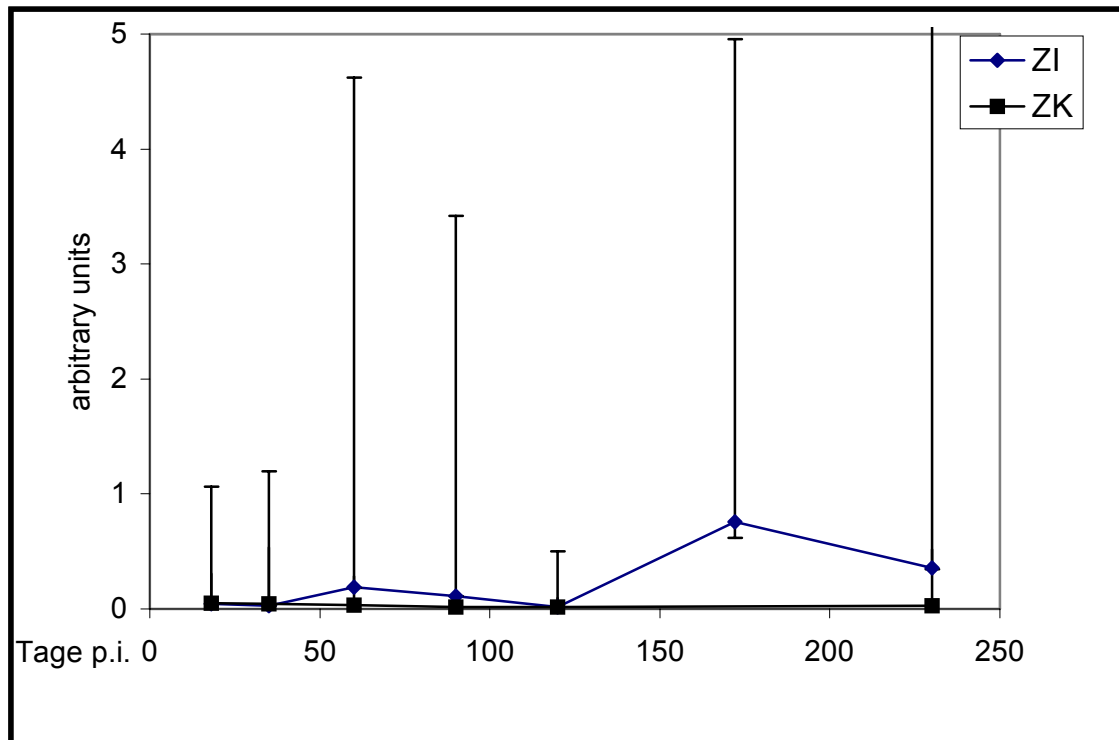


Abb. 5.34: Transkription des IL-5-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

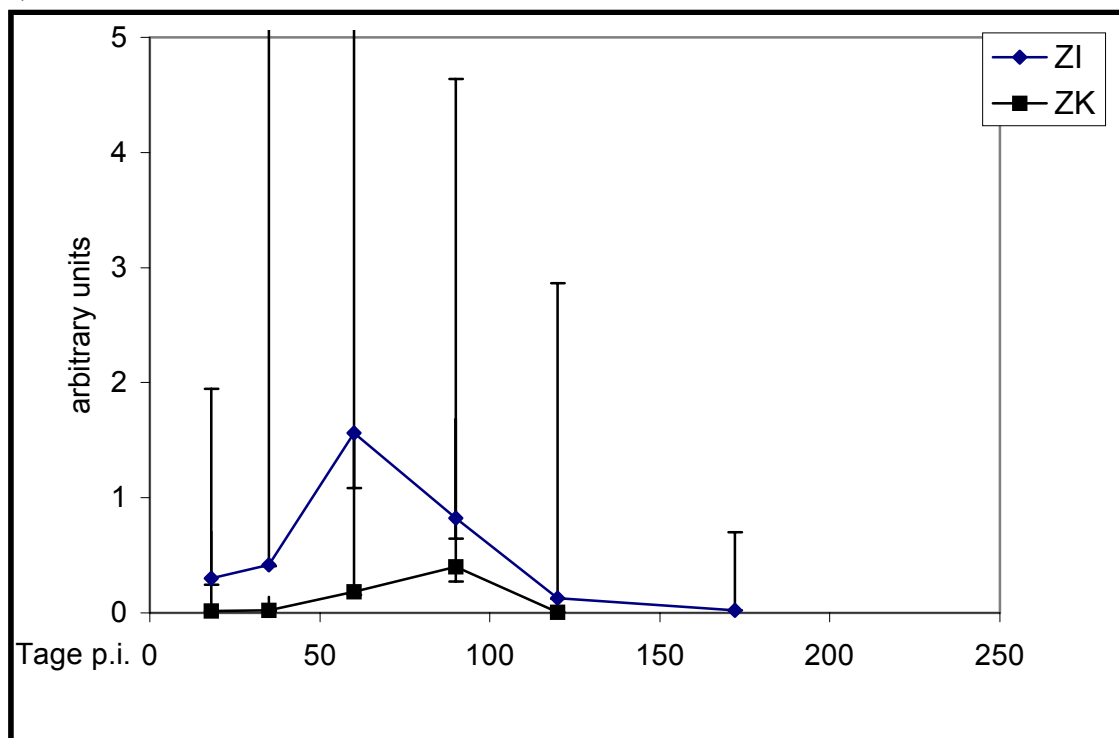
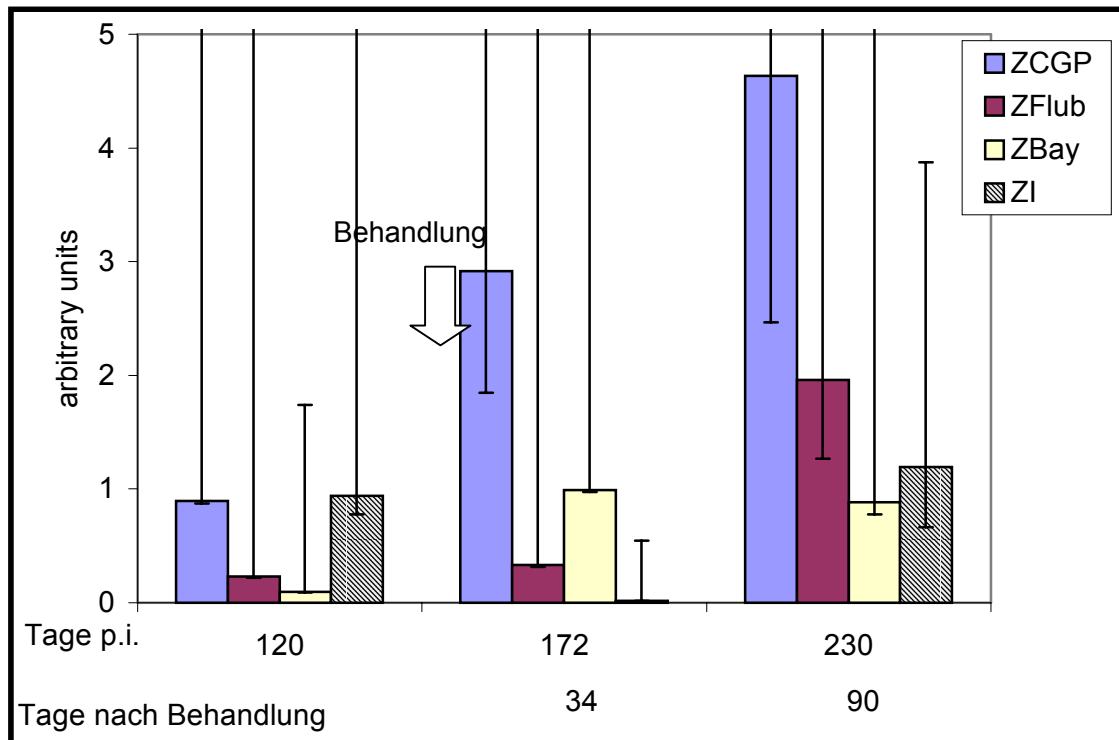


Abb. 5.35: Transkription des IL-5-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigenen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

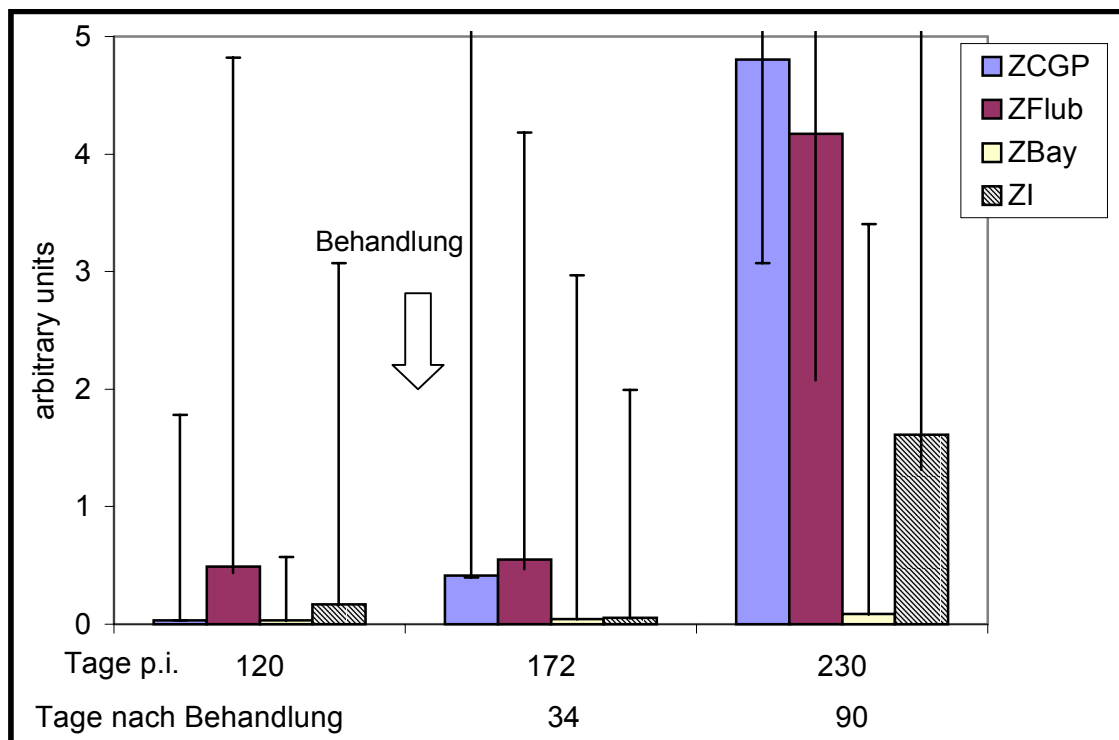
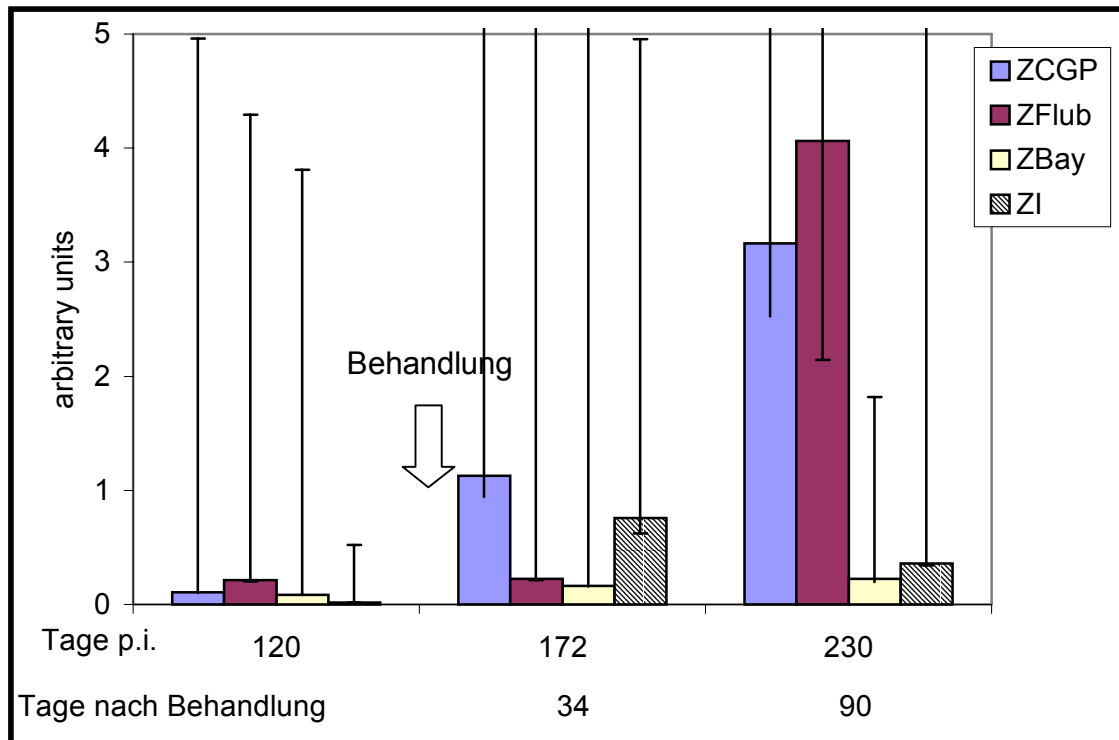


Abb. 5.36: Transkription des IL-5-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

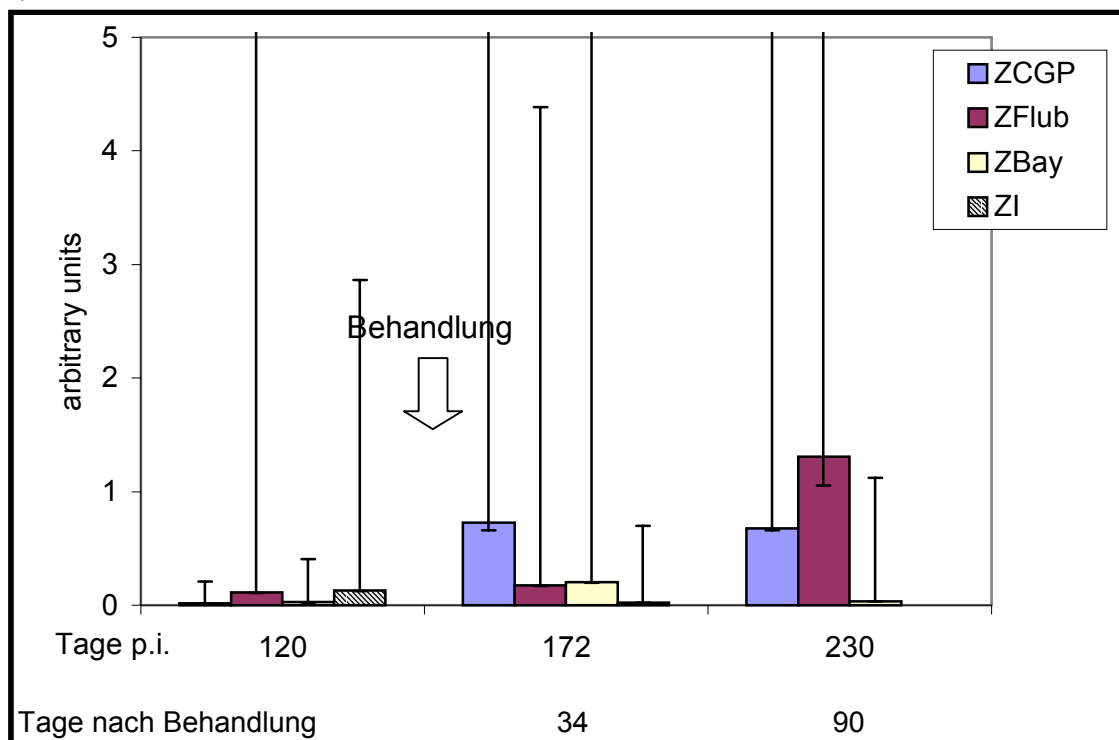


Abb. 5.37: Transkription des IL-5-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

5.7.4 IL-10-Gen-Transkription (vergl. Abb. 5.38-5.41)

Im Fall des IL-10-Gens war die Abhängigkeit vom Infektionsstatus nach Stimulation mit Männchen-, Mikrofilarien- und L3-Antigen signifikant, bzw. hochsignifikant (s. Tab. A 11). Nach Stimulation mit Weibchen-Antigen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Gruppen beobachtet werden. Anders als bei den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-5 war aber der Einfluß des Untersuchungstages im Infektionsverlauf in allen Fällen bedeutend (s. Tab. A11).

Nach Stimulation von PBL infizierter Tiere mit Weibchen- und Männchen-Antigen zeigte sich am Tag 34 p.i. gegenüber den Zellen nicht infizierter Tiere eine Steigerung der Transkription. Dem anschließenden Rückgang der Transkription folgte am 90. Tag p.i. ein vorübergehend sehr starker Anstieg, in dessen Folge bereits 120 Tage p.i. wieder Kontrollwerte erreicht wurden. Nach diesem Rückgang traten in der letzten Untersuchungsphase wieder gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöhte Transkriptionsraten auf (Abb. 5. 38 A, B).

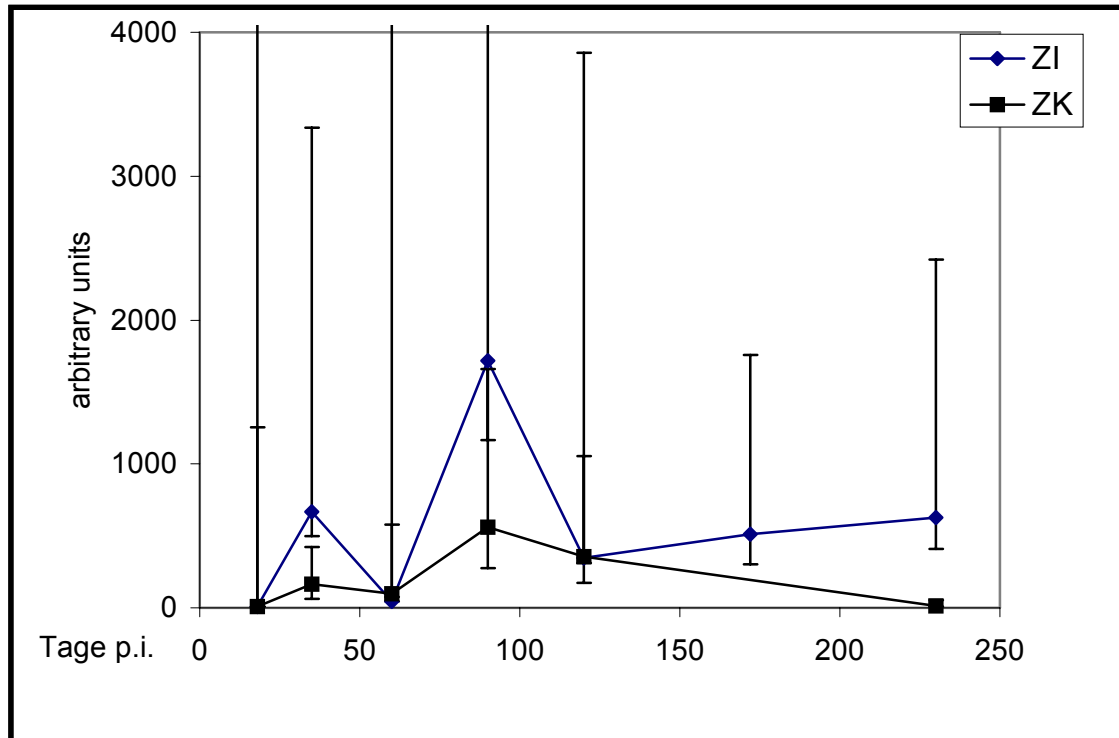
Bei Verwendung von Mikrofilarien-Antigen ließ sich 34 Tage p.i. gegenüber den Kontrollen keine Transkriptionsvermehrung nachweisen, doch zeigte sich ebenfalls ein ausgeprägter Peak am Tag 90 p.i., dem ein leichter Rückgang und eine erneute Steigerung zum Versuchsende folgten (Abb. 5.39 A).

Im Fall von L3-Antigen war dagegen der Peak am 34. Tag p.i. besonders deutlich. Einem vorübergehenden Abfall folgte ein zweiter Peak am Tag 90 p.i. Danach fielen die Werte bis zum 170. Tag ab, doch kann aus den bereits vorn genannten Gründen keine Aussage über die Situation am Tag 230 p.i. gemacht werden.

Die chemotherapeutische Behandlung der infizierten Tiere beeinflusste die IL-10-Gen-Transkription in Reaktion auf Weibchen- und Männchen-Antigen nicht in signifikantem Maß. Im Falle von Weibchen-Antigen ließ sich nach chemotherapeutischer Behandlung mit CGP 20376 und Flubendazol 34 Tage nach Behandlung eine vorübergehende Steigerung der Transkription beobachten, nach Behandlung mit Bay 44-4400 war die Steigerung bis zum Ende des Versuchszeitraumes vermutbar, jedoch nicht signifikant (Abb. 5.40 A).

Eine mit $p = 0,043$ bzw. $p = 0,0076$ signifikante Veränderung der IL-10-Transkription im Zeitverlauf konnte dagegen nach Behandlung mit Bay 44-4400 und Stimulation mit Mikrofilarien- und L3-Antigen im Vergleich zu der nicht behandelten Gruppe ZI nachgewiesen werden.

A)



B)

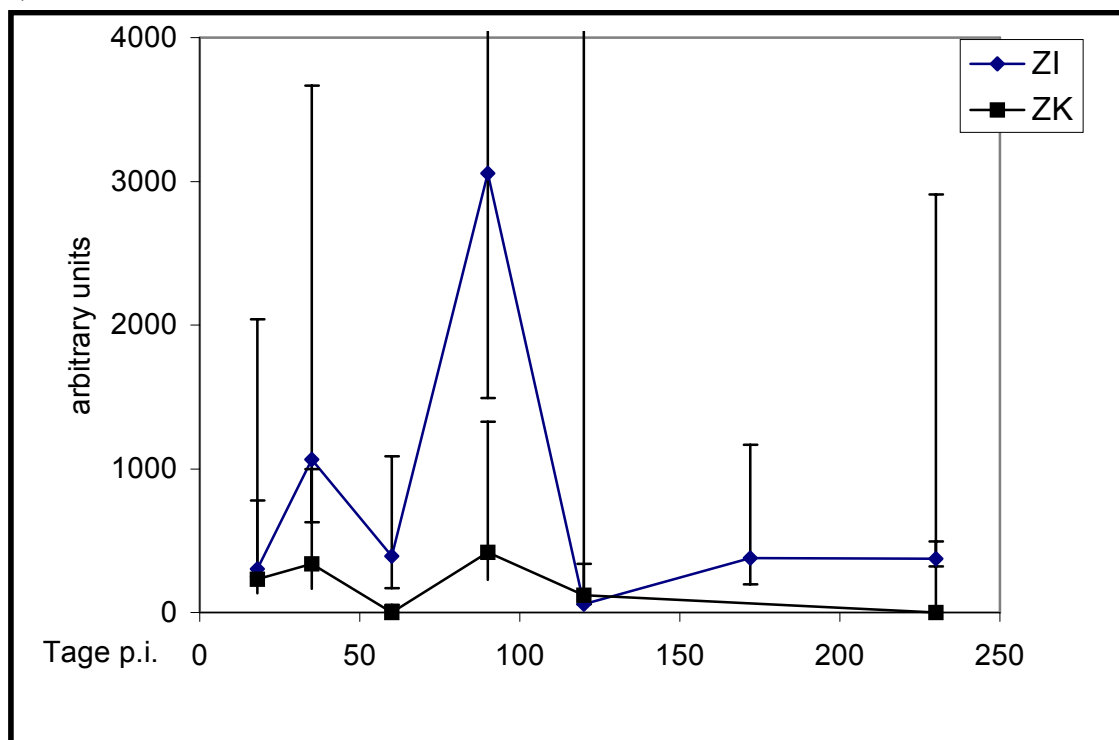
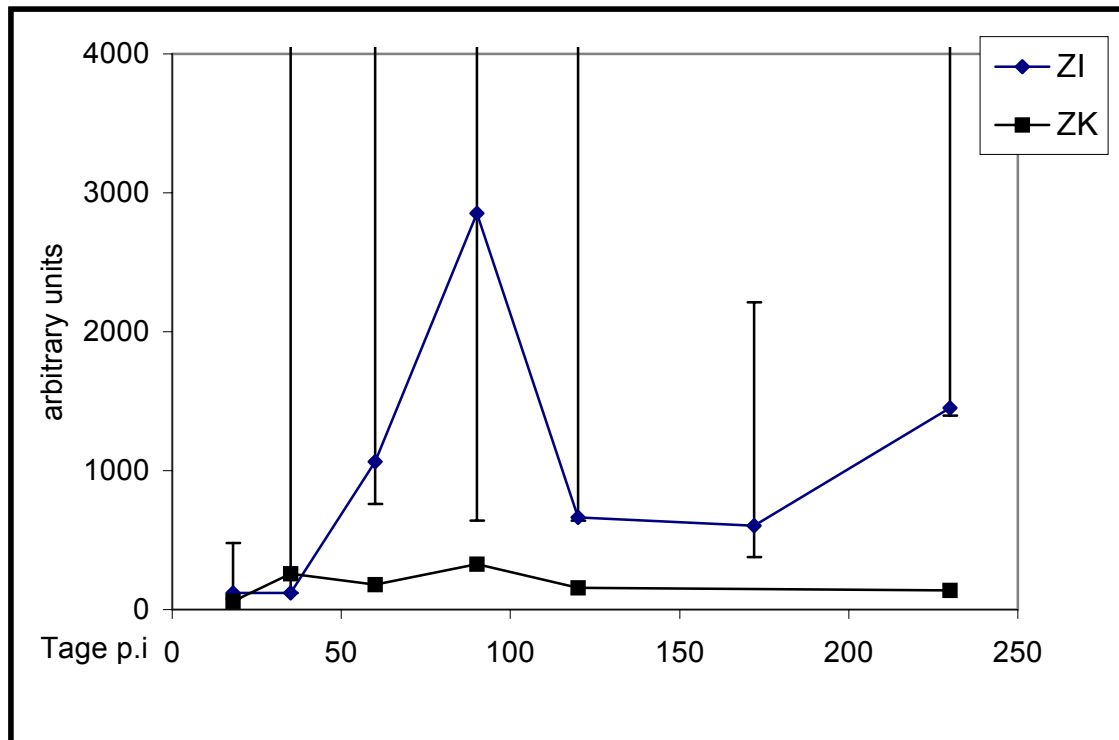


Abb. 5.38: Transkription des IL-10-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

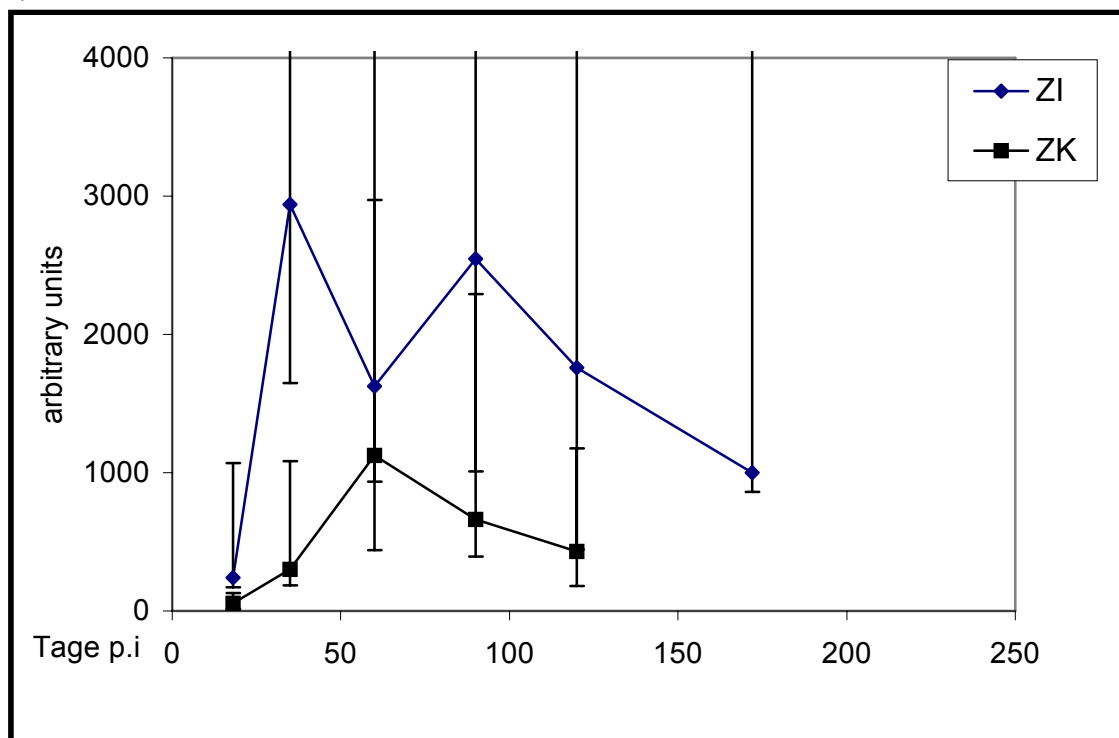
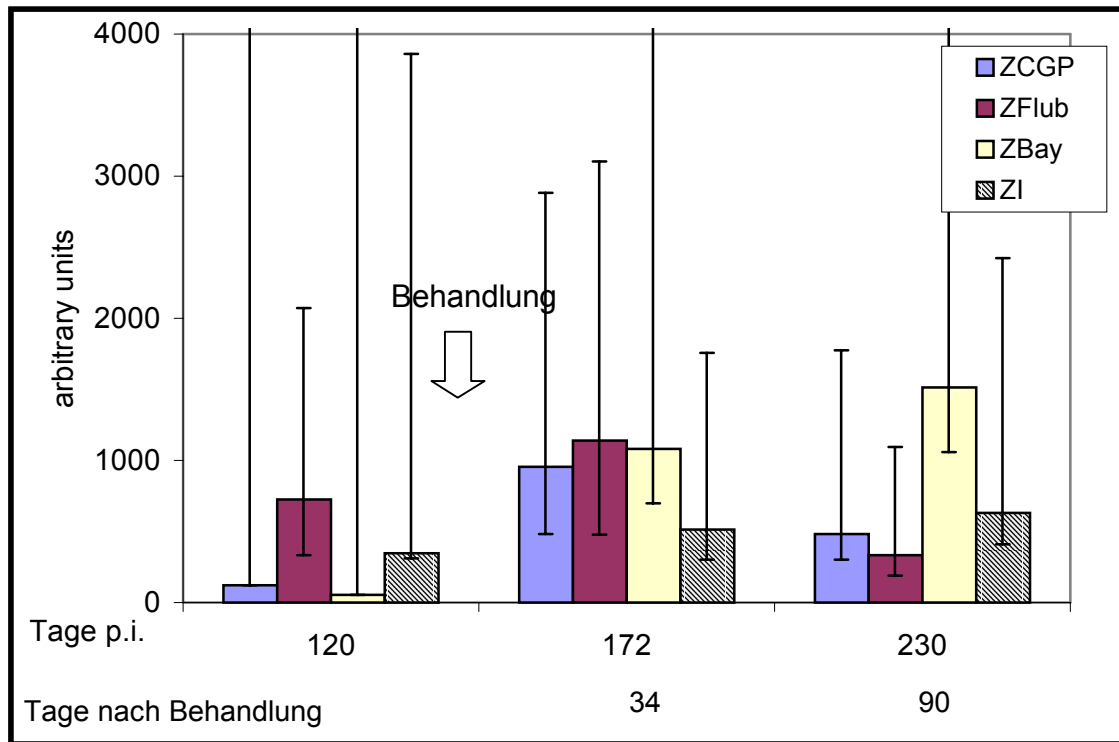


Abb.5.39: Transkription des IL-10-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi* Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

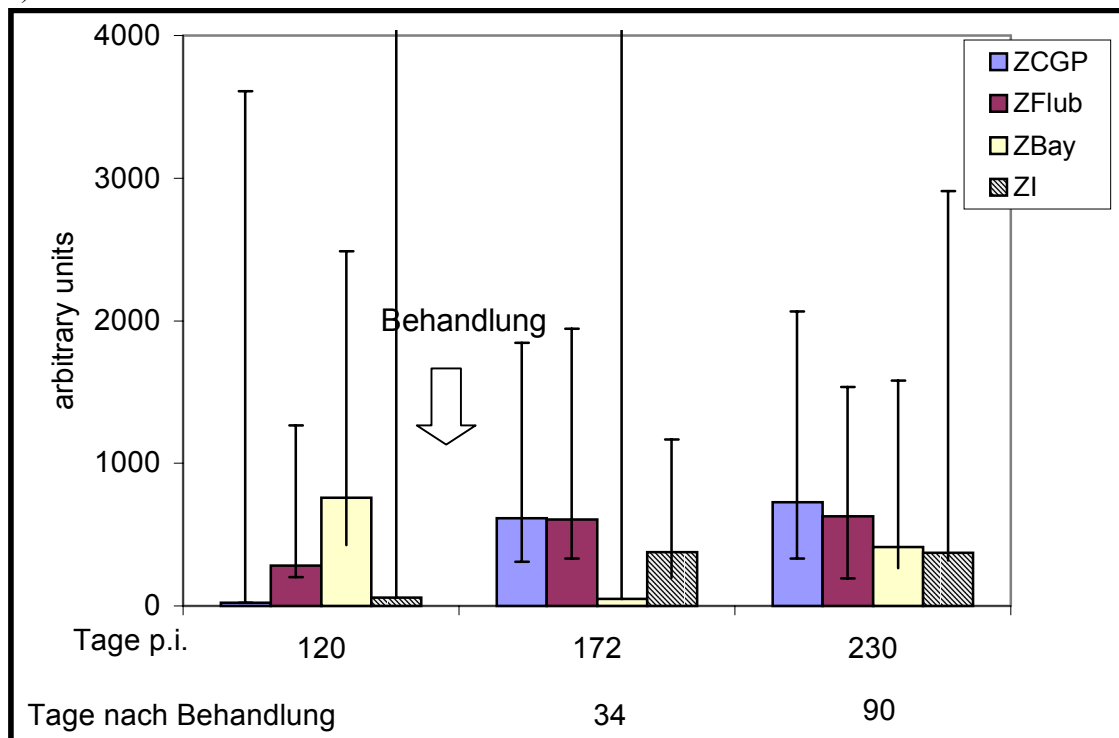
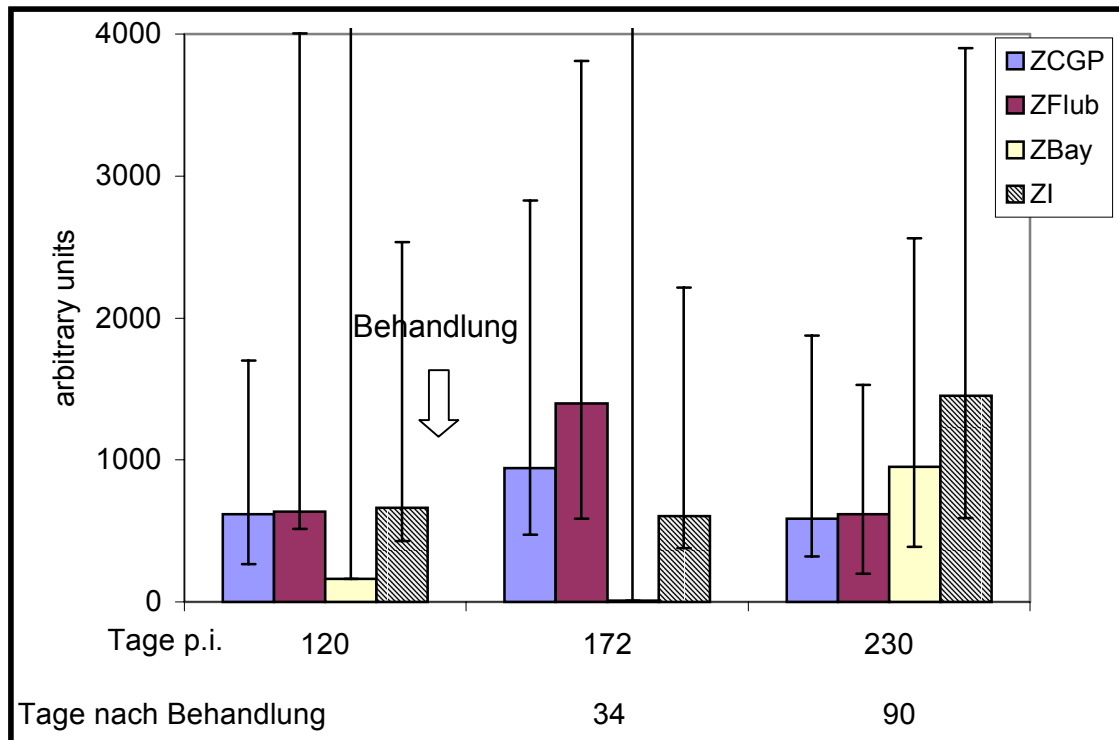


Abb. 5.40: Transkription des IL-10-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

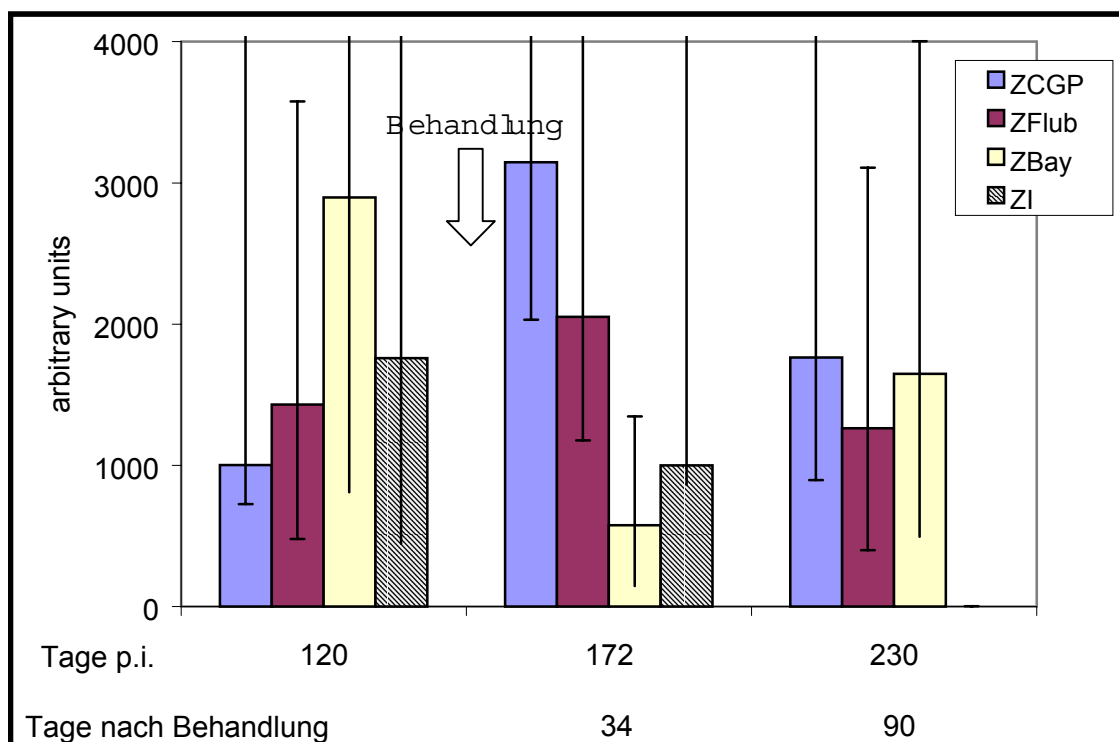


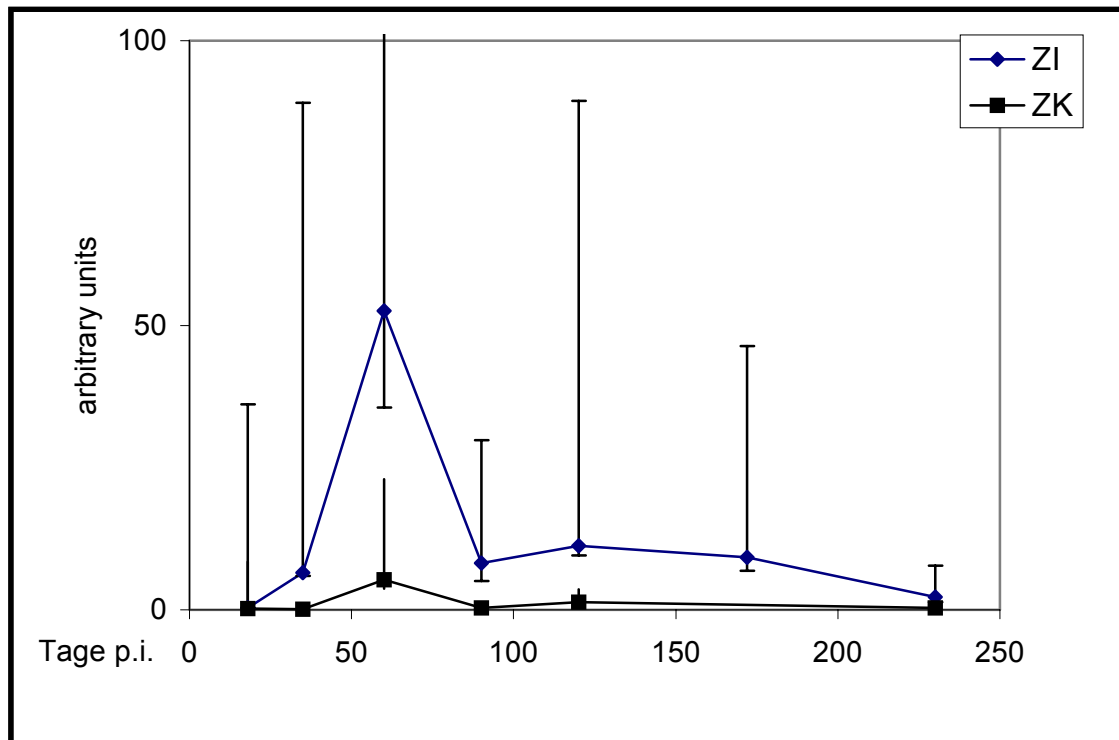
Abb. 5.41: Transkription des IL-10-Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi* Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

5.7.5 IFN γ -Gen-Transkription (vergl. Abb. 5.42-5. 45)

In der IFN γ -Gen-Transkription zeigten sich sowohl im Gruppenvergleich, als auch in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion bei allen eingesetzten Antigenen hochsignifikante Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht infizierten Gruppen (s. Tab A 11). Nach Stimulation von *M. coucha*-PBL mit *B. malayi*-Weibchen-, Männchen-, Mikrofilarien- und L3-Antigen zeigten die Kurven der IFN γ -Transkription alle einen hochsignifikanten Peak, der nach Stimulation mit Weibchen-, Männchen und Mikrofilarien-Antigen am Tag 60 p.i. auftrat, in Reaktion auf L3-Antigen dagegen bereits am Tag 35 p.i. (p siehe Tab A 11; Abb. 5.42 A, B und 5.43 A, B). Ein zweiter, schwächerer Peak konnte nach Stimulation mit Weibchen- Mikrofilarien- und L3-Antigen am Tag 120 p.i. beobachtet werden, wobei er in Reaktion auf Mikrofilarien-Antigen am deutlichsten ausgeprägt war (Abb. 5.43 A). Dem Gipfelwert folgte in allen Fällen ein starker Abfall bis zum Tag 90 p.i. In der Folge und abgesehen von der Verwendung von L3-Antigen blieb die Transkriptionsrate bei den infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten Kontrollen bis 170 Tage p.i. erhöht.

Bei den behandelten Gruppen hatte vor allem das Medikament CGP 20376 (Gruppe ZCGP) einen deutlichen Einfluß auf die IFN γ -Gentranskription. In Reaktion auf alle zur Stimulation eingesetzten Antigene stiegen die Transkriptionsraten nach der Behandlung in dieser Gruppe an, eine Reaktion, die insbesondere wegen des kontinuierlichen Rückganges bei den unbehandelten Tieren bemerkenswert ist. Für Weibchen- und Männchen-Antigen ließ sich dabei eine mit $p = 0,0017$ bzw. $p = 0,0078$ hochsignifikante Abhängigkeit vom Infektionstag ermitteln. Der beobachtete Anstieg nach Stimulation mit Mikrofilarien- und L3-Antigen war dagegen statistisch nicht signifikant. In der Gruppe ZFlub erfolgte ebenfalls ein genereller Anstieg nach der Behandlung, dieser fiel aber geringer aus als in der Gruppe ZCGP. Für die Stimulation mit Weibchen-Antigen war der Anstieg im Vergleich zu der nicht behandelten Gruppe ZI signifikant ($p = 0,025$), für Männchen-Antigen ergab sich ein hochsignifikanter ($p < 0,0001$) Gruppenunterschied. Das Chemotherapeutikum Bay 44-4400 hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf die IFN γ -Gentranskription.

A)



B)

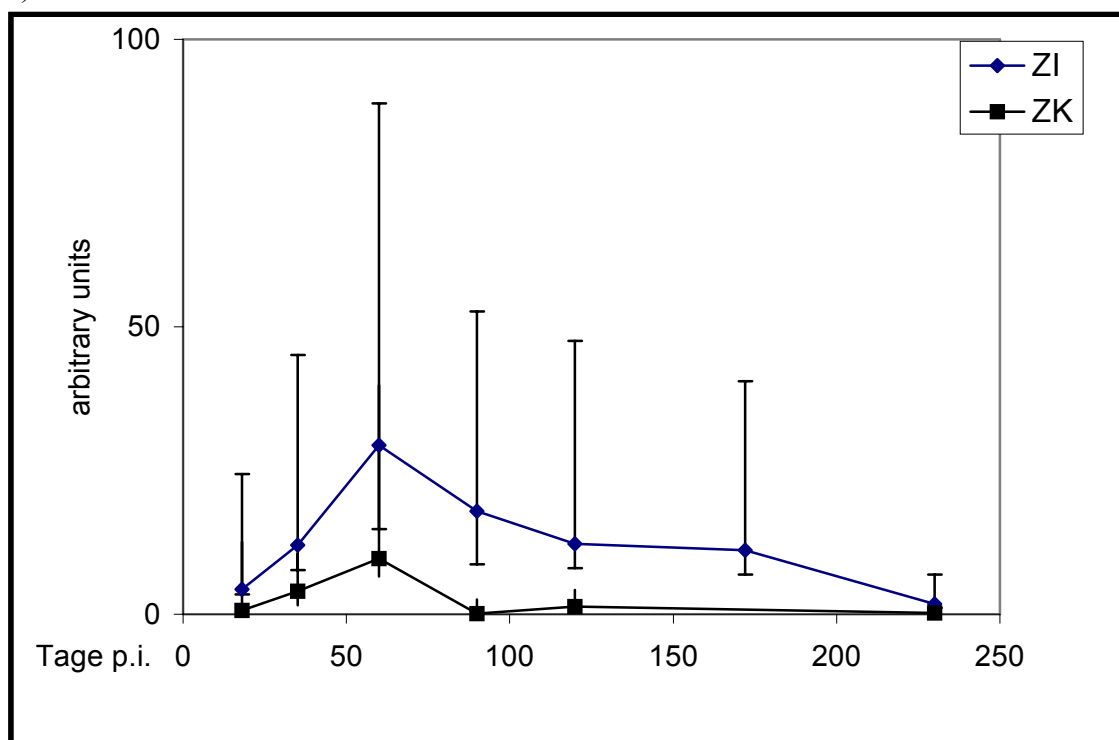
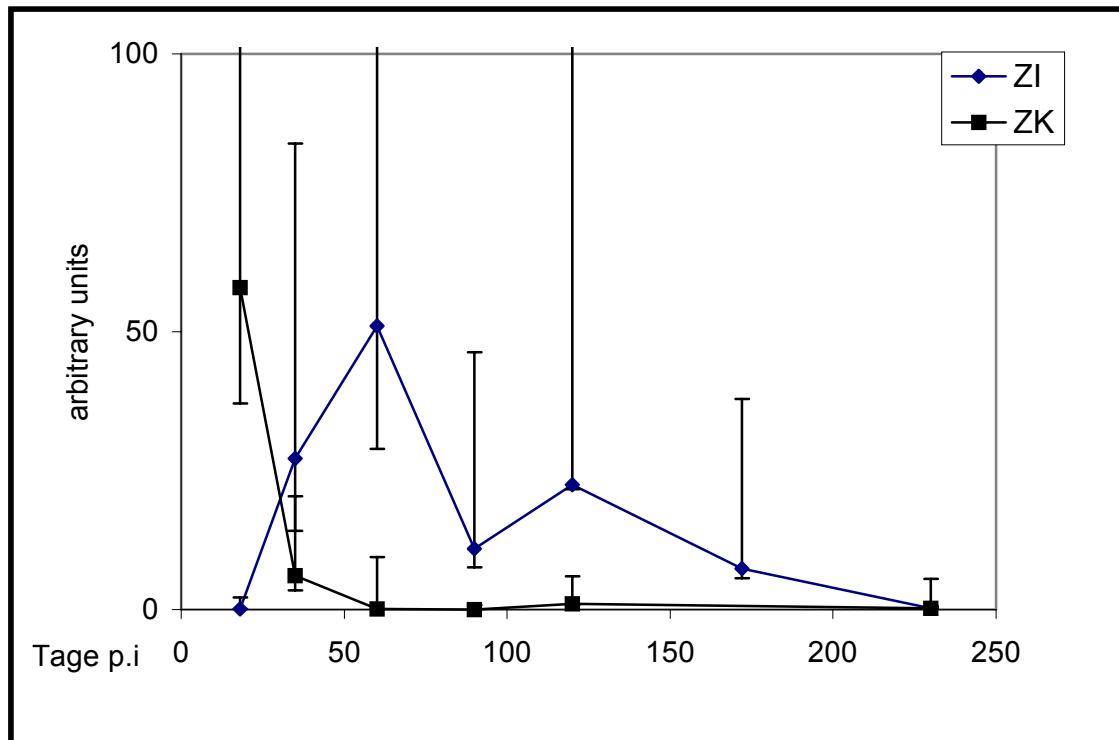


Abb. 5.42: Transkription des IFN γ -Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Mannen-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

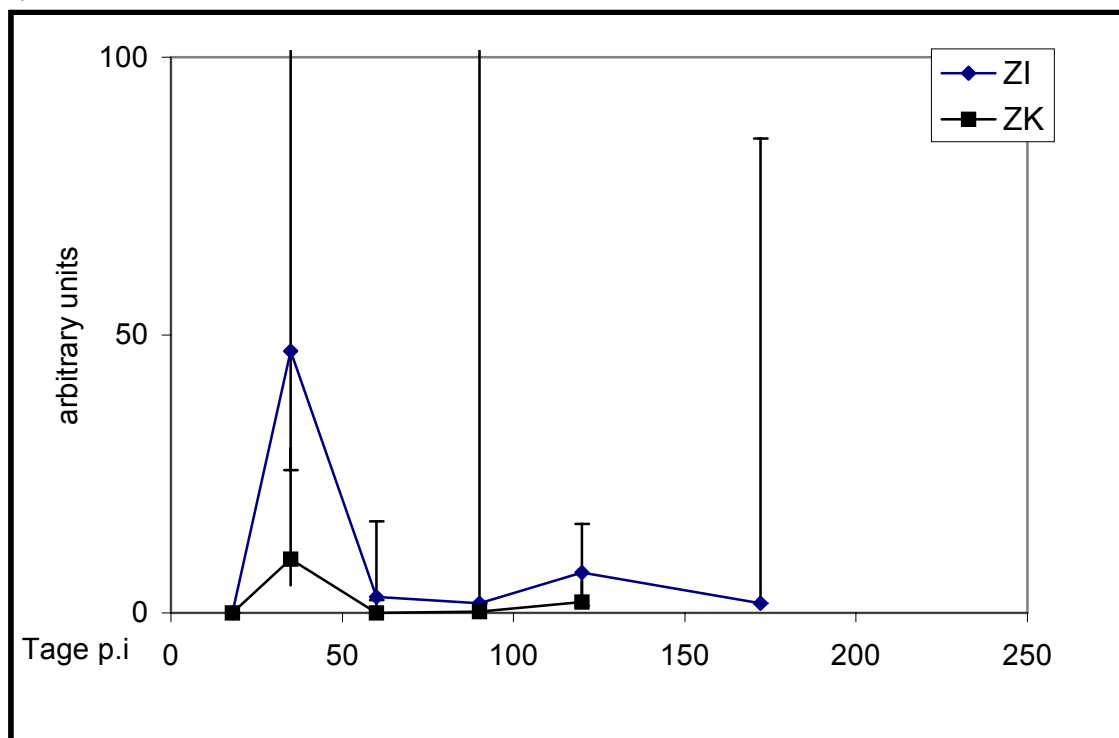
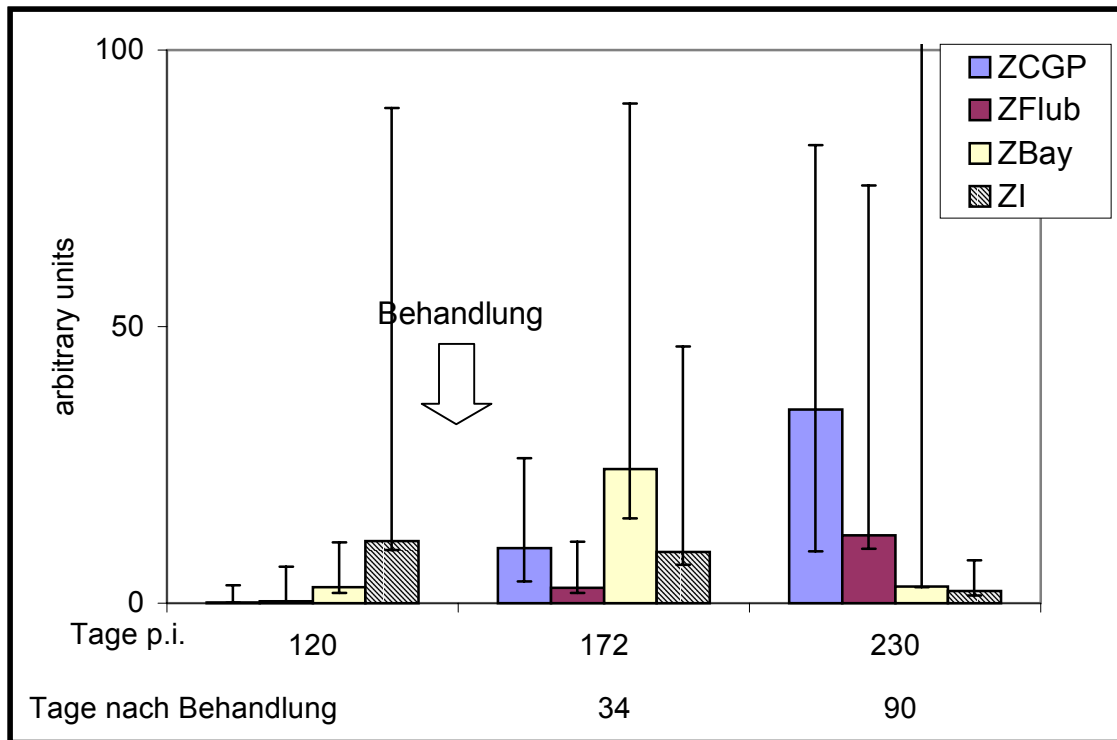


Abb. 5.43: Transkription des IFN γ -Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der infizierten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Gruppe ZK. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

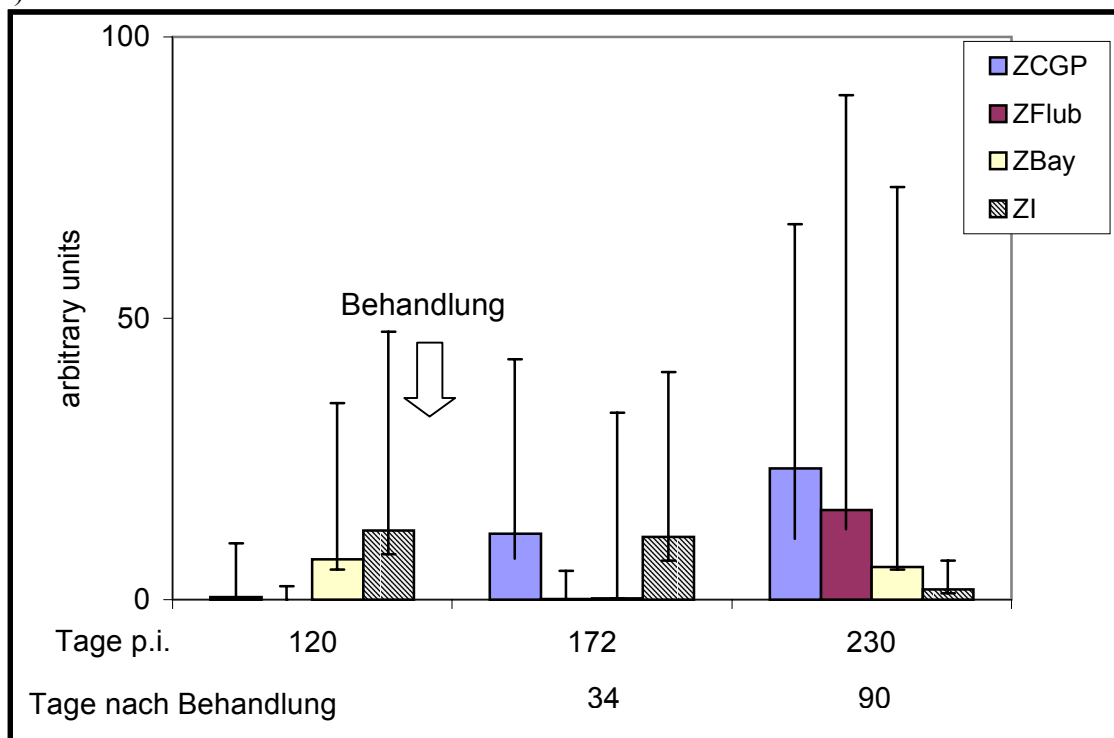
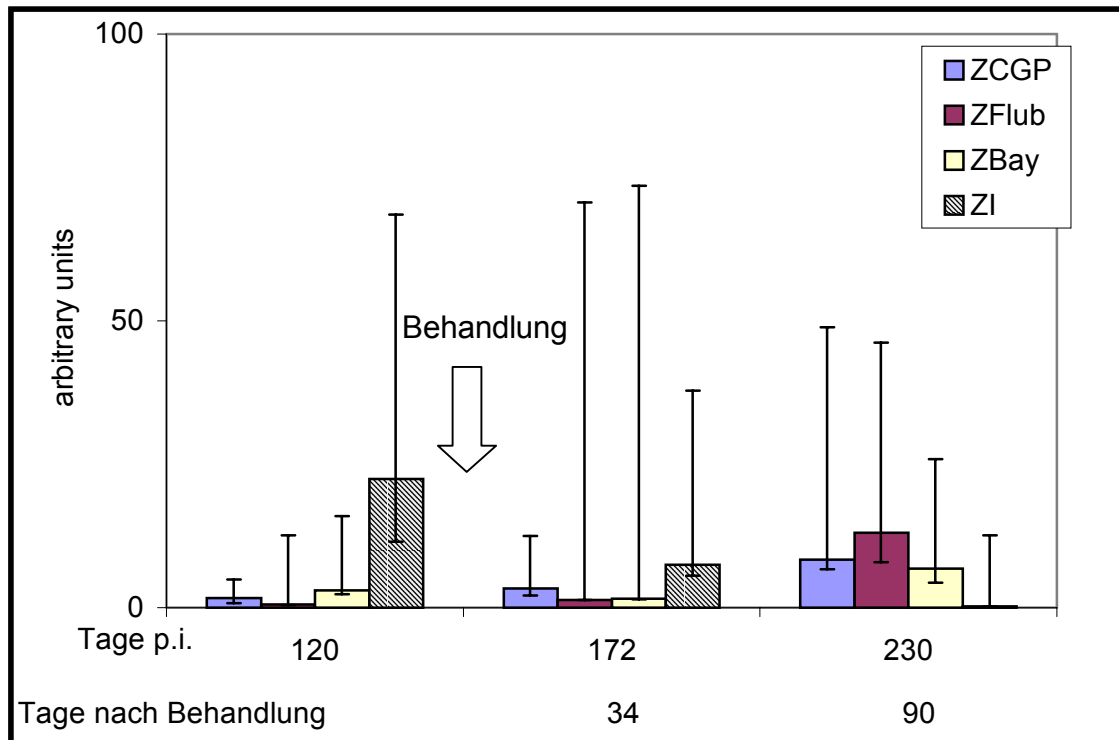


Abb. 5.44: Transkription des IFN γ -Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-(A) und Männchen-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400). Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

A)



B)

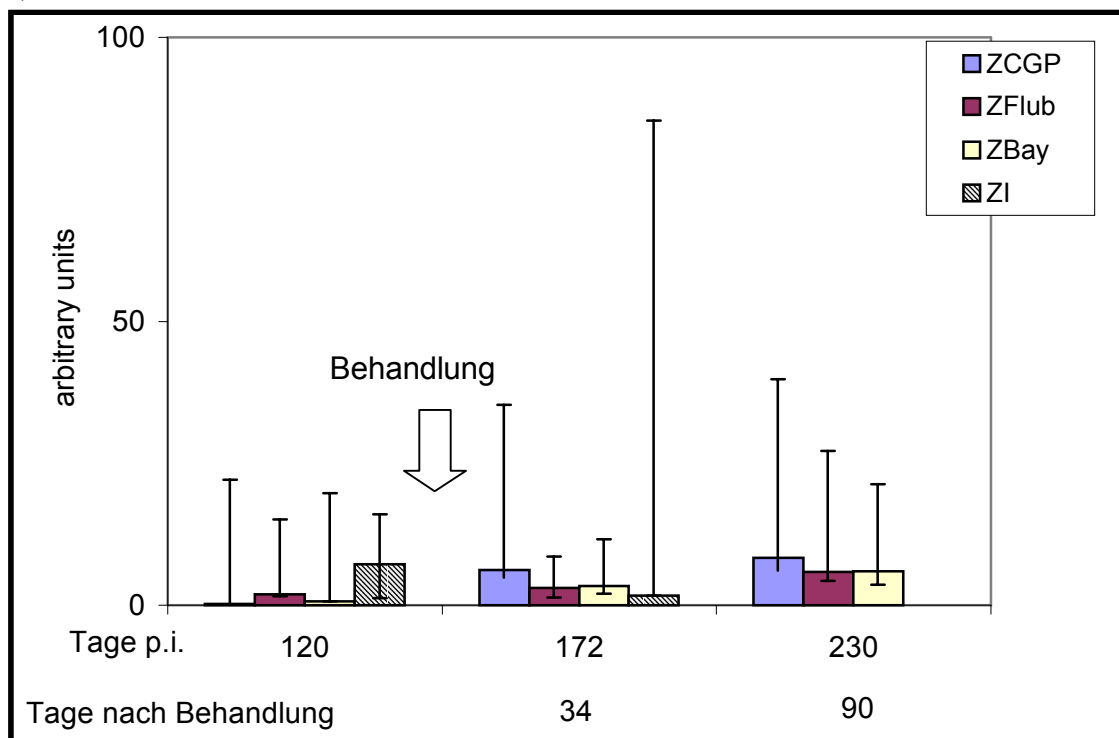


Abb. 5.45: Transkription des IFN γ -Gens in PBL *B. malayi*-infizierter *M. coucha* nach Stimulation mit *B. malayi*-Mikrofilarien-(A) und L3-Antigen (B). Vergleich der nicht behandelten Gruppe ZI mit den behandelten Gruppen ZCGP (Behandelt mit CGP20376), ZFlub (behandelt mit Flubendazol) und ZBay (behandelt mit Bay 44-400. Die IntOD der Amplifikatbanden im Polyacrylamid-Gel nach Anfärben mit Ethidiumbromid sind nach Berechnung der Endwerte als arbitrary units dargestellt (geometrischen Mittelwerte und Streufaktoren).

6. Diskussion

6.1 Die semi-quantitative RT-PCR zur Erfassung von Zytokintranskripten im Verlauf der Infektion von *M. coucha* mit *B. malayi*.

In der vorliegenden Arbeit sollten zelluläre Reaktionen und immunregulatorische Zusammenhänge im Verlauf der *B. malayi*-Infektion bei *M. coucha* untersucht werden. Dies sollte in Reaktion auf stimulierende Antigene sowohl auf der Ebene der Zellproliferation als auch anhand der Profile unterschiedlicher Zytokine geschehen. Dabei war die Etablierung der RT-PCR für die Zytokinbestimmung bei *M. coucha* Bestandteil der Arbeit.

Die Untersuchungen sollten als echte Verlaufsuntersuchungen vorgenommen werden. Um dies zu ermöglichen, wurden den Tieren an jedem Untersuchungstag Blutproben aus dem retroorbitalen Augenwinkel entnommen und die gewonnenen PBL zur Proliferation und für die Gewinnung von RNA verwendet. Hieraus resultierte, daß sehr wenig Zellen als Ausgangsmaterial zur Verfügung standen. Die gewählte Methode der mRNA-Isolierung mit Hilfe einer Oligotex-Suspension erwies sich als das einzige Verfahren mit dem es gelang, relativ einfach (aufgrund des sehr hohen Probenaufkommens war dies ein wesentliches Kriterium) und zuverlässig RNA aus PBL zu gewinnen und nach der RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese gut auswertbare, dem jeweiligen Zytokin entsprechende, Banden zu erhalten.

Versuche, Gesamt-RNA zu gewinnen führten dagegen zu unbefriedigenden Ergebnissen. Dabei waren einige der Protokolle zu arbeitsintensiv [z.B. die Gewinnung von RNA nach Chomczynski und Sacchi (1987)] oder aufgrund der Probenanzahl nicht praktikabel (z.B. die RNA-Extraktion mit Hilfe der sog. Dynabeads). Nach einigen Protokollen ließ sich gar keine verwertbare RNA isolieren: z.B. mit peqGOLD RNA-Pure™ oder dem Qiagen-RNeasy-Mini-Kit. Für diese Protokolle war wahrscheinlich die Ausgangsmenge der Zellen nicht ausreichend.

Für die semi-quantitative Erfassung von Zytokintranskripten in der PCR ist es aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung der Moleküle von besonderer Bedeutung, daß die Ausgangsmengen an RNA möglichst genau bestimmt werden können (Plazer und Blankenstein, 1993). Eine Schwierigkeit dieser Arbeit bestand in der Quantifizierung der aus den stimulierten Zellen erhaltenen mRNA. Die Mengen waren zu gering, um im Photometer gemessen werden

zu können. Alternativ zu einer Messung bestand die Möglichkeit des Zählens der eingesetzten Zellen. Dieses Vorgehen wurde aber aus arbeitstechnischen Gründen sowie aufgrund der hohen Ungenauigkeit und der schlechten Reproduzierbarkeit verworfen. Daher wurde ein System etabliert, mit dem RNA fluorometrisch gemessen werden kann. Der Farbstoff „Ribogreen“ bindet an RNA-Moleküle und ist nur im gebundenen Zustand fluorometrisch erfassbar. Die RNA-Menge wird dann anhand der Fluoreszenzintensität des gebundenen Farbstoffes bestimmt. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit einer Standardkurve (Jones *et al.*, 1998). Diese Methode erwies sich als sensitiv genug, um auch RNA im pg/ μ l-Bereich messen zu können. Der Vergleich der einzelnen Standardkurven zeigte, daß die Abweichungen zwischen den Kurven sehr gering waren, so daß diese Methode als zuverlässige Möglichkeit angesehen werden kann, kleine Mengen RNA zu bestimmen.

Besonderer Wert sollte allerdings auf die Etablierung der Messkonditionen gelegt werden, da der Fluoreszenzfarbstoff nur ein geringes Intensitätsmaximum besitzt. Das Zeitfenster zwischen dem Ende der Bindungsreaktion, während welcher die Farbintensität ansteigt und dem Wiederabsinken der Intensität ist auf maximal zwei bis drei Minuten beschränkt. Daher ist es besonders wichtig, das Gerät so einzustellen, daß auch bei automatischer Verteilung des Farbstoffes auf eine 96-Loch-Platte für alle Vertiefungen dieselbe Inkubationszeit gegeben ist. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Einstellungen sehr genau ermittelt werden.

Als weitere Absicherung der Daten wurde aus jeder cDNA-Probe das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin amplifiziert. Housekeeping-Gene sollen theoretisch in jeder Zelle, unabhängig vom Stimulationsstatus, auf gleicher Höhe transkribiert werden, so daß das Amplifikat zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge herangezogen werden kann. Verschiedene Autoren (Siebert und Fukunda, 1984; Elder *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1991) haben allerdings gezeigt, daß auch bei Housekeeping-Genen mit Variationen zu rechnen ist. Es existieren keine Literaturangaben bezüglich eines Housekeeping-Gens bei *M. coucha*. In Anlehnung an Taubert (1999), die zeigen konnte, daß β 2-Mikroglobulin in Balb/c-Mäusen mit hoher Konstanz transkribiert wird, wurde dieses Gen in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Nach Taubert (1999) besteht mit einer Kombination aus photometrischer/ fluorometrischer RNA-Messung und der Bestimmung der Transkripte eines Housekeeping-Gens die Möglichkeit, die tatsächliche RNA-Konzentration so weit zu erfassen, daß eine semiquantitative Bestimmung von Zytokin-Transkripten möglich ist. Die Quantifizierung der Amplifikate wurde mit Hilfe eines Standardplasmids, welches in bekannter Konzentration mitamplifiziert wurde, vorgenommen. Insgesamt waren drei „Normalisierungsschritte“ notwendig (s. 3.15.2), damit die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung aller Amplifikatbanden eines Zytokins direkt miteinander verglichen werden konnten. Dazu wurden zunächst die Plasmid- und Probenbanden

des Housekeeping-Gens „normalisiert“ indem sie an einen willkürlich gewählten Referenz-Meßwert angeglichen wurden (Bildung des Angleichungsfaktors). In einem zweiten Schritt wurden dann die Proben-Banden der jeweiligen Zytokine durch Multiplikation mit dem Angleichungsfaktor standardisiert. Die relative Menge an transkribierter RNA ließ sich schließlich anhand des Plasmids bestimmen. Aus den Normalisierungsschritten resultierte, daß korrespondierende Zytokinwerte direkt von der Intensität der jeweiligen β 2-Mikroglobulin-Banden (je Plasmid- und Probenbande) bzw. der zugehörigen Plasmidbande abhängig waren. Fiel eine der genannten Banden sehr schwach aus, so multiplizierten sich die Werte der Zytokin-Probenbanden um denselben Faktor. Da solche Werte eine rein rechnerische Grundlage hatten und nicht mit den Bandenstärken der Amplifikate übereinstimmten, wurden sie aus der Wertung herausgenommen. Die Beurteilung der β 2-Mikroglobulin- und der Plasmid-Banden wurde anhand von Photographien der Gele nach Elektrophorese und Anfärben der Banden mit Ethidiumbromid vorgenommen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Angleichungsfaktoren der β 2-Mikroglobulin-Banden sehr starke Streuungen aufweisen, wodurch auch die einzelnen Probenbanden starken rechnerischen Korrekturen unterliegen. Die großen Unterschiede in den Angleichungsfaktoren könnten damit zusammen hängen, daß β 2-Mikroglobulin in *M. coucha* nicht gleichförmig transkribiert wird. Zur Klärung dieser Frage wären weiterführende Untersuchungen notwendig.

Schwankungen innerhalb der PCR-Reaktionen und Unterschiede zwischen einzelnen Reaktionsgefäßen während eines PCR-Laufes sind ein weiterer Faktor, der zu den erwähnten Abweichungen führen kann. Tatsächlich kam es im Laufe der Arbeit immer wieder zu Problemen hinsichtlich der gleichförmigen Amplifikation derselben cDNA-Proben innerhalb eines PCR-Laufes. Versuche, diese sog. „tube to tube-variation“ zu erfassen, erbrachten Abweichungen zwischen den einzelnen Proben von bis zu 17 %. Die Ungenauigkeiten bei der RNA-Messung sind aufgrund der gleichförmigen Standardkurven als sehr gering zu beurteilen, so daß die Abweichungen bei den Angleichungsfaktoren wahrscheinlich nur zu einem kleinen Teil aus Meßfehlern resultieren. Die RNA-Mengen der ersten Untersuchungstage (zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere erst sechs Wochen alt) waren jedoch so gering, daß ein gewisses Maß an Hintergrundverfälschungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Während der Vorversuche wurde deutlich, daß nach Stimulation der PBL von *M. coucha* mit Con A nicht alle Zytokine gleichmäßig exprimiert wurden. Von den ca. 50 für die Vorversuche herangezogenen Tieren transkribierten über 90 % nach Con A-Stimulation die IFN γ - und IL-10-Gene. Dagegen konnten nur bei zwei Tieren Amplifikate von IL-4 nachgewiesen werden. Die Transkriptionsraten von IL-5 waren ebenfalls niedrig und inkonsistent. Ähnliche

Ergebnisse erzielte Babu (1993) mit Versuchen zur Analyse der Expressionsmuster verschiedener Zytokine bei zwei Mausstämmen nach Stimulation der Milzzellen mit Con A. Nach Babu (1993) betrug der Anteil von IL-4- und IL-5-mRNA an der Gesamt-RNA zum Zeitpunkt maximaler Expression nur etwa 0,1 % bzw. 0,002 %. Dagegen lagen die Anteile der IL-2- und IFN γ -mRNA bei 1-2 % der Gesamt-Zell-RNA. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Abschluß der Versuche deutlich, daß vor allem Mikrofilarien- und L3-Antigene während eines eng begrenzten Zeitraumes im Infektionsverlauf eine IL-4-Expression hervorrufen. Diese Antigene waren in den Vorversuchen nicht eingesetzt worden, da sie nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

Verglichen mit Ergebnissen anderer Autoren (z.B. Svetic, 1991; Taubert, 1999) war die Anzahl der PCR-Zyklen, die zur Erfassung der Amplifikate notwendig war, sehr hoch. Lag die maximale Zykluszahl zur Erfassung eines der Zytokintranskripte bei Taubert (1999) bei 32, so waren bei Svetic (1991) nur maximal 23, bei dem Housekeeping-Gen HPRT sogar nur 7 Zyklen durchlaufen worden. In beiden Vergleichsarbeiten konnte jedoch auf Gesamt-RNA aus Milzzellpräparationen zurückgegriffen werden, wodurch die Ausgangsmenge an RNA, die in die RT-PCR eingesetzt wurde, das etwa 13-fache der Menge betrug, die in der vorgestellten Arbeit zur Verfügung stand. Höhere cDNA-Ausgangskonzentrationen führen zu früherem und steilerem Anstieg der Amplifikationskurve, die Plateauphase wird evtl. schon bei 5 Zyklen erreicht (Barry Walker, 1998). Die Autoren berichten, daß nach 30 Zyklen die Korrelation zwischen Amplifikat und Ausgangsmenge nicht mehr gegeben ist. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei ausgeschlossen werden, da die Quantifizierung für alle Zytokine in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen wurde und Titrationsstudien deutlich zeigten, daß bei den gewählten Zykluszahlen eine hohe Korrelation zwischen Ausgangs-cDNA-Menge und Amplifikatmenge gegeben war (s. 5.3.4.5). Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche können die gewählten Zykluszahlen gut vertreten werden. Bei der Bestimmung der Annealingtemperatur spielten individuelle Unterschiede eine bedeutende Rolle. Für alle Primerpaare außer für IL-2 mußten deshalb Temperaturen ausgewählt werden, die im Mittel zwischen den auseinander liegenden optimalen Temperaturen der Einzeltiere lagen (nur für die Primerpaare von IL-2 zeigte sich ein relativ einheitliches Bild). Dieses Vorgehen war aufgrund des Tiermaterials unvermeidlich, es ist aber möglich, daß Zytokintranskripte einzelner Tiere außerhalb des jeweiligen Temperaturoptimums amplifiziert wurden und damit in der PAGE als deutlich schwächere Bande erschienen.

Die Quantifizierung eines PCR-Produktes kann auf verschiedene Weise vorgenommen werden (vergl. Souazé *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Standardplasmid, das die Primersequenzen aller untersuchter Zytokine enthielt, als sog. exogener interner Standard in

jeder Reaktion mitamplifiziert. Das Plasmid diente sowohl zur Normalisierung der β 2-Mikroglobulinbanden als auch zur Bestimmung der relativen Endkonzentration des Zytokintranskriptes (s.o.). Nach Abschluß der Plasmidsynthese stellte sich heraus, daß die Affinität der einzelnen Primerpaare zu dem Plasmid sehr unterschiedlich war, so daß die Zytokintranskripte untereinander nicht verglichen werden konnten. Die Primerpaare von IL-2 zeigten eine besonders schlechte Affinität zu dem Plasmid, was damit begündet werden kann, daß die Upstream-Sequenzen für IL-2 im Plasmid direkt dem Vektor, die Downstream-Sequenzen direkt der Zwischensequenz anliegen (vergl. Abb. 3.2). Bei der Transkription der Plasmid-DNA kann es deshalb zu einer unvollständigen Umsetzung der ersten Basen der IL-2-Sequenz kommen. Daher wurde die Plasmid-DNA ein weiteres Mal transkribiert, wodurch die Affinität der IL-2-Primer deutlich erhöht werden konnte. Trotzdem blieb die Amplifikation der IL-2-Transkripte und des Plasmids sehr inkonstant, z.T. kam es zu Doppelbandenbildung bei der Amplifikation des Plasmids. Dieses Problem konnte mit dem Einsatz einer Hot-Star-Taq-Polymerase behoben werden. Diese Polymerase benötigt eine 15-minütige Inkubationszeit bei 95°C, um aktiv zu werden. Damit werden Fehlbanden bei niedrigeren Temperaturen verhindert, die Amplifikation wird präziser. Nach den guten Erfolgen bei der Amplifikation von IL-2 wurde diese Polymerase auch für IL-4 eingesetzt, dessen Amplifikation sich ebenfalls als schwierig erwiesen hatte. Die Schwierigkeiten der IL-4-Amplifikation lagen jedoch nicht in der Inkonstanz der Plasmidamplifikation, sondern in der sehr uneinheitlichen Transkription des IL-4-Gens in *M. coucha*. Es scheint so zu sein, daß in *M. coucha* IL-4 bevorzugt in Reaktion auf stadienspezifische Antigene (Mikrofilarien- und L3-Antigen) exprimiert wird. Aber auch dieser Befund traf nur für einige Tiere zu; zu keinem Zeitpunkt reagierten alle 6 Tiere einer Gruppe gleichermaßen auf die Stimulation.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse darf nicht vernachlässigt werden, daß es sich nicht um den Nachweis akkumulierten Proteins handelt, sondern nur der momentane Stimulationsstatus der Zellen wiedergegeben wird. Hier besteht ein großer Nachteil gegenüber der ELISA-Technik, in der über den gesamten Stimulationszeitraum akkumuliertes Protein aus dem Überstand gemessen wird. Einige Autoren gehen davon aus, daß das Maximum der IL-4-Transkription innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Stimulation erreicht ist (vergl. Babu, 1993; Rottman, 1995). Diese Ergebnisse basieren allerdings auf der Stimulation mit Con A. Taubert (1999) erzielte bei Maus-Proben mit einer 48-stündigen Inkubationszeit gute Ergebnisse bei der Erfassung von Zytokintranskripten nach Stimulation mit Filarien-Antigenen. In der vorliegenden Arbeit mit *M. coucha* erbrachten Vorversuche mit 4 bis 8-stündigen Inkubationszeiten nach Stimulation mit Filarien-Antigenen keine besseren Ergebnisse für IL-4, so daß eine Inkubation über 48 h als akzeptabel erachtet wurde.

Zusammenfassend erwies sich die Etablierung einer RT-PCR für die Erfassung von Zytokintranskripten aus stimulierten PBL von *M. coucha* als schwierig. Dies lag zum einen an der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen, zum anderen an der großen Variabilität der Reaktion der Einzeltiere sowohl auf spezifische als auch auf unspezifische Stimulationen. In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings durch eine Vielzahl von Vorversuchen Bedingungen etabliert werden, die es letztlich doch erlaubten, einen guten Überblick über die Immunreaktionen sowohl im Verlauf einer unbeeinflussten Infektion der *M. coucha* mit *B. malayi* als auch nach Chemotherapie zu erhalten.

6.2 Mikrofilarienzahlen und Wurmbürde

Die Versuchstiere wurden mit L3 von *B. malayi* quantitativ infiziert (vergl. 3.6.1.1). Dazu wurden je 85 L3 in 3 Wochen alte, männliche *M. coucha s.c.* injiziert. In männlichen Tieren ist die Erfolgsrate einer Infektion deutlich höher als bei weiblichen Tieren (Erfahrungswerte aus dem Institut für Parasitologie der JLU-Gießen). Die Methode erwies sich als zuverlässig und einfach vorzunehmen.

Die Mikrofilariämie begann, wie erwartet, am Tag 90 p.i. (vergl. Sänger *et al.*, 1981). Ab Tag 120 p.i. konnten bei allen Tieren Mikrofilarien nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich bei den nicht behandelten Gruppen ein einheitlicher Verlauf, in dem die Mikrofilariämie bei allen Tieren bis zum Tag 230 p.i., dem Ende des Versuchszeitraumes, anstieg. Dieser Befund bestätigt Ergebnisse anderer Autoren, die in Versuchszeiträumen von bis zu einem Jahr ein kontinuierliches Ansteigen der Mikrofilarienwerte beobachteten (Petrányi *et al.*, 1975; Sänger *et al.*, 1981). Die Einzelwerte der Tiere unterschieden sich jedoch erheblich voneinander. So wurden am Tag 230 p.i. in der Gruppe PI zwischen 97 (Tier 5) und 1174 (Tier 1) Mikrofilarien / 20 µl Blut gezählt. Es konnte, wie bei Petrányi *et al.* (1975), kein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikrofilarien und der nach der Sektion gefundenen Weibchen hergestellt werden. Das Auftreten von Mikrofilarien war daher lediglich ein eindeutiger Beweis dafür, daß die Infektion erfolgreich verlaufen war.

In der Gesamtbetrachtung liefert die in 3.6.1.1 beschriebene Methode sichere Infektionsergebnisse. In allen der 48 mit 85 L3 infizierten Tieren entwickelten sich patente Infektionen. Die Wiederfindungsrate der adulten Filarien nach der Sektion lag zwischen 7,05 und 72,9 %. Dies ist verglichen mit Studien von Petrányi *et al.* (1975) und Sänger *et al.* (1981) ein gutes Ergebnis. Die Autoren berichteten von einer Rückfindungsrate von durchschnittlich 21,1 % bzw. 9 %. Während Sänger *et al.* (1981) die meisten adulten Würmer im Herzen fanden, wurde

in dieser Studie der Hauptanteil der Würmer in den Lungen nachgewiesen (s. 5.5), gefolgt vom Herz und den Hoden. In den Lymphgefäßen und den Lymphknoten war der Anteil an adulten Filarien sehr gering. Sänger *et al.* (1981) berichten, daß die Verteilung der adulten Filarien in den Organen von der Infektionsstelle abhängig ist. Während nach einer s.c. Infektion in der Nackenregion 84 % der adulten Filarien in der Lunge und im Herz wiedergefunden wurden, aber nur 12 % in den Hoden und 3 % in den Lymphgefäßen, ließen sich nach einer Infektion in der Leiste 23 % der Filarien in den Hoden und 14.9 % in den Lymphgefäßen wiederfinden. Petranyi *et al.* (1975) isolierten nach Infektion in der Skrotalregion sogar 34 % der adulten Filarien aus den Lymphgefäßen. Die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit stimmen mit den Beobachtungen von Sänger *et al.* (1981) überein.

Petranyi *et al.* (1975) beobachteten, daß die Dauer der Präpatenz mit der Zahl der nach Sektion gefundenen adulten Filarien negativ korrelierte, d.h. je eher Mikrofilarien im Blut der Tiere nachzuweisen waren, desto mehr Filarien konnten bei der Sektion isoliert werden. Die Autoren hypothetisieren, daß bei einer höheren Zahl von Adulten die Wahrscheinlichkeit zur Befruchtung der Weibchen höher ist, und deshalb früher Mikrofilarien im peripheren Blut auftreten. Diese Korrelation ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht feststellen.

Nach der Behandlung fielen in den Gruppen ZCGP und PCGP die Mikrofilarienwerte 3 (Gruppe PCGP) bzw. 7 Tage (Gruppe ZCGP) nach der Behandlung auf Null ab. Nach Zahner und Schares (1993) ist CGP 20376 eines der Benzazole, die etwa gleichmäßig mikro- und makrofilarizid wirken. Dies entspricht dem raschen Abfall der Parasitämie nach der Behandlung sowie der Beobachtung, daß bei der Sektion keine lebenden adulten Würmer nachgewiesen werden konnten. Das vorübergehende Wiederauftreten von Mikrofilarien im peripheren Blut bei beiden behandelten Gruppen ist eventuell damit zu erklären, daß einerseits das Absterben der Würmer ein sich über einen gewissen Zeitraum hinziehender Prozeß ist, während dessen noch Mikrofilarien freigesetzt werden und andererseits das Medikament nur eine kurze Halbwertszeit hat (Zahner, pers. Mitteilung), so daß diese Mikrofilarien persistieren konnten. Mikrofilarien von *B. malayi* können nach Injektion in die Blutbahn in Mäusen z. B. bis zu 65 Tagen zirkulieren (Fanning und Kazura, 1983).

Flubendazol ist das gegen adulte *Brugia*-Parasiten wirksamste Benzimidazol, es hat jedoch keine Wirkung gegen Mikrofilarien (Denham *et al.*, 1978, 1979, 1980, 1981; Zahner und Schares 1993). Mikrofilarienwerte sinken daher erst mit einer Verzögerung von zwei bis drei Wochen nach Behandlung infolge fehlender Nachlieferung ab (Zahner und Schares, 1993). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprechen diesen Befunden. Der Abfall der Mikrofilarienwerte begann in beiden Gruppen (ZFlub und PFlub) am Tag 14 nach Behandlung, am Tag 28 waren in der Gruppe ZFlub bereits drei von sechs Tieren negativ, in der Gruppe

PFlub, zwei von sechs. Ab Tag 35 war dann die überwiegende Zahl der Tiere beider Gruppen mikrofilarienfrei. Nach der Sektion wurden in keiner der beiden Gruppen lebende adulte Filarien gefunden. In 50 % der seziierten Tiere konnten aber verkapselte Stadien in den Lymphbahnen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die gute adultizide Wirkung des Flubendazols.

Bay 44-4400, ein semisynthetisches zyklisches Depsipeptid, wirkt nach Studien von Zahner *et al.* (2001 a,b) mikrofilarizid und bedingt durch eine Störung der Embryogenese eine langanhaltende Reduktion der Mikrofilariämie. Nach der spot-on Behandlung sanken in der hier vorgestellten Arbeit die Mikrofilarienwerte der behandelten Tiere innerhalb der ersten drei Tage auf Null ab, bereits ab Tag 35 traten aber in beiden Gruppen (ZBay und PBay) wieder Mikrofilarien auf, und ab Tag 56 wurde, ebenfalls in beiden Gruppen, ein verstärkter, kontinuierlicher Anstieg beobachtet, der sich bis zum Ende des Versuchszeitraumes fortsetzte. Dieses Ergebnis bestätigt Befunde von Zahner *et al.* (2001a), die nach spot-on Behandlung *B. malayi*-infizierter *M. coucha* bereits am Tag 15 einen erneuten Anstieg der Mikrofilarienzahlen beobachteten. Bay 44-4400 scheint speziesabhängig zu wirken. Während die mikrofilarizide Wirkung bei *B. malayi* zwar rasch einsetzt, es aber wie hier demonstriert, zu einem Wiederanstieg der Mikrofilariämie kommt, bewirkt das Medikament bei *L. sigmodontis*- und *A. viteae*-infizierten Tieren eine langanhaltende Reduktion der Mikrofilarien (Zahner *et al.*, 2001a). Weiterhin konnte mit einer einmaligen Behandlung bei *A. viteae*-infizierten Tieren ein vollständiger adultizider Effekt erzielt werden, der weder bei *B. malayi*-noch bei *L. sigmodontis*-infizierten Tieren auftrat (Zahner *et al.*, 2001a). In der hier vorliegenden Studie konnten dementsprechend in beiden behandelten Gruppen nach der Sektion lebende adulte Filarien gewonnen werden.

6.3 Proliferationsstudien

Die Hyporesponsivität der T-Zellen nach Stimulation mit Filarien-Antigen in vitro ist eines der auffälligsten Merkmale der mikrofilarämisch-asymptomatischen Form der Lymphatischen Filariose (Ottesen *et al.*, 1977; Piessens *et al.*, 1980b, 1982; Ottesen, 1984, 1992b; Nutman, Kumaraswami und Ottesen, 1987; King *et al.*, 1992; Mahanty und Nutman, 1995; Mahanty *et al.*, 1996a, 1996b; Ravichandran *et al.*, 1997). Dabei ist bis heute strittig, ob sich die Hyporesponsivität allein auf eine Stimulation mit Filarien-Antigen bezieht

(z.B. Mahanty *et al.*, 1996a) oder ob sie auch nach unspezifischer Stimulation, z.B. mit Con A oder PHA nachweisbar ist, wie es Lammie und Katz (1983b) oder Mistry und Subrahmanyam (1985) in ihren Untersuchungen zeigen konnten.

In der vorliegenden Arbeit reagierten die Zellen der infizierten als auch die der nicht infizierten Tiere im Versuchsverlauf zunehmend weniger auf die Stimulation mit Con A. Zu Beginn der Infektion (Tag 18 p.i.) zeigten die Zellen der infizierten Tiere noch eine gesteigerte Reaktion, doch erfolgte bereits am Tag 35 p.i. ein Einbruch der Proliferationsleistung, die dann bis zum Ende des Versuchszeitraumes auf niedrigem Niveau verblieb. Lediglich an den Tagen 60 und 172 p.i. kam es vorübergehend zu einem leichten Anstieg der Proliferation. Die Reaktivität der Zellen infizierter Tiere nach Stimulation mit Con A war an allen Untersuchungstagen niedriger als die der nicht infizierten Tiere (s. 5.6, Abb. 5.21A).

In Reaktion auf *B. malayi*-Antigen zeigte sich ein weitgehend ähnliches Bild. Bei allen eingesetzten Antigenen kam es bei den Zellen infizierter Tiere am Tag 35 p.i. zu einem vergleichbar deutlichen Rückgang der Proliferationsleistung, die im Falle von Weibchen- und Männchen-Antigen dann bis zu Versuchsende auf unverändert niedrigem Niveau verblieb (s. Abb 5.22A; 5.23A). Nach Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen konnte allerdings am Tag 90 p.i. eine vorübergehend gesteigerte Reaktivität beobachtet werden (s. Abb. 5.24A). Im Gegensatz zu der Reaktion der Zellen auf Con A war die Proliferationsleistung von Zellen infizierter Tiere in Reaktion auf spezifisches Antigen aber meist stärker als die nicht infizierter Tiere. Eine Ausnahme bildete der Tag 35 p.i., an dem es in Reaktion sowohl auf Con A als auch auf Mikrofilarien-Antigen zu einem vorübergehenden, im Nachhinein nicht erklärbaren starken Anstieg der Proliferation der Zellen nicht infizierter Tiere kam.

Auffallend war, daß im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Antigenen mit L3-Antigen praktisch keine meßbare Stimulation erreicht werden konnte. Die Aktivitäten lagen bei den infizierten und den nicht infizierten Gruppen maximal bei 500 DPM und damit noch unterhalb der Werte der Medium-Kontrollen, denen kein Antigen zugesetzt worden war. Offensichtlich reagieren PBL von *B. malayi*-infizierten *M. coucha* zu keinem Zeitpunkt der Infektion auf eine Stimulation mit L3-Antigen. Es ist möglich, daß die Konzentration von 20 µg L3-Antigen /ml für eine effektive Stimulation der PBL nicht ausreichte, jedoch konnte aus Materialgründen keine höhere Konzentration gewählt werden. Aus Arbeiten anderer Autoren geht außerdem hervor, daß 20 µg /ml in den meisten Fällen eher eine maximale Antigen-Konzentration darstellt (z.B. Lammie und Katz, 1984b; Mistry und Subrahmanyam, 1985; Lawrence *et al.*, 1994; Schönfeld, 1998). Warum L3-Antigen von *B. malayi* im vorliegenden Fall keinen meßbaren stimulatorischen Effekt auf PBL infizierter Tiere ausübte, ist unklar.

Die Verläufe der Proliferationskurven der behandelten Tieren waren in Reaktion auf alle eingesetzten Antigene ähnlich: nach einem initialen geringfügigem Abfall der Proliferationsleistung im Anschluß an die Behandlung kam es zum Ende des Versuchszeitraumes zu einem deutlichen Anstieg. Dabei zeigten die Zellen derjenigen Tiere die stärkste Reaktion, die mit CGP 20376 behandelt worden waren, einem Medikament, das sowohl makro- als auch mikrofilarizid wirkt. Im gleichen Zeitraum reagierten die Zellen nicht behandelter Tiere zunehmend schwächer auf die Stimulantien (s. Abb. 5.22-5.24B).

Einige Autoren führen die Hyporesponsivität der T-Zellen auf persistierende Spiegel von zirkulierendem Mikrofilarien-Antigen zurück (z.B. Ottesen, 1992; Ramsdell und Fowlkes, 1992). Auch Schönfeld (1998) beobachtete an dem Modell *M. coucha*/ *L. sigmodontis* einen Tiefpunkt der Stimulierbarkeit von Milzzellen am Tag 120 p.i., zur Zeit der maximalen Mikrofilariämie. Der Einbruch der Proliferationsleistung der Zellen infizierter Tiere trat in der vorliegenden Arbeit jedoch bereits am Tag 35 p.i., d.h. zeitgleich mit der letzten Häutung der L4 zu Präadulten auf (Ash und Riley, 1970) und konnte nicht nur nach unspezifischer Stimulation mit Con A, sondern auch nach Stimulation mit spezifischem Parasiten-Antigen beobachtet werden. Die Mikrofilariämie setzt dagegen bei *B. malayi* erst am Tag 90 p.i. ein, so daß Mikrofilarien-Antigene im vorliegenden Fall nicht für die abgeschwächte Reaktion verantwortlich sein können. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit Beobachtungen von Mistry und Subrahmanyam (1985) überein, die am Modell *M. coucha*/ *L. carinii*, bereits in der Präpatenz eine sehr schwache Proliferation der PBL in Reaktion auf Con A beobachteten. Eine vollständige Anergie der Zellen wurde in der Patenz beobachtet.

Vor allem unter Einbeziehung der Ergebnisse der Therapieversuche liegt die Vermutung nahe, daß nicht nur Mikrofilarien sondern auch andere Stadien einschließlich der Adulten für die Hyporesponsivität verantwortlich sind, da die Zellen derjenigen Tiere die stärkste Reaktion zeigten, bei denen Mikrofilarien und adulte Würmer eliminiert worden waren. Außerdem ist zu beachten, daß es nach Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen am Tag 90 p.i., also zeitgleich mit dem Beginn der Mikrofilariämie, vorübergehend zu einem Anstieg der Reaktivität der Zellen gekommen war. Mikrofilarien scheinen also nicht initial hyporesponsiv zu wirken. Eventuell wird eine durch exkretorisch/ sekretorische Produkte der Weibchen eingeleitete Hyporesponsivität im Verlauf der Parasitämie durch zirkulierende Mikrofilarien verstärkt, so daß die Elimination eines der beiden Parasitenstadien zu schwächerer Regeneration der Proliferationsfähigkeit der Zellen führt, als die Elimination beider Stadien.

Bereits Anfang der 80er Jahre beobachteten Piessens *et al.* (1980a) und Lammie *et al.* (1984), daß Serum infizierter Patienten und Tiere eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von PBL hat. Es ist bekannt, daß PC-haltige Epitope aus ES-Produkten von Nematoden die

Proliferation von murinen B-Zellen und von humanen T-Zellen nach Antigen-Stimulation inhibieren können (vergl. Harnett *et al.*, 1999b; Harnett 2000). Es scheint also möglich, daß ES-Produkte der Filarien schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion abgesondert werden und die Proliferationsfähigkeit der Zellen negativ beeinflussen. Ein in diesem Zusammenhang sehr interessantes ES-Produkt präadulter Filarien ist Juv-p-120, ein von präadulten *L. sigmodontis* freigesetztes Molekül, das möglicherweise ebenfalls immunmodulatorische Wirkung besitzt (Wagner, 1998). Das Molekül ist in hohem Maße posttranslational modifiziert [die Modifikationen machen ca. 75 % des Molekulargewichtes aus (Hintz *et al.*, 1998)] und trägt in diesen Modifikationen Dimethylaminoethanol (DMAE), eine dem PC sehr ähnliche Komponente (Hintz *et al.*, 1998). Wager (1998) konnte verwandte Sequenzen in Genen von *B. malayi* erfassen und mittels PCR deren stadienspezifische Transkription nachweisen. Dabei beobachtete Wager (1998) die verstärkte Transkription einer dem Juv-p-120-Gen ähnlichen Nukleotidsequenz ab Tag 60 p.i. Es wäre möglich, daß solche Moleküle zu der Hyporesponsivität der PBL bei *B. malayi*-infizierten *M. coucha* beitragen.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit Beobachtungen bei *B. malayi*-infizierten Menschen, so wird allerdings deutlich, daß beim Menschen die Hyporesponsivität der T-Zellen eher in engem Zusammenhang mit dem Auftreten der Mikrofilarien im Blut steht (Ottesen *et al.*, 1977; Piessens *et al.*, 1979, 1980a, b). Piessens *et al.* (1980b) beobachteten in einer Studie mit 101 Personen, daß die Hyporesponsivität der Zellen lediglich nach Stimulation mit parasitärem Antigen auftrat, in Reaktion auf unspezifische Stimulantien bestand kein Unterschied in der Proliferationsleistung zwischen Zellen infizierter und nicht infizierter Personen. Eine generelle Hyporesponsivität, wie sie in dieser Arbeit auftrat, wurde nicht beobachtet. Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, daß die Proliferationsleistung der Zellen in Reaktion auf Parasiten-Antigen in Abhängigkeit vom Infektionsstatus stark variierte: so reagierten Zellen amikrofilärämisch asymptomatischer Patienten stark auf Mikrofilarien- aber nicht auf Adulten-Antigen, wohingegen Zellen mikrofilärämisch asymptomatischer Patienten keinerlei Reaktivität nach Stimulation mit Parasiten-Antigen erkennen ließen. Wie zuvor diskutiert, können in der vorliegenden Arbeit Mikrofilarien als alleinige Ursache der Hyporesponsivität ausgeschlossen werden. Da es bei Untersuchungen am Menschen aber nicht möglich ist, differenzierte Aussagen über den Infektionsstatus zu machen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Hyporesponsivität ebenfalls durch das Zusammenwirken von E/S-Produkten der adulten Filarien und zirkulierender Mikrofilarien hervorgerufen wurde. Interessant ist der Befund, daß in der Studie von Piessens *et al.*, (1980b) die Zellen asymptomatisch amikrofilärämischer Patienten stark auf Mikrofilarien-Antigen reagierten. Ginge man nach Weil *et al.* (1998) davon aus, daß es in endemischen Gebieten

kaum Personen gibt, die keinen Kontakt mit Filarien hatten, könnte man vermuten, daß die von Piessens *et al.*, (1980b) gefundene Reaktion auf Mikrofilarien-Antigen der in dieser Arbeit nachgewiesenen, gesteigerten Reaktion der Zellen auf Mikrofilarien-Antigen um den Tag 90 p.i. entspricht. Eventuell sind bei leichten, also klinisch nicht nachweisbaren, Filarien-Infektionen die suppressiven Einflüsse der E/S-Produkte so gering, daß eine Reaktion auf Mikrofilarien-Antigen stärker ausfallen kann.

Mehrere Autoren konnten zeigen, daß sich nach Therapie die T-Zell-Aktivität von menschlichen Patienten mit Lymphatischer Filariose, deren Zellen zuvor nicht auf Filarien-Antigen reagiert hatten, verstärkte (Piessens *et al.*, 1981b; Lammie *et al.*, 1988; Sartono *et al.*, 1995). Piessens *et al.*, (1981b) führen dies auf ein Absinken der mikrofilarien-assoziierten Antigenspiegel zurück, die nach einer Theorie der Autoren spezifische Suppressorzellen aktivieren. Mistry und Subrahmanyam vermuteten bei *L. sigmodontis*-infizierten Nagern bereits 1986, daß E/S Produkte der Parasiten für die Hyporesponsivität verantwortlich sind, die nach dem Tod der Filarien nicht mehr gebildet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie von Mistry und Subrahmanyam (1986) und erweitern die Erkenntnisse dahingehend, daß deutlich wurde, daß nicht nur Einflüsse der adulten Parasiten eine Rolle spielen, sondern das Zusammenwirken von Adulten und Mikrofilarien für die Ausprägung der Hyporesponsivität verantwortlich ist.

Ein Aspekt, der weiterhin Beachtung finden sollte, ist, daß es in der vorliegenden Arbeit nicht gelang, mit L3-Antigen eine mittels der verwendeten Verfahren meßbare T-Zell-Antwort zu induzieren. Es ist bekannt, daß verschiedene Stadien von Filarien unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem ausüben (vergl. Mistry und Subrahmanyam, 1985; Steel *et al.*, 1994; Osborne und Devaney, 1999). Interessant ist, daß L3-Antigen auf humoraler Ebene offensichtlich stärker immunogen wirkt, als Weibchen- oder Mikrofilarien-Antigen (Day, 1991; Maizels und Lawrence, 1991). Basierend auf der Tatsache, daß Erwachsene in endemischen Gebieten mehrheitlich Antikörper gegen die Oberfläche von L3 aufweisen, beschrieben Maizels und Lawrence (1991) das Prinzip der „concomitant immunity“, wonach mit zunehmendem Alter der Patienten eine effektive Immunität gegen L3 aufgebaut wird, ohne die vorhandenen adulten Filarien zu schädigen. Tatsächlich unterscheiden sich Antikörper gegen L3 von denen gegen adulte Stadien (Kurniawan-Atjmada *et al.*, 1998). Mehrere Autoren konnten zeigen, daß nach Immunisierung mit Larven 3 oder Larven 3-Extrakt eine wirksame Immunität aufgebaut wird, die z.T. in einer Reduktion der Parasitenbürde um bis zu 78 % resultiert (Crandall *et al.*, 1994; vergl. auch le Goff *et al.*, 1997). Auf zellulärer Ebene gibt jedoch keine Studien, die Reaktionen von T-Zellen nach Stimulation mit L3-Antigen erfassen. Um das in dieser Arbeit beobachtete Phänomen zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.4 Transkription unterschiedlicher Zytokingene im Verlauf der Infektion

Die Transkription des IL-2-Gens zeigte bei den nicht behandelten infizierten Tieren einen charakteristischen Verlauf, der sowohl nach Stimulation mit Weibchen-, als auch mit Männchen-, und Mikrofilarienantigenen zu beobachten war. Die Transkription sank, ausgehend von Tag 18 p.i., kontinuierlich ab, um am Tag 60 p.i. die Werte der nicht infizierten Kontrolle zu erreichen (Abb. 5.26A, B, 5.27A). Es scheint damit, daß die Transkription von IL-2 von den einzelnen Parasitenstadien sehr unterschiedlich beeinflusst wird. Sehr stark stimulierend wirken offensichtlich die frühen Stadien bis zur Larve 4. Zum Zeitpunkt, zu dem hier die maximale Transkription als Reaktion auf die Stimulation mit Antigen folgte, dem Tag 18 p.i., finden sich nach Ash und Riley (1970) Larven 4 im Wirt. Mit der Etablierung der L4 kam es aber anschließend zu einem gegenläufigen Effekt, indem die Transkription des IL-2-Gens, unabhängig von den eingesetzten Antigenen, zumindest vorübergehend deutlich zurückging. Mikrofilarien scheinen dagegen wieder stimulierend zu wirken, da es mit ihrem Auftreten - bei Verwendung von Mikrofilarien-Antigen bereits vorher- zu einer gesteigerten Transkription kam. Allerdings war zumindest in der frühen Patenz auch dieser Effekt bei steigenden Mikrofilariendichten von einem vorübergehenden Abfall der IL-2-Transkription unterbrochen. Eine bessere Zuordnung zu den eventuell stimulierenden Stadien war von der Untersuchung der chemotherapeutisch behandelten Gruppen erhofft worden. Dies gestaltete sich im Falle des IL-2 dadurch kompliziert, daß die Gruppe ZCGP vor der Therapie eine deutlich höhere IL-2 Transkription aufwies als die übrigen Gruppen einschließlich der nicht behandelten Kontrollgruppe ZI. In der Gesamtbetrachtung der Daten ergibt sich jedoch, daß es zu einer Steigerung der IL-2 Transkription kam, wenn die adulten Parasiten eliminiert waren. Eine weitgehende Reduktion der Mikrofilariämie mit Bay 44-4400 bei persistierenden Adulten reichte nicht aus; die Transkriptionsraten lagen bei der Gruppe ZBay zum Versuchsende noch unter denen der nicht behandelten Kontrollen. Dieses Ergebnis spricht für mehrere Zusammenhänge: Zum einen haben offensichtlich adulte Parasiten einen gewissen negativen Einfluß auf die in vitro induzierbare IL-2-Transkription, zum anderen scheinen Mikrofilarien in infizierten Tieren leicht stimulierend zu wirken. Dies lassen sowohl die Transkriptionskurven der infizierten, nicht behandelten Tiere als auch der Vergleich der Gruppen ZBay und ZI zu Versuchsende vermuten. Nach Elimination der Mikrofilarien in der Gruppe ZBay waren die Transkriptionsraten deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe ZI. Betrachtet man das TH1/TH2-System von Mosman (1995), so zählt IL-2 zu den Th1-Zytokinen und ist damit an der Stimulation der zytotoxischen T-Zellen und über Stimulation von B-Zellen an der Sezernierung vor allem nicht-homozytotropher Antikörper beteiligt (Kuby, 1994). Viele

Autoren vermuten, daß die Hyporesponsivität der T-Zellen sich lediglich auf Th1-Zellen bezieht und in engem Zusammenhang zum Auftreten der Mikrofilarien im Blut steht (King *et al.*, 1993; Maizels *et al.*, 1995; Ravichandran *et al.*, 1997). Der in dieser Arbeit beobachtete Expressionspeak für IL-2 am Tag 90 p.i. sowie die Daten, die nach der Chemotherapie erhalten wurden, sprechen jedoch gegen diese Theorie. Weiterhin verhalten sich die Transkriptionskurven für IL-2 und IFN γ , dem zweiten klassischen Th1-Zytokin, gegenläufig: Zum Zeitpunkt der minimalen Transkription von IL-2 wurde IFN γ nach Stimulation mit Weibchen- und Männchen-Antigen maximal transkribiert (s. Abb. 5.42 A, B). Mit Beginn der Patenz, zu einem Zeitpunkt als die Transkription von IL-2 noch einmal anstieg, erfuhr die von IFN γ einen deutlichen Rückgang. Die Zusammenhänge müssen allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da das klassische Th1/ Th2-Konzept durchaus nicht für alle Spezies angewendet werden darf (Kelso, 1995) und gerade für *M. coucha* hierfür keine Daten existieren.

Neuere Studien deuten darauf hin, daß die Bedeutung von IL-2 weniger in der Rolle eines zytotoxische Vorgänge induzierenden als vielmehr in der eines Vorläuferzytokins liegt. So sezernieren nach Mosman und Moore (1991) nicht nur bis dahin unstimulierte T-Helferzellen, sondern auch kurzzeitig stimulierte Th0-Zellen zunächst IL-2. Erst im weiteren Verlauf der Reaktion differenzieren die Zellen dann zu Th1- bzw. Th2-Klonen aus. Kultiviert man T-Zellen unter Zusatz von TGF β oder IFN γ , so verbleiben sie in einem proliferierenden, IL-2 sezernierenden Stadium (Mosman, 1995). Immer mehr wird das strikte Schema der Th1/Th2-Reaktion in Frage gestellt (Mosman und Sad, 1996; Kelso, 1995). Murine CD8 $^{+}$ -Zellen sezernieren zwar überwiegend Zytokine der Th1-Gruppe, doch sind IL-2-Expressionen häufig schwach oder fehlen ganz (Mosman und Moore, 1991). Einige Autoren postulieren, daß es bei T-Zellen individuelle Regulierungsmöglichkeiten für die Gene der einzelnen Zytokine gibt (siehe Kelso, 1995).

Welche Rolle IL-2 unter diesen Aspekten im Verlauf einer Filarien-Infektion zukommt, ist unklar. Es wäre denkbar, daß IL-2 als „Vorläuferzytokin“ zu den Zeitpunkten im Infektionsverlauf sezerniert wird, an denen der Organismus mit bis dahin unbekanntem Antigenen konfrontiert wird (L4 am Tag 18 p.i.; Mikrofilarien am Tag 90 p.i.). Mit dieser Theorie läßt sich aber das allmähliche Ansteigen der IL-2-Transkription nach Stimulation mit Weibchen- und Männchen-Antigen ab Tag 120 p.i. bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht vereinbaren, zumal die Ergebnisse der Therapieversuche auf einen negativen Einfluß der adulten Parasitenstadien bezüglich der induzierbaren IL-2-Transkription hindeuten.

Die offenbar leicht stimulierende Wirkung von Mikrofilarien ist ein bisher nicht beschriebenes Phänomen und bedarf weiterführender Studien.

Ein weiteres Zytokin der Th1-Gruppe ist nach Mosman (1995) IFN γ , das die zytotoxischen T-Zellen anregt und mit Hyperreaktivität vom verzögerten Typ in Verbindung gebracht wird. Nach Mosman (1995) ist IFN γ in der Lage, Th2-Reaktionen zu unterdrücken. King *et al.* (1993), Maizels *et al.* (1995), Mahanty *et al.* (1996a, 1997) und Ravichandran *et al.* (1997) konnten zeigen, daß die Synthese von IFN γ -mRNA und die Zahl IFN γ -produzierender Zellen bei Patienten mit asymptomatischer Mikrofilariämie stark erniedrigt waren, bei chronisch Kranken jedoch eine verstärkte IFN γ -Sekretion auftrat. Die Expression von IFN γ scheint daher invers mit dem Auftreten von Mikrofilarien im Blut verbunden. Nach Sartono *et al.* (1999) ist IFN γ sogar der Parameter, der am empfindlichsten auf Änderungen der Mikrofilariendichte reagiert.

Wie bereits angesprochen, folgte in der vorliegenden Studie die IFN γ -Transkription einem anderen Muster als die IL-2-Transkription. Zwar trat auch hier der Maximalwert in der Präpatenz auf, doch fehlte der bei IL-2 zu beobachtende frühe Stimulus. Lediglich bei Stimulation mit L3-Antigen zeigte sich am Tag 35 p.i. ein Gipfelwert; in allen anderen Fällen lag er mit 60 Tagen deutlich später, so daß als wesentliche Induktoren die präadulten Parasiten in Frage kommen. Entsprechend den Ergebnissen einer Studie bei Menschen (Maizels *et al.*, 1995) kam es mit Beginn der Mikrofilariämie in der vorgestellten Arbeit, unabhängig von zur Stimulation verwendeten Antigenen, zu einer Abschwächung der Transkription, eine Entwicklung, die sich mit steigender Mikrofilariendichte fortsetzte, so daß sich zum Versuchsende keine Unterschiede mehr zwischen infizierten Tieren und Kontrollen zeigten. Dieser Prozeß ist anhand der Ergebnisse bei den chemotherapeutisch behandelten Tieren allerdings nur andeutungsweise mit den Mikrofilarien in Verbindung zu bringen. Zwar nahmen die Transkriptionsraten für IFN γ in Gruppe ZBay nach der Behandlung vorübergehend zu, doch beschränkte sich dies bei den Stimulatoren auf Adulten-Antigene. In der Gruppe ZCGP, in der sowohl Adulte als auch Mikrofilarien abgetötet wurden, zeigte sich dagegen keine erhöhte Transkription. Dies könnte damit zusammenhängen, daß mit dem Abbau der adulten Parasiten andere /weitere Prozesse mit Einfluß auf die Zytokintranskription in den Tieren ablaufen. Als ein negativ regulierender Gegenpart zu Th1-Reaktionen ist IL-10 anzusehen, ein zumindest bei der Maus vorwiegend von TH-2-Zellen synthetisiertes Zytokin (Mosman *et al.*, 1995). Nach King *et al.* (1993) und Mahanty *et al.* (1996b) ist IL-10 das Zytokin, das für die Hyporesponsivität der T-Zellen verantwortlich ist. Die Autoren beobachteten, daß PBL mikrofilariämischer Patienten spontan sowie in Reaktion auf Filarien-Antigen mit der Synthese

von IL-10 reagierten, während Zellen chronisch Kranker kaum IL-10 sezernierten. King *et al.* (1993) konnten zeigen, daß sich nach Zugabe eines Antiserums gegen IL-10 die Proliferationsleistung von PBL erhöhte.

Zu der Frage, inwieweit IL-10 tatsächlich und direkt für eine abgeschwächte IL-2 und IFN γ -Reaktion bei bestimmten Patientengruppen verantwortlich ist, sind die Befunde allerdings nicht einheitlich. Mahanty und Nutman (1995) konnten *in vitro* die IL-2- und IFN γ -Sekretion von Lymphozyten durch Zugabe eines Antiserums gegen IL-10 steigern, während dies einer Reihe anderer Autoren (Dimock *et al.*, 1994; Sartono *et al.*, 1995b; Maizels *et al.*, 1995) nicht gelang. In der vorliegenden Studie ergab sich für die IL-10 Transkription bei Stimulation mit Weibchen- und Männchen- sowie L3-Antigen ein zweigipfliger Verlauf mit Spitzenwerten an den Tagen 35 und 90 p.i. Daß bei Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen nur der Gipfelwert am Tag 90 p.i. auftrat, könnte mit unterschiedlichen Spezifitäten der Antigene zusammenhängen. Auch die Beobachtung, daß, anders als bei den übrigen Zytokinen, hier L3-Antigene in starkem Maß die Transkription stimulieren, spricht bei IL-10 für besondere Verhältnisse im Hinblick auf induzierende Antigene.

Wie nach den dargestellten Zusammenhängen zu erwarten, kam es zu einer gegenläufigen Entwicklung bei der Transkription des IL-10- und des IFN γ -Gens, d.h. dem Gipfelwert am Tag 90 p.i. für IL-10 stand eine zurückgehende Transkription für IFN γ gegenüber. Diese Gegenläufigkeit deutete sich auch für den weiteren Verlauf bis Versuchsende mit abnehmender IFN γ -Transkription und zunehmender IL-10 Transkription an. Die hohen IL-10-Transkriptionsraten waren jedoch nicht konstant und werden scheinbar auch nicht von steigenden Mikrofilariendichten im Blut aufrecht erhalten, wie aus dem massiven Abfall der Transkription zwischen Tag 90 und 120 p.i. hervorgeht. Die Ergebnisse nach Chemotherapie sind ebenfalls nicht eindeutig. So kam es weder nach Behandlung mit CGP 20376 noch mit Bay 44-4400 (beide Substanzen sind mikrofilarizid) in allen Fällen zum Rückgang der IL-10-Transkription.

Neuere Erkenntnisse von MacDonald *et al.* (1998) werfen die Frage auf, ob IL-10 überhaupt die von Mahanty *et al.* (1996b) postulierten suppressiven Effekte ausübt. Die Autoren konnten bei Mäusen zeigen, daß eine direkte Korrelation zwischen parasitenspezifischer IL-4-Produktion und durch Peritonealhöhlenzellen vermittelter Hyporesponsivität von Lymphozyten besteht. IL-4^{-/-}-Tiere waren nicht in der Lage eine Suppressor-Zellpopulation zu aktivieren. Die Autoren vermuten, daß durch die Anwesenheit von IL-4 (bis jetzt nicht identifizierte) Mediatoren sezerniert werden, die wiederum die Suppressor-Zellpopulation aktivieren. IL-10 soll in diesen

Zusammenhängen keine Rolle spielen. In den eigenen Studien erwies sich die Transkription des IL-4-Gens als sehr unbeständig. Eine deutliche Transkription zeigte sich ausschließlich am Tag 60 p.i. und nach Stimulation mit Mikrofilarien- und L3-Antigen. Aber auch dies traf lediglich für einige Tiere der untersuchten Gruppe zu. Mehrere Autoren beobachteten nach Injektion von L3 in Mäuse einen starken Anstieg der IL-4-Transkription (Zusammenfassend bei Lawrence und Devaney, 2001). In diesen Studien hatte die Injektion von Mikrofilarien, im Gegensatz zur Reaktivität des Mikrofilarien-Antigens in der hier vorgestellten Studie, keinen Effekt auf die IL-4-Transkription. Interessant ist außerdem, daß Weibchen-Antigen im gesamten Infektionsverlauf nur wenig stimulierend wirkte. Werden adulte Weibchen in Mäuse implantiert, so wirken sie als potente Stimulatoren der IL-4-Synthese (Lawrence *et al.*, 1994; MacDonald, *et al.*, 1998; Lawrence und Devenay, 2001). In der vorgestellten Studie waren darüber hinaus die IL-4- und IFN γ -Transkriptionsraten nach Stimulation mit L3-Antigen zum gleichen Zeitpunkt (Tag 60 p.i.) erhöht. Dies widerspricht den Beobachtungen zahlreicher Autoren (z.B. Lawrence *et al.*, 1994; de Boer *et al.*, 1998; Sartono *et al.*, 1999), nach denen sich die Transkriptionsraten von IL-4 und IFN γ stets gegenläufig verhielten. Es muß aber beachtet werden, daß nach Stimulation mit Weibchen-Antigen eine gesteigerte IL-4-Transkription am Tag 60 p.i. nicht nachzuweisen war, wohingegen die IFN γ -Transkription nach Stimulation mit Weibchen-Antigen an diesem Tag besonders ausgeprägt war. Weiterhin deuten neuere Studien von Babu *et al.* (2000) darauf hin, daß in Mäusen sowohl IL-4, als auch IFN γ für die Elimination der Parasitenbürde verantwortlich sind.

In der Bewertung ist allerdings die insgesamt unbeständige und schwache Transkription des IL-4-Gens bei *M. coucha* zu berücksichtigen. Bereits in Vorversuchen war es nur in wenigen Fällen geglückt, IL-4-Amplifikate aus mit Con A stimulierten PBL darzustellen.

Dementsprechend schwierig war die Etablierung der PCR-Reaktionsbedingungen für dieses Zytokin. Die Tatsache, daß am Tag 60 p.i. bei einigen Tieren in Reaktion auf Mikrofilarien- und L3-Antigen doch eine sehr deutliche Transkription gemessen werden konnte, spricht aber gegen die Vermutung, daß die Transkripte aus technischen Gründen nicht erfasst wurden.

Sehr viel konstantere Ergebnisse ließen sich demgegenüber für die Transkription des IL-5-Gens erlangen. Der Verlauf in unbehandelten Tieren wies, soweit Weibchen- und Männchen-Antigen zur Stimulation der Zellen verwendet wurden, eine Ähnlichkeit mit dem für IL-10 beschriebenen Verlauf auf. Der Peak in der Präpatenz lag zwar bei IL-5 früher, doch folgte einem Abfall wie bei IL-10 am Tag 90 p.i. ein Gipfelwert sowie, nach deutlichem Rückgang, zum Versuchsende ein erneuter Anstieg. Mikrofilarien-Antigen wirkte sich im Fall von IL-5

dagegen weitaus schwächer aus als im Fall von IL-10 und auch die Reaktion auf L3-Antigen war erheblich schwächer als dort.

Vorausgesetzt, daß sich die Verhältnisse von Maus und Mensch auf *M. coucha* übertragen lassen, könnte die Gleichförmigkeit der Verläufe bei IL-5 und IL-10 darauf beruhen, daß beide Zytokine ausschließlich oder im Wesentlichen von Th2-Zellen gebildet werden (Mosman *et al.*, 1995). Dies muß nicht mit einer Deckungsgleichheit der Reaktionen verbunden sein - eine Steigerung der IL-5-Transkription lief in der Präpatenz der von IL-10 voraus - da verschiedene Zytokingene auch im gleichen Zelltyp unterschiedlich reguliert sein können (Kelso, 1995).

Die auffallendsten Befunde ergaben sich aber nach den chemotherapeutischen Behandlungen, wobei es in den Gruppen, in denen die makrofilariziden Medikamente CGP 20376 und Flubendazol eingesetzt worden waren, zu einer erheblichen Steigerung der IL-5 Transkription gegenüber den unbehandelten und mit Bay 44-4400 behandelten Tieren kam.

In der Gesamtbetrachtung zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie ein bisher unbekanntes Bild. Adulte Stadien scheinen negativ auf die Expression vor allem von IL-2 und IL-5 zu wirken, wohingegen Mikrofilarien eine leicht stimulierende Wirkung auf die Expression von IL-2, aber auch von IL-5 und IL-10 zu haben scheinen. In allen beschriebenen Fällen ist die Abhängigkeit der Expression von der Höhe oder Dauer der Mikrofilariämie aber nicht eindeutig. Im Gegensatz dazu wirkten Mikrofilarien im Infektionsverlauf zunehmend supprimierend auf die Transkription von IFN γ , ein Befund, der mit den Ergebnissen anderer Autoren (z.B. Maizels *et al.*, 1995) übereinstimmt. Nach den hier dargelegten Beobachtungen ist es allerdings fraglich, ob die Suppression allein durch die Mikrofilarien ausgelöst wird, da nach chemotherapeutischer Elimination der Mikrofilarien keine signifikante Erhöhung der IFN γ -Gen-Transkription erzielt werden konnte. Eindeutig ist dagegen die Stimulation des IFN γ -Gens durch die präadulten Stadien am Tag 60 p.i.

Besonders interessant ist der Einfluß der Larven 3. So konnte eine nennenswerte Expression von IL-4 überhaupt nur nach Stimulation mit L3- und Mikrofilarien-Antigen erreicht werden und auch bei der Induktion des IL-10-Gens scheinen L3-Antigene eine besondere Rolle zu spielen (s.o. und Abb. 5.39B).

Vergleicht man die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie mit Daten von Lawrence *et al.* (1994), die unterschiedliche Stadien von *B. malayi* in Mäuse implantierten, so ergibt sich ein völlig anderes Bild (s.o.). Die Autoren postulieren, daß adulte Filarien die Immunantwort rasch in Richtung einer Th2-Antwort polarisieren, wobei diese Stimulation so stark sei, daß sie die durch die Mikrofilarien hervorgerufene Th1-Antwort überlagere. Diese Polarisierung konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden; im Gegenteil wirkten Adult-Antigene eher negativ auf die Transkription von IL-5, einem klassischen Th2-Zytokin und Mikrofilarien-

Antigen positiv auf die Transkription von IL-10, ebenfalls zumindest bei Mensch und Maus, einem Th2-Zytokin. Abgesehen davon, daß in der vorliegenden und in der zitierten Studie mit *M. coucha* bzw. Mäusen verschiedene Wirte verwendet wurden, scheint es generell fraglich, ob die Inokulation von einzelnen Parasitenstadien ein umfassendes Bild des immunologischen Geschehens liefern kann. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, kommt es zu übergreifenden Reaktionen, so daß oftmals auch, wie z.B. im Falle von IL-10 und IFN γ , nach Elimination der einzelnen Stadien keine genaue Zuordnung des stimulierenden oder supprimierenden Stadiums möglich war. Durch das „Zerlegen“ der Infektion werden diese Zusammenhänge nicht erfasst und führen u.U. zu verzerrten Ergebnissen, so daß Studien, die den gesamten Infektionsverlauf erfassen, vorzuziehen sind.

Taubert und Zahner (2001) führten eine solche Studie durch, die sich mit den immunologischen Reaktionen im Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis*, einer anderen Filarie, bei Balb/c Mäusen befasste. Ähnlich der eigenen Untersuchungen kam es dabei in der Phase der Präpatenz zu einer deutlichen Stimulation der IL-2-Gentranskription. In der späten Präpatenz sanken die Werte aller Zytokine bis auf IL-10 drastisch ab; für IL-10 wurde dagegen am Tag 45 p.i. ein Gipfelwert gemessen. Auch im weiteren Verlauf verhielt sich IL-10 gegenläufig zu den anderen Zytokinen, indem die Transkription des IL-10-Gens zu Beginn der Patenz zurück ging, während sie bei allen anderen Zytokin-Genen wieder anstieg. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Beobachtungen dieser Studie, wonach die IL-10-Werte mit Beginn der Patenz Gipfelwerte erreichen. Beiden Studien haben jedoch gemeinsam, daß die klassischen Muster der Th1/ Th2-Antworten nicht zutreffen. Es gibt mehr und mehr Anhaltspunkte dafür, daß dieses Schema zum einen zu einfach ist (s.o.), zum anderen sich nicht beliebig auf unterschiedliche Spezies übertragen läßt (z.B. Kelso, 1995).

Zusammenfassend wurde mit der vorliegenden Studie zum ersten Mal an einem für *B. malayi* voll empfänglichen Wirt nach quantitativer Infektion eine Analyse der Zytokinantworten vorgenommen. Auch wenn die Ergebnisse mit gewissen Einschränkungen interpretiert werden müssen, weil zwischen einzelnen Tieren zum Teil erhebliche Unterschiede auftraten und durch die vermutlich ungleichmäßige Transkription des Housekeeping-Gens β 2-Mikroglobulin Unsicherheiten aufkamen, können die erarbeiteten Daten als Grundlage für weitere Studien im Rahmen des verwendeten Modellsystems dienen und dazu beitragen, das Immungeschehen der Filarien-Infektionen besser zu verstehen.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden am Modell der *Brugia malayi*-Infektion des Nagers *Mastomys coucha* zelluläre Reaktionen und immunregulatorische Zusammenhänge im Verlauf der experimentellen Lymphatischen Filariose untersucht.

Die Studie deckt bei quantitativ infizierten Tieren und nicht infizierten Kontrollen einen Zeitraum von 230 Tagen post infectionem (p.i.) ab. Zusätzliche Gruppen wurden am Tag 129 p.i. mit verschiedenen Filariziden behandelt und zum Vergleich ebenfalls bis zum Tag 230 p.i. untersucht. Mit CGP 20376 (25 mg /kg per os), Flubendazol (50 mg /kg s.c.) und Bay 44-4400 (25 mg/kg „spot-on“ Applikation) wurden Substanzen mit mikro- und makrofilarizider, ausschließlich makrofilarizider bzw. mikrofilarizider und die Embryogenese beeinträchtigender Wirkung eingesetzt. Infektions- und Therapieerfolge wurden durch die Bestimmung der Mikrofilariendichten im Blut und die abschließende Sektion der Versuchstiere kontrolliert. Periphere Blutlymphozyten (PBL) der Versuchstiere dienten als Grundlage für weiterführende Untersuchungen. Die Reaktion der PBL auf Stimulation mit *B. malayi*-Weibchen-, Männchen-, Mikrofilarien- und L3-Antigenen sowie dem T-Zell-Mitogen Con A wurde in Proliferationsassays anhand des Einbaus von ³H-Thymidin und über die m-RNA-Spiegel für IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IFN γ in einer semiquantitativen RT-PCR überprüft. Die Etablierung der PCR mittels *M. coucha*-spezifischer Primer war Teil der Aufgaben in der vorgelegten Arbeit. Für die Proliferationsassays und die RT-PCR wurden unterschiedliche Gruppen mit jeweils 6 Tieren in Form von Verlaufsuntersuchungen eingesetzt.

Die Infektion mit L3 von *B. malayi* verlief in allen 48 infizierten *M. coucha* erfolgreich. Am Tag 90 p.i. traten zum ersten Mal Mikrofilarien im Blut einzelner Tiere auf. Die Mikrofilariämie stieg in den unbehandelten Tieren bis Versuchsende an. Die Rückfindungsrate der Parasiten nach Sektion betrug im Durchschnitt 31,1 % (7,05-72,9 %).

CGP 20376 bewirkte eine rasche, weitgehend vollständige und anhaltende Reduktion der Parasitämie und war adultizid. Flubendazol tötete die adulten Filarien ab wodurch es ab Tag 21 zu einem kontinuierlichen, letztlich fast vollständigen Rückgang der Parasitämie kam. Bay 44-4400, das nicht adultizid wirkte, führte innerhalb weniger Tage zur Mikrofilarienfreiheit. Ab dem 21. Tag nach der Behandlung stieg die Mikrofilariendichte im Blut wieder langsam an, blieb aber bis Versuchsende bis auf eine Ausnahme unter den Ausgangswerten.

In den Proliferationsassays zeigte sich am 18. Tag p.i. bei infizierten Tieren nach spezifischer Stimulation eine gesteigerte Reaktion. Am Tag 35 p.i. und anhaltend bis Versuchsende trat

sowohl eine unspezifische als auch in Reaktion auf Weibchen und Männchen-Antigen eine spezifische Suppression auf.

In Reaktion auf Mikrofilarien-Antigen zeigte sich ein ähnliches Bild, doch reagierten die Zellen am Tag 90 p.i., mit Beginn der Mikrofilariämie, vorübergehend stärker. L3-Antigene induzierte keine PBL-Proliferation.

Die chemotherapeutischen Behandlungen resultierten in einer generell gesteigerten Proliferationsleistung der PBL, wobei sich CGP 20376 mit seiner makro- und mikrofilariziden Wirkung stärker auswirkte, als die beiden jeweils nur gegen ein Parasitenstadium wirksamen Medikamente.

Für die Analyse der Zytokin-Gen-Transkription war die Etablierung der semi-quantitativen RT-PCR für *M. coucha*, verbunden mit der Synthese eines Standardplasmids und der Erarbeitung eines Meßsystems für geringe Mengen mRNA, Bestandteil der Arbeit.

Die Etablierung der semi-quantitativen RT-PCR war wegen der geringen Zell-Mengen, die für die einzelnen Messungen zur Verfügung standen, und aufgrund individueller Unterschiede zwischen den Versuchstieren schwierig. Weiterhin war die Amplifikation des $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gens, eines sog. Housekeeping-Gens, das als Standard bei der PCR verwendet wurde, nicht immer konstant.

Bei den infizierten Tieren zeigten sich für die einzelnen Zytokine unterschiedliche Verläufe, wobei zusätzlich Abhängigkeiten von den eingesetzten Antigenen beobachtet wurden. Am ersten Untersuchungstag nach der Infektion (18 Tage p.i.) zeigte sich vorwiegend in Reaktion auf Adult-Antigene eine im Gegensatz zu den nicht infizierten Kontrollen verstärkte Transkription bei IL-2 und IL-5. In beiden Fällen kam es danach zu einem Abfall und mit Beginn der Mikrofilariämie (90 Tage p.i.) zu weiteren Gipfelwerten, gefolgt von einem erneuten Abfall und einem Anstieg zum Versuchsende. Demgegenüber verzögert mit einem ersten Peak am Tag 30 p.i., ansonsten aber ähnlichem Verlauf, zeigte sich die Transkription des IL-10-Gens, wobei sich hier neben den Adult-Antigenen auch Mikrofilarien- und L3-Antigene als potente Stimulatoren erwiesen. Die IL-4-Gentranskription ließ sich insgesamt nur sehr schwach stimulieren. Für IFN γ ergab sich nach Stimulation mit Adult-Antigenen ein Gipfelwert am Tag 60 p.i., dem bis 90 Tage p.i. ein Abfall auf relativ niedrige Werte folgte. Diese wurden bis Tag 170 p.i. beibehalten. Anschließend gingen die Transkriptionsraten auf Kontrollniveau zurück. Nach Stimulation mit Mikrofilarien-Antigen ergab sich dagegen ein zweigipfliger Verlauf mit höchsten Werten an den Tagen 60 p.i. und 120 p.i.

Die chemotherapeutischen Behandlungen hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Transkriptionsmuster von IL-4 und IL-10. Im Falle von IL-2 und IFN γ , insbesondere aber bei IL-5 führte die Elimination der adulten Parasiten bis Versuchsende zur Steigerung der

Transkription, wobei sich die mit einer frühen Abtötung der Mikrofilarien verbundene CGP 20376-Applikation stärker auswirkte als der rein makrofilarizide Effekt von Flubendazol. Diese Effekte konnten vor allem nach Stimulation mit Adult-Antigenen beobachtet werden. Andererseits ergab sich aus der raschen Eliminierung der Mikrofilarien und der zeitweisen Freiheit von Mikrofilarien kein Effekt.

8. Summary

In this work cellular responses and immunoregulatory interactions were examined in the course of experimental *Brugia malayi*-infection of *Mastomys coucha* as a model for lymphatic filariasis.

The study covered a time span of 230 days post infection (p.i.) for quantitatively infected experimental animals and non-infected control animals. At 129 days p.i. additional groups were treated with a) the micro and macrofilaricidal CGP 20376 (25mg/kg per os), b) the macrofilaricide Flubendazol (50mg/kg s.c.) and c) the microfilaricide Bay 44-4400 (25 mg/kg „spot on“). Infection and response to treatment were followed using microfilarial counts from blood and all animals were autopsied at the end of the trial period. Harvested PBLs served as the basis for further investigations. The responses of harvested PBLs to stimulation with female-, male-, microfilarial- and L3-antigens as well as Con A were examined using ³H-thymidine incorporation as a measure of proliferation, and semi-quantitative RT-PCR to investigate regulation of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IFN- γ gene transcription. For the proliferation assays and for the RT-PCR assays, all groups consisted of 6 animals.

Infection with *B. malayi* L3 was established successfully in all 48 infected animals. At 90 days p.i. the first circulating microfilariae were detected in some of the animals. In untreated animals microfilarial counts increased up till the end of the study period. The recovery rate of adult parasites at autopsy was on average 31.1% (7.1-72.9%).

CGP 20376 produced a rapid, longlasting and almost complete reduction of microfilaraemia and was also adulticidal. Flubendazol killed the adult parasites and thereby lead to a continual and eventually almost complete abatement of parasitaemia. Bay 44-4400, which lacked adulticidal activity, produced complete microfilarial clearance within a few days. 21 days after treatment with Bay 44-4400 microfilariae re-appeared in the circulation and microfilarial counts increased slowly. With one exception however, microfilaraemia remained below control levels for the remainder of the study.

Proliferation assays showed increased responses after antigen-specific stimulation in infected animals at 18 days p.i.. From 35 days p.i. to the end of the study, the cells showed suppressed non-antigen-specific and male- and female-antigen specific responses.

Responses to microfilarial antigen showed a similar pattern, with the cells briefly showing a stronger response at 90 days p.i., with the onset of microfilaraemia. L3-antigen produced no PBL-proliferative response.

Treatment resulted in a general increase in proliferative responses. PBLs from animals treated with CGP 20376 produced stronger responses than PBLs from animals treated with stage specific medications.

To allow analysis of cytokine gene transcription, design of species-specific cytokine primers coupled with construction of a standard plasmid, the establishment of semi-quantitative RT-PCR protocols for *M. coucha* and the methods allowing determination of very low RNA concentrations were necessary additional components of the work.

Due to the low cell numbers per sample and due also to the substantial variation between animals of the same group, establishment of a stable and robust RT-PCR protocol was particularly problematic. Furthermore, the amplification of the β 2-microglobulin, the so-called house keeper gene used as the standard allowing normalisation of the RT-PCR results, did not always remain constant. In infected animals the examined cytokines showed distinct patterns, which varied according to the stimulating antigens. In infected animals, at the first time point post infection (18 days p.i.) IL-2 and IL-5 were elevated relative to the uninfected controls. In both cases these then declined, with later peaks at 90 days p.i. (onset of microfilaraemia) and towards the end of the study period. IL-10 responses were comparatively delayed with the first peak at 30 days p.i., showing an otherwise similar progression, though in addition to adult antigen, microfilarial and L3-Ag were also potent stimulators of transcription. IL-4 transcription responded generally very weakly to antigenic stimulation. IFN- γ transcription in response to adult antigen peaked at 60 – 90 days before declining to low transcription rates which were then maintained until 170 days p.i.. Thereafter IFN- γ transcription diminished to control levels. Stimulation with microfilarial antigen produced two IFN- γ transcription peaks, with maxima at 60 and 120 days p.i.. Treatment had no significant effect upon IL-4 or IL-10 transcription. In the case of IL-2, IFN- γ and especially IL-5, clearance of the adult parasites lead to continuous elevation of transription, whereby CGP 20376 mediated simultaneous killing of adult and larval stages produced a stronger effect than the pure adulticide of Flubendazol. This was especially clear to see in responses to adult antigen. In contrast, killing and temporary clearance of microfilariae alone had no effect.

9. Literaturverzeichnis

- Addiss, D. G., M. J. Beach, T. G. Streit, S. Lutwick, F. H. LeConte, J. G. Lafontant, A. W. Hightower and P. J. Lammie (1997). "Randomised placebo-controlled comparison of ivermectin and albendazole alone and in combination for *Wuchereria bancrofti* microfilaraemia in Haitian children." Lancet **350**(9076): 480-4.
- Addiss, D. G., K. A. Dimock, M. L. Eberhard and P. J. Lammie (1995). "Clinical, parasitologic, and immunologic observations of patients with hydrocele and elephantiasis in an area with endemic lymphatic filariasis." J Infect Dis **171**(3): 755-8.
- Addiss, D. G., M. L. Eberhard, P. J. Lammie, M. B. McNeeley, S. H. Lee, D. F. McNeeley and H. C. Spencer (1993). "Comparative efficacy of clearing-dose and single high-dose ivermectin and diethylcarbamazine against *Wuchereria bancrofti* microfilaremia." Am J Trop Med Hyg **48**(2): 178-85.
- Alcami, A. and G. L. Smith (1995). "Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology." Immunol Today **16**(10): 474-8.
- Allen, J. E., R. A. Lawrence and R. M. Maizels (1996). "APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production." Int Immunol **8**(1): 143-51.
- Ash, L. R. and J. F. Schacher (1971). "Early life cycle and larval morphogenesis of *Wuchereria bancrofti* in the jird, *Meriones unguiculatus*." J Parasitol **57**(5): 1043-1051.
- Ash, L. R. and J. M. Riley (1970). "Development of subperiodic *Brugia malayi* in the jird, *Meriones unguiculatus*, with notes on infections in other rodents." J Parasitol **56**(5): 969-73.
- Babu, J. S., S. Kanangat and B. T. Rouse (1993). "Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA." J Immunol Methods **165**(2): 207-16.
- Babu, S., L. M. Ganley, T. R. Klei, L. D. Shultz and T. V. Rajan (2000). "Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*." Infect Immun **68**(5): 3034-5.
- Babu, S., L. D. Shultz, T. R. Klei and T. V. Rajan (1999). "Immunity in experimental murine filariasis: roles of T and B cells revisited." Infect Immun **67**(6): 3166-7.
- Babu, S., P. Porte, T. R. Klei, L. D. Shultz and T. V. Rajan (1998). "Host NK cells are required for the growth of the human filarial parasite *Brugia malayi* in mice." J Immunol **161**(3): 1428-32.
- Ballagi-Pordány, A. and K. Funa (1991). "Quantitative determination of mRNA phenotypes by the polymerase chain reaction." Anal Biochem **196**(1): 89-94.
- Bancroft, A. J., R. K. Grencis, K. J. Else and E. Devaney (1993). "Cytokine production in BALB/c mice immunized with radiation attenuated third stage larvae of the filarial nematode, *Brugia pahangi*." J Immunol **150**(4): 1395-402.

- Barry Walker, K. (1998). "Detection and analysis of cytokin mRNA in tissue and cell lines." J Immunol Meth **212**: 113-123.
- Becker-André, M. and K. Hahlbrock (1989). "Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)." Nucleic Acids Res **17**(22): 9437-46.
- Cabrera, Z., D. W. Buttner and R. M. Parkhouse (1988). "Unique recognition of a low molecular weight *Onchocerca volvulus* antigen by IgG3 antibodies in chronic hyper-reactive oncho-dermatitis (Sowda)." Clin Exp Immunol **74**(2): 223-9.
- Cao, W. C., C. P. Van der Ploeg, A. P. Plaisier, I. J. van der Sluijs and J. D. Habbema (1997). "Ivermectin for the chemotherapy of bancroftian filariasis: a meta- analysis of the effect of single treatment." Trop Med Int Health **2**(4): 393-403.
- CDC (1993). "Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication." MMWR **42**: 1-38.
- Chamberlain, J., R. A. Gibbs, J. E. Ranier, P. N. Nguyen and C. T. Caskey (1988). "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplifications." Nucleic Acids Res **16**: 11141-11156.
- Chandrashekar, R., U. R. Rao, G. R. Rajasekariah and D. Subrahmanyam (1984). "Isolation of microfilariae from blood on iso-osmotic percoll gradients." Indian J Med Res **79**: 497-501.
- Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, K. D. Brown and T. R. Mosmann (1987). "Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies." J Exp Med **166**(5): 1229-44.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Crandall, R., C. Crandall, J. Nayar and T. Doyle (1994). "Resistance and disease in *Brugia malayi* infection of ferrets following prior infection, injection of attenuated infective larvae and injections of larval extracts." Parasite Immunol **16**(8): 425-33.
- Cross, J. H., F. Partono, M. Y. Hsu, L. R. Ash and S. Oemijati (1979). "Experimental transmission of *Wuchereria bancrofti* to monkeys." Am J Trop Med Hyg **28**(1): 56-66.
- Dallman, M. J., R. A. Montgomery, C. P. Larsen, A. Wanders and A. F. Wells (1991). "Cytokine gene expression: analysis using northern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization." Immunol Rev **119**: 163-79.
- Day, K. P. (1991). "The Endemic Normal in Lymphatic Filariasis: A Static Concept." Parasitol Today **7**(12): 341-343.
- de Boer, B. A., Y. E. Fillé, Y. C. Kruize and M. Yazdanbakhsh (1998). "Antigen-stimulated IL-4, IL13, and IFN γ production by human T cells at a single-cell level." Eur J Immunol **28**: 3145-3160.

- Del Prete, G. F., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokin production." J. Immunol. **150**(2): 353-360.
- Del Prete, G. F., M. De Carli, C. Mastromauro, R. Biagotti, D. Macchia, P. Falagiani, M. Ricci and S. Romagnani (1991). "Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T- cells with stable opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production." J Clin Invest **88**(1): 346-350.
- Denham, D. A., F. Medeiros, C. Baldwin, H. Kumar, I. C. Midwinter, D. W. Birch and A. Smail (1992). "Repeated infection of cats with *Brugia pahangi*: parasitological observations." Parasitology **104**(Pt 3): 415-20.
- Denham, D. A., E. Brandt and D. A. Liron (1981). "Anthelmintic effects of oxibendazole on *Brugia pahangi*." J Parasitol **67**(1): 123.
- Denham, D. A., D. A. Liron and E. Brandt (1980). "The anthelmintic effects of albendazole on *Brugia pahangi*." J Helminthol **54**(3): 199-200.
- Denham, D. A., R. Samad, S. Y. Cho, R. R. Suswillo and S. C. Skippins (1979). "The anthelmintic effects of flubendazole on *Brugia pahangi*." Trans R Soc Trop Med Hyg **73**(6): 673-6.
- Denham, D. A., R. R. Suswillo and R. Rogers (1978). "Studies with *Brugia pahangi* 19. Anthelmintic effects of mebendazole." Trans R Soc Trop Med Hyg **72**(5): 546-7.
- Dimock, K. A., D. G. Addiss, M. L. Eberhard and P. J. Lammie (1994). "Differential proliferative and interleukin-10 responses to fractionated filarial antigens: preferential recognition by patients with chronic lymphatic dysfunction." J Infect Dis **170**(2): 403-12.
- Dissanayake, S., L. Watawana and W. F. Piessens (1995). "Lymphatic pathology in *Wuchereria bancrofti* microfilaraemic infections." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(5): 517-21.
- Duplaa, C., T. Couffinhal, L. Labat, C. Moreau, J. M. Lamaziere and J. Bonnet (1993). "Quantitative analysis of polymerase chain reaction products using biotinylated dUTP incorporation." Anal Biochem **212**(1): 229-36.
- Elder, P., C. French and M. Subramaniam (1988). "Evidence that the functional β -actin gene is single copy in most mice and is associated with 5' sequences capable of conferring serum- and cycloheximide-dependent regulation." Mol Cell Biol **8**: 480-485.
- Fanning, M. M. and J. W. Kazura (1983). "Genetic association of murine susceptibility to *Brugia malayi* microfilaraemia." Parasite Immunol **5**(3): 305-16.
- Finkelman, F. D., E. J. Pearce, J. F. Urban, Jr. and A. Sher (1991). "Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses." Immunol Today **12**(3): A62-6.

- Fletcher, C., D. W. Birch and D. A. Denham (1992). "Cats with single *Brugia pahangi* infections: relationship between parasitological status and humoral responses to somatic and surface parasite antigens." Parasite Immunol **14**(3): 339-50.
- Fowlkes, B. J. and F. Ramsdell (1993). "T-cell tolerance." Curr Opin Immunol **5**(6): 873-9.
- Freedman, D. O. (1998). "Immune Dynamics in the Pathogenesis of Human Lymphatic Filariasis." Parasitol Today **14**(6): 229-234.
- Freedman, D. O., T. D. Horn, C. M. Maia e Silva, C. Braga and A. Maciel (1995). "Predominant CD8+ infiltrate in limb biopsies of individuals with filarial lymphedema and elephantiasis." Am J Trop Med Hyg **53**(6): 633-8.
- Freedman, D. O., P. J. de Almeida Filho, S. Besh, M. C. Maia e Silva, C. Braga and A. Maciel (1994). "Lymphoscintigraphic analysis of lymphatic abnormalities in symptomatic and asymptomatic human filariasis." J Infect Dis **170**(4): 927-33.
- Freedman, D. O., A. Lujan-Trangay, C. Steel, C. Gonzalez-Peralta and T. B. Nutman (1991). "Immunoregulation in onchocerciasis. Functional and phenotypic abnormalities of lymphocyte subsets and changes with therapy." J Clin Invest **88**(1): 231-8.
- Fritz, E., D. Thiele, H. Willems and M. M. Wittenbrink (1995). "Quantification of *Coxiella burnetii* by polymerase chain reaction (PCR) and a colorimetric microtiter plate hybridization assay (CMHA)." Eur J Epidemiol **11**(5): 549-57.
- Gascan, H., J. F. Gauchat, M. G. Roncarolo, H. Yssel, H. Spits and J. E. de Vries (1991). "Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones." J Exp Med **173**(3): 747-50.
- Gelband, H. (1994). "Diethylcarbamazine salt in the control of lymphatic filariasis." Am J Trop Med Hyg **50**(6): 655-62.
- Giambartolomei, G. H., B. L. Lasater, F. Villinger and V. A. Dennis (1998). "Diminished production of T helper 1 cytokines and lack of induction of IL-2R+ T cells correlate with T-cell unresponsiveness in rhesus monkeys chronically infected with *Brugia malayi*." Exp Parasitol **90**(1): 77-85.
- Gilliland, G., S. Perrin, K. Blanchard and H. F. Bunn (1990). "Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): 2725-9.
- Gomez-Escobar, N., A. van den Biggelaar and R. Maizels (1997). "A member of the TGF-beta receptor gene family in the parasitic nematode *Brugia pahangi*." Gene **199**(1-2): 101-9.
- Green, C. A., D. H. Gordon and N. F. Lyons (1978). "Biological species in *Praomys (Mastomys) natalensis* (Smith): a rodent carrier of Lassa virus and Bubonic plague in Africa." Am J Trop Med Hyg **27**: 627-629.
- Grenfell, B. T. (1991). "A Model for the Dynamics of human Lymphatic Filariasis." Parasitol Today **7**(11): 318-323.

- Harnett, M. M., M. R. Deehan, D. M. Williams and W. Harnett (1998). "Induction of signalling energy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product." Parasite Immunol **20**: 551-564.
- Harnett, W. and M. M. Harnett (2000). "Phosphorylcholine: an immunomodulator present on glycoproteins secreted by filarial nematodes." Mod Asp Immunobiol **1**(2): 40-42.
- Harnett, W., M. R. Deehan, K. M. Houston and M. M. Harnett (1999b). "Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein." Parasite Immunol **21**(12): 601-8.
- Harnett, W., K. M. Houston, R. Tate, T. Garate, H. Apfel, R. Adam, S. M. Haslam, M. Panico, T. Paxton, A. Dell, H. Morris and H. Brzeski (1999a). "Molecular cloning and demonstration of an aminopeptidase activity in a filarial nematode glycoprotein." Mol Biochem Parasitol **104**(1): 11-23.
- Harnett, W. and R. M. Parkhouse (1995). "Nature and function of parasitic nematode surface and excretory-secretory antigens" in: Perspectives in Nematode Physiology and Biochemistry (ed. M. L. S. J. Kapur), Narendra Publishing House, Delhi, India: 207-242.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman and R. M. Locksley (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." J Exp Med **169**(1): 59-72.
- Hines, S. A., R. B. Crandall, C. A. Crandall and J. P. Thompson (1989). "Lymphatic filariasis. *Brugia malayi* infection in the ferret (*Mustela putorius furo*)." Am J Pathol **134**(6): 1373-6.
- Hintz, M., G. Schares, A. Taubert, R. Geyer, H. Zahner, S. Stirm and F. J. Conraths (1998). "Juvenile female *Litomosoides sigmodontis* produce an excretory/secretory antigen (Juv-p120) highly modified with dimethylaminoethanol." Parasitology **117**(Pt 3): 265-71.
- Horwitz, D. A., J. D. Gray, K. Ohtsuka, M. Hirokawa and T. Takahashi (1997). "The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity." Immunol Today **18**(11): 538-42.
- Hussain, R., M. Grogl and E. A. Ottesen (1987). "IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclass recognition of parasite antigens correlates with different clinical manifestations of infection." J Immunol **139**(8): 2794-8.
- Ismail, M. M., R. L. Jayakody, G. J. Weil, N. Nirmalan, K. S. Jayasinghe, W. Abeyewickrema, M. H. Rezvi Sheriff, H. N. Rajaratnam, N. Amarasekera, D. C. de Silva, M. L. Michalski and A. S. Dissanaike (1998). "Efficacy of single dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **92**(1): 94-7.
- Jalava, T., P. Lehtovaara, A. Kallio, M. Ranki and H. Soderlund (1993). "Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates." Biotechniques **15**(1): 134-9.

- Jones, L. J., S. T. Yue, C. Y. Cheung and V. L. Singer (1998). "RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization." Anal Biochem **265**(2): 368-74.
- Kellogg, D. E., J. J. Sninsky and S. Kowk (1990). "Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction." Anal Biochem **189**(2): 202-8.
- Kelso, A. (1995). "Th1 and Th2 subsets: Paradigms lost?" Immunol Today **16**(8): 374-379.
- Khan, I., T. Tabb, R. E. Garfield and A. Grover (1992). "Polymerase chain reaction assay of mRNA using 28S rRNA as internal standard." Neuroscience Letters **136**: 18.
- King, C. L., S. Mahanty, V. Kumaraswami, J. S. Abrams, J. Regunathan, K. Jayaraman, E. A. Ottesen and T. B. Nutman (1993). "Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset." J Clin Invest **92**(4): 1667-73.
- King, C. L., V. Kumaraswami, R. W. Poindexter, S. Kumari, K. Jayaraman, D. W. Alling, E. A. Ottesen and T. B. Nutman (1992). "Immunologic tolerance in lymphatic filariasis. Diminished parasite-specific T and B lymphocyte precursor frequency in the microfilaremic state." J Clin Invest **89**(5): 1403-10.
- King, C. L. and T. B. Nutman (1991). "Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis." Immunol Today **12**(3): A54-8.
- King, C. L., E. A. Ottesen and T. B. Nutman (1990). "Cytokine regulation of antigen-driven immunoglobulin production in filarial parasite infections in humans." J Clin Invest **85**(6): 1810-5.
- Kinoshita, T., J. Imamura, H. Nagai and K. Shimotohno (1992). "Quantification of gene expression over a wide range by polymerase chain reaction." Anal Biochem **206**: 231-235.
- Kozbor, D., E. Hyjek, R. Wiaderkiewicz, Z. Wang, M. Wang and E. Loh (1993). "Competitor mRNA fragments for quantitation of cytokine specific transcripts in cell lysates." Mol Immunol **30**(1): 1-7.
- Kuby, J. (1994). "Cytokines" in: Immunology, (ed. J. Kuby), W. H. Freedman and Company, New York, USA: 297-322.
- Kumaraswami, V. (1999). "The Clinical Manifestations of Lymphatic Filariasis" in: Lymphatic Filariasis (ed. T. B. Nutman), Imperial College Press, London, UK: 103-126.
- Kurniawan-Atmadja, A., E. Sartono, F. Partono, M. Yazdanbakhsh and R. M. Maizels (1998). "Antibody responses to filarial infective larvae are not dominated by the IgG4 isotype." Parasite Immunol **20**(1): 9-17.
- Kurniawan, A., M. Yazdanbakhsh, R. van Ree, R. Aalberse, E. Murray, M. E. Selkirk, F. Partono and R. Maizels (1993). "Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis." J Immunol **150**: 3941-3950.

- Kwan-Lim, G. E., K. P. Forsyth and R. M. Maizels (1990). "Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection." J Immunol **145**(12): 4298-305.
- Lal, R. B., V. Kumaraswami, C. Steel and T. B. Nutman (1990). "Phosphocholine-containing antigens of *Brugia malayi* nonspecifically suppress lymphocyte function." Am J Trop Med Hyg **42**(1): 56-64.
- Lal, R. B. and E. A. Ottesen (1988). "Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment." J Infect Dis **158**(5): 1034-7.
- Lammie, P. J., D. G. Addiss, G. Leonard, A. W. Hightower and M. L. Eberhard (1993). "Heterogeneity in filarial-specific immune responsiveness among patients with lymphatic obstruction." J Infect Dis **167**(5): 1178-83.
- Lammie, P. J., M. L. Eberhard, L. E. Leiva, R. C. Lowrie, Jr. and S. P. Katz (1988). "The effect of diethylcarbamazine treatment of Bancroftian filariasis on the immunological reactivity of microfilaraemic individuals." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(5): 726-9.
- Lammie, P. J. and S. P. Katz (1984b). "Immunoregulation in experimental filariasis. IV. Induction of non-specific suppression following in vitro exposure of spleen cells from infected jirds to *Brugia pahangi* antigen." Immunology **52**(2): 221-9.
- Lammie, P. J. and S. P. Katz (1984a). "Immunoregulation in experimental filariasis. III. Demonstration and characterization of antigen-specific suppressor cells in the spleen of *Brugia pahangi*-infected jirds." Immunology **52**(2): 211-9.
- Lammie, P. J., S. P. Katz and W. H. Anderson (1984). "Serosuppression in experimental filariasis." Clin Exp Immunol **55**(3): 602-10.
- Lammie, P. J. and S. P. Katz (1983b). "Immunoregulation in experimental filariasis. II. Responses to parasite and nonparasite antigens in jirds with *Brugia pahangi*." J Immunol **130**(3): 1386-9.
- Lammie, P. J. and S. P. Katz (1983a). "Immunoregulation in experimental filariasis. I. In vitro suppression of mitogen-induced blastogenesis by adherent cells from Jirds chronically infected with *Brugia pahangi*." J Immunol **130**(3): 1381-5.
- Lammie, P. J. and S. P. Katz (1981). "Effect of treatment with diethylcarbamazine on immune responses to filarial antigens in patients infected with *Brugia malayi*." Acta Trop **38**: 227-234.
- Lawrence, R. A. and E. Devaney (2001). "Lymphatic filariasis: parallels between the immunology of infection in humans and mice." Parasite Immunol **23**: 353-361.
- Lawrence, R. A. (1996). "What mice can tell us." Parasitol Today **12**(7): 267-271.
- Lawrence, R. A., J. E. Allen, W. F. Gregory, M. Kopf and R. M. Maizels (1995). "Infection of IL-4-deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response." J Immunol **154**(11): 5995-6001.

- Lawrence, R. A., J. E. Allen, J. Osborne and R. M. Maizels (1994). "Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice." J Immunol **153**(3): 1216-24.
- Lawrence, R. A. and D. A. Denham (1993). "Stage and isotype specific immune responses in a rat model of filariasis." Parasite Immunol **15**(8): 429-39.
- Le Goff, L., P. Marechal, G. Petit, D. W. Taylor, W. Hoffmann and O. Bain (1997). "Early reduction of the challenge recovery rate following immunization with irradiated infective larvae in a filaria mouse system." Trop Med Int Health **2**(12): 1170-4.
- Limaye, A. P., E. A. Ottesen, V. Kumaraswami, J. S. Abrams, J. Regunathan, V. Vijayasekaran, K. Jayaraman and T. B. Nutman (1993). "Kinetics of serum and cellular interleukin-5 in posttreatment eosinophilia of patients with lymphatic filariasis." J Infect Dis **167**(6): 1396-400.
- Lok, J. B. and D. Abraham (1992). "Animal Models for the Study of Immunity in Human Filariasis." Parasitol Today **8**(5): 168-171.
- Lüneberg, E. and M. Frosch (1993). "Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates." J Clin Microbiol **31**: 1088-1094.
- MacDonald, A. S., R. M. Maizels, R. A. Lawrence, I. Dransfield and J. E. Allen (1998). "Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasites." J Immunol **160**(8): 4124-32.
- Mahanty, S., M. Ravichandran, U. Raman, K. Jayaraman, V. Kumaraswami and T. B. Nutman (1997). "Regulation of parasite antigen-driven immune responses by interleukin-10 (IL-10) and IL-12 in lymphatic filariasis." Infect Immun **65**(5): 1742-7.
- Mahanty, S., S. N. Mollis, M. Ravichandran, J. S. Abrams, V. Kumaraswami, K. Jayaraman, E. A. Ottesen and T. B. Nutman (1996b). "High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis." J Infect Dis **173**(3): 769-73.
- Mahanty, S., H. E. Luke, V. Kumaraswami, P. R. Narayanan, V. Vijayshekar and T. B. Nutman (1996a). "Stage-specific induction of cytokines regulates the immune response in lymphatic filariasis." Exp Parasitol **84**(2): 282-90.
- Mahanty, S. and T. B. Nutman (1995). "Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10." Parasite Immunol **17**(8): 385-92.
- Mahanty, S., C. L. King, V. Kumaraswami, J. Regunathan, A. Maya, K. Jayaraman, J. S. Abrams, E. A. Ottesen and T. B. Nutman (1993). "IL-4- and IL-5-secreting lymphocyte populations are preferentially stimulated by parasite-derived antigens in human tissue invasive nematode infections." J Immunol **151**(7): 3704-11.
- Maizels, R. M. (1995). "T-cell Activation and the Balance of Antibody Isotopes in Human Lymphatic Filariasis." Parasitol Today **11**(2): 50-56.

- Maizels, R. M., D. A. Bundy, M. E. Selkirk, D. F. Smith and R. M. Anderson (1993). "Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations." Nature **365**(6449): 797-805.
- Maizels, R. M., A. Kurniawan, M. E. Selkirk and M. Yazdanbakhsh (1991). "Immune responses to filarial parasites." Immunol Lett **30**(2): 249-54.
- Maizels, R. M. and R. Lawrence (1991). "Immunological Tolerance: The Key Feature in Human Filariasis." Parasitol Today **7**(10): 271-276.
- Marras, S. A., F. R. Kramer and S. Tyagi (1999). "Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons." Genet Anal **14**(5-6): 151-6.
- Mazza, C., G. Mantero and D. Primi (1991). "DNA enzyme immunoassay: a rapid and convenient colorimetric method for diagnosis of cystic fibrosis." Mol Cell Probe **5**: 459-466.
- McCall, J. W., J. B. Malone, A. Hyong-Sun and P. E. Thompson (1973). "Mongolian jirds (*Meriones unguiculatus*) infected with *Brugia pahangi* by the intraperitoneal route: a rich source of developing larvae, adult filariae, and microfilariae." J Parasitol **59**(3): 436.
- Michael, E. (1999). "The population dynamics and epidemiology of lymphatic filariasis" in: *Lymphatic Filariasis* (ed. T. B. Nutman), Imperial College Press, London, UK, 41-81
- Michael, E., D. A. Bundy and B. T. Grenfell (1996). "Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis." Parasitology **112**(Pt 4): 409-28.
- Michael, E., B. T. Grenfell and D. A. Bundy (1994). "The association between microfilaraemia and disease in lymphatic filariasis." Proc R Soc Lond B Biol Sci **256**(1345): 33-40.
- Miller, S., D. Schreuer and B. Hammerberg (1991). "Inhibition of antigen-driven proliferative responses and enhancement of antibody production during infection with *Brugia pahangi*." J Immunol **147**(3): 1007-13.
- Mistry, S. S. and D. Subrahmanyam (1986). "Unresponsiveness of lymphocytes in patent filarial infection: modulation by diethylcarbamazine." Trop Med Parasitol **37**(1): 25-7.
- Mistry, S. S., R. J. Tataka and D. Subrahmanyam (1985). "Cellular immune status in rodents infected with *Litomosoides carinii*." Indian J Med Res **82**: 133-8.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunology Today **17**(3): 138-146.
- Mosmann, T. R. (1995). "Cytokines, Differentiation and Functions of Subsets of CD4 and CD8 T Cells." Behring Inst Mitt **96**: 1-6.
- Mosmann, T. R. and K. W. Moore (1991). "The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses." Immunol Today: A49-A53.

- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Murphy, L. D., C. E. Herzog, J. Rudick, A. T. Fojo and S. E. Bates (1990). "Use of polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression." Biochemistry **29**: 10351-10356.
- Nagata, Y., O. Kosud, K. Takemura and T. Kikuchi (1985). "Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells." FEBS Lett **183**: 379-382.
- Neubauer, A., B. Neubauer and E. Liu (1991). "Polymerase chain reaction based assay to detect allelic loss in human DNA: Loss of β -interferon gene in chronic myelogenous leukemia." Nucleic Acids Res **18**: 993-998.
- Ngu, J. L. (1978). "Immunological studies on onchocerciasis. Varying skin hypersensitivity and leucocyte migration inhibition in a clinical spectrum of the disease." Acta Trop **35**(3): 269-79.
- Niemeyer, C. M., M. Adler and D. Blohm (1997). "Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates." Anal Biochem **246**(1): 140-5.
- Nutman, T. B. (1989). "Protective immunity in lymphatic filariasis." Exp Parasitol **68**(2): 248-52.
- Nutman, T. B., V. Kumaraswami and E. A. Ottesen (1987). "Parasite-specific anergy in human filariasis. Insights after analysis of parasite antigen-driven lymphokine production." J Clin Invest **79**(5): 1516-23.
- Oomen, A. P. (1969). "Fatalities after treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine." Trans R Soc Trop Med Hyg **63**(4): 548.
- Osborne, J. and E. Devaney (1999). "Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress Th1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*." Infect Immun **67**(4): 1599-605.
- Osborne, J. and E. Devaney (1998). "The L3 of *Brugia* induces a Th2-polarized response following activation of an IL-4-producing CD4-CD8- α beta T cell population." Int Immunol **10**(10): 1583-90.
- Ottesen, E. A. (1999). "Towards Eliminating Lymphatic Filariasis" in: Lymphatic Filariasis (ed. T. B. Nutman), Imperial College Press, London, UK, 201-215.
- Ottesen, E. A. (1992). "The Wellcome Trust Lecture. Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective." Parasitology **104**(Suppl): S71-9.
- Ottesen, E. A. and T. B. Nutman (1992). "Tropical pulmonary Eosinophilia." Annu Rev med **43**: 417-424.
- Ottesen, E. A. (1989). "Filariasis now." Am J Trop Med Hyg **41**(3 Suppl): 9-17.

- Ottesen, E. A., F. Skvaril, S. P. Tripathy, R. W. Poindexter and R. Hussain (1985). "Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis." J Immunol **134**(4): 2707-12.
- Ottesen, E. A. (1984). "Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis in man." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(Suppl): 9-18.
- Ottesen, E. A., N. R. Mendell, J. M. MacQueen, P. F. Weller, D. B. Amos and F. E. Ward (1981). "Familial predisposition to filarial infection-not linked to HLA-A or-B locus specificities." Acta Trop **38**(3): 205-16.
- Ottesen, E. A., P. F. Weller and L. Heck (1977). "Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis." Immunology **33**(3): 413-21.
- Palmieri, J. R. e. a. (1982). "Experimental infection of *Wuchereria bancrofti* in the silvered leaf monkey *Presbytis cristatus* Eschscholz, 1821." J Helminthol **56**: 243-245.
- Pani, S. P., J. Yuvaraj, P. Vanamail, V. Dhanda, E. Michael, B. T. Grenfell and D. A. Bundy (1995). "Episodic adenolymphangitis and lymphoedema in patients with bancroftian filariasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(1): 72-4.
- Partono, F. (1987). "The spectrum of disease in lymphatic filariasis." Ciba Found Symp **127**: 15-31.
- Pearlman, E., F. P. Heinzl, F. E. Hazlett, Jr. and J. W. Kazura (1995). "IL-12 modulation of T helper responses to the filarial helminth, *Brugia malayi*." J Immunol **154**(9): 4658-64.
- Pearlman, E., W. K. Kroeze, F. E. Hazlett, Jr., S. S. Chen, S. D. Mawhorter, W. H. Boom and J. W. Kazura (1993b). "*Brugia malayi*: acquired resistance to microfilariae in BALB/c mice correlates with local Th2 responses." Exp Parasitol **76**(2): 200-8.
- Pearlman, E., F. E. Hazlett, Jr., W. H. Boom and J. W. Kazura (1993a). "Induction of murine T-helper-cell responses to the filarial nematode *Brugia malayi*." Infect Immun **61**(3): 1105-12.
- Petrányi, G., H. Mieth and I. Leitner (1975). "*Mastomys natalensis* as an experimental host for *Brugia malayi* subperiodic." S E J Trop med Pub Hlth **6**(3): 328-337.
- Petter, F. (1957). "Remarques sur la systematique des Rattus africains et description d'une forme nouvelle de l'air." Mammalia **21**: 125-132.
- Piessens, W. F., F. Partono, S. L. Hoffman, S. Ratiwayanto, P. W. Piessens, J. R. Palmieri, I. Koiman, D. T. Dennis and W. P. Carney (1982). "Antigen-specific suppressor T lymphocytes in human lymphatic filariasis." N Engl J Med **307**(3): 144-8.
- Piessens, W. F., S. Ratiwayanto, P. W. Piessens, S. Tuti, P. B. McGreevy, F. Darwis, J. R. Palmieri, I. Koiman and D. T. Dennis (1981b). "Effect of treatment with diethylcarbamazine on immune responses to filarial antigens in patients infected with *Brugia malayi*." Acta Trop **38**(3): 227-34.
- Piessens, W. F. (1981a). "Lymphatic filariasis in humans: an immunologic maze." Ann Intern Med **95**(6): 778-9.

- Piessens, W. F., P. B. McGreevy, P. W. Piessens, M. McGreevy, I. Koiman, J. S. Saroso and D. T. Dennis (1980b). "Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: specific cellular unresponsiveness to filarial antigens." J Clin Invest **65**(1): 172-9.
- Piessens, W. F., S. Ratiwayanto, S. Tuti, J. H. Palmieri, P. W. Piessens, I. Koiman and D. T. Dennis (1980a). "Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi*." N Engl J Med **302**(15): 833-7.
- Piessens, W. F. and M. Beldekas (1979). "Diethylcarbamazine enhances antibody-mediated cellular adherence to *Brugia malayi* microfilariae." Nature **282**(5741): 845-7.
- Plazer, C. and T. Blankenstein (1993). "Polymerase chain reaction to quantitate cytokine mRNA" in: Cytokines-a practical approach (ed. F. R. Balkwill), IRL Press, second ed.: 57-68.
- Ponnudurai, T., D. A. Denham, G. S. Nelson and R. Rogers (1974). "Studies with *Brugia pahangi*. 4. Antibodies against adult and microfilarial stages." J Helminthol **48**(2): 107-17.
- Portaro, J. K., S. Britton and L. R. Ash (1976). "*Brugia pahangi*: depressed mitogen reactivity in filarial infections in the jird, *Meriones unguiculatus*." Exp Parasitol **40**(3): 438-6.
- Prendergast, J. A., C. D. Helgason and R. C. Bleackley (1992). "Quantitative polymerase chain reaction analysis of cytotoxic cell proteinase gene transcripts in T cells. Pattern of expression is dependent on the nature of the stimulus." J Biol Chem **267**(8): 5090-5.
- Rajan, T. V., S. Babu, D. Sardinha, H. Smith, L. Ganley, N. Paciorkowski and P. Porte (1999). "Life and death of *Brugia malayi* in the mammalian host: passive death vs active killing." Exp Parasitol **93**(2): 120-2.
- Rajan, T. V. (1999). "Lymphatic Filariasis: A Historical Perspective" in: Lymphatic Filariasis (ed. T. B. Nutman), Imperial College Press, London, UK: 1-4.
- Rajan, T. V. and A. V. Gundlapalli (1997). "Lymphatic filariasis." Chem Immunol **66**: 125-58.
- Rajasekariah, G. R., P. M. Puri, R. Chandrashekar and D. Subrahmanyam (1988). "Clearance of *Brugia pahangi* microfilariae in immunized mice." Immunol Cell Biol **66**(Pt 5-6): 331-6.
- Ramsdell, F. and B. J. Fowlkes (1992). "Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen." Science **257**(5073): 1130-4.
- Ravichandran, M., S. Mahanty, V. Kumaraswami, T. B. Nutman and K. Jayaraman (1997). "Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection." Parasite Immunol **19**(2): 69-77.
- Reddy, A., R. Chandrashekar, U. Rao and D. Subrahmanyam (1984). "Microfilaricidal periodicity in *Mastomys natalensis*." Journal of Helminthology **58**: 117-121.

- Robinson, M. O. and M. I. Simon (1991). "Determining transcript number using the polymerase chain reaction: P_{gk}-2, mP₂, and PGK-2 transgene mRNA levels during spermatogenesis." Nucleic Acids Res **19**(7): 1557-62.
- Romagnani, S. (1991). "Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease." Int J Clin Lab Res **21**(2): 152-8.
- Rottman, J. B., W. A. Tompkins and M. B. Tompkins (1996). "A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals." Vet Pathol **33**(2): 242-8.
- Rottman, J. B., E. B. Freeman, S. Tonkonogy and M. B. Tompkins (1995). "A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes." Vet Immunol Immunopathol **45**(1-2): 1-18.
- Salomon, R. N., R. Underwood, M. V. Doyle, A. Wang and P. Libby (1992). "Increased apolipoprotein E and c-fms gene expression without elevated interleukin 1 or 6 mRNA levels indicates selective activation of macrophage functions in advanced human atheroma." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2814-8.
- Sänger, I., G. Lämmle and P. Krimmig (1981). "Filarial infections in *Mastomys natalensis* and their relevance for experimental chemotherapy." Acta Trop **38**: 277-288.
- Santiago-Stevenson, D., J. Oliver-Gonzales and R. I. Hewitt (1947). "Treatment of filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamy-4-methylpiperazine hydrochloride ("Hetrazan")." JAMA **135**: 708-712.
- Sartono, E., C. Lopriore, Y. C. Kruize, A. Kurniawan-Atmadja, R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh (1999). "Reversal in microfilarial density and T cell responses in human lymphatic filariasis." Parasite Immunol **21**(11): 565-71.
- Sartono, E., Y. C. Kruize, F. Partono, A. Kurniawan, R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh (1995b). "Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms." Parasite Immunol **17**(11): 587-94.
- Sartono, E., Y. C. Kruize, A. Kurniawan, P. H. van der Meide, F. Partono, R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh (1995a). "Elevated cellular immune responses and interferon-gamma release after long-term diethylcarbamazine treatment of patients with human lymphatic filariasis." J Infect Dis **171**(6): 1683-7.
- Schares, G. (1992). "Studien zur Charakterisierung von Immunglobulinen der *Mastomys coucha* und zur Beeinflussung der humoralen Immunreaktion des Versuchstieres auf eine Infektion mit *Litomosoides carinii* durch filarizide Behandlungen." Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Schmidt, E. E. and G. F. Merrill (1991). "Changes in dihydrofolate reductase (DHFR) mRNA levels can account fully for changes in DHFR synthesis rates during terminal differentiation in a highly amplified myogenic cell line." Mol Cell Biol **11**(7): 3726-34.
- Schönfeld, K. (1998). "Zelluläre und humorale Immunreaktionen der *Mastomys coucha* auf Infektionen mit der Filarie *Litomosoides sigmodontis*." Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." Science **248**(4961): 1349-56.
- Scott, A. L. (1999). "Lymphatic-dwelling Filariae" in: Lymphatic Filariasis (ed. T. B. Nutman), Imperial College Press, London, UK: 5-39.
- Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce and A. Sher (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens." J Exp Med **168**(5): 1675-84.
- Shenoy, R. K., V. Kumaraswami, K. Rajan, S. Thankom and Jalajakumari (1993). "A comparative study of the efficacy and tolerability of single and split doses of ivermectin and diethylcarbamazine in periodic brugian filariasis." Ann Trop Med Parasitol **87**(5): 459-67.
- Siebert, P. and M. Fukunda (1984). "Induction of cytoskeletal vimentin and actin gene expression by a tumor-promoting phorbol ester in human leukemic cell lines." J. Biol. Chem. **260**: 3868-3874.
- Singer-Sam, J., M. O. Robinson, A. R. Bellve, M. I. Simon and A. D. Riggs (1990). "Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis." Nucleic Acids Res **18**(5): 1255-9.
- Sivitz, W. I. and E. C. Lee (1991). "Assessment of glucose transporter gene expression using the polymerase chain reaction." Endocrinol **128**(5): 2387-94.
- Soboslay, P. T., C. M. Dreweck, W. H. Hoffmann, C. G. Luder, C. Heuschkel, H. Gorgen, M. Banla and H. Schulz-Key (1992). "Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment." Clin Exp Immunol **89**(3): 407-13.
- Souazé, F., A. Ntodu-Thomé, C. Y. Tran, W. Rostène and P. Forgez (1996). "Quantitative RT-PCR: Limits and Accuracy." Biotechniques **21**: 280-285.
- Spencer, H. C. (1973). "Nematode Diseases. II. Filarial Diseases" in: Tropical Pathology (ed. H. C. Spencer), Springer Verlag, Berlin: 511-559.
- Spry, C. J. and V. Kumaraswami (1982). "Tropical eosinophilia." Semin Hematol **19**(2): 107-15.
- Steel, C., A. Guinea, J. S. McCarthy and E. A. Ottesen (1994). "Long-term effect of prenatal exposure to maternal microfilaraemia on immune responsiveness to filarial parasite antigens." Lancet **343**(8902): 890-3.
- Storey, D. M. (1993). "Filariasis: nutritional interactions in human and animal hosts." Parasitology **107**(Suppl): S147-58.

- Surin, J. and D. A. Denham (1990). "Comperative susceptibility to anthelmintics of *Brugia pahangi* in jirds infected by different methods." J. Helminth. **64**: 232-238.
- Suswillo, R. R., D. G. Owen and D. A. Denham (1980). "Infections of *Brugia pahangi* in conventional and nude (athymic) mice." Acta Trop **37**(4): 327-35.
- Svetic, A., F. D. Finkelman, Y. C. Jian, C. W. Dieffenbach, D. E. Scott, K. F. McCarthy, A. D. Steinberg and W. C. Gause (1991). "Cytokine gene expression after in vivo primary immunization with goat antibody to mouse IgD antibody." J Immunol **147**(7): 2391-7.
- Taubert, A. and H. Zahner (2001). "Cellular immune responses of filaria (*Litomosoides sigmodontis*) infected BALB/c mice detected on the level of cytokine transcription." Parasite Immunol **23**(8): 453-62.
- Taubert, A. (1999). "Zellulär-immunologische Reaktionen der BALB/c-Maus auf Infektionen mit *Litomosoides sigmodontis*, erfaßt mittels der RT-PCR." Inagural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996). "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." Nat Biotechnol **14**(3): 303-8.
- Tyagai, k., P. K. Murthy, T. K. Roy Chowdhury, R. K. Chatterjee and A. B. Sen (1986). "Chemotherapeutic responses of *Brugia Malayi* to antifilarials in *Mastomys Natalensis*." Indian J Parasitol **10**(2): 195-207.
- van den Winkel, J. G. J. and P. J. A. Capel (1993). "Human IgG Fc receptors heterogeneity: molecular aspects and clinical implications." Immunol Today **14**(5): 215-221.
- Vanamail, P., K. D. Ramaiah, S. P. Pani, P. K. Das, B. T. Grenfell and D. A. Bundy (1996). "Estimation of the fecund life span of *Wuchereria bancrofti* in an endemic area." Trans R Soc Trop Med Hyg **90**(2): 119-21.
- Vliet, v. d. (1993). "A simple colorimetric assay for detection of amplified Mycobacterium-Leprae DNA." Mol Cell Probe **7**: 61-66.
- Wages, J. M., L. Dolenga and A. K. Fowler (1993). "Electrochemoluminescent detection and qantitation of PCR-amplified DNA." Amplifications **10**: 1-6.
- Wagner, U. (1998). "Klonierung und Charakterisierung des stadienspezifisch exprimierten ES-Proteins Juv-p-120 aus *Litomosoides sigmodontis* und ähnlicher Sequenzen aus *Brugia malayi*." Inagural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Wang, A., M. V. Doyle and D. F. Mark (1989). "Quantification of mRNA by the polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **86**: 9717-9721.
- Weil, G. J. (1997). "THE ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis." Parasitol Today **13**: 401-404.
- Williams, R. W. and H. W. Brown (1945). "The development of *Litomosoides carinii* Filariid parasite of the cotton rat in the tropical rat mite." Science **102**.

- Wong, M. M. and M. F. Guest (1969). "Filarial antibodies and eosinophilia in human subjects in an endemic area." Trans R Soc Trop Med Hyg **63**(6): 796-800.
- World-Health-Organisation (WHO) (1992). "Lymphatic Filariasis: The Disease and its control." WHO Tech Rep Ser No. 821.
- World-Health-Organisation (WHO) (1984). "Lymphatic Filariasis." WHO Tech Rep Ser No. 702.
- Yazdanbakhsh, M., E. Sartono, Y. C. Kruize, A. Kurniawan, T. van der Pouw-Kraan, P. H. van der Meide, M. E. Selkirk, F. Partono, R. Q. Hintzen, R. A. van Lier and et al. (1993b). "Elevated levels of T cell activation antigen CD27 and increased interleukin-4 production in human lymphatic filariasis." Eur J Immunol **23**(12): 3312-7.
- Yazdanbakhsh, M., W. A. Paxton, Y. C. Kruize, E. Sartono, A. Kurniawan, A. van het Wout, M. E. Selkirk, F. Partono and R. M. Maizels (1993a). "T cell responsiveness correlates differentially with antibody isotype levels in clinical and asymptomatic filariasis." J Infect Dis **167**(4): 925-31.
- Zahner, H., A. Taubert, A. Harder and G. von Samson-Himmelstjerna (2001b). "Filaricidal efficacy of anthelmintically active cyclodepsipeptides." Int J Parasitol **31**(13): 1515-22.
- Zahner, H., A. Taubert, A. Harder and G. von Samson-Himmelstjerna (2001a). "Effects of Bay 44-4400, a new cyclodepsipeptide, on developing stages of filariae (*Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi*, *Litomosoides sigmodontis*) in the rodent *Mastomys coucha*." Acta Trop **80**(1): 19-28.
- Zahner, H. (1995). "Induction and prevention of shock-like lethal side effects after microfilaricidal treatment in filariae infected rodents." Trop Med Parasitol **46**(4): 221-9.
- Zahner, H. and G. Schares (1993). "Experimental chemotherapy of filariasis: comparative evaluation of the efficacy of filaricidal compounds in *Mastomys coucha* infected with *Litomosoides carinii*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *B. pahangi*." Acta Trop **52**(4): 221-66.
- Zahner, H., H. P. Striebel, I. Sanger and H. R. Schütze (1990). "Antifilarial activities of benzazole derivatives. 3. Effects of benzothiazoles on third stage larvae and preadult worms of *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *B. pahangi* in *Mastomys natalensis*." Trop Med Parasitol **41**(4): 407-10.
- Zahner, H. and H. A. Müller (1989). "Characteristics of microfilaricidal activity of DEC, ivermectin and the benzothiazole derivative CGP 20376." Abstract of the 13th Conf. World Ass Adv Vet Parasitol (WAAVP) Berlin: 49.
- Zahner, H., E. J. Soulsby, E. Weidner, I. Sanger and G. Lammler (1987). "Reaginic and homocytotropic IgG antibody response of *Mastomys natalensis* in experimental infections of filarial parasites (*Litomosoides carinii*, *Dipetalonema viteae*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*)." Parasitol Res **73**(3): 271-80.
- Zahner, H. L., G.; Schütze, H. (1980). "The use of *Mastomys natalensis* in experimental parasitology." S. Afr. Cancer Bull. **24**: 278-287.

10 Anhang

10.1 Anhang I

Tab. A1: Ergebnisse der fluorometrischen m-RNA-Messung nach Berechnung des Verdünnungsfaktors in µg/ml

HZ 18												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	100.00	69.11	158.80	104.09	242.07	245.29	21.61	7.72	14.19	11.89	5.85	8.81
D	47.70	33.17	39.20	58.16	33.01	60.81	12.72	8.90	17.40	7.64	6.63	14.62
E	46.35	34.82	40.73	53.33	65.03	78.69	20.93	6.54	8.78	10.62	7.92	17.39
F	45.46	28.20	44.02	37.10	29.07	79.22	34.50	15.24	7.09	10.85	10.87	14.81
G	28.46	25.21	23.97	58.88	31.00	53.10	8.89	4.19	16.75	11.00	12.06	-5.29
H	39.82	30.98	46.01	26.18	41.21	27.42	18.75	16.13	17.68	10.17	8.26	27.62
HZ 35												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	83.28	123.78	103.34	-15.06	52.05	137.83	82.07	64.51	171.35	24.78	54.36	207.93
D	55.22	49.06	34.54	26.40	65.36	31.50	53.99	43.49	17.58	30.08	48.88	55.41
E	50.60	-11.53	31.39	35.20	52.51	35.14	35.27	45.21	80.75	61.17	23.84	82.86
F	48.85	19.03	53.10	19.97	56.11	50.80	44.84	37.88	32.73	24.03	46.63	152.45
G	42.24	38.28	31.53	15.89	72.62	30.91	38.21	31.73	26.15	30.76	35.51	60.73
H	37.68	36.17	155.43	29.61	47.32	41.85	50.14	58.54	21.35	64.95	61.30	128.72
HZ 60												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	127.83	155.68	61.79	106.53	84.50	124.61	53.31	193.85	41.86	103.42	27.47	47.82
D	65.68	47.45	36.13	32.11	40.23	42.49	26.30	111.62	30.17	40.40	15.08	31.38
E	36.84	51.59	46.05	52.56	35.43	47.26	35.94	83.87	32.93	30.97	27.90	32.82
F	53.69	62.05	35.34	38.04	40.80	40.02	28.88	92.17	49.85	31.74	26.27	33.22
G	56.93	46.89	29.60	29.54	37.28	58.88	28.67	59.68	35.39	27.24	16.84	26.28
H	57.04	34.13	39.01	99.85	53.60	51.46	22.09	82.37	35.89	32.68	30.02	32.78
HZ 90												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	14.87	115.82	49.22	73.57	69.73	41.13	148.08	66.76	117.78	50.52	72.69	38.73
D	77.63	53.05	29.69	6.88	24.86	12.09	51.37	56.53	54.48	35.96	68.15	10.59
E	38.02	72.84	30.75	45.87	32.55	7.67	65.42	52.12	80.30	23.04	146.82	15.99
F	47.39	47.29	-17.14	45.13	28.32	3.15	100.28	22.91	65.74	21.37	73.41	24.18
G	43.25	55.31	24.43	28.49	13.92	5.93	56.76	22.84	51.08	55.07	172.53	22.20
H	-25.68	30.42	23.35	46.68	12.68	18.16	38.77	31.35	38.66	45.18	73.51	32.49
HZ 120												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	118.19	210.00	587.29	336.08	236.48	218.81	179.18	198.79	222.22	-14.84	48.95	102.16
D	66.27	57.34	160.78	98.76	25.57	70.88	72.74	44.66	13.91	84.75	37.97	33.03
E	35.40	80.85	94.09	56.49	81.41	96.61	83.48	70.70	92.69	80.89	96.52	22.41
F	108.85	59.92	113.93	78.76	95.27	64.65	646.73	53.01	114.06	87.37	35.26	52.79
G	35.03	44.52	39.59	70.92	65.56	79.06	62.46	81.02	186.17	412.48	34.60	51.03
H	55.63	21.06	159.94	126.19	101.01	104.32	67.51	66.98	117.47	-11.54	30.03	64.06

HZ 230												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	416.07	338.38	235.04	104.45	193.81	173.24	235.67	99.23	74.35	79.17	110.80	56.10
D	143.25	108.60	133.85	79.76	71.80	110.35	64.67	95.59	43.58	30.73	60.58	43.59
E	109.06	74.08	75.45	81.20	70.46	78.27	70.09	52.78	61.44	33.34	82.62	35.92
F	107.94	122.34	113.25	69.23	80.93	90.54	55.46	58.44	34.21	76.75	47.59	46.92
G	12.25	9.53	9.89	8.61	8.34	6.59	7.12	8.04	6.14	6.52	4.75	4.91
H	114.94	100.16	140.95	59.77	84.82	81.16	7.45	44.06	40.94	39.45	42.75	40.89
AB 131												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	140.47	134.84	140.31	70.34	203.56	153.76	79.91	71.84	55.95	31.42	99.80	31.34
D	117.55	121.61	101.67	88.65	160.77	100.42	53.43	87.26	60.54	29.27	52.79	29.98
E	137.86	134.26	83.36	80.45	153.23	144.67	74.47	78.76	60.29	30.91	65.77	43.34
F	114.94	131.69	88.56	89.23	152.98	124.43	65.48	53.99	70.82	36.87	67.74	44.67
G	123.99	70.86	74.84	79.65	130.35	5.58	60.59	63.40	48.10	33.07	62.09	2.55
H	89.74	107.38	111.86	90.60	117.70	141.34	32.50	72.13	59.88	32.58	40.73	53.54
AB 172												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	122.90	147.51	172.86	106.48	138.42	96.84	74.83	87.41	132.13	177.68	71.68	115.33
D	52.48	80.71	76.83	63.50	48.16	111.96	69.76	60.64	94.05	129.78	66.89	116.91
E	60.62	154.94	93.66	75.49	48.88	70.54	91.44	55.47	75.72	94.95	77.79	55.34
F	59.20	81.93	87.90	62.45	91.00	114.72	101.08	79.26	63.37	84.63	83.84	68.93
G	53.95	77.58	67.35	61.49	71.30	-2.70	79.11	38.27	70.88	99.11	77.04	-6.30
H	88.15	93.18	79.29	99.23	64.07	94.17	66.11	62.68	77.39	139.79	72.79	75.56
AB 230												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	120.38	153.73	97.97	76.77	67.34	281.36	119.10	118.91	65.58	123.96	82.69	55.36
D	63.36	78.17	63.21	57.23	88.54	111.32	113.54	64.72	81.25	69.61	53.26	48.91
E	66.43	74.06	84.62	79.17	54.86	105.90	119.45	56.77	66.45	67.17	66.03	59.75
F	63.28	85.44	73.56	48.83	65.71	96.93	126.73	-7.42	69.93	69.78	59.51	53.56
G	76.79	75.67	63.69	75.74	78.61	95.92	98.78	48.29	69.06	61.03	55.45	26.31
H	65.98	76.62	73.59	54.75	67.99	121.65	143.73	76.28	52.95	56.88	67.88	44.84
C 130 230												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	113.58	49.49	65.86	66.90	220.37	205.23	63.78	38.58	93.71	108.04	84.62	105.94
D	81.15	68.78	69.03	35.76	126.33	64.78	48.10	43.73	67.65	90.26	83.50	57.59
E	120.60	81.62	84.91	55.63	176.34	95.04	63.10	45.29	97.09	71.72	84.33	49.36
F	54.73	59.40	74.93	48.71	99.55	86.86	87.91	49.08	124.71	126.25	64.35	53.42
G	86.43	101.45	54.82	47.64	99.24	94.82	57.91	29.60	88.01	85.95	56.09	5.23
H	97.77	67.20	54.34	60.62	164.95	98.27	56.67	57.64	101.94	112.27	61.49	59.95
C HZ 172												
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00
C	181.13	139.97	140.35	118.62	106.03	157.89	86.74	155.66	131.22	120.90	93.17	176.72
D	161.34	114.68	110.96	100.30	99.31	139.57	100.47	102.48	118.36	99.24	74.96	87.90
E	145.03	117.40	132.91	119.55	89.24	120.49	101.22	123.65	128.01	28.60	93.14	93.80
F	131.10	107.08	143.93	97.48	84.46	139.72	94.28	102.54	118.26	130.09	79.91	94.50
G	150.55	109.51	135.62	102.73	100.02	29.24	80.35	87.11	116.36	104.61	74.36	84.04
H	181.06	116.57	152.51	107.79	94.23	125.04	91.72	93.39	122.83	107.25	75.38	96.35

10.2. Anhang II

Tab. A2: Mikrofilarienwerte *B. malayi*-infizierter *M. coucha*. Einzeltierwerte der infizierten, unbehandelten Gruppe PI.

Tag p.i.	Anzahl der Mikrofilarien					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6
18	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
90	3	0	0	0	3	2
120	32	4	16	12	10	11
172	438	51	204	59	97	504
230	1174	165	360	147	97	486

Tab. A3: Mikrofilarienwerte *B. malayi*-infizierter *M. coucha*. Einzeltierwerte der infizierten, unbehandelten Gruppe ZI.

Tag p.i.	Anzahl der Mikrofilarien					
	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6
18	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
90	2	3	0	0	4	0
120	16	10	5	2	1	17
172	92	52	57	7	160	108
230	231	156	118	42	324	268

Tab. A4: Einzelwerte von Mikrofilarien/ 20 µl Blut der Tiere der Gruppen ZCGP, ZFlub, ZBay und ZI (nicht behandelte Kontrollgruppe) über den Versuchszeitraum.

Gruppe ZI												
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84	90
Tier 1	16		26	42	15	50	92	24	37	68	63	65
Tier 2	10		18	24	62	23	52	30	30	149	38	93
Tier 3	5		3	25	4	6	57	26	8	59	29	44
Tier 4	2		6	3	2	12	7	18	38	32	0	17
Tier 5	1		87	24	42	13	160	9	104	42	75	58
Tier 6	17		60	6	9	84	108	24	63	57	85	71
Gruppe ZCGP												
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84	90
Tier 1	9	0	0	0	1	0	1	0	0	14	1	2
Tier 2	94	3	0	0	0	0	0	0	0	22	1	1
Tier 3	27	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	1
Tier 4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Tier 5	19	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Tier 6	23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Gruppe ZFlub												
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84	90
Tier 1	23	82	33	50	18	18	22	5	12	0	6	8
Tier 2	60	85	32	1	31	2	1	2	2	0	1	2
Tier 3	24	55	29	22	4	0	0	0	0	0	0	0
Tier 4	12	7	1	9	0	0	0	0	0	1	0	1
Tier 5	13	8	64	29	2	1	0	0	1	0	0	0
Tier 6	11	2	11	25	6	0	0	0	0	0	0	2
Gruppe ZBay												
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84	90
Tier 1	12	0	1	0	0	0	0	4	1	7	6	5
Tier 2	101	0	0	0	1	0	2	1	0	18	63	70
Tier 3	77	0	0	0	1	2	3	1	9	23	19	23
Tier 4	10	0	0	1	1	0	0	1	1	1	7	9
Tier 5	36	0	0	0	0	0	1	0	0	4	17	17
Tier 6	13	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2

Tab. A5: Einzelwerte von Mikrofilarien/ 20 µl Blut der Tiere der Gruppen PCGP, PFlub, PBay und PI (nicht behandelte Kontrollgruppe) über den Versuchszeitraum.

Gruppe		PI									
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84
Tier 1	376		394	456	438	171	542	530	800		
Tier 2	41		24	31	51	25	108	63	44		
Tier 3	140		76	108	204	23	309	151	60		
Tier 4	34		1	28	59	16	88	5	6		
Tier 5	78		90	49	97	45	134	12	70		
Tier 6	416		301	227	504	49	1616	123	263		
Gruppe		PCGP									
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84
Tier 1	11	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Tier 2	90	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0
Tier 3	73	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Tier 4	65	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Tier 5	39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 6	101	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Gruppe		PFlub									
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84
Tier 1	73	24	82	61	16	3	0	0	1	0	0
Tier 2	80	118	58	61	22	1	0	0	0	0	0
Tier 3	274	85	93	60	0	0	0	1	2	0	0
Tier 4	15	9	12	6		6	1	0	1	1	1
Tier 5	79	80	35	33	13	0	0	0	0	2	0
Tier 6	80	115	52	198	10	5	0	0	0	0	0
Gruppe		PBay									
Tag n. Beh.	0	3	7	14	21	28	35	42	56	70	84
Tier 1	66	2	0	0	0	1	2	3	23	19	102
Tier 2	130	0	0	0	0	0	1	0	8	13	50
Tier 3	14	0	0	0	0	3	0	0	1	1	4
Tier 4	42	0	0	0	0	2	0	0	0	1	23
Tier 5	31	0	0	0	1	1	5	1	14	15	25
Tier 6	174	0	0	0	1	0	9	6	13	20	139

10.3 Anhang III

Tab. A6: Wurmbürde von mit *B. malayi* infizierten, nicht behandelten *M. coucha* am Tag 230 nach der Infektion.

Am Tag der Sektion wurde den Tieren Lunge, Herz, Lymphbahnen- und -knoten und die Hoden entnommen und auf lebende Parasiten untersucht. Die Filarien wurden nach Geschlechtern getrennt und gezählt. Tote, verkapselte Parasiten wurden mittels eines Kompressoriums (s. 3.5) nachgewiesen.

Gruppe	ZI		
Tier 1			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	7	12	19
Lymphknoten	0	0	0
Herz	4	3	7
Hoden	1	2	3
Tier 2			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	1	10	11
Lymphknoten	0	0	0
Herz	1	1	2
Hoden	0	1	1
Tier 3			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	6	4	10
Lymphknoten	0	0	0
Herz	5	3	8
Hoden	0	3	3
Tier 4			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	3	7	10
Lymphknoten	0	0	0
Herz	3	4	7
Hoden	3	6	9
Tier 5			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	6	11	17
Lymphknoten	0	0	0
Herz	4	5	9
Hoden	1	0	1
Tier 6			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	2	4	6
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	2	2
Hoden	0	2	2

Gruppe	PI		
Tier 1			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	11	18	29
Lymphknoten	11	11	4
Herz	1	2	3
Hoden	1	6	7
Tier 2			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	3	16	19
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	3	1	4
Tier 3			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	6	7	13
Lymphknoten	0	0	0
Herz	2	0	2
Hoden	0	0	0
Tier 4			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	6	2	8
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	1	2	3
Tier 5			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	4	2	6
Lymphknoten	0	0	0
Herz	3	7	10
Hoden	0	1	1
Tier 6			
	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	4	11	15
Lymphknoten	0	0	1
Herz	8	10	18
Hoden	0	0	0

Tab. A7: Wurmbürde von mit *B. malayi*-infizierten und am Tag 129 p.i. mit CGP 20376 (25 mg /kg) behandelten *M. coucha* am Tag 230 nach der Infektion.

Am Tag der Sektion wurde den Tieren Lunge, Herz, Lymphbahnen- und knoten und die Hoden entnommen und auf lebende Parasiten untersucht. Die Filarien wurden nach Geschlechtern getrennt und gezählt. Tote, verkapselte Parasiten wurden mittels eines Kompressoriums (s. 3.5) nachgewiesen

Gruppe	ZCGP		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	2Kapseln
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0

Gruppe	PCGP		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0

Tab. A8: Wurmbürde von mit *B. malayi* infizierten, am Tag 129 p.i. mit Flubendazol (50 mg/ kg s.c.) behandelten, *M. coucha* am Tag 230 nach der Infektion.

Am Tag der Sektion wurde den Tieren Lunge, Herz, Lymphbahnen- und knoten und die Hoden entnommen und auf lebende Parasiten untersucht. Die Filarien wurden nach Geschlechtern getrennt und gezählt. Tote, verkapselte Parasiten wurden mittels eines Kompressoriums (s. 3.5) nachgewiesen

Gruppe	ZFlub		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	4Kapseln
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0

Gruppe	PFlub		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	1	1
Hoden	0	1	1
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	2 Kapseln
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	0	0
Lymphknoten	0	0	1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	0	0

Tab. A9: Wurmbürde von mit *B. malayi*-infizierten, am Tag 129 p.i. mit Bay 44-4400 (25 mg/kg „spot-on“) behandelten, *M. coucha* am Tag 230 nach der Infektion.

Am Tag der Sektion wurde den Tiere Lunge, Herz, Lymphbahnen- und knoten und die Hoden entnommen und auf lebende Parasiten untersucht. Die Filarien wurden nach Geschlechtern getrennt und gezählt. Tote, verkapselte Parasiten wurden mittels eines Kompressoriums (s. 3.5) nachgewiesen

Gruppe	ZBay		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	0	3	3
Lymphknoten	0	3	3,2Kapseln
Herz	0	1	1
Hoden	1	1	2
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	9	11	20
Lymphknoten	0	1	1, 1 Kapsel
Herz	0	0	0
Hoden	0	4	4
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	5	11	16
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	0	0
Hoden	2	2	4
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	3	6	9
Lymphknoten	0	0	0
Herz	0	1	1
Hoden	0	0	0
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	2	3	7
Lymphknoten	0	0	0
Herz	3	4	5
Hoden	0	1	1
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	1	4	5
Lymphknoten	0	0	0
Herz	1	0	1
Hoden	0	0	0

Gruppe	PBay		
Tier 1	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	16	31	47
Lymphknoten	0	0	0
Herz	6	8	14
Hoden	1		1
Tier 2	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	10	6	16
Lymphknoten	0	0	0
Herz	3	2	5
Hoden	3	2	5
Tier 3	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	8	7	15
Lymphknoten	0	0	0
Herz	8	3	11
Hoden	1		1
Tier 4	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	17	16	33
Lymphknoten	0	1	1
Herz	0	0	0
Hoden	5	0	5
Tier 5	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	25	16	41
Lymphknoten	0	2	2
Herz	0	0	0
Hoden	2	6	8
Tier 6	Männchen	Weibchen	gesamt
Lunge	15	18	33
Lymphknoten	1	1	2, 1Kapsel
Herz	2	3	5
Hoden	4	3	7

10.4 Anhang IV

Tab. A10: β 2-Mikroglobulin-Angleichungsfaktoren (Probe). Beispielhaft sind die Angleichungsfaktoren für die Gruppe ZI dargestellt.

Tier	Antigen	Tage p.i.						
		Con A	18	35	60	90	120	172
1		1,0	2,723	2,021	4,294	0,662	0,564	1,031
2		3,073	0,772	0,721	1,576	1,148	0,552	0,587
3		0,871	1,128	2,216	0,925	1,208	1,173	0,632
4		1,197		1,720	1,281	1,077	3,592	0,908
5		0,754	1,264	0,833	0,891	1,279	1,140	0,580
6		0,461	0,547	5,284	0,829	1,119	0,996	0,571
	Weibchen							
1		8,733	1,040	3,006	9,312	2,134	3,684	1,088
2		11,509	16,490	0,646	1,222	1,488	2,965	1,488
3		33,885	1,930	24,603	1,492	1,210	2,304	0,619
4		3,357	2,065	8,909	3,741	1,257	2,890	1,131
5		12,461	5,973	3,821	0,920	68,055	5,501	4,214
6		1,040	2,430	5,961	5,228	1,878	7,176	0,480
	Männchen							
1		1,720	4,104	1,327	7,891	1,716	2,838	1,749
2		4,640		1,366	2,023	1,205	3,489	2,172
3		1,300	2,916	5,148	1,866	4,630	3,361	2,368
4		4,661	3,425	2,153	2,357	14,370		5,339
5		2,514		6,481	3,297	1,656	1,796	3,328
6		105,8	6,394	6,567	8,517	2,030	3,216	3,400
	Mikrofilar.							
1		8,290	3,700	1,408	3,949	3,898	2,405	6,257
2		1,130	6,302	2,352	1,161	1,055	2,509	1,174
3		5,013	2,678	7,300		3,908	2,936	6,753
4		6,594	7,909	2,316	1,463	8,188	9,318	1,994
5		2,188	2,326	6,239	0,828	1,160	8,451	2,193
6		7,936	1,954	8,107	9,619	5,037	3,134	1,516
	L3							
1		10,821	4,737	1,636	2,158	0,675	9,935	
2		2,061	9,027	1,100	2,784	0,880	1,345	
3		3,377	23,206	1,524	2,741	1,060	4,302	
4		1,839	3,625	2,319	1,434	0,928	4,631	
5		1,889	1,994	3,179	5,650	0,818	22,177	
6		0,449	11,364	3,199	4,891	1,037	5,229	
	RPMI							
1		1,954	13,484	2,305		1,223	1,312	2,153
2		1,733	7994	5,697	1,762	0,809	2,070	3,428
3		4,440	3,764	20,565	1,532	2,430	2,810	3,206
4		2,061	1,889	13,974	3,297	1,708	7,795	3,829
5		2,035	2,120	2,779	3,193	1,304	1,617	1,133
6		2,296	3,367	19,416	16,261	4,297		1,395

10.5 Anhang V

Statistische Auswertungen:

Tab. A 11: Paarweiser Vergleich der Endwerte nach Quantifizierung der PCR-Amplifikate der infizierten, nicht behandelten Gruppe ZI mit der nicht infizierten Kontrollgruppe ZK

IL2	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p = 0,0007	p < 0,0001	n.s.
	Weibchen	p = 0,0003	n.s.	n.s.
	Männchen	p < 0,0001	p = 0,0096	n.s.
	Mikrofilarien	p < 0,0001	n.s.	p = 0,0023
	L3	p = 0,0348	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	p = 0,04	n.s.
IL4	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p = 0,0286	p = 0,0387.	n.s.
	Weibchen	p = 0,0359	p = 0,0063	n.s.
	Männchen	p < 0,0001	n.s.	n.s.
	Mikrofilarien	p < 0,0001	p = 0,0002	n.s.
	L3	p = 0,0232	p < 0,0001	n.s.
	RPMI	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0058
IL5	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p < 0,0001	p = 0,0057	n.s.
	Weibchen	p < 0,0001	n.s.	n.s.
	Männchen	p = 0,0003	n.s.	p = 0,0010
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	n.s.
	L3	p = 0,0001	p = 0,0007	n.s.
	RPMI	p < 0,0001	n.s.	n.s.
IL10	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p < 0,0001	p = 0,0024	n.s.
	Weibchen	n.s.	p = 0,0018	n.s.
	Männchen	p = 0,0039	p < 0,0001	p = 0,0002
	Mikrofilarien	p = 0,0075	p = 0,0308	n.s.
	L3	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,302
	RPMI	n.s.	p = 0,0051	n.s.
IFN	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0002
	Weibchen	p < 0,0001	p < 0,0001	n.s.
	Männchen	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0036
	Mikrofilarien	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0003
	L3	p = 0,0002	p < 0,0001	n.s.
	RPMI	p < 0,0001	p < 0,0001	n.s.

Tab. A 12: Paarweiser Vergleich der Endwerte nach Quantifizierung der PCR-Amplifikate der infizierten, nicht behandelten Gruppe ZI mit der mit CGP 20376 behandelten Gruppe ZCGP

	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
IL2	Con A	n.s.	p = 0,0238	n.s.
	Weibchen	p < 0,0001	n.s.	n.s.
	Männchen	p < 0,0001	p = 0,0255	n.s.
	Mikrofilarien	p = 0,021	n.s.	p = 0,0284
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	p = 0,0203	n.s.	n.s.
IL4	Con A	n.s.	n.s.	n.s.
	Weibchen	p = 0,0262	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p = 0,0318
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	p = 0,0007
	RPMI	n.s.	n.s.	p = 0,0238
IL5	Con A	n.s.	n.s.	n.s.
	Weibchen	p = 0,0049	p = 0,0143	p = 0,0043
	Männchen	n.s.	p = 0,0052	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	p < 0,0001	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	p < 0,0001
	RPMI	n.s.	p < 0,0001	n.s.
IL10	Con A	n.s.	n.s.	n.s.
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	p = 0,0437	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	n.s.	n.s.
IFN	Con A	p = 0,0143	p = 0,0107	p = 0,0004
	Weibchen	n.s.	p = 0,0017	p < 0,0001
	Männchen	n.s.	p = 0,0078	p < 0,0001
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	p < 0,0001
	L3	n.s.	n.s.	p = 0,0446
	RPMI	p = 0,0392	p < 0,0001	n.s.

Tab. A 13: Paarweiser Vergleich der Endwerte nach Quantifizierung der PCR-Amplifikate der infizierten, nicht behandelten Gruppe ZI mit der mit Flubendazol behandelten Gruppe ZFlub

	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
IL2	Con A	n.s.	p = 0,0011	n.s.
	Weibchen	n.s.	p = 0,0438	n.s.
	Männchen	p = 0,026	p = 0,0030	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	p = 0,0171
	L3	n.s.	n.s.	p = 0,0139.
	RPMI	n.s.	n.s.	n.s.
IL4	Con A	n.s.	p = 0,0202	n.s.
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p = 0,0041
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	n.s.
	L3	n.s.	p = 0,0040	n.s.
	RPMI	p < 0,0001	p = 0,0007	p = 0,0025
IL5	Con A	n.s.	n.s.	p = 0,0584
	Weibchen	n.s.	p = 0,0055	n.s.
	Männchen	p = 0,0276	p = 0,0086	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	p = 0,0026	p = 0,0492
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	p = 0,0011	n.s.
IL10	Con A	n.s.	p = 0,0300	n.s.
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	p = 0,0019	n.s.
IFN	Con A	p = 0,0008	p = 0,035	p = 0,0001
	Weibchen	p = 0,0251	n.s.	p = 0,0013
	Männchen	p < 0,0001	n.s.	p = 0,0002
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	p = 0,0003
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	p = 0,0010	n.s.	n.s.

Tab. A 14: Paarweiser Vergleich der Endwerte nach Quantifizierung der PCR-Amplifikate der infizierten, nicht behandelten Gruppe ZI mit der mit Bay 44-4400 behandelten Gruppe ZBay

	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
IL2	Con A	n.s.	p = 0,0229	n.s.
	Weibchen	n.s.	p = 0,0249	n.s.
	Männchen	n.s.	p = 0,051	n.s.
	Mikrofilarien	p = 0,054	p = 0,019	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	n.s.	n.s.
	IL4	Con A	p = 0,0445	p = 0,0404
Weibchen		p = 0,0031	n.s.	n.s.
Männchen		n.s.	n.s.	p = 0,0030.
Mikrofilarien		n.s.	n.s.	n.s.
L3		p = 0,0096	p = 0,0550	p = 0,0079
RPMI		p = 0,0418	n.s.	p = 0,0052
IL5		Con A	n.s.	n.s.
	Weibchen	n.s.	p = 0,0340	p = 0,0021
	Männchen	p = 0,0459	n.s.	n.s.
	Mikrofilarien	n.s.	p = 0,0243	n.s.
	L3	n.s.	n.s.	p = 0,0310
	RPMI	n.s.	p < 0,0001	p < 0,0001
	IL10	Con A	n.s.	n.s.
Weibchen		n.s.	n.s.	n.s.
Männchen		n.s.	n.s.	n.s.
Mikrofilarien		n.s.	p = 0,0437	n.s.
L3		n.s.	p = 0,0076.	n.s.
RPMI		n.s.	n.s.	n.s.
IFN		Con A	p = 0,0006	p = 0,0007
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p = 0,0476
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	p = 0,0057
	L3	n.s.	n.s.	n.s.
	RPMI	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. A15: Paarweiser Vergleich der Proliferationsergebnisse

PI/ PK	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p= 0,0019	p < 0,0001	p < 0,0001
	Weibchen	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001
	Männchen	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001
	Mikrofilarien	n.s.	p < 0,0001	p < 0,0001
	L3	p = 0,055 (s.s.)	p < 0,0001	p = 0,0009
	RPMI	n.s.	p < 0,0001	p < 0,0001

PI /PCGP	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p < 0,0001	p = 0,0300	p < 0,0001
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p = 0,0033
	Mikrofilarien	n.s.	n.s.	p < 0,0001
	L3			
	RPMI	n.s.	p = 0,0004	p = 0,0002

PI /PFlub	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	p = 0,0193	n.s.	p = 0,0213
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p < 0,0001
	Mikrofilarien	n.s.	p = 0,0150	p < 0,0001
	L3			
	RPMI	p = 0,0035	p < 0,0001	p < 0,0001

PI /PBay	Antigen	Gruppe	Tag	Gruppe/Tag
	Con A	n.s.	n.s.	p = 0,0001
	Weibchen	n.s.	n.s.	n.s.
	Männchen	n.s.	n.s.	p = 0,0009
	Mikrofilarien	n.s.	p = 0,0002	p = 0,0007
	L3			
	RPMI	n.s.	p < 0,0001	p = 0,0132

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. H. Zahner für die Betreuung der Arbeit,
- Dr. Tariq Dafa'alla für die praktische Hilfestellung bei der Anfertigung des Standardplasmids, die immer guten Ratschläge, die vielen Antworten auf die vielen Fragen und die schier endlose Geduld während der gesamten Zeit,
- Dr. Jörg Hirzmann und Dr. Anja Taubert für die Unterstützung bei der Etablierung der PCR und die hilfreichen Diskussionen,
- Dr. Mathias Schäfer für die Einführung in die Welt der fluorometrischen RNA-Messung,
- Brigitte Hofmann und Tina Scheld für die exzellente technische Unterstützung bei der Infektion, Therapie und Sektion der *M. coucha* sowie dem Monitoring der Infektion und der Zellisolation,
- Regina Löwenstein für die Hilfe bei den Photo-Arbeiten,
- Dr. Ulrike Wager für das sehr sorgfältige Korrektur-Lesen trotz des großen Zeitdrucks,
- Nicole Obermeier und Nicola Pantchev für die spaßige Zeit im Zimmer 209, die stets bekundete Anteilnahme und die sehr benötigten Aufheiterungsmaßnahmen,
- allen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre,
- Dr. Klaus Failing und Horst Heiter für die statistische Auswertung der Ergebnisse,
- Gerhard Weigand für die Messung der ³H-Thymidin-Proben
- und nicht zuletzt Rob für seinen nächtelangen Einsatz bei der Erstellung verschiedener Excel-sheet-Vorlagen, seine Ruhe und Geduld zu Zeiten, wo ich diese längst verloren hatte und dafür, daß er es immer verstanden hat, die Dinge wieder in richtige Proportionen zu rücken.
- Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich nie in die Lage gekommen wäre, eine Doktorarbeit überhaupt zu beginnen.