

**DIE FUNKTION VON Juv-p120 IM VERLAUF DER
INFEKTION MIT *LITOMOSOIDES SIGMODONTIS***

FRAUKE ERHORN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Parasitologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer Prof. Dr. H. Zahner

**Die Funktion von Juv-p120 im Verlauf
der Infektion mit *Litomosoides sigmodontis***

Inaugural-Dissertation

Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Frauke Erhorn

Tierärztin aus Hamburg

Gießen 2008

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

Dekan Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. H. Zahner

Prof. Dr. W. Clauss

Tag der Disputation: 10.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	3
2.1.	Die lymphatische Filariose des Menschen	3
2.2.	Immunreaktionen bei der Lymphatischen Filariose	3
2.2.1.	Zelluläre Reaktionen	3
2.2.2.	Zytokinreaktionen bei Filarieninfektionen	10
2.2.3.	Humorale Reaktionen bei Filarieninfektionen	12
2.3.	Die Nagetierfilarie <i>L. sigmodontis</i>	13
2.3.1.	Entwicklung von <i>L. sigmodontis</i>	14
2.4.	Immunreaktionen bei der <i>L. sigmodontis</i>-Infektion	16
2.5.	Immunmodulatorische Exkretorisch/Sekretorische Produkte von Filarien	18
2.6.	Juv-p120	22
3.	Material und Methoden	23
3.1.	Versuchstiere	23
3.1.1.	<i>Sigmodon hispidus</i>	23
3.1.2.	<i>Mastomys coucha</i>	23
3.1.3.	BALB/c-Mäuse	23
3.2.	<i>Litomosoides sigmodontis</i>	24
3.2.1.	Haltung von <i>Litomosoides sigmodontis</i>	24
3.2.2.	Quantitative Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	24
3.2.3.	Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut	25
3.2.4.	Isolierung von <i>L. sigmodontis</i>	26
3.2.5.	Embryogramme	26
3.2.6.	Sterile Gewinnung von präadulten und adulten Parasiten	26
3.2.7.	In vitro-Kultivierung der Parasiten	27
3.2.8.	Reinigung und Ankonzentrierung der Überstände von	

	präadulten und adulten Weibchen	27
3.2.9.	Präparation von <i>L. sigmodontis</i> -Mikrofilarien und Mikrofilarienantigen	28
3.2.10.	Präparation von <i>L. sigmodontis</i> -Dritt (L3)- und Viertlarven (L4)-Antigen	29
3.2.11.	Antigen präadulter Weibchen	29
3.3.	Blutentnahme	30
3.3.1.	Gewinnung von Plasma	30
3.3.2.	Gewinnung von Serum	30
3.4.	Proteinbestimmung nach Bradford	31
3.5.	Kopplung von Phospho-Dimethylaminoethanol (P-DMAE) an ein lysinreiches (Lys)-Peptid	31
3.6.	Behandlungen von Versuchstieren	33
3.6.1.	Immunisierung mit nÜP	33
3.7.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	34
3.7.1.	PAGE zur Auftrennung von Proteinen	34
3.7.2.	PAGE für die Auftrennung von DNA-Proben	35
3.7.3.	Gelfärbungen nach PAGE-Proteinelektrophorese	36
3.7.3.1.	Silberfärbung	36
3.7.3.2.	Coomassiefärbung	37
3.8.	Immunoblotting	37
3.8.1.	Semi-Dry-Blotting	37
3.8.2.	Dot Blotting	38
3.8.3.	Immunfärbungen	38
3.9.	Stimulation von Milzzellen mit Mitogen und <i>in-vitro</i>-Überstand von präadulten Weibchen	39
3.9.1.	Isolierung von Milzzellen	39
3.9.2.	Vitalitätsbestimmung und Zählung der Milzzellen	40
3.9.3.	Stimulation der Zellen für Proliferationsassays	41
3.9.4.	Radioaktive Markierung und Ernten der stimulierten Zellen	42
3.9.5.	Stimulation und Ernte der Milzzellen für RNA-Isolierung	42
3.10.	Gewinnung von Gesamt-RNA aus stimulierten Milzzellen	43
3.10.1.	Konzentrationsbestimmung der RNA	43
3.11.	Reverse Transkription der Gesamt-RNA und von	

	pMus3-RNA mit DNase-Behandlung	44
3.12.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	45
3.12.1.	Überprüfung und Optimierung der pMus3-cDNA-Konzentration	47
3.13.	Quantifizierung der Amplifikate	47
3.13.1.	Auswertung der Gele	47
3.13.2.	Berechnung der Zytokin-Transkripte	47
3.14.	Statistische Auswertung	49
4.	Vorversuche und Versuchsaufbau	50
4.1.	Vorversuche	50
4.2.	Hauptversuche	50
4.2.1.	Immunisierung	50
4.2.2.	Proliferation	51
4.2.3.	Zytokinmessungen	51
5.	Ergebnisse	52
5.1.	Gewinnung von Juv-p120 <i>in vitro</i> aus präadulten weiblichen <i>L. sigmodontis</i> sowie Anreicherung	52
5.2.	Serologische Kreuzreaktionen von Anti-Juv und P-DMAE-Peptid	55
5.3.	Synthese von mit Juv-p120 kreuzreagierenden Molekülen in verschiedenen Stadien von <i>L. sigmodontis</i>	55
5.3.1.	Synthese in L3	56
5.3.2.	Synthese in L4	56
5.3.3.	Synthese in weiblichen adulten <i>L. sigmodontis</i>	57
5.4.	Nachweis von Juv-p120 im Blut <i>L. sigmodontis</i>-infizierter BALB/c-Mäuse	58
5.5.	Nachweis von Antikörpern gegen Juv-p120 in <i>L. sigmodontis</i>-infizierten BALB/c-Mäusen und <i>M. coucha</i>	59
5.6.	Effekte einer Immunisierung von <i>M. coucha</i> und BALB/c-Mäusen mit Juv-p120	61
5.6.1.	Produktion von Antikörpern gegen Juv-p120 nach der Immunisierung	61
5.6.2.	Einfluss der Immunisierung auf die Parasitämie	

	nach Belastungsinfektion	63
5.6.2.1.	Effekte bei <i>M. coucha</i>	63
5.6.2.2.	Effekte bei BALB/c-Mäusen	64
5.6.3.	Einfluss der Immunisierung auf die Anzahl adulter <i>L. sigmodontis</i> nach Belastungsinfektion	64
5.6.3.1.	Effekte bei <i>M. coucha</i>	62
5.6.3.2.	Effekte bei BALB/c-Mäusen	65
5.6.4.	Einfluss der Immunisierung auf intrauterine Entwicklungsstadien von <i>L. sigmodontis</i> nach Belastungsinfektion	66
5.6.4.1.	Effekte bei <i>M. coucha</i>	66
5.6.4.2.	Effekte bei Balb/C-Mäusen	67
5.7.	Stimulierbarkeit von Milzlymphozyten (Proliferationsassay) <i>L. sigmodontis</i>-infizierter BALB/c-Mäuse und <i>M. coucha</i> auf Stimulation mit ConA, Juv-p120 und P-DMAE-Peptid sowie Beeinflussung der ConA-Stimulation durch Juv-p120 und P-DMAE-Peptid	68
5.7.1.	Vorversuche zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen von Juv-p120 und P-DMAE-Peptid	68
5.7.2.	Wurmbürde der Versuchstiere	70
5.7.2.1.	<i>M. coucha</i>	70
5.7.2.2.	BALB/c-Mäuse	71
5.7.3.	Reaktion von Milzlymphozyten auf Stimulation mit ConA und Juv-p120 im Infektionsverlauf	72
5.7.3.1.	<i>M. coucha</i>	72
5.7.3.2.	BALB/c-Mäuse	74
5.7.4.	Einfluss von Juv-p120 und P-DMAE-Peptid auf die ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten	76
5.7.4.1.	Lymphozyten aus <i>M. coucha</i>	76
5.7.4.2.	Lymphozyten aus BALB/c-Mäusen	82
5.8.	Effekte von ConA und Juv-p120 auf die Transkription ausgewählter Zytokingene bei der BALB/c-Maus im Verlauf der <i>L. sigmodontis</i>-Infektion	88
5.8.1.	Vorversuche	88
5.8.2.	IFN- γ -Gentranskription	89

5.8.3.	IL-2-Gentranskription	92
5.8.4.	IL-4-Gentranskription	94
5.8.5.	IL-5-Gentranskription	96
5.8.6.	IL-10-Gentranskription	98
5.8.7.	IL-13-Gentranskription	100
6.	Diskussion	102
7.	Zusammenfassung	112
8.	Summary	115
9.	Literaturverzeichnis	117
10.	Anhang	135

Liste der verwendeten Abkürzungen

<i>A. viteae</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
Anti-Juv	Hyperimmunserum gegen Juv-p120 aus Kaninchen
APS	Ammoniumpersulfat
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
<i>B. pahangi</i>	<i>Brugia pahangi</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cAg	Zirkulierendes Antigen
cDNA	complementary DNA
ConA	Concavalin A
DEC	Diethylcarbamazin
DMAE	Dimethylaminoethanol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	exkretorisch-sekretorisch
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN	Interferon
IgE, IgG, IgM	Immunglobuline der Subklassen E, G und M
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
L3	Drittlarve
L4	Viertlarve
LPS	Lipopolysaccharid
<i>L. sigmodontis</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
<i>M. coucha</i>	<i>Mastomys coucha</i>
min	Minute
MIF	Migrationsinhibitionsfaktor
NO	Stickoxid

nÜP	Ankonzentrierter, Juv-p120-haltiger <i>in-vitro</i> -Überstand präadulter Weibchen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-DMAE	Phospho-DMAE
PEC	Peritonealexsudatzellen
p.i.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
s.c.	subkutan
<i>S. hispidus</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>
Shp	Scheidenprotein
SI	Stimulationsindex
SPN	Serpin
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	Tumor growth factor
TH1/TH2	T-Helferzelle vom Typ 1/2
TPE	Tropische pulmonale Eosinophilie
Tr1	Regulatorische T-Zellen vom Typ 1

1. Einleitung

Die lymphatische Filariose zählt zu den bedeutenden tropischen Parasitosen des Menschen. Einhundertzwanzig Millionen Menschen in mindestens 80 Ländern [tropische Gegenden in Südostasien, Afrika und Mittel- und Südamerika (Michael et al. 1996)] der Welt sind mit den Erregern der lymphatischen Filariose, *Wuchereria bancrofti* und *Brugia*-Arten, infiziert. 1,2 Milliarden Menschen (20% der Weltbevölkerung) sind der alltäglichen Gefahr der Infektion ausgesetzt. 90% der Infektionen werden durch *W. bancrofti* verursacht, die übrigen 10% vor allem durch *Brugia malayi*. Die Übertragung der Erreger erfolgt durch Culiciden (WHO 2002).

Die pathologischen Veränderungen, die mit der Lymphatischen Filariose einhergehen können, sind Folge eines komplexen Zusammenspiels des pathogenetischen Potentials des Parasiten, der Immunreaktion des Wirtes und begleitender bakterieller Superinfektionen. Die Lymphatische Filariose manifestiert sich in einer Vielzahl von Symptomen. Sie reichen von akuten entzündlichen Episoden der Lymphgefäße von Extremitäten und Genitalorganen bis zu chronischen Veränderungen wie Hydrozele und Elephantiasis (WHO 2002). Ein großer Teil der Patienten bleibt klinisch asymptomatisch, obwohl bereits subklinische Veränderungen der Lymphgefäße oder Nieren vorliegen (Freedman et al. 1994; Dissanayake et al. 1995).

Die Eliminierung der Erkrankung wird in einem weltweiten Programm angestrebt. Zum Einen wird versucht, die Übertragung der Erreger durch eine Massenbehandlung von Bewohnern endemischer Gebiete zu kontrollieren, zum Anderen werden die Patienten einem individuellen Behandlungsplan unterworfen. Einmal jährliche Gaben einer Kombination von Ivermectin und Diethylcarbamazin (DEC) oder Albendazol können die Mikrofilariämie um bis zu 99% während des ganzen Jahres reduzieren. Feldstudien haben gezeigt, dass so die Übertragung unterbrochen werden kann (zusammengefasst bei Ottesen et al. 1997).

Die Erforschung der Immunreaktionen bei Filarieninfektionen ist noch nicht abgeschlossen. Eine anerkannte Tatsache ist aber die Anergie der T-Zellen während der mikrofilariämisch-asymptomatischen Phase der Infektion (zusammenfassend bei Maizels et al. 1995). Als eine mögliche Ursache dafür wird eine Immunmodulation durch von Parasiten sezernierte, biologisch aktive Stoffe (ES-Produkte) diskutiert Harnett und Parkhouse (1995). Mit Juv-p120 wurde bei der Nagetierfilarie *L. sigmodontis* ein ES-Produkt entdeckt, bei dem ebenfalls immunmodulatorische Fähigkeiten vermutet werden (Hintz et al. 1998; Taubert und Zahner 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine eventuelle immunmodulatorische Funktion von Juv-p120 bei der *L. sigmodontis*-Infektion von BALB/c-Mäusen und *M. coucha* nachzuweisen. Mit Hilfe von Proliferationsassays sollte eine Beeinflussung der mitogeninduzierten Proliferation von T-Zellen durch Juv-p120 gemessen werden. Außerdem wurden die T-Zellreaktionen der mit *L. sigmodontis* infizierten BALB/c-Maus auf Juv-p120 und das T-Zellmitogen ConA durch die Erfassung von Zytokinprofilen charakterisiert. Die Messung der Zytokinproduktion (IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) erfolgte auf Transkriptionsebene mittels semiquantitativer RT-PCR (Taubert und Zahner 2001). Für eine zusätzliche Information über die Funktion von Juv-p120 im Infektionsverlauf wurden *M. coucha* und BALB/c-Mäuse mit Juv-p120-haltigem-*in-vitro*-Überstand immunisiert. Während der anschließenden Belastungsinfektion wurden die Mikrofilariämie gemessen und die Wurmbürde bestimmt. Über Embryogramme wurde ein Einfluss der Immunisierung auf die Embryogenese untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1. Die lymphatische Filariose des Menschen

Die lymphatische Filariose des Menschen wird durch die Filarienarten *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* und *Brugia timori* verursacht. Diese Nematoden gehören zur Superfamilie Filarioidea. Die viviparen Filarien leben im lymphatischen System des Endwirtes und produzieren während ihrer Lebensdauer von vier bis sechs Jahren Millionen von Erstlarven, die Mikrofilarien, die im Blut des Wirtes zirkulieren. Die Übertragung der obligat heteroxenen Parasiten ist an Stechmücken gebunden. Die Endemiegebiete der lymphatischen Filariose sind Mittel- und Südamerika, Zentralafrika und Südostasien, wo über eine Milliarde Menschen mit dem Risiko der Infektion leben. Ungefähr 118 Millionen Menschen sind infiziert und haben eine Form der Erkrankung. Von diesen sind ca. 74 Millionen mikrofilariämisch und asymptomatisch; sie zeigen in der Regel aber subklinische Veränderungen der Lymphgefäße und/ oder Nierenveränderungen. Weitere 41 Millionen Menschen leiden aufgrund der Filariose an wiederkehrenden Schüben akuter Adenolymphangitis, endend in chronischen Veränderungen wie Elephantiasis oder Hydrozele (z.B. in Skrotum oder Penis); die Mehrzahl dieser Personen ist amikrofilariämisch. Eine kryptische Infektion, die zu Krankheiten wie der Tropischen Eosinophilen Pneumonie (TPE) führen kann, betrifft eine Million Menschen. Weltweit ist die lymphatische Filariose der zweithäufigste Grund von dauerhafter Arbeitsunfähigkeit (WHO 2002).

2.2. Immunreaktionen bei der Lymphatischen Filariose

2.2.1. Zelluläre Reaktionen

Die verschiedenen Krankheitsbilder bei der Lymphatischen Filariose sind begleitet von jeweils unterschiedlichem Immunstatus der Patienten. Eine Klassifizierung der verschiedenen Krankheitsformen nach Maizels et al. (1995) basiert auf Zusammenhängen zwischen Mikrofilariämie und T-Zellreaktivität (s. Abb. 2.1.). In der mikrofilariämisch-asymptomatischen Phase der Infektion zeigt sich bei den Patienten eine deutlich reduzierte oder fehlende T-Zellreaktivität gegenüber Parasitenantigenen.

Lymphozyten symptomatischer Patienten waren dagegen hyperreaktiv, während solche aus kryptischen Infektionen, d.h. Patienten mit einer ganz geringen Anzahl von Mikrofilarien ohne klinische Erkrankung, im Bezug auf die T-Zell-Reaktivität eine gewisse Mittelstellung einnehmen. Anfänglich überraschend und unverstandlich war die Beobachtung, dass Zellen aus Personen in endemischen Gebieten, die weder klinische noch parasitologische Anzeichen einer Filarieninfektion aufweisen, gewöhnlich stark auf Filarienantigene reagieren. Diese Population wird inzwischen als Gruppe der „endemisch Normalen“ bezeichnet. Sie schließt vermutlich die Menschen ein, die exponiert und infiziert waren, aber eine solche Immunität entwickelten, dass die Erstinfektionen eliminiert und Reinfektionen kupiert wurden (zusammenfassend bei Maizels et al. 1995).

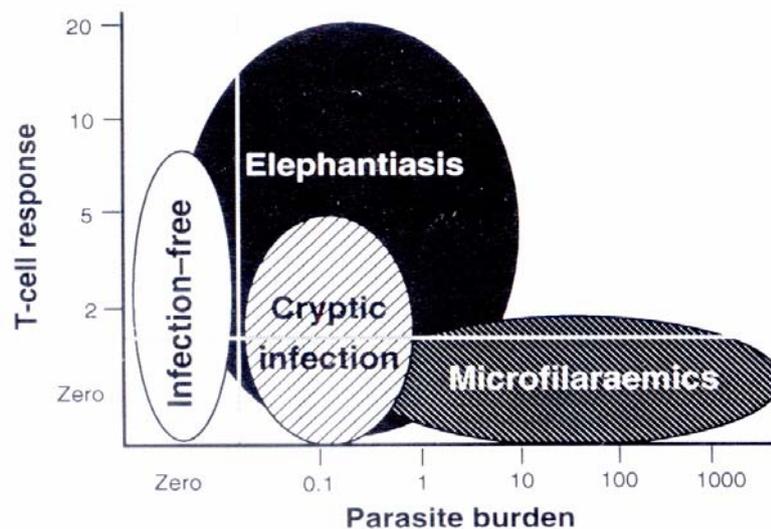


Abb. 2.1.

T-Zellreaktivitäten bei der Lymphatischen Filariose.

Die Höhe der T-Zellreaktivitäten ist dargestellt als Stimulationsindex, die Parasitenbürde als Anzahl von Mikrofilarien/ml Blut. Personen aus endemischen Gebieten ohne klinische oder parasitologische Anzeichen einer Infektion („endemisch Normale“) und Elephantiasispatienten haben starke T-Zellreaktionen, während die T-Zellreaktivität bei mikrofilarämischen Personen stark reduziert ist (aus Maizels 1995)

Ein anderes Verfahren der Patientenklassifizierung bezieht sich auf die Bestimmung von zirkulierendem Antigen (CAg) (Freedman 1998). Der Test auf CAg erwies sich als sensitiver zur Erkennung einer aktiven Infektion als die Bestimmung von Mikrofilarien im Blut (Weil et al. 1987; More und Copeman 1990; Weil et al. 1990; Ramzy et al. 1999).

Da auch mikrofilariämische Patienten subklinische pathologische Veränderungen der Lymphgefäße aufweisen (Freedman et al. 1994; Dissanayake et al. 1995), hielt Freedman eine Klassifizierung allein nach der Pathologie nicht für sinnvoll. Außerdem sind chronisch erkrankte Patienten nicht generell amikrofilariämisch (Michael et al. 1994). Freedman (1998) teilte die Patienten daher nach dem Vorhandensein von zirkulierendem Antigen in drei Gruppen ein (siehe auch Abb. 2.2.):

1. Asymptomatische Infektion, CAg-positiv
2. Klinische Filariose, aktive Infektion, CAg-positiv
3. Klinische Filariose, keine aktive Infektion, CAg-negativ

Die Hyporeaktivität der T-Zellen sowie die spezifischen Zytokinmuster (Produktion von IL-4 und IFN γ) stehen nach diesem Schema in engem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von CAg:

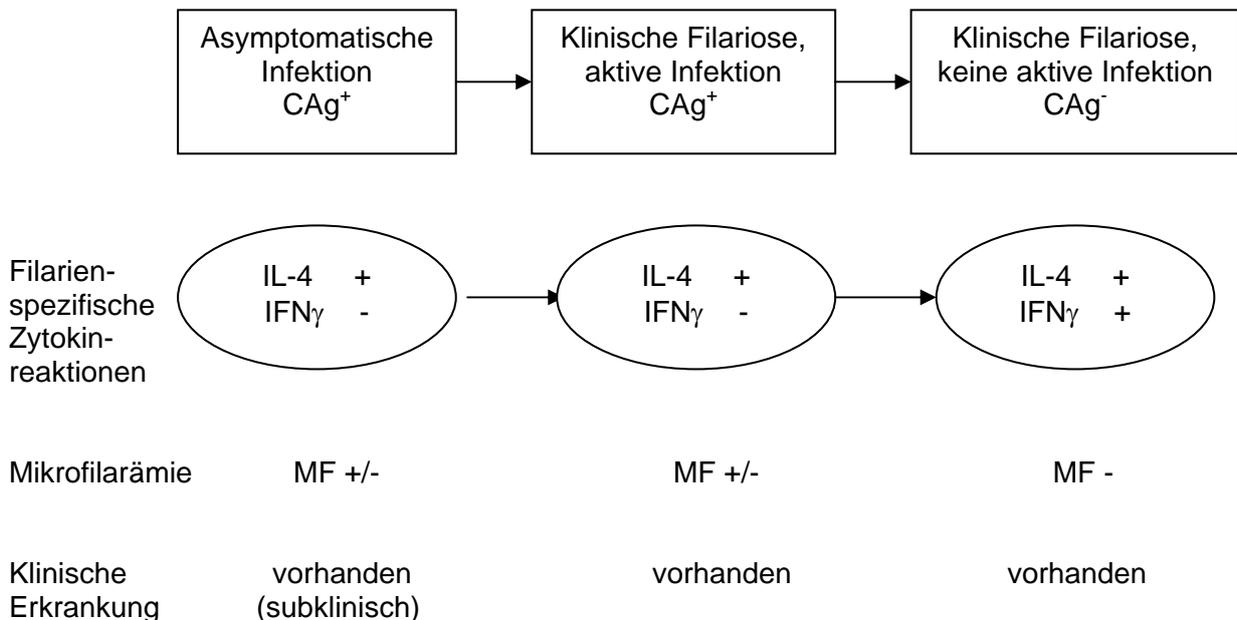


Abb. 2.2. Klassifikation der Patienten nach Infektionsstatus, basierend auf dem Nachweis von zirkulierendem Antigen im Blut (CAg), modifiziert nach Freedman (1998).

Die Mechanismen, die der Modulation der Immunantwort zugrunde liegen könnten, wurden von Nutman und Kumaraswami (2001) wie folgt zusammengefasst:

1. systemische zelluläre Immunreaktionen (Proliferationsreaktionen von Lymphozyten und Zytokinreaktionen)
2. Veränderungen in der Antigenpräsentation
3. Induktion einer T-Zellanergie durch eine hohe Antigenbelastung
4. Apoptose von Immunzellen
5. Andere Mechanismen der Regulation wie z.B. durch regulatorische T-Zellen, neonatale Toleranz und exkretorisch-sekretorische (ES)-Produkte.

1. Zelluläre Immunreaktionen bei Filarieninfektionen (Proliferationsreaktionen und Zytokinreaktionen):

Die deutlich verminderte oder fehlende antigenspezifische Proliferationsreaktion der T-Zellen bei mit Filarien infizierten Patienten in der Patenz (Mikrofilariämie und/oder CAg⁺) sind ein von vielen Autoren beschriebenes Phänomen (Ottesen et al. 1977; Piessens et al. 1980; Piessens et al. 1982; Nutman et al. 1987; King et al. 1992; Yazdanbakhsh et al. 1993a; Mahanty und Nutman 1995; Maizels et al. 1995; Sartono et al. 1995; Mahanty et al. 1996b; Mahanty et al. 1997; Ravichandran et al. 1997; King 2001). Auf einen Zusammenhang zwischen Mikrofilariämie und der antigenspezifischen T-Zellanergie wiesen Studien hin, in denen sich die Proliferationsleistung der peripheren Lymphozyten nach mikrofilarizider Behandlung der Patienten mit Diethylcarbamazin (DEC) (Piessens et al. 1981; Mistry und Subrahmanyam 1985; Sartono et al. 1995) oder DEC in Kombination mit Ivermectin (Lammie et al. 1992) wieder deutlich steigerte. Auch im Hinblick auf zirkulierendes Antigen wurde ein Zusammenhang von Antigenämie und T-Zellanergie beobachtet (Dimock et al. 1996): Bei T-Lymphozyten von Patienten ohne zirkulierendes Antigen konnten wesentlich höhere filarienspezifische Proliferationsraten gemessen werden als bei Patienten, bei denen zirkulierendes Antigen nachweisbar war. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, dass noch mehrere Jahre nach Eliminierung von Mikrofilarien aus dem Blut die T-Zellreaktivität abgeschwächt sein kann (Gopinath et al. 1999; Steel und Ottesen 2001).

In der Regel war bei mikrofilarämischen Patienten die Fähigkeit, auf Mitogene und nicht-parasitenspezifische Antigene zu reagieren, im Gegensatz zur antigenspezifischen Anergie erhalten und lag in gleicher Höhe lag wie bei Patienten mit chronischen Veränderungen (Piessens et al. 1980; Nutman et al. 1987; King et al. 1992; King et al. 1993; Gopinath et al. 1999; Steel und Ottesen 2001).

Weitergehende Untersuchungen zu immunologischen Unterschieden zwischen den verschiedenen Formen der lymphatischen Filariose erstreckten sich auf die Zytokinprofile, die sich nach Stimulation von Lymphozyten aus Patienten *in vitro* ergaben (Nutman et al. 1987; King et al. 1993; Yazdanbakhsh et al. 1993b; Mahanty und Nutman 1995; Maizels et al. 1995; Mahanty et al. 1996b; Ravichandran et al. 1997; Sartono et al. 1997; de Almeida et al. 1998; Gopinath et al. 1999; Sartono et al. 1999). Die gemessenen Zytokinprofile schienen in das Modell der Differenzierung von T-Zellen in verschiedene Subklassen (TH1/TH2-Paradigma; Mosmann et al. 1986; Mosmann und Coffman 1989) zu passen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Zellen von mikrofilarämischen Personen signifikant weniger antigenspezifisch induziertes IFN γ produzieren, welches typisch für TH1-Antworten ist, als Zellen von Patienten mit Elephantiasis (Nutman et al. 1987; King et al. 1993; Mahanty und Nutman 1995; Sartono et al. 1995; Mahanty et al. 1996b; Ravichandran et al. 1997; de Almeida et al. 1998; Gopinath et al. 1999). Die IL-4 oder IL-5-Sekretion, ein Zeichen für eine TH2-Antwort, war dagegen bei Patienten mit aktiver Infektion oder chronischer Erkrankung nicht unterschiedlich ausgeprägt (King et al. 1993; Yazdanbakhsh et al. 1993a; Maizels et al. 1995; Sartono et al. 1995; Ravichandran et al. 1997). Ein Vergleich der Anzahl der Zellen, welche IFN γ oder IL-4 produzierten, zeigte jedoch, dass das Verhältnis von IL-4 zu IFN γ -produzierenden (TH2:TH1) Zellen bei Patienten mit symptomatischer Filariose niedrig (1:4) und bei mikrofilarämischen Patienten hoch (8:1) war (King et al. 1993).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Parasitenstadien verschiedene Zytokinmuster induzieren (Lawrence et al. 1994). So induzierte eine intraperitoneale Applikation von *B. malayi*-Mikrofilarien bei BALB/c-Mäusen hohe IFN γ -Spiegel und nur eine schwache IL-4-Sekretion in Milzzellen. Nach einer intraperitonealen Implantierung von adulten Würmern dagegen zeigte sich ein umgekehrtes Muster.

Über den Einfluß von IL-4 auf unterschiedliche Parasitenstadien existieren in Tiermodellen unterschiedliche Daten. Während Lawrence et al. (1995) beobachteten,

dass die Abwesenheit von IL-4 keinen Einfluß auf das Überleben von *B. malayi*-Adulten, -L3 oder -Mikrofilarien hatte, fanden Devaney et al. (2002), dass IL-4 die Produktion von Mikrofilarien beeinflusst. Hier waren bei *B. pahangi*-infizierten IL-4^{-/-}-BALB/c-Mäusen die Mikrofilarienzahlen gegenüber Wildtyp-BALB/c-Mäusen deutlich erhöht.

In einigen Studien wurde der Einfluß von IL-10 auf die Regulation der antigenspezifischen TH1-Antwort und die zelluläre Hyporesponsivität untersucht (Mahanty und Nutman 1995; Mahanty et al. 1996b; Mahanty et al. 1997; Ravichandran et al. 1997; Osborne und Devaney 1999). So beobachteten z. B. Mahanty et al. (1996) eine negative Korrelation zwischen antigenspezifischer IL-10 Produktion und antigenspezifischer Proliferation bei mikrofilarämischen Patienten. King et al. (1993) fanden eine Steigerung der Proliferation durch Zugabe von Antikörpern gegen IL-10; dieses konnte von Maizels et al. (1995) und Sartono et al. (1995) nicht bestätigt werden. In einer neueren Untersuchung von King et al. (2001) konnte ein Zusammenhang zwischen IL-10-Produktion oder auch TGFβ-Produktion und Hyporesponsivität bzw. IFNγ-Reaktionen ebenfalls nicht bestätigt werden.

2. Veränderungen in der Antigenpräsentation bei Filarieninfektionen:

Eine weitere Theorie stützt sich auf die Beeinflussung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen. Zellen aus Peritonealexsudat (PEC) von mit adulten *B. malayi* (Allen et al. 1996) oder L3 (MacDonald et al. 1998) implantierten Mäusen waren in der Lage, die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen zu hemmen. IL-4 war hierbei im Gegensatz zu IL-10 essentiell für die Induktion der Suppression (MacDonald et al. 1998). Supprimierende PEC konnten ebenfalls durch eine tägliche Injektion von ES-Produkten sowohl von *B. malayi* als auch von *Nippostrongylus brasiliensis* und *Toxocara canis* generiert werden (Allen und MacDonald 1998). Es zeigte sich, dass diese alternativ aktivierten Makrophagen die T-Zellproliferation reversibel über einen direkten Zellkontakt hemmen (Loke et al. 2000b) und eine Differenzierung von T-Zellen in Richtung TH2 (Loke et al. 2000a) induzieren. Ähnliches wurde für ES-62 gezeigt, ein E/S-Produkt von *Acanthocheilonema viteae*. Es induzierte die Reifung von dendritischen Zellen, welche die Entwicklung von TH2-Zellen fördern (Whelan et al. 2000).

Allen und Loke (2001) stellten die Hypothese auf, dass tote oder sterbende Filarien die klassische Aktivierung von Makrophagen und eine spätere proinflammatorische

Reaktion induzieren, sezernierte Produkte von lebenden Filarien dagegen eine TH2-Antwort und alternativ aktivierte Makrophagen, die ihrerseits eine inflammatorische Reaktion supprimieren.

3. Induktion einer immunologischen Anergie durch hohe Parasitenbürde:

Hohe Wurmbürden wurden ebenfalls als eine mögliche Ursache bei der Induktion der spezifischen Anergie der T-Zellen diskutiert. In einer Studie von King et al. (2001) verglich man die T-Zellproliferationsraten und Zytokinreaktionen von Bewohnern zweier Dörfer mit niedriger bzw. sehr hoher Übertragungsintensität. Bewohner des Dorfes mit hoher Übertragungsintensität zeigten eine wesentlich geringere spezifische und unspezifische T-Zellproliferation und niedrigere antigenspezifische IFN γ -Synthese, dagegen aber eine höhere IL-5-Produktion als die Bewohner des Dorfes mit niedriger Übertragungsintensität.

4. Filarieninduzierte Apoptose von Immunzellen:

Ein weiteres Phänomen, das mitverantwortlich für den proliferativen Defekt der T-Zellen sein könnte, ist die Induktion von Apoptose von Immunzellen durch Mikrofilarien. Jenson et al. (2002) stellten fest, dass antigenstimulierte CD4⁺ T-Zellen von mit *B. pahangi*-Mikrofilarien infizierten Mäusen ein hohes Ausmaß an Stickoxid(NO)-abhängiger Apoptose zeigten, da eine Blockierung der induzierbaren Stickoxidsynthese die Zellen vor Apoptose schützte. Das Stickoxid wurde hierbei von den Milzlymphozyten selbst produziert. Im Gegensatz dazu konnte bei Milzlymphozyten von Tieren, die mit L3 infiziert wurden, keine Apoptose nach antigenem Stimulus erzeugt werden. Die Autoren vermuteten, dass die Zellen indirekt ihre eigene Apoptose triggern, indem sie hohe Mengen an IFN γ produzieren. Dieses resultiert in der Induktion von großen Mengen an NO und der darauf folgenden Eliminierung der Effektorzellen.

5. Andere Mechanismen der Immunoregulation bei Filarieninfektionen:

Regulatorische T-Zellen könnten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Modulation der T-Zellreaktionen spielen. So genannte „T regulatory type 1 (Tr1)“-Zellen, eine CD4⁺-Subpopulation mit schwachen Proliferationsreaktionen und hoher IL-10-Produktion, werden durch wiederholte Stimulierung in Anwesenheit von IL-10 erzeugt (Groux et al. 1997). Interessanterweise konnte die gleich Arbeitsgruppe in

einem Mausmodell für Typ 1-Überempfindlichkeitsreaktionen eine klassische TH2-Antwort durch die Sekretion von IL-10 inhibieren (Cottrez et al. 2000).

Satoguina et al. (2002) beschrieben erstmals regulatorische T-Zellen bei Filarieninfektionen im Zusammenhang mit Immunsuppression bei chronischer Onchozerkose.

Für eine intrauterin induzierte spezifische Toleranz als Ursache einer weitgehenden Anergie gegenüber Filarienantigenen spricht die Beobachtung, dass Kinder mikrofilarämischer Mütter eine deutliche spezifische zelluläre Hyporesponsivität zeigten (Steel et al. 1994).

Die Bedeutung von immunmodulatorischen ES-Produkten wird im Kapitel 2.5. besprochen.

2.2.2. Zytokinreaktionen bei Filarieninfektionen

IFN γ wird von TH1-Zellen produziert (Mosmann und Coffman 1989; Romagnani 1999; Romagnani 2000) und ist das wichtigste Zytokin für die Makrophagenaktivierung vgl. (Romagnani 1999). Außerdem hemmt IFN γ die Entwicklung von TH2-Zellen vgl. (Seder und Paul 1994; Mosman 1995; Janeway et al. 2002). Bei Filarieninfektionen konnte gezeigt werden, dass die Synthese von IFN γ -mRNA und die Anzahl der IFN γ -produzierenden Zellen bei mikrofilarämischen Personen im Gegensatz zu Personen mit chronischer Pathologie stark verringert war (King et al. 1993; Maizels et al. 1995; Mahanty et al. 1996a; Mahanty et al. 1997; Ravichandran et al. 1997). Offensichtlich kommt IFN γ eine Rolle bei der Kontrolle der Mikrofilariämie zu, denn bei Infektionen von IFN γ -KO-Mäusen mit *L. sigmodontis* (Saeftel et al. 2001) kam es zu einer erhöhten und bei *B. malayi* (Babu et al. 2000) zu einer verlängerten Mikrofilariämie.

Nach dem Schema von Mosman (1995) und Romagnani (1999) gehört IL-2 zu den TH1-Zytokinen. Außerdem wird IL-2 von TH0-Zellen produziert, den Vorläuferstadien von sowohl TH1- als auch TH2-Zellen (Mosman und Moore 1991; Janeway et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich nicht mit den Arbeiten anderer Autoren beim gleichen Infektionsmodell, allerdings wurde bei diesen Filarienantigen und kein ES-Antigen verwendet. Während Nurmi (1998) und Taubert und Zahner (2001) vor allem in der frühen Präpatenz eine gesteigerte IL-2-Produktion nachweisen konnten, maß Marechal et al. (1997) in der Präpatenz kein IL-2. Diese Autoren wiesen aber eine gesteigerte IL-2-Produktion in der Patenz nach. Bei

humanen Filarieninfektionen konnte bei mikrofilariämischen Patienten deutlich niedrigere Spiegel an IL-2 gemessen werden als bei Patienten mit chronischer Pathologie (el-Sharkawy et al. 2001). Ravichandran et al. (1997) beschrieben bei mikrofilariämischen Patienten eine TH2-Antwort mit geringer oder fehlender Transkription von IL-2 und IFN γ . Das Fehlen von Mikrofilarien und/oder cAg war dagegen korreliert mit einer TH1-Antwort mit hohen IL-2 und IFN γ -Spiegeln (Dimock et al. 1996).

Eine IL-4-Expression in der Frühphase einer Infektion wird verantwortlich gemacht für die Entwicklung einer TH2-Antwort vgl. (Romagnani 2000). Das früh auftretende IL-4 kann dabei aus naiven CD4-T-Zellen selber stammen (Paul und Seder 1994) oder aus einer spezialisierten Untergruppe der CD4-Zellen, den NK1.1⁺-T-Zellen (Bendelac et al. 1996; Balmer und Devaney 2002), die nach ihrer Aktivierung hohe Mengen an IL-4 sezernieren. Durch von aktivierten TH2-Zellen sezerniertes IL-4 wird weiterhin in B-Zellen der Klassenwechsel zu IgE induziert (Bacharier und Geha 2000). Der in dieser Arbeit gemessene Anstieg der IL-4-Transkription in der frühen Präpatenz stimmt mit den Beobachtungen von Nurmi (1998) und Al-Qaoud et al. (1997) überein. Al-Qaoud et al. (1997) konnten ebenfalls eine gesteigerte IL-5-Sekretion in der Präpatenz dokumentieren. Marechal et al. (1997) wiesen dagegen einen Anstieg von IL-4 erst in der Patenz nach, während IL-5 auch schon in der Präpatenz produziert wurde. IL-4 scheint besonders für die Kontrolle der Mikrofilariämie während der Infektion eine Rolle zu spielen. So war die Mikrofilariämie sowohl bei Infektionen von IL-4-KO-BALB/c-Mäusen mit *B. malayi* (Babu et al. 2000; Devaney et al. 2002) als auch mit *L. sigmodontis* (Volkman et al. 2001; Volkman et al. 2003) deutlich erhöht und verlängert, die adulten Würmer blieben unbeeinflusst. IL-5 hatte zusätzlich noch eine Wirkung auf adulte Filarien bei der Kapselbildung: IL-5-KO-BALB/c-Mäuse entwickelten eine drastisch erhöhte Wurmbürde bei chronischen Infektionen mit verringerter Kapselbildung (Volkman et al. 2003), während bei Mäusen, die IL-5 überexprimierten, die Rückfindungsrate deutlich reduziert war (Martin et al. 2000).

Das Zytokin IL-10 wird von den meisten Autoren zur Gruppe der TH2-Zytokine gezählt (vgl. Fiorentino et al. 1989; Romagnani 1999; Romagnani 2000; Janeway et al. 2002). Ihm wird ein negativ regulierender Einfluß auf die Proliferation von TH1-Zellen zugesprochen (Fiorentino et al. 1989; Sher et al. 1991; Mahanty et al. 1996b; Mosman und Sad 1996; Mahanty et al. 1997; Ravichandran et al. 1997), aber auch

auf andere Zellen wie B-Zellen, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, Mastzellen, Granulozyten, dendritische Zellen, Keratinozyten und Endothelzellen (Moore et al. 2001). Eine wichtige Rolle spielt IL-10 auch bei der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, die wiederum selbst in großen Mengen IL-10 produzieren (Groux et al. 1997; Cottrez et al. 2000; Levings et al. 2001; Satoguina et al. 2002). Diese Zellen können antigenspezifische Immunreaktionen supprimieren. Einige Studien zeigten die direkte Hemmung der Sekretion von IFN γ (D'Andrea et al. 1992) und IL-2 (Taga und Tosato 1992; de Waal Malefyt et al. 1993) durch IL-10. Die Bedeutung von IL-10 bei Filarieninfektionen wird kontrovers diskutiert. Mahanty et al. (1996b) konnten eine negative Korrelation zwischen antigenspezifischer IL-10 Produktion und antigenspezifischer Proliferation bei mikrofilarämischen Patienten nachweisen. King et al. (1993) dokumentierte eine Steigerung der Proliferation durch Antikörper gegen IL-10; dieses konnte von Maizels et al. (1995) und Sartono et al. (1995) nicht bestätigt werden. In einer neueren Untersuchung von King et al. (2001) konnte ein Zusammenhang zwischen IL-10-Produktion und Hyporesponsivität bzw. IFN γ -Produktion nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Steigerung der IL-10-Produktion durch ES-Produkte wurde ebenfalls von Hartmann et al. (1997) bei *A. viteae* beschrieben. Nurmi (1998) konnte hohe IL-10 Werte nach Stimulation mit Filarienantigenen in der frühen Präpatenz nachweisen. Bei Taubert und Zahner (2001) dagegen trat eine maximale IL-10-Produktion in der späten Präpatenz zusammen mit einem kompletten Einbruch aller anderen Zytokine auf.

IL-13 wird von Romagnani (1999, 2000) zu den TH2-Zytokinen gezählt. Es ist wie IL-4 verantwortlich für die Induktion der IgE-Synthese in B-Zellen und spielt vor allem im Hinblick auf allergische Erkrankungen eine wichtige Rolle (Bacharier und Geha 2000). Von Nair et al. (2003) wird vermutet, dass IL-13 zusammen mit IL-4 bei Filarieninfektionen eine Funktion bei Entstehung von alternativ aktivierten Makrophagen zukommt.

2.2.3. Humorale Reaktionen bei Filarieninfektionen

Bei den verschiedenen Erkrankungsformen der lymphatischen Filariose herrschen unterschiedliche Subklassen von Antikörpern vor (Hussain et al. 1987). Während mikrofilarämische Patienten vorwiegend spezifische IgG4-Antikörper (Ottesen et al. 1985; Kwan-Lim et al. 1990; Haarbrink et al. 1999) produzierten und wenig spezifisches IgE (Terhell et al. 2002), lagen bei Patienten mit klinisch manifester

Filariose vor allem IgG1, IgG2 und IgG3 und ein hoher IgE-Spiegel vor (Kurniawan et al. 1993; Maizels et al. 1995; Zhang et al. 1999). Bei Patienten mit zirkulierendem Antigen war ebenfalls ein erhöhter IgG4-Antikörperspiegel messbar, während bei mikrofilarämischen Patienten niedrige Spiegel an IgG2-Antikörper gefunden wurden (Dimock et al. 1996). Nach Behandlung von infizierten Patienten mit DEC sank die spezifische IgG4-Produktion deutlich (Wamae et al. 1992; Atmadja et al. 1995), korreliert mit dem Absinken der Mikrofilarien im Blut (Wamae et al. 1992). Nach Maizels et al. (1995) könnte IgG3 an der Entstehung von obstruktiven Lymphgefäßveränderungen beteiligt sein. Diese Vermutung stützen die Ergebnisse von Nielsen et al. (2002); hier wurden bei Erkrankten mit fortgeschrittener Elephantiasis hohe IgG3-Spiegel gemessen.

Einen Hinweis auf die Regulation der filarienspezifischen Antikörperproduktion durch Zytokine zeigten King et al. (1990). Als genereller Zusammenhang ist bekannt, dass die Produktion von IgE (Janeway und Travers 2002) und IgG4 beim Menschen durch IL-4 vermittelt wird (Gascan et al. 1991). Dagegen wird die Produktion von IgE durch IFN γ gehemmt (Janeway und Travers 2002). King et al. (1990) fanden heraus, dass die filarienspezifische IgE-Produktion durch Antiserum gegen IL-4 komplett geblockt wird und dass sie durch Zugabe IFN γ nahezu vollständig unterbunden werden kann.

2.3. Die Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis*

L. sigmodontis wird oft als Modellparasit für die lymphatische Filariose des Menschen verwendet (Hoffmann et al. 2000). *L. sigmodontis* ist ein in den südlichen USA vorkommender Parasit der Baumwollratte *Sigmodon hispidus*, die den natürlichen Endwirt für diese Filarienart darstellt. Die Infektion der Baumwollratte mit *L. sigmodontis* wurde seit langem intensiv beforscht (Chandler 1931; Culbertson und Rose 1944; Bertram et al. 1946; Scott 1946; Williams 1948; Wenk und Heimburger 1967; Bayer und Wenk 1988). Unter Laborbedingungen gelang die Übertragung von *L. sigmodontis* auf einige andere Tierarten wie z. B. Gerbils (Ah und Burke 1976), Hamster und Mäuse (Wenk und Heimburger 1967), Albinoratten (Bagai und Subrahmanyam 1968) und *Mastomys coucha* (Lämmler et al. 1968; Pringle und King 1968).

Ein neu etabliertes Infektionsmodell stellt die Infektion von BALB/c-Mäusen eines bestimmten Haplotyps mit *L. sigmodontis* dar (Petit et al. 1992). Dieses

Modell erlaubt die vollständige Entwicklung von der infektiösen Drittlarve bis zum Freisetzen von Mikrofilarien in der immunologisch gut charakterisierten BALB/c-Maus.

2.3.1. Entwicklung von *L. sigmodontis*

Der Entwicklungszyklus von *L. sigmodontis* in der Baumwollratte wurde zusammenfassend von Bertram (1966) geschildert und ist in Abb. 2.3. dargestellt. Die adulten Stadien von *L. sigmodontis* befinden sich in der Pleurahöhle ihrer Endwirte. Die weiblichen Parasiten sind vivipar und setzen bescheidete Erstlarven, die sog. Mikrofilarien frei. Der Zwischenwirt für *L. sigmodontis* ist die blutsaugende Milbe *Ornithonyssus bacoti*. Von ihr werden die Mikrofilarien mit der Blutmahlzeit aufgenommen. Sie entwickeln sich in der Milbe über zwei Häutungen innerhalb von 10-13 Tagen zu infektiösen Drittlarven. Diese werden bei einer weiteren Blutmahlzeit wieder auf den Endwirt übertragen, wo sie über das Lymphsystem und die rechte Herzkammer in die Lunge und anschließend in die Pleurahöhle gelangen (Wenk 1967). Nach 8-10 Tagen p. i. findet die erste Häutung zur L4 statt, nach 24 Tagen p. i. häuten sich die L4 zu präadulten Parasiten, die dann zu Adulten heranreifen (Bertram 1966).

Die Präpatenz bei der Infektion von Baumwollratten und *M. coucha* mit *L. sigmodontis* dauert 50 bis 52 Tage (Bertram 1966; Lämmler et al. 1968). Nach der maximalen Mikrofilariämie um Tag 120 bis 150 p. i. sinkt die Mikrofilarienzahl wieder ab bis zum Beginn der Postpatenz 240 bis 300 Tage p. i. (Lämmler et al. 1968). Bei der Infektion von BALB/c-Mäusen dauert die Präpatenz ebenfalls etwa 50 Tage (Nurmi 1998; Taubert und Zahner 2001). Die Mikrofilariämie ist deutlich niedriger und kürzer als bei *M. coucha*; die Patenz endet an Tag 100-120 p.i. (Al-Qaoud et al. 1997; Nurmi 1998; Taubert und Zahner 2001). Am Tag 200 p. i. waren die Parasiten in der BALB/c-Maus komplett eliminiert (Nurmi 1998).

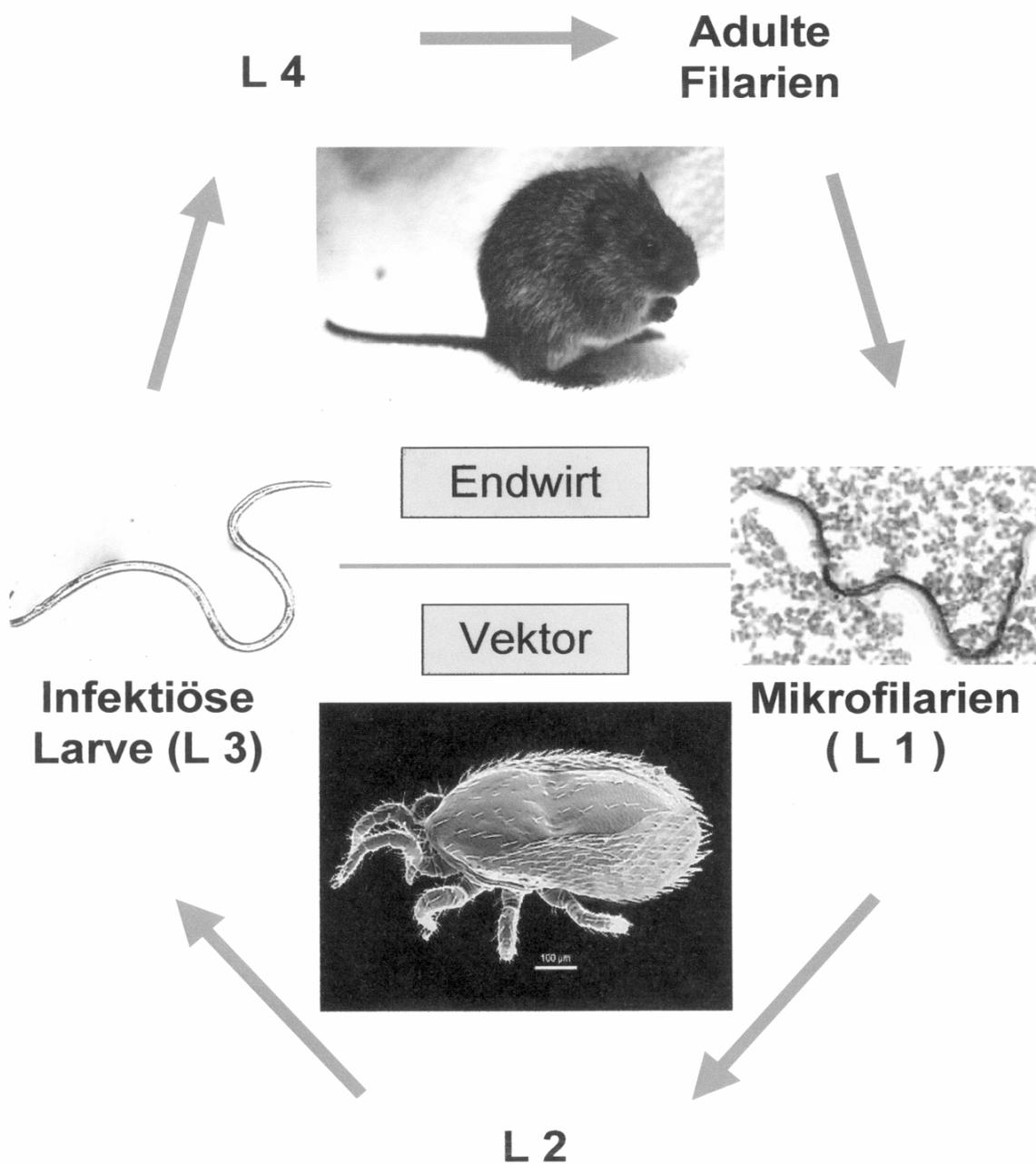


Abb. 2.3.

Entwicklungszyklus der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis*

Die adulten Würmer der Nagetierfilarie *L. sigmodontis* befinden sich in der Pleurahöhle ihres Wirtes, z.B. der Baumwollratte *S. hispidus*. Die viviparen Weibchen setzen bescheidete Erstlarven, die sog. Mikrofilarien frei. Die Mikrofilarien werden vom Vektor, der Milbe *Ornithonyssus bacoti*, mit der Blutmahlzeit aufgenommen. In der Milbe entstehen daraus über 2 Häutungen die infektiösen Drittlarven, die wieder auf den Endwirt übertragen werden. Nach zwei weiteren Häutungen entwickeln sich aus ihnen in der Pleurahöhle wieder adulte Filarien.

2.4. Immunreaktionen bei der *L. sigmodontis*-Infektion

Die antigenspezifische T-Zellenergie ist auch bei der Infektion mit *L. sigmodontis* ein wiederholt beschriebenes Phänomen. Milz- und Lymphknotenzellen infizierter *M. coucha* waren in der Präpatenz und in der Patenz nicht in der Lage, auf Filarienantigenen zu proliferieren (Mistry et al. 1985; Mistry und Subrahmanyam 1986). Schönfeld und Zahner (2000) fanden gleichfalls bei *M. coucha* herabgesetzte antigenspezifische Proliferationsraten in der Präpatenz und Patenz, die mit absinkender Mikrofilariämie wieder kontinuierlich stärker wurden. Eine antigenspezifische Hyporesponsivität trat ebenfalls bei der Infektion von BALB/c-Mäusen in der Präpatenz (Marechal et al. 1997) bzw. Patenz (Le Goff et al. 2000b) auf. Immunisierungen von *M. coucha* mit intrauterinen Entwicklungsstadien und Mikrofilarien führten zu einer Erhöhung der Proliferationsreaktionen in der Präpatenz (Schönfeld und Zahner 2000), ähnlich wie bei Immunisierungsversuchen von BALB/c-Mäusen mit bestrahlten L3, wodurch die Proliferationsleistung in den darauf folgenden zwei Tagen deutlich gesteigert wurde (Le Goff et al. 2000b). In beiden Studien kam es jedoch wieder zu einem Abfall der Proliferationsraten in der Patenz. In einem Teil der Studien zeigte sich, dass die zelluläre Hyporesponsivität sich auch unspezifisch auswirkt. Bei infizierten *M. coucha* kam es in der Präpatenz und Patenz auch nach Stimulation mit ConA und LPS (Schönfeld und Zahner 2000) oder ConA und PHA (Mistry et al. 1985) zu herabgesetzten Proliferationsreaktionen. Zahner et al. (1989) konnten eine unspezifische Immunsuppression *in vivo* nachweisen, indem sie mit *L. sigmodontis* infizierte *M. coucha* gegen Schaferythrozyten sensibilisierten und den immunsuppressiven Effekt der Infektion als Einfluss auf die Immunreaktion gegen Erythrozyten vom verzögerten Typ maßen.

Al-Qaoud et al. (1997) untersuchten die Rolle von CD4⁺ T-Zellen an der zellulären Immunantwort während der *L. sigmodontis*-Infektion. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen zeigte einen entscheidenden Einfluß dieser Zellen in der Frühphase der Infektion. Die Behandlung von BALB/c-Mäusen mit CD4-Antikörpern führte zu einer deutlichen Erhöhung der Wurmbürde und der Mikrofilariämie.

Über die filarienspezifische Produktion von Zytokinen bei der BALB/c-Maus kamen verschiedene Studien zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen (Al-Qaoud et al. 1997; Marechal et al. 1997; Nurmi 1998; Taubert und Zahner 2001). Al-Qaoud et al. (1997) fanden in der Präpatenz bei infizierten Tieren hohe Spiegel der

TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 und geringe Mengen an dem TH1-Zytokin IFN γ , bei CD4⁺-depletierten Tieren herrschten umgekehrte Verhältnisse. Ebenfalls eine TH2-Antwort, hier allerdings in der Patenz, zeigte sich in einer Untersuchung von Marechal et al. (1997). In der Patenz stiegen zwar auch die TH1-Zytokine IFN γ und IL-2 an, blieben aber deutlich unter dem Level der TH2-Zytokine. Im Gegensatz dazu konnte Nurmi (1998) während der Präpatenz vorwiegend die TH1-Zytokine IFN γ und IL-2 und nur geringe Mengen an IL-4 und kein IL-5 nachweisen. In der Arbeit von Taubert und Zahner (2001) zeigte sich ebenfalls keine deutliche Polarisierung in Richtung TH1 oder TH2. Besonders auffallend war hier ein komplettes Absinken in der Synthese sämtlicher Zytokine außer IL-10 am Ende der Präpatenz, unmittelbar vor dem ersten Auftreten von Mikrofilarien in Blut.

Die Bedeutung einzelner Zytokine wurde auch in verschiedenen Knockout (KO)-Modellen untersucht (Le Goff et al. 2000a; SaefteI et al. 2001; Volkmann et al. 2001; Volkmann et al. 2003). So entwickelten z. B. IFN γ -KO-Mäuse eine höhere Wurmbürde und Mikrofilariämie als Wildtyp-BALB/c-Mäuse (SaefteI et al. 2001).

In IL-4-KO-Mäusen fand man eine bis zu 100-fach erhöhte und deutlich verlängerte Mikrofilariämie, das Überleben von Adulten wurde jedoch nicht beeinflusst (Volkmann et al. 2001). In IL-5-KO-Mäusen untersuchten Volkmann et al. (2003) die Bedeutung von IL-5. IL-5 hatte sowohl einen Einfluß auf die Mikrofilariämie, die in IL-5-KO-Mäusen bis zu 160-fach erhöht war, als auch auf die Zahl von adulten Würmern: es persistierten bis zu 200-mal mehr Adulte während einer chronischen Infektion. Damit im Prinzip übereinstimmend entwickelten sich in Mäusen, die IL-5 überexprimieren, signifikant weniger *L. sigmodontis* als im Wildtyp (Martin et al. 2000).

Die Anwesenheit von präadulten Weibchen scheint bei der Empfänglichkeit des Wirtes gegenüber Mikrofilarien eine wichtige Rolle zu spielen. Hoffmann et al. (2001) injizierten verschiedenen resistenten Mausstämmen Mikrofilarien und zeigten, dass schon ein in die Bauchhöhle implantiertes präadultes Weibchen vormals resistente Stämme nun empfänglich gegenüber Mikrofilarien macht. Dieser Effekt war abhängig von IL-10. Als Ursache für diesen Zusammenbruch der Resistenz gegenüber Mikrofilarien durch nur ein präadultes Weibchen vermuteten die Autoren eine Beeinflussung des Wirtes durch ES-Produkte von diesem Weibchen.

Bezüglich der Antikörperproduktion während der *L. sigmodontis*-Infektion existieren nur zum Teil einheitliche Daten. In der Patenz wiesen Marechal et al. (1997) bei BALB/c-Mäusen erhöhte Spiegel von filarienspezifischen IgM-, IgA-, IgG1-, IgG2a-, IgG2b- und IgG3- Antikörpern nach. Al-Qaoud et al. (1997) fanden bei BALB/c-Mäusen in der Präpatenz erhöhte IgE-Werte, während in der Untersuchung von Nurmi (1998) der Nachweis von spezifischem IgE nicht gelang. Volkmann et al. (2001) schlossen einen Einfluß von IgE auf die Mikrofilariämie aus, da bei B-Zell-KO-Mäusen keine Veränderungen in der Mikrofilariämie auftraten. Bei *M. coucha* kam es dagegen zu einem steilen Anstieg an spezifischem homozytotropen IgE in der Präpatenz mit maximalem Spiegel in der frühen Patenz (Zahner et al. 1987).

Außer bei Mäusen wurde die Verteilung der IgG-Subklassen nur bei *M. coucha* weitergehend untersucht, so charakterisierte Schares (1992) IgG1-, IgG2-, IgM- und IgA-Antikörper bei infizierten *M. coucha*. Außerdem führte die Infektion mit *L. sigmodontis* bei *M. coucha* auch zu einer Suppression der Produktion unspezifischer Antikörper. Mit Schaferythrozyten immunisierte *M. coucha* mit patenten Infektionen entwickelten niedrigere Titer lytischer und agglutinierender Antikörper als nicht infizierte Tiere (Zahner et al. 1989).

2.5. Immunmodulatorische exkretorisch/sekretorische Produkte von Filarien

Die Fähigkeit von Filarien in einem immunkompetenten Wirt zu persistieren beruht offensichtlich darauf, dass sie Mechanismen entwickelt haben, die Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen oder zu modulieren. Filarien produzieren eine Vielzahl von exkretorisch-sekretorischen (ES) Produkten, von denen viele biologisch aktiv sind und daher für das Überleben des Parasiten eine wichtige Rolle spielen [zusammengefasst bei (Harnett und Parkhouse 1995)]. Bei vielen dieser ES-Produkte sind immunmodulatorische Fähigkeiten nachgewiesen worden (Lal et al. 1990; Harnett und Harnett 1993; Yamaoka et al. 1994; Allen und MacDonald 1998; Zang et al. 2000; Falcone et al. 2001; Manoury et al. 2001; Schonemeyer et al. 2001; Pfaff et al. 2002). Einige dieser immunmodulatorischen ES-Produkte tragen Phosphorylcholin (PC)-Epitope (Maizels et al. 1987; Lal et al. 1990; Harnett und Harnett 1993; Harnett et al. 1993).

ES-62 ist ein immunmodulatorisches, PC-haltiges ES-Produkt der Nagetierfilarie *Acanthocheilonema viteae*, das bereits gut untersucht wurde (Harnett et al. 1989b; Harnett et al. 1990; Harnett et al. 1993; Harnett et al. 1999). ES-62 wird von L4 und adulten Filarien produziert (Harnett et al. 1989b; Stepek et al. 2002). Sein immunmodulatorischer Effekt ist PC-abhängig, er konnte durch PC-modifiziertes BSA (PC-BSA) oder PC alleine simuliert werden (Harnett und Harnett 1993; Deehan et al. 1998; Harnett et al. 1999; Harnett und Harnett 2001).

ES-62 resp. PC-modifizierte Moleküle modulieren die Immunantwort des Wirtes auf verschiedene Weise:

Wöchentlich injiziertes PC-BSA reduzierte bei BALB/c-Mäusen die Aktivierung von B-Zellen über den Antigenrezeptor *in vivo* (Harnett et al. 1999). ES-62 hemmt zusätzlich die Proliferation von murinen B-Zellen aus der Milz, einhergehend mit einer Bindung an den B-Zellrezeptor (Harnett und Harnett 1993) und greift in die intrazelluläre Signaltransduktion ein, so z. B. auf einige Tyrosinkinasen und eine Form der mitogeninduzierten Proteinkinase (Deehan et al. 1998). Es reduziert die Menge und Aktivität der Proteinkinase C (Harnett und Harnett 1993) und moduliert die Expression einer Vielzahl von Isoformen der Proteinkinase C (Deehan et al. 1998).

Zusätzlich induzierte ES-62 in der humanen Jurkat T-Zellen eine Anergie gegenüber der polyklonalen Aktivierung der Zellen, indem die Signaltransduktionskaskade des T-Zellrezeptors unterbrochen wurde (Harnett et al. 1998).

BALB/c-Mäuse entwickelten nach subkutaner Inokulation von ES-62 IgG1-Antikörper gegen PC-freie Epitope (Houston et al. 2000), somit lag offensichtlich eine TH2-betonte Antikörperproduktion vor (Harnett et al. 1999). PC blockierte hierbei abhängig von IL-10 die Produktion von IgG2a-Antikörpern, denn PC-depletiertes ES-62 induzierte sowohl die Bildung von IgG1- als auch IgG2a-Antikörpern (Houston et al. 2000).

Weiterhin induzierten ES-62 und LPS die Reifung von dendritischen Zellen, die ihrerseits die Differenzierung von CD4⁺-Zellen in Richtung TH1 oder TH2 förderten: Die mit ES-62 inkubierten dendritischen Zellen förderten die Entwicklung von TH2-Zellen, während die mit LPS inkubierten dendritischen Zellen die Entwicklung von TH1-Zellen förderten (Whelan et al. 2000).

Die Makrophagenfunktion wurde ebenfalls von ES-62 moduliert. Es supprimierte in IFN γ /LPS-stimulierten Makrophagen dosisabhängig die Produktion von IL-12, IL-6 und TNF α ; die Stickoxidproduktion wurde dabei nicht beeinflusst (Goodridge et al. 2001). Dieser Zustand der Hyporesponsivität hielt längere Zeit an, auch nach Waschen der Zellen nach der ES-62-Inkubation und vor der Stimulierung mit IFN γ und LPS wurde die Produktion von IL-12 gehemmt. Um die Wirkung von ES-62 *in vivo* zu testen, implantierten Goodridge et al. (2001) Mäusen osmotische Pumpen, die permanent physiologische Mengen ES-62 abgaben. Makrophagen dieser Mäuse produzierten danach ebenfalls deutlich weniger IL-12, IL-6 und TNF α .

Ein immunmodulatorisches ES-Produkt der Filarie *Dirofilaria immitis* wurde von Yamaoka et al. (1994) untersucht. Dieses ES-Produkt erhöhte die Expression von CD23, einem niedrig affinen IgE-Rezeptor und Marker für differenzierte B-Zellen. Es steigerte die IL-4 induzierte IgE-Synthese in Milzzellen.

Bei *Brugia malayi* wurden verschiedene immunmodulatorische ES-Produkte beschrieben. Allen und MacDonald (1998) zeigten, dass intraperitoneal applizierte ES-Produkte von adulten Parasiten genauso wie die Implantation von lebenden Filarien in die Bauchhöhle von Mäusen die Bildung von Peritonealexsudatzellen (PEC) induzierten, die ihrerseits in der Lage waren, die T-Zellproliferation zu hemmen.

Ein weiteres ES-Produkt von *B. malayi* ist ein Homolog des humanen Migrationsinhibitionsfaktors (MIF), genannt *Bm*-MIF (Pastrana et al. 1998). *Bm*-MIF-1 führte wie lebende Parasiten zur Hochregulierung der Synthese von YM1 in Makrophagen, einem chemotaktischen Faktor für eosinophile Granulozyten. Außerdem führte es zu einer erhöhten Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Falcone et al. 2001). *Bm*-MIF-1 und *Bm*-MIF-2 wirkten chemotaktisch auf humane Monozyten und aktivierten in ihnen die Produktion von IL-8 und TNF α (Zang et al. 2002).

Bm-SPN-2 ist ein stadienspezifisch sezerniertes Serpin (Serinproteaseinhibitor) und wird ausschließlich von *B. malayi*-Mikrofilarien produziert (Zang et al. 1999). Bei BALB/c-Mäusen, denen intraperitoneal Mikrofilarien appliziert wurden, induzierte *Bm*-SPN-2 kurzzeitig eine starke spezifische TH1-Antwort: Am Tag 14 nach Injektion,

nicht mehr aber am Tag 35 war eine hohe IFN γ -, aber keine IL-4- und IL-5-Produktion in Milzzellen messbar (Zang et al. 2000). *Bm*-SPN-2 wurde ebenfalls von humanen B- und T-Zellen erkannt: alle mikrofilarämischen Patienten der Studie hatten IgG4-Antikörper gegen *Bm*-SPN-2, während nur bei 30% der so genannten endemisch Normalen Antikörper gefunden wurden. T-Zellen der meisten Patienten (mit allen klinischen Formen) produzierten IFN γ nach Stimulation mit *Bm*-SPN-2.

Cystatine (Cysteinproteaseinhibitoren) von Filarien sind ebenfalls als ES-Produkte mit immunmodulatorischer Wirkung beschrieben worden. Ein Cystatin von *B. malayi*, *Bm*-CPI-2, inhibierte die Antigenprozessierung in humanen B-Zelllinien (Manoury et al. 2001).

Hartmann et al. (1997) und Schierack et al. (2003) untersuchten ein Cystatin (Av17) von *Acanthocheilonema viteae*. Die immunmodulatorische Wirkung von rekombinantem Av17 beruhte auf einer Suppression der Proliferation von murinen T-Zellen nach mitogener Stimulation und auf einer Steigerung der IL-10-Produktion. Für rekombinantes Ov17, ein Cystatin der humanpathogenen Filarie *Onchocerca volvulus* wurden ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen: eine Suppression der spezifischen und unspezifischen Proliferation von humanen T-Zellen (Schönemeyer et al. 2001; Schierack et al. 2003) und eine Steigerung der NO-Produktion von IFN γ -stimulierten Makrophagen (Hartmann et al. 2002; Schierack et al. 2003).

Auch bei *L. sigmodontis* wurde ein Cystatin (*Ls*-Cystatin) mit immunmodulatorischer Wirkung entdeckt (Pfaff et al. 2002). Durch osmotische Pumpen kontinuierlich in der Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen freigesetztes *Ls*-Cystatin steigerte die Synthese von TNF α -mRNA in PEC und reduzierte die NO-Produktion nach Applikation von Mikrofilarien. Eine Vakzinierung von BALB/c-Mäusen mit *Ls*-Cystatin führte nicht zu einer Beeinflussung der Wurmbürde, aber zu einer Reduktion der Mikrofilariämie während der Infektion.

2.6. Juv-p120

Als man die Struktur der Mikrofilarienscheide von *L. sigmodontis* untersuchte, wurde entdeckt, dass Antikörper gegen die Oberfläche der Mikrofilarienscheide auch mit einem ES-Produkt dieser Filarie reagierten (Schaes et al. 1994). Dieses ES-Produkt mit einer Größe von 120 kD wurde als Juv-p120 bezeichnet (Hintz et al. 1998). Präadulte, 32 und 46 Tage alte *L. sigmodontis*-Weibchen sezernierten Juv-p120; im Inkubationsmedium von adulten Weibchen wurde es nicht nachgewiesen (Schaes et al. 1994).

Dieses Ergebnis deckte sich mit den Beobachtungen von Harnett et al. (1989a), welche bei 40 bis 42 Tage alten *L. sigmodontis*-Weibchen ein 140-160 kD großes ES-Produkt beschrieben. Juv-p120 wurde außerdem in Homogenat von präadulten Weibchen nachgewiesen, nicht aber in Homogenaten von Mikrofilarien und adulten Weibchen (Wagner 1998). Es zeigte sich, dass Juv-p120 *in vivo* sowohl in die Pleurahöhle infizierter *M. coucha* sezerniert wird, als auch an Tag 41 und 45 p.i. im Blut infizierter Tiere auftritt (Taubert, pers. Mitteilung). Interessanterweise wurden bei den Untersuchungen von Schaes et al. (1994) keine Antikörper gegen Juv-p120 wie auch gegen die Scheidenproteine Shp3 und 3a in infizierten Tieren gefunden.

Ein weiterer Hinweis auf ein kreuzreagierendes Epitop mit der Oberfläche der Mikrofilarienscheide war die drastische Reduzierung der Mikrofilarämie bei infizierten *M. coucha* durch intravenös appliziertes Hyperimmunserum gegen Juv-p120 (Taubert, pers. Mitteilung). Eine genaue Charakterisierung des Proteins wurde von Hintz et al. (1998) und Kasper (2000) durchgeführt. Hintz et al. (1998) stellten fest, dass Juv-p120 ebenso wie die Oberflächenproteine der Mikrofilarienscheide Shp3 und 3a (Hintz et al. 1996; Hirzmann et al. 2002) posttranslational hochgradig mit Dimethylaminoethanol (DMAE) modifiziert sind. DMAE unterscheidet sich strukturell nur durch eine fehlende Methylgruppe von Phosphorylcholin, der immunmodulatorischen Komponente von ES-62 (Harnett und Harnett 1993). Inwieweit die DMAE-Modifikationen von Juv-p120 für eine mögliche immunmodulatorische Funktion von Bedeutung sind, ist noch ungeklärt. Erste Hinweise auf einen immunmodulatorischen Effekt von Juv-p120 ergaben sich aus der Arbeit von Taubert und Zahner (2001). Der komplette Einbruch der Synthese sämtlicher Zytokine außer von IL-10 am Ende der Präpatenz fiel exakt auf den Zeitpunkt der maximalen Juv-p120-Produktion.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

3.1.1. *Sigmodon hispidus*

Die für die Stammhaltung und Mikrofilariengewinnung von *Litomosoides sigmodontis* eingesetzten Baumwollratten, *S. hispidus*, stammten aus institutseigener Zucht. Dieses Versuchstier ist der natürliche Endwirt von *L. sigmodontis*. Vom Absetzen bis zur Infektion wurden die Tiere in Gruppen in Makrolon[®]-Käfigen (Typ 3) auf Hobelspaneinstreu gehalten. Nach der Infektion erfolgte eine Einzelhaltung in Makrolon[®]-Käfigen (Typ 3). Als Futter diente Altromin[®] (Alleinfutter für Ratten und Mäuse; Altromin GmbH, Lage); Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung.

3.1.2. *Mastomys coucha*

Als weiterer Endwirt für *L. sigmodontis* wurde die Vielzitzenmaus *M. coucha* (Stamm Gießen GRA) verwendet. Die Tiere stammten aus institutseigener Zucht. Nach dem Absetzen im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere in Gruppen von bis zu 6 Tieren in Makrolon[®]-Käfigen (Typ 3) auf Hobelspaneinstreu gehalten. Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen bei 22°C und 60% relativer Luftfeuchte untergebracht. Das Futter bestand aus 40% Hafer, jeweils 13% Weizen und Gerste, je 11% Mais und Sonnenblumenkernen, 9% Hühnervollkorn und 3% Garnelen (Angaben in Gewichtsprozenten). Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung.

3.1.3. BALB/c-Mäuse

Für einige Versuche wurden BALB/c-Mäuse (Stamm OlaHsd) verwendet, die aus institutseigener Zucht stammten. Die Tiere wurden nach dem Absetzen im Alter von 3 Wochen in Makrolon[®]-Käfigen (Typ 3) mit Hobelspaneinstreu gehalten. Die Gruppengröße betrug 5 oder 6 Tiere. Gefüttert wurden die Mäuse mit Altromin[®]; Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung.

3.2. *Litomosoides sigmodontis*

3.2.1. Haltung von *Litomosoides sigmodontis*

Als Zwischenwirt der Nagetierfilarie *L. sigmodontis* diente die blutsaugende tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti*. Zur Stammhaltung wurden Baumwollratten als Endwirte verwendet. Die Milben wurden in 35 cm hohen Glasstutzen gezüchtet; in den Stutzen befanden sich ca. 5 cm hoch Hobelspäne und etwas Baumwollwatte. Die Stutzen standen in einer Spülmittellösung, um eine Verbreitung der Milben zu verhindern. Die Raumtemperatur betrug 28°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 80%.

Um die Milben mit *L. sigmodontis*-Mikrofilarien zu infizieren, wurde jeweils eine mikrofilariämische Baumwollratte mit 1.700 bis 4.000 Mikrofilarien (Mff)/mm³ Blut für sechs Stunden in den Stutzen eingesetzt. Die Milben nahmen nun mit der Blutmahlzeit die Mikrofilarien auf. In der Milbe entwickelte sich innerhalb von elf Tagen die infektiöse Drittlarve (L3), die dann beim nächsten Saugakt auf den Endwirt übertragen wurde. Anschließend wurden im Abstand von 3 bzw. 4 Tagen abwechselnd infizierte Baumwollratten und nicht infizierte Tiere in den Stutzen eingesetzt, so dass eine kontinuierliche Infektion aufrechterhalten werden konnte.

3.2.2. Quantitative Infektion mit *L. sigmodontis*

Für die quantitative Infektion wurden L3 aus Spendertieren isoliert, welche zuvor besonders hoch infiziert worden waren. Es wurde dabei in leicht modifizierter Form nach Petranyi und Mieth (1972) vorgegangen.

Dafür wurde in einem sog. Poolstutzen eine sehr große Anzahl von Milben gezüchtet. Dann wurden diese Milben infiziert durch das Einsetzen einer Baumwollratte mit 1.750 Mff/mm³ Blut über 6 Stunden. Am 4. und 7. Tag nach der Infektion der Milben erfolgte eine Zwischenfütterung der Milben an nicht infizierten *M. coucha*. Ab dem 11. Tag p.i. wurden die Milben nicht mehr gefüttert, da sonst eventuell früh entwickelte L3 verloren gegangen wären. An Tag 14 p.i. wurden die Spendertiere infiziert. Dazu wurden je nach Milbenzahl 6-12 männliche *M. coucha* (mit einem Gewicht von ca. 40 g) mit Pentobarbital (50 mg/kg) narkotisiert, mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung subkutan (s. c.) zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes versorgt und für 2 Stunden in den Stutzen eingesetzt.

Nach 116 Stunden wurden die Spendertiere nach CO₂-Betäubung dekapitiert und enthäutet. Zu diesem Zeitpunkt war ein Großteil der bei der Infektion übertragenen

L3 in die Pleurahöhle der Spendertiere gelangt. Die Pleurahöhle der Spendertiere wurde mit 38°C warmer 0,9%iger NaCl-Lösung gespült um die L3 zu gewinnen. Die isolierten Larven wurden mittels eines Stereomikroskops auf ihre Vitalität überprüft und die benötigte Anzahl mit einer Pasteurpipette aufgezogen. In einem Volumen von bis zu 1 ml wurden sie den zu infizierenden Tieren s. c. injiziert.

3.2.3. Übersicht über die zu den verschiedenen Experimenten eingesetzten Tiere

Kapitel	Anzahl und Spezies	Infektion
5.4.	6 BALB/c-Mäuse	<i>L. sigmodontis</i> , quantitativ
5.5.	4 <i>Mastomys coucha</i>	<i>L. Sigmodontis</i> , natürlich
	4 BALB/c-Mäuse	<i>L. Sigmodontis</i> , quantitativ
5.6.	6 <i>Mastomys coucha</i>	<i>L. sigmodontis</i> , quantitativ
	6 BALB/c-Mäuse	<i>L. sigmodontis</i> , quantitativ
5.7. und 5.8.	6 <i>Mastomys coucha</i>	<i>L. sigmodontis</i> , natürlich
	5 BALB/c-Mäuse	<i>L. sigmodontis</i> , quantitativ

3.2.4. Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut

Reagenzien und Lösungen

- 3%ige Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Durchführung

Die Bestimmung der Mikrofilariendichte im Blut erfolgte nach der Methode von Raether und Meyerhofer (1967). Unmittelbar nach der Entnahme (s. 3.3.) wurde das Blut mit 3%iger Essigsäure 1:20 (Baumwollratten und *M. coucha*) oder 1:10 (BALB/c-Mäuse) verdünnt. Die Mikrofilarien wurden dann in der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Baumwollratten und *M. coucha*) oder nach Jessen (BALB/c-Mäuse) ausgezählt und in Mff/mm³ Blut umgerechnet.

3.2.5. Isolierung von *L. sigmodontis*

Die infizierten Versuchstiere wurden mit CO₂ betäubt, dekapitiert und ausgeblutet. Nach Eröffnung der Pleurahöhle wurden die Parasiten mit einer Federstahlpinzette in eine Glaspetrischale mit 0,9%iger NaCl-Lösung überführt. Die Würmer wurden nach Geschlechtern getrennt und gezählt.

3.2.6. Embryogramm

Reagenzien und Lösungen

- PBS (phosphate-buffered saline): 137 mM NaCl (Sigma, Deisenhofen), 2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt), 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O (Merck), 1,4 mM KH₂PO₄ (Merck)

Durchführung

Die Bestimmung der Anzahl pathologischer Embryonalstadien und der Gesamtembryonenzahl erfolgte in leicht modifizierter Form nach der Methode von Wegerhof (1977).

Nach der Sektion wurden zwei *L. sigmodontis*-Weibchen aus jedem Tier in ein 1,5 ml -Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) überführt, mit einer Schere zerkleinert und nach Zugabe von 100 µl PBS mit einem Plastikpistill zermörsert. Die Differenzierung der in der Lösung enthaltenen Embryonalstadien in multizelluläre Stadien, Ring -und Brezelstadien und Mikrofilarien sowie die Bestimmung des prozentualen Anteils an pathologischen Stadien erfolgte unter dem Mikroskop. Zur Zählung der Gesamtembryonenzahl wurde die Lösung im Verhältnis von 1:10 mit 3%iger Essigsäure verdünnt und die Stadien in der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal ausgezählt.

3.2.7. Sterile Gewinnung von präadulten und adulten Parasiten

Reagenzien und Lösungen

- RPMI 1640: 104,3 g RPMI-Pulver mit Glutamin (GIBCO BRL Eggenstein) ad 10 l Aqua bidest., 20 g NaHCO₃; auf pH 7,2 eingestellt und steril abgefüllt

Durchführung

Infizierte *M. coucha* wurden am 39. bzw. 123. Tage post infectionem (p.i.) nach CO₂-Betäubung dekapitiert, mit Alkohol besprüht und unter eine Sterilbank gebracht. Die Parasiten wurden mit einer sterilen Federstahlpinzette aus der Pleurahöhle entnommen, in eine Petrischale mit RPMI-Medium gelegt, dreimal in RPMI gewaschen und nach Geschlechtern getrennt.

3.2.8. In vitro-Kultivierung der Parasiten

Reagenzien und Lösungen

- RPMI /Penstrep: 450 ml RPMI 1640 (s. 3.2.6.), 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma), 5 ml Glutamin (GIBCO BRL)
- Sterilfilter (0,2 µm Sterilfilter, Renner Darmstadt)

Durchführung

In eine 24-Loch Platte (Nunc) wurden in jede Vertiefung 2 ml RPMI/Penstrep vorgelegt und jeweils 10 Weibchen oder ca. 30 Männchen verbracht. Nach 5 Tagen Inkubationszeit (37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit) wurden die Würmer entfernt und die Überstände gesammelt. Der Überstand von patenten Weibchen wurde sterilfiltriert, um die Mikrofilarien zu entfernen.

3.2.9. Reinigung und Ankonzentrierung der Überstände von präadulten und adulten Weibchen

Reagenzien und Lösungen

- PBS (s. 3.2.5.)
- Vivaspin 20, 100.000 MWCO (Vivasience, Sartorius group, Göttingen)
- Sterilfilter Millex GV (PVDF) 0,22 µm (Millipore, Molsheim, Frankreich)

Durchführung

Die gesammelten Überstände (s. 3.2.8.) wurden mittels Vivaspin 20 bei 3.000 x g zentrifugiert, bis das eingesetzte Volumen von insgesamt 60 ml auf 500 µl reduziert war. Dieses Filtersystem hatte eine Ausschlussgrenze von 100 kD. Nach zwei

Waschungen mit PBS wurde das Volumen des Überstandes wiederum auf ca. 500 µl reduziert und enthielt jetzt überwiegend Proteine mit einer Größe über 100 kD. Der Filterdurchlauf wurde aufgehoben. Der ankonzentrierte Überstand und der Durchlauf wurden mit einem Millex GV-Filter sterilfiltriert und nach Proteinbestimmung (s. 3.4.) bei –80°C eingefroren.

Ein Teil der Überstände von präadulten Weibchen, im folgenden nÜP genannt, wurde von Martin Hintz (Institut für Biochemie im Klinikum, JLU Gießen) mittels HPLC weiter aufgereinigt (Hintz et al. 1998).

3.2.10. Präparation von *L. sigmodontis*-Mikrofilarien und Mikrofilarienantigen

Reagenzien und Lösungen

- Liquemin® (Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Whylen)
- PBS (s. 3.2.5.)
- Percoll, Dichte 1,13 (Pharmacia, Freiburg)
- 2,5 M Saccharoselösung (Haushaltszucker)
- 0,25 M Saccharoselösung
- Protein Assay (BIO-RAD, München)
- Sterilfilter 0,2 µm (s. 3.2.7.)

Durchführung

Die Isolierung der Mikrofilarien erfolgte über einen Percoll-Dichtegradienten, modifiziert nach Chandrashekar et al. (1984). Mit Liquemin® ungerinnbar gemachtes Blut von Baumwollratten mit einer hohen Mikrofilariämie wurde mit PBS 1:2 verdünnt. Aus 1 g 2,5 M Saccharose und 9 g Percoll wurde Lösung 1 hergestellt. 10 g von Lösung 1 wurden mit 0,25 M Saccharoselösung auf 40 ml aufgefüllt und gut vermischt (Lösung 2). In Duran-Glasröhrchen wurden jeweils 3 ml von Lösung 2 mit 1,5 ml verdünntem Blut überschichtet und zentrifugiert (30 min bei 400 x g). Danach waren die Mikrofilarien als weißer Ring an der Grenzzone zu erkennen und konnten mit einer Pasteurpipette abgesaugt werden. Die Mikrofilarien wurden dreimal mit PBS gewaschen (30 min bei 400 x g) und anschließend in 300-400 µl PBS aufgenommen. Für die Verwendung von lebenden Mikrofilarien wurde ihre Konzentration in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt (s. 3.2.3.).

Zur Herstellung von Mikrofilarienantigenen wurden die Parasiten bei -80°C eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Diese Einfrier- und Auftauprozedur wurde viermal wiederholt. Mit Ultraschallbehandlung (Sonifer B-12, Danburg, Connecticut) wurden die Mikrofilarien homogenisiert (20 Zyklen von 30 s). Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert ($11.000 \times g$, 30 min). Der Überstand wurde abgesaugt und aufbewahrt, das Pellet wurde mit PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert (20 min bei $11.000 \times g$). Die Überstände wurden vereinigt und sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde auf $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (s. 3.4.) und die Lösung bei -20°C eingefroren.

3.2.11. Präparation von *L. sigmodontis*-Dritt (L3)- und Viertlarven (L4)-Antigen

Reagenzien und Lösungen

- PBS (s. 3.2.5.)
- Probenpuffer für Proteinelektrophorese: 500 μl Lösung A [$0,625 \text{ M}$ Tris-HCL (ICN, Ohio), $0,4\%$ Natriumdodecylsulfat, SDS (Serva, Heidelberg), pH 6,8], 500 μl 2-Mercaptoethanol (2-ME, Serva, Heidelberg), 500 μl 20% SDS (Serva), 50 μl Glycerin (ICN), 1 Spatelspitze Bromphenolblau (Merck)

Durchführung

Die Larven wurden an Tag 8 (L3) bzw. Tag 18 (L4) p.i. aus der Pleurahöhle infizierter *M. coucha* isoliert. Dafür wurden die Pleurahöhlen nach CO_2 -Betäubung dekapitierter Tiere mit 1 ml PBS gespült und die Larven mitsamt Spülflüssigkeit gewonnen. Die Spülflüssigkeit wurde zentrifugiert (4°C , $15.000 \text{ U}/\text{min}$, 15 min). Das Pellet enthielt die Larven und wurde in 500 μl PBS in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel (Glas-Col, Terre Haute, USA) zerkleinert.

Das Homogenisat wurde mit 125 μl Probenpuffer versetzt, 15 min bei 100°C gekocht und 5 min bei $10.000 \text{ U}/\text{min}$ zentrifugiert.

3.2.12. Antigen präadulten Weibchen

Antigen von präadulten Weibchen 40 Tage p.i. in Probenpuffer wurde freundlicherweise von A. Taubert zur Verfügung gestellt (Taubert und Zahner 2001). Die Parasiten wurden in einem Glashomogenisator mit Teflonstempel (Glas-Col,

Terre Haute, USA) zerkleinert. Das Homogenisat wurde mit Probenpuffer versetzt, 15 min bei 100°C gekocht und 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert.

3.3. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Tieren durch Punktieren des retrobulbären Venenplexus am nasalen Augenwinkel mittels einer Kapillare zur Schmelzpunktbestimmung (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt) mit einem Außendurchmesser von 1,35 mm (Baumwollratten und *M. coucha*) oder 1 mm (BALB/c-Mäuse).

Zur Gewinnung von größeren Mengen Serum von *M. coucha* wurden diese nach CO₂-Betäubung dekapitiert und entblutet. Das gewonnene Blut wurde wie unter 3.3.2. beschrieben weiterverarbeitet.

3.3.1. Gewinnung von Plasma

Reagenzien und Lösungen

- 3,8%ige Natriumcitratlösung (Merck, Darmstadt)

Durchführung

Von infizierten BALB/c-Mäusen wurden jeweils 300 µl Blut entnommen (s. 3.3.). Das Blut wurde mit 3,8%iger Natriumcitratlösung im Verhältnis von 3:1 vermischt, um eine Gerinnung zu verhindern und zentrifugiert (4.000 U/min, 5 min). Danach wurde der Überstand abpipettiert und nochmals zentrifugiert (4°C, 10.000 U/min, 15 min), um eventuell vorhandene Mikrofilarien zu entfernen. Der Überstand wurde bei –80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3.2. Gewinnung von Serum

Für die Gewinnung kleinerer Mengen Serum von Einzeltieren (*M. coucha* und BALB/c-Mäuse) wurden je nach Größe der Tiere 150-500 µl Blut entnommen (s. 3.2.3.). Das Blut wurde bis zum Einsetzen der Gerinnung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (20 min,

4.000 U/min). Das Serum wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Zur Gewinnung größerer Mengen Normalserum wurde das von mehreren *M. coucha* vereinigte Blut (s. 3.3.) eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach zentrifugiert (20 min, 4.000 U/min). Das Serum wurde abpipettiert, sterilfiltriert (0,2 μm Sterilfilter, Renner Darmstadt) und portioniert bei -20°C eingefroren.

3.4. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Reagenzien und Lösungen

- Protein Assay (BIO-RAD München)
- Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA, Sigma)
- Aqua bidest.
- Immuno modules (Nunc)

Durchführung

Zur Herstellung der Stammlösung für die Proteinbestimmung wurde die Lösung des Proteinassays 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Als Referenzlösung diente eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, von der eine Standardreihe mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hergestellt wurde. Je 1 μl , 5 μl und 10 μl der zu prüfenden Lösung wurden mit der Lösung zur Proteinbestimmung gemischt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde durch adspektorischen Vergleich mit der Standardreihe anhand des entstehenden Farbumschlags bestimmt.

3.5. Kopplung von Phospho-Dimethylaminoethanol (P-DMAE) an ein lysinreiches (Lys)-Peptid

Reagenzien und Lösungen

- Lys-Peptid (H-Lys-Lys-Lys-Trp-Lys-Lys-Lys-OH; Bachem, Heidelberg)
- 4-Nitrophenyldichlorphosphat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Dimethylaminoethanol research grade (Serva, Heidelberg)
- Chinolin (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (CH₃CN, Sigma-Aldrich)
- Pyridin (Merck, Darmstadt)
- MB-3 (Ionenaustauscher Amberlite, Merck, Darmstadt)
- trockener Methanol (HYDRANAL[®]-Methanol dry, Sigma-Aldrich)
- Pd/C (Palladiumkatalysator, Wako Chemicals, Neuss)
- Ammoniumformiat (HCOONH₄, Merck, Darmstadt)
- 1 N HCL (Merck, Darmstadt)
- Natriumnitrit (NaNO₂, Merck, Darmstadt)

Durchführung

Die Kopplung von P-DMAE (s. Abb. 3.2.) an ein lysinreiches Peptid wurde von Günther Lochnit (Institut für Biochemie im Klinikum, JLU Gießen) durchgeführt. Die Ausgangssubstanz p-Aminophenyl-P-DMAE wurde wie folgt hergestellt:

4 mmol 4-Nitrophenyldichlorphosphat und 4 mmol Dimethylaminoethanol wurden mit 0,1 äq Chinolin in 10 ml Acetonitril 5 h unter Rühren auf Eis inkubiert, danach mit 8 mmol Pyridin in 10 ml Aqua dest. hydrolysiert und mit MB-3 (Ionenaustauscher) versetzt, bis keine Farbänderung mehr eintrat. Nach der Lyophilisierung erfolgte die Zugabe von 10 ml wasserfreiem Methanol und 0,3 g Pd/C unter Schutzgasatmosphäre. Nach Zugabe von 1,1 g Ammoniumformiat wurde die Lösung 20 min bei Raumtemperatur stengelassen. Zum Entfernen des Pd/C wurde die Lösung zentrifugiert (10 min bei 4000 U/min) und danach in der Vakuumzentrifuge getrocknet. p-Aminophenyl-P-DMAE wurde in Diazoniumphenyl-P-DMAE überführt und an Lysin gekoppelt (Baltar et al. 1998):

274 mg p-Aminophenyl-P-DMAE wurden auf Eis in 3 ml 1 N HCL gelöst, 69 mg Natriumnitrit dazugegeben und 10 min geschüttelt. Danach erfolgte eine Inkubation von 500 µl 0,5 M Diazoniumphenyl-P-DMAE mit 500 µg Lys-Peptid (12 h, unter

Rühren auf Eis). Die entstandene P-DMAE-Peptid-Lösung wurde ebenso wie das nicht modifizierte Kontrollpeptid in der HPLC aufgereinigt.

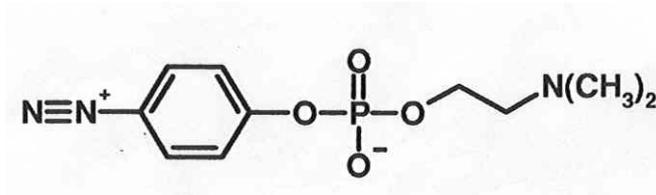


Abb. 3.1. Strukturformel der Diazobindung

3.6. Behandlungen von Versuchstieren

3.6.1. Immunisierung mit nÜP

Reagenzien und Lösungen

- nÜP (s. 3.2.8.)
- Freund's Complete Adjuvans (FCA, Sigma)
- Freund's Incomplete Adjuvans (FCA, Sigma)
- PBS (s. 3.2.5.)

Durchführung

5 Wochen alte BALB/c-Mäuse oder *M. coucha* wurden mit 10 µg nÜP pro Tier immunisiert. Dafür wurde nÜP, für die Kontrollgruppe PBS, mit gleicher Menge FCA vermischt. Die Mischung wurde so lange intensiv gemischt bis eine stabile Emulsion entstanden war. Jedem Tier wurden 0,2 ml Emulsion s.c. an der seitlichen Brustwand injiziert. Für die Boosterung 2 Wochen später wurden nativer Überstand (5 µg Protein) oder PBS mit FIA emulgiert und davon 0,2 ml pro Tier s.c. injiziert.

3.7. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

3.7.1. PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Reagenzien und Lösungen

- Lösung A: 6,06 g Tris ultra pure (ICN, Ohio), 0,4% SDS (Serva, Heidelberg), HCl auf pH 6,8, Aqua dest. ad 100 ml
- Lösung B: 18,17 g Tris ultra pure, 0,4% SDS, HCl auf pH 8,8, Aqua dest. ad 100 ml
- Lösung C: 30,0 g Acrylamid (Sigma), 0,8 g Bisacrylamid (Sigma), Aqua dest. ad 100 ml
- 10% Ammoniumpersulfat (APS, Pharmacia, Biotech)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED, Pharmacia, Biotech)
- Aqua dest.
- 70% Ethanol
- 10x Laufpuffer: 30,3 g Tris ultra pure (ICN), 144,1 g Glycin (ICN), 10 g SDS (Serva), H₂O Aqua dest. ad 1000 ml
- Probenpuffer für Proteinelektrophorese (s.3.2.10.)
- BenchMark[®] Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

Durchführung

Für die Elektrophorese wurde eine Mini-Protean 2-Kammer (BIO-RAD, München) nach Anleitung des Herstellers mit 1 mm-Abstandshaltern und den entsprechenden Kämmen benutzt. Für 7,5%ige Trenngele wurden 3,75 ml Lsg. C, 7,5 ml Aqua dest., 3,75 ml Lösung B, 90 µl APS und 30 µl TEMED gemischt, in die Kassetten gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Für 5%ige Trenngele wurden 2,5 ml Lsg. C und 8,25 ml Aqua dest. eingesetzt. Um das Polymerisieren zu beschleunigen, wurde das Gel für 20 min in den Wärmeschrank (37°C) gestellt.

Die Lösung für das Sammelgel bestand aus 1,5 ml Lösung A, 0,6 ml Lösung C, 3,6 ml Aqua dest., 50 µl APS und 30 µl TEMED; sie wurde auf das Trenngel gegossen. Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden 4:1 mit Probenpuffer gemischt, für 15 min auf 95 °C erhitzt und zentrifugiert (5 min bei 10.000 U/min). Die Überstände wurden in die Geltaschen pipettiert und 70 min bei 130 V im Gel aufgetrennt.

3.7.2. PAGE für die Auftrennung von DNA-Proben

Reagenzien und Lösungen

- 50x TAE-Puffer: 242 g Tris ultra pure (ICN, Ohio), 57,1 g Eisessig (Merck), 100 ml 0,5 M NaEDTA (Sigma), ad 1000 ml Aqua bidest.
- 10x TAE-Puffer: 50x TAE-Puffer 1:5 verdünnt in Aqua bidest.
- 1x TAE-Puffer: 50xTAE-Puffer 1:50 verdünnt in Aqua bidest.
- 40% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: 40 g Acrylamid (Sigma), 1,2 g Bisacrylamid (Sigma) ad 100 ml Aqua dest.
- 7,5%ige Polyacrylamid (PA)-Stammlösung: 93,75 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 50 ml 10x TAE-Puffer, ad 500 ml Aqua bidest.
- 10% APS (s. 3.6.1.)
- TEMED (s. 6.6.1.)
- Probenpuffer für DNA: 40% Sucrose (Sigma), 0,25% Bromphenol (Sigma), 0,25% Xylene Cyanol FF (Sigma)
- DNA Gene Ruler Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Roth)
- Ethidiumbromid-Lösung: 1 µg Ethidiumbromid (Sigma) in 1000 ml Aqua bidest.

Durchführung

Die Mini-Protean 2-Kammer (BIO-RAD, München) wurde mit 0,75 mm Abstandhaltern und entsprechenden Kämmen nach Herstelleranleitung zusammengebaut und mit der Trenngellösung gefüllt. Diese bestand aus 10 ml PA-Stammlösung, 100 µl APS und 11,4 µl TEMED. Nach ca. 15 min waren die Gele polymerisiert.

Die Gelkammer wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt und die Geltaschen wurden mit je 18 µl der 1:10 mit Probenpuffer gemischten PCR-Proben gefüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V über 60 min. Anschließend wurden die Gele für 15 min in Ethidiumbromid gefärbt, kurz in Aqua dest. gewaschen und mittels eines Transilluminators (Renner, Darmstadt) die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht.

3.7.3. Gelfärbungen nach PAGE-Proteinelektrophorese

3.7.3.1. Silberfärbung

Reagenzien und Lösungen

- Lösung 1: 100 ml Essigsäure (Merck), 500 ml Methanol (Merck), 400 ml Aqua dest.
- Lösung 2: 50% Methanol (Merck)
- Lösung 3: 0,8 mM Natriumthiosulfatlösung (Merck), 1:2 verdünnt
- Lösung 4: 0,2 g Silbernitrat (Merck), 75 µl 37%iges Formaldehyd in 100 ml Aqua dest., frisch ansetzen
- Lösung 5: 30 g Na₂CO₃ (Merck), 2 mg Na₂S₂O₃ (Merck), 250 µl 37%iges Formaldehyd (Merck) in 500 ml Aqua dest., 1:3 bis 1:4 (frische Lsg.) verdünnen
- Lösung 6: 0,05 M NaEDTA (Sigma)

Durchführung

Das Gel wurde nach folgendem Schema gefärbt:

- 1) Fixierung: 2 h in Lösung 1
- 2) Wässern über Nacht in Aqua dest.
- 3) Waschen: 3 x 10 min mit Lösung 2
- 4) Vorbehandeln: 2 min in Lösung 3
- 5) Waschen: 3 x 20 s mit Aqua dest.
- 6) Imprägnierung: 10 min in Lösung 4
- 7) Waschen: 3 x 20 s mit Aqua dest.
- 8) Entwicklung: 2 bis 5 min in Lösung 5 je nach Frische der Lösung
- 9) Waschen: 2 x 20 s mit Aqua dest.
- 10) Stoppen: 10 min in Lösung 5
- 11) Wässern: 20 min in Aqua dest.
- 12) Trocknen auf dem Gelrockner

3.7.3.2. Coomassiefärbung

Reagenzien und Lösungen

- Universallösungsmittel: 400 ml Methanol (Merck), 100 ml Eisessig (Merck), 500 ml Aqua dest.
- Coomassie-Färbelösung: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva, Heidelberg) in 250 ml Universallösungsmittel

Durchführung

Das Gel wurde 1 Stunde in der Färbelösung gefärbt. Danach wurde das Gel mit Universallösungsmittel entfärbt bis der Hintergrund wieder klar war und auf dem Geltrockner getrocknet.

3.8. Immunoblotting

3.8.1. Semi-Dry-Blotting

Reagenzien und Lösungen

- Methanol (Merck)
- Transferpuffer: 3,03 g Tris ultra pure (ICN, Ohio), 14,4 g Glycin (ICN), 400 ml Methanol (Merck) ad 1000 ml Aqua dest.
- Ponceaulösung: 0,25 g Ponceau S (Serva, Heidelberg), 0,5 ml Eisessig, ad 500 ml H₂O

Durchführung

Auf das Blotting-Gerät (Biometra) wurde zuerst ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Darauf kam blasenfrei die auf Gelgröße zugeschnittene und zuvor in Methanol benetzte Immobilon P®-Membran (Millipore, Molsheim). Auf die Membran wurde das Gel platziert und mit einem weiteren getränkten Filterpapier abgedeckt. Nun wurde für 1 Stunde bei 200 mA pro Gel geblottet. Die Membran wurde in Ponceaulösung 2 min gefärbt und anschließend mit Aqua dest. entfärbt.

3.8.2. Dotblotting

Reagenzien und Lösungen

- Probenpuffer für Proteine (s. 3.2.10.)
- Methanol (Merck)

Durchführung

Nach einer kurzen Benetzung der Immobilon P®-Membran (Millipore) mit Methanol wurden je 3 µl Probe (in Probenpuffer 4:1) aufgetropft.

3.8.3 Immunfärbungen

Reagenzien und Lösungen

- PBS/T 0,5%: 100 ml PBS (s. 3.2.5.), 500 µl TWEEN 20 (Sigma)
- PBS/T 0,05%: 1000 ml PBS (s. 3.2.5.), 500 µl TWEEN 20 (Sigma)
- Nachweispuffer: 12,11 g Tris ultra pure (ICN, Ohio), 5,84 g NaCl, 1,02 g MgCl₂ ad 1000 ml Aqua dest., pH 9,5
- Anti-Juv-p120 Kaninchen-Hyperimmunserum (Anti-Juv) (Hintz et al. 1998), Verdünnung 1:4.000 (Westernblot) bzw. 1:1.000 (Dot Blot)
- Sera von *M. coucha* (s. 3.3.2., Verdünnung 1:2.000)
- Sera von BALB/c-Mäusen (s. 3.3.2., Verdünnung 1:1.000)
- Anti-Mastomys-IgG-Serum von Kaninchen (zur Verfügung gestellt von Nikola Pantchev, Gießen, Verdünnung 1:5.000)
- Anti-Mouse-IgG (H&L)-AP Conjugate (Promega, Madison, Verdünnung 1:10.000)
- Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP Conjugate (Promega, Verdünnung 1:10.000 alle Verdünnungen in PBS/T 0,05%)
- NBT/BCIP Stock Solution® (Roche, Mannheim)
- Coomassie-Färbelösung (s. 3.7.3.2.)

Durchführung

Nach der Ponceaufärbung (s. 3.8.1.) wurden die Membranen mit PBS/T 0,5% 30 min blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-Juv, Sera von *M. coucha*, Sera von BALB/c-Mäusen) 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran gewaschen (3 x für 5 min in PBS/T 0,05%), in

Konjugat [(Anti-Mouse-IgG (H&L)-AP Conjugate, Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP Conjugate)] oder dem Sekundärantikörper (Anti-Mastomys-IgG-Serum von Kaninchen) inkubiert (1 Stunde bei Raumtemperatur) und anschließend gewaschen (PBS/T 0,05% 3 x 5 min).

Bei der Verwendung des Sekundärantikörpers wurde die Membran dann 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Konjugat (Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP Conjugate) inkubiert. Vor der Entwicklung wurde die Membran nochmals gewaschen (3 x 5 min mit PBS/T 0,05%) und 5 min in Nachweispufer äquilibriert. Anschließend wurde die Reaktion durch Verbringen der Membran in Substratlösung (NBT/BCIP 1:50 verdünnt in Nachweispufer) sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt.

3.9. Stimulation von Milzlymphozyten mit Mitogen und *in-vitro*-Überstand von präadulten Weibchen

3.9.1. Isolierung von Milzlymphozyten

Reagenzien und Lösungen

- RPMI 1640 (s. 3.2.6.)
- RPMI/4%MCS (Negativserum von *M. coucha*): 450 ml RPMI 1640, 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma), 5 ml L-Glutamin(GIBCO BRL), 20 ml Negativserum von *M. coucha* (s. 3.3.2.)
- RPMI/10% FKS (Fetales Kälber Serum): 450 ml RPMI, 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma), 5 ml L-Glutamin(GIBCO BRL), 50 ml FKS (Fetales Kälber Serum, Biochrom KG)
- Siebgewebe-Taschen: Nylonsiebewebe, Maschenweite 118 µm (Reichert Chemietechnik GmbH und Co, Heidelberg) wurde zu 3,5 x 5 cm großen Säckchen vernäht und in Petrischalen autoklaviert
- ACK Lysispufer: 8,29 g NH₄Cl (Sigma), 1 g KHCO₃ (Merck), 32,7 mg EDTA (Sigma) ad 1000 ml H₂O, pH 7,2, autoklaviert.

Durchführung

M. coucha und BALB/c-Mäuse wurden nach CO₂-Betäubung dekapitiert und mit Alkohol besprüht. Die Entnahme der Milz erfolgte steril über einen Schnitt an der linken Flanke. Sie wurde in eine Siebgewebe-Tasche geschoben, die sich in einer Petrischale mit 17 ml RPMI befand und mit einem Glasstempel vorsichtig quetschend-reibend durch die Tasche gedrückt, so dass möglichst alle Bindegewebesteile in der Tasche zurückblieben und die einzelnen Milzzellen frei wurden. Um grobe Bestandteile zu entfernen, erfolgte eine Sedimentierung der Zellsuspension in zwei 10 ml-Zentrifugenröhrchen (Nunc). Danach wurde der Überstand in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt, mit RPMI auf 45 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 400 x g, 4 °C). Nach dem Abgießen des Überstandes erfolgte eine Aufschüttelung des Zellpellets. Nach dem Lysieren der Erythrozyten durch dreiminütiges Schütteln mit 5 ml ACK Lysispuffer wurde die Zellsuspension auf 45 ml mit RPMI aufgefüllt. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit RPMI (10 min, 400 x g, 4 °C).

Die Zellen wurden in 6 ml RPMI/4%MCS (bei *M. coucha*-Zellen) oder 4 ml RPMI/10%FKS (bei Zellen von BALB/c-Mäusen) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.9.2. Vitalitätsbestimmung und Zählung der Milzlymphozyten

Reagenzien und Lösungen

- 0,4%ige Trypanblau-Lösung (Sigma)
- 3% Essigsäure (Merck)

Durchführung

50 µl der Milzlymphozytensuspension wurden mit jeweils 450 µl Trypanblau-Lösung zur Bestimmung der Vitalität der Zellen und 450 µl Essigsäure zur Zählung kernhaltiger Zellen vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Trypanblau-Färbung diente zur Bestimmung des Anteils toter Zellen; diese nehmen nach 5 min Inkubation den blauen Farbstoff auf, während sich lebende Zellen nicht anfärben lassen.

3.9.3. Stimulation der Milzlymphozyten für Proliferationsassays

Reagenzien und Lösungen

- RPMI 1640 (s. 3.2.6.)
- RPMI/4%MCS (s. 3.9.1.)
- RPMI/10%FKS (s. 3.9.1.)
- **nÜP** (s. 3.2.8.)
Stammlösung: 0,15 µg Protein/µl in PBS (s. 3.2.5.)
Gebrauchslösungen: Stammlösung verdünnt in RPMI 1640, verschiedene Konzentrationen
- **P-DMAE-Peptid** (s. 3.5.)
Stammlösung: 0,33 µg P-DMAE-Peptid/µl in PBS (s. 3.2.5.)
Gebrauchslösungen: Stammlösung verdünnt in RPMI 1640, verschiedene Konzentrationen
- **Lys-Peptid** (s. 3.5.)
Stammlösung: 1 µg Lys-Peptid/µl in PBS (s. 3.2.5.)
Gebrauchslösungen: Stammlösung verdünnt in RPMI 1640, verschiedene Konzentrationen
- **Durchlauf** (von der Ankonzentrierung) (s. 3.2.8.), unverdünnt eingesetzt
- **Concavalin A (ConA)-Lösung** (Biochrom KG)
Stammlösung: 4 mg Trockensubstanz, in 5 ml RPMI 1640
Gebrauchslösungen: Stammlösung verdünnt mit RPMI 1640 1:8 bzw. 1:4

Durchführung

Die Zellsuspension (s. 3.9.1.) wurde mit RPMI/4%MCS (bei Zellen von *M. coucha*) oder mit RPMI/10%FKS (bei Zellen von BALB/c-Mäusen) auf 2.000 lebende Zellen pro µl eingestellt und in einem Volumen von 100 µl in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (Nunc) pipettiert. Für jeden Messwert wurden Triplikate angesetzt. Zur alleinigen Stimulation mit Mitogen (ConA, Verdünnung 1:8) oder Antigen (P-DMAE-Peptid, Konzentration 10 µg/ml oder nÜP, Konzentration 2 µg/ml) kamen jeweils 100 µl dieser Lösungen zur Zellsuspension. Bei gleichzeitiger Inkubation von Antigen (nÜP und P-DMAE-Peptid; Lys-Peptid und Durchlauf als Kontrolle) und Mitogen (ConA, Verdünnung 1:4) betrug das dazugegebene Volumen jeweils 50 µl. Es ergab sich eine Endkonzentration von 5 µg ConA/ml, 5 µg/ml P-DMAE-Peptid oder 1 µg nÜP /ml. Die Platten wurden über 96 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.9.4. Radioaktive Markierung und Ernten der stimulierten Milzlymphozyten

Reagenzien und Lösungen

- ^3H -Thymidin, Stammlösung 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig)
- ^3H -Thymidin Gebrauchslösung: Stammlösung 1:40 verdünnt in RPMI 1640 (s. 3.2.6.)
- Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint Eco Plus (Roth, Karlsruhe)

Durchführung

Nach der Inkubationszeit (s. 3.9.3.) erfolgte eine Markierung der Zellen mit 20 μl ^3H -Thymidin-Gebrauchslösung pro Vertiefung über weitere 18 Stunden. Danach wurden sie mit einem Semiautomatic Cell Harvester (Skatron, Oslo, Norwegen) auf Glasfaser-Sammelfilter für 12-Loch-Zellernter (Malar, Nauheim) geerntet. Nach Trocknung der Filter über Nacht wurden diese in Minivials (Roth, Karlsruhe) mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit verbracht und die enthaltene Radioaktivität in einem β -Liquid-Szintillation-Counter (Hewlett Packard) gemessen.

3.9.5. Stimulation und Ernte der Milzlymphozyten für die RNA-Isolierung

Reagenzien und Lösungen

- RPMI 1640 (s. 3.2.6.)
- RPMI/10%FKS (s. 3.9.1.)
- **nÜP** (s. 3.2.8.)
 - a) Stammlösung: 0,15 μg Protein/ μl in PBS (s. 3.4.3.)
 - b) Gebrauchslösung: 4 μg Protein/ml, Stammlösung verdünnt in RPMI 1640
- **Concavalin A (ConA)-Lösung** (Biochrom KG)
 - a) Stammlösung: 4 mg Trockensubstanz, 5 ml RPMI 1640
 - b) Gebrauchslösung: Stammlösung verdünnt mit RPMI 1640 1:8

Durchführung

100 μl Zellsuspension (s. 3.9.1.) wurden in jede Vertiefung einer 96-er Rundbodenplatte (Nunc) pipettiert. Dazu kamen jeweils 100 μl ConA-

Gebrauchslösung, nÜP (4 µg/ml) oder RPMI. Pro Stimulans wurden für jedes Tier 24 Vertiefungen angesetzt. Im Endvolumen von 200 µl befanden sich 200.000 Zellen und eine Konzentration von 5 µg/ml ConA und 2µg/ml nÜP. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden jeweils die Zellen von identischen Ansätzen vereinigt, zentrifugiert (400 x g, 10 min) und als Pellet weiterverarbeitet.

3.10. Gewinnung von Gesamt-RNA aus stimulierten Milzlymphozyten

Reagenzien und Lösungen

- RNeasy-Kit zur Isolation von Gesamt-RNA (Qiagen, Hilden)
- 2-Mercaptoethanol (2-ME, Serva)
- 70% Ethanol
- RNase free DNase set (Qiagen, Hilden)

Durchführung

Das Zellpellet (s. 3.9.5.) wurde mit 594 µl Lysispuffer aus dem Kit und 6 µl 2-ME lysiert und mit 600 µl 70 %igem Ethanol gemischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Säule aus dem Kit wurde mit der Probe beladen, zentrifugiert (11.000 x g, 30 s) und anschließend mit 350 µl RW 1-Puffer gewaschen (11.000 x g, 30 s). Danach folgten eine DNase-Behandlung mit 80 µl DNase für 15 min und weitere Waschschrte mit Lösungen aus dem Kit: einmal mit 350 µl RW ein- und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer (30 s bei 11.000 x g bei den ersten beiden Schritten, beim letzten Waschen mit 18.000 x g über 3 min, um die Flüssigkeit komplett zu entfernen).

Die RNA wurde nun mit 35 µl RNase-freiem Aqua dest. eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.10.1. Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit dem Spektrophotometer (Ultrospec[®] Plus, Pharmacia) bei 260 nm gemessen.

3.11. Reverse Transkription der Gesamt-RNA und von pMus3-RNA mit DNase-Behandlung

Reagenzien und Lösungen

- M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl, GIBCO BRL)
- 0,1 M Dithiothreitol (DTT, GIBCO BRL)
- 5x Erststrangpuffer (GIBCO BRL)
- Hexanucleotid-Gemisch (Roche, Mannheim)
- dNTP-Gemisch (Fermentas): 10mM Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
- RNase-freie DNase 1 (10 U/µl, Roche, Mannheim)
- pMus3-RNA als interner Standard für die Polymerase-Kettenreaktion, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Taubert, Gießen (Taubert und Zahner 2001)

Durchführung

Bei Proben mit hoher Konzentration an Gesamt-RNA wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben, bei Proben mit geringerer RNA-Konzentration 0,5 oder 0,25 µg RNA. Von der pMus3-RNA, welche als interner Standard in der Polymerase-Kettenreaktion diente, wurde 1 µg RNA umgeschrieben.

Zuerst erfolgte eine DNase-Behandlung (jeweils 1 U DNase pro µg RNA) über 30 min bei 37°C, an die sich eine Hitzeinaktivierung der DNase für 6 min bei 70°C anschloss. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden für die Reverse Transkription pro Probe 1 µl Reverse Transkriptase, 2 µl 0,1 M DTT, 5 µl Erststrangpuffer, 2 µl Hexanucleotid-Gemisch und 1 µl 10 mM dNTP-Gemisch zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert.

Die Probe wurde anschließend mit TE-Puffer verdünnt (27,5 µl bei 0,25 µg RNA, 80 µl bei 0,5 µg und 185 µl bei 1 µg RNA); die entstandene cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

Durchführung

Für jede Probe erfolgte ein Ansatz in 40 µl:

5 µl pMus3-cDNA

5 µl 10x PCR-Puffer

5 µl MgCl₂

4 µl Primer-Gemisch

1,2 µl dNTP-Gemisch

1 µl Taq-Polymerase

18,8 µl Aqua bidest.

Die Komponenten wurden in der benötigten Menge, je nach Anzahl der Proben, gemischt und davon jeweils 40 µl in die Reaktionsgefäße pipettiert. Dazu kamen noch 10 µl von der jeweiligen Maus-cDNA.

Für die PCR wurde folgendes Schema eingesetzt:

1. Denaturierung	95°C	2 min	} n Zyklen
Denaturierung	94°C	40 sec	
Annealing	58°C	1 min	
Verlängerung	72°C	1 min	
Abschlussverlängerung	72°C	10 min	

Die Anzahl der eingesetzten Zykluszahlen variierte je nach Zytokin:

Tab. 3.2. Anzahl der Zyklen (Taubert und Zahner 2001)

mRNA	Zykluszahl
IL-2	31
IL-4	31
IL-5	31
IL-10	30
IL-13	32
IFN γ	29
β 2-Mikroglobulin	27

Anschließend wurden die PCR-Proben in der PAGE aufgetrennt (s. 3.7.2.).

3.12.1. Überprüfung und Optimierung der pMus3-cDNA-Konzentration

In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration der pMus3-cDNA-Konzentration ermittelt, hier sollten zwischen Ziel- und Standardamplifikat ungefähr gleiche Mengenverhältnisse herrschen (Platzer und Blankenstein 1995). Hierfür wurde cDNA von ConA-stimulierten Zellen verwendet, von denen bekannt war, dass sie in großen Mengen die jeweiligen Zytokine produziert hatten. Für folgende Zytokine konnte den Angaben von Taubert und Zahner (2001) gefolgt werden: Für **IFN γ** und **β 2-Mikroglobulin** wurde je 5 pg pMus3-cDNA, für **IL-4** und **IL-5** je 1 pg und für **IL-13** 2 pg verwendet.

Bei **IL-10** und **IL-2** musste die Menge an pMus3-cDNA optimiert werden: Für **IL-10** wurden 2 pg und 5 pg pMus3-cDNA und für **IL-2** 1 pg, 2 pg, 5 pg und 10 pg zugegeben. Die optimale Konzentration von pMus3-cDNA wurde hier nach Analyse in der PAGE bestimmt.

3.13. Quantifizierung der Amplifikate

3.13.1. Auswertung der Gele

Die mit Ethidiumbromid gefärbten und im UV-Licht sichtbar gemachten Banden (s. 3.6.2.) wurden mit Hilfe des Videodokumentationssystems 2000i (MWG-Biotech, Ebersfeld) auf Diskette gespeichert. Die Messung erfolgte in einem Bereich, der nicht im Sättigungsbereich der Kamera lag.

Danach wurden die Banden mit Hilfe der Analyse-Software One-D-Scan (Scanalytics) densitometrisch ausgewertet. Die Werte wurden als integrierte optische Dichte (intOD) angegeben, in das Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft) importiert und dort weiter bearbeitet.

3.13.2. Berechnung der Zytokin-Transkripte

Zur Kontrolle der vorliegenden RNA-Menge diente, neben der photometrischen Bestimmung der RNA-Menge, β 2-Mikroglobulin, ein sog. House-Keeping-Gen. Es sollte in allen Zellen unabhängig vom Stimulationsstatus gleichermaßen transkribiert werden. Als Referenzwert wurde willkürlich der β 2-Mikroglobulin-Wert einer Probe gewählt und mit dem β 2-Mikroglobulin-Wert jeder Probe verrechnet. So wurden die β 2-Mikroglobulin-Werte untereinander angeglichen und vergleichbar gemacht.

- Mengen-Angleichungsfaktor ergibt sich aus dem:

$$\beta 2\text{-Mikroglobulin-Wert der Referenz} / \beta 2\text{-Mikroglobulin-Wert der Probe}$$

Mit Hilfe ihres jeweiligen Mengen-Angleichungsfaktors wurden die Zytokin-Transkripte der Proben angeglichen.

- Angleichung der Proben:

$$\text{Wert des Zytokin-Transkriptes der jeweiligen Probe} \times \\ \text{Angleichungsfaktor der jeweiligen Probe}$$

In jeder PCR wurde eine bekannte Menge an pMus3 als Standard mitamplifiziert, um ein Aussage über die relative Menge an Maus-Zytokin-Transkript machen zu können, so dass in der PAGE für jede Reaktion zwei Banden erschienen. Für die Quantifizierung wurden die Werte für die Zytokin-Transkript-Bande zu den Werten für die jeweilige Bande des pMus3-Transkriptes in Beziehung gesetzt.

- Berechnung der Zytokin-Transkript-Zwischenwerte:

$$\text{Wert für die Bande des jeweiligen Zytokin-Transkriptes} / \\ \text{Wert für die korrespondierende Standardbande}$$

Für die Berechnung des Endwertes wurden die Zwischenwerte mit der jeweiligen Menge des eingesetzten Standards multipliziert.

- Endwert der Zytokintranskripte:

$$\text{Zwischenwert der Zytokin-Transkripte} \times \\ \text{Menge des in der PCR eingesetzten Standards}$$

3.14. Statistische Auswertung

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 unter Verwendung des Statistikprogramms BMDP/Dynamic Release (Dixon, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm EXEL Version 2000 erzeugt. Die Proliferations- und Zytokindaten waren rechtsschief verteilt und mussten vor der Auswertung logarithmiert bzw. wurzeltransformiert werden.

Die Beschreibung der Daten erfolgte mit Hilfe der geometrischen Mittelwerte (x_g) und der Streufaktoren (SF).

Die statistischen Prüfungen wurden mittels:

- zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Behandlung (Proliferationsdaten, Zytokine)
- zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Zeit (Mikrofilarienzahlen)
- einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung im Faktor Behandlung (Proliferationsdaten)
- einfaktorielle Varianzanalyse ohne Messwiederholung (Proliferationsdaten)
- Paarvergleiche gegen die Kontrollgruppe: Dunnett-Test (Zytokine)
- t-Test für unabhängige Stichproben (Wurmbürde und Embryogramme nach Immunisierung)

durchgeführt.

Bei der Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p \leq 0,001$:	hochsignifikant
$p \leq 0,01$:	signifikant
$p \leq 0,05$:	schwach signifikant
$p \geq 0,05$:	nicht signifikant (n.s.)

4. Vorversuche und Versuchsaufbau

4.1. Vorversuche

Zur Sicherung ausreichender Antigenmengen musste eine ökonomische Methode entwickelt werden, um E/S-Produkte von *L. sigmodontis* und damit Juv-p120 in größeren Mengen zu gewinnen. Dafür wurde die Methode der Ankonzentrierung von Überständen *in vitro*-kultivierter präadulter Weibchen etabliert (s. Material und Methoden Kapitel 3.2.8). Außerdem mussten die Konzentrationen der in den Milzzellproliferationsassays zu prüfenden Substanzen (Juv-p120-haltiger *in vitro*-Überstand präadulter Weibchen (nÜP) und P-DMAE-Peptid) ausgetestet werden. Hierbei sollte eine eventuelle Beeinflussung der ConA-induzierten Proliferation von Milzzellen durch nÜP oder P-DMAE-Peptid gemessen werden.

4.2. Hauptversuche

4.2.1. Immunisierung

In einem weiteren Versuch erfolgte eine Immunisierung von Tieren mit nÜP. Dazu wurde eine Gruppe mit 5 *M. coucha* (A 1-5) im Alter von 5 Wochen mit 10 µg nativem Überstand immunisiert (s. 3.6.1.), 14 Tage später mit der halben Menge Antigen geboostert und eine Woche darauf mit 60 L3 infiziert. Die Kontrollgruppe (B 1-5) wurde zu entsprechenden Zeitpunkten vor der Infektion mit Puffer immunisiert. Während des Versuchs wurden Antikörperproduktion und Mikrofilariämie untersucht; 120 Tage p.i. wurden die Tiere seziiert und die Wurmbürde bestimmt.

Analog zu diesem Versuch wurden BALB/c-Mäuse mit nÜP immunisiert. Die Gruppen bestanden aus je 6 Tieren (C 1-6; D 1-6), die mit je 120 L3 infiziert wurden. Die Sektion fand 80 Tage p.i. statt.

4.2.2. Proliferation

In einem ersten Versuch sollte die Proliferation von Milzlymphozyten auf ConA-Stimulation mit gleichzeitiger Inkubation von nÜP und P-DMAE-Peptid in verschiedener Konzentration und somit ein eventueller proliferationshemmender Einfluss dieser Substanzen gemessen werden. Als Versuchstiere wurden qualitativ mit *L. sigmodontis* infizierte *M. coucha* und Balb/c-Mäuse, die quantitativ mit 60 L3 infiziert worden waren, verwendet.

nÜP (s. 3.2.8.) wurde bei beiden Tierarten in den Proliferationsassays getestet, P-DMAE-Peptid nur bei *M. coucha*. Bei *M. coucha* bestand eine Gruppe aus 6 Tieren, bei BALB/c-Mäusen aus 5 Tieren. Die Untersuchungstermine wurden so gelegt, dass verschiedene Zeitpunkte der Infektion erfasst wurden, wobei besondere Aufmerksamkeit der späten Präpatenz galt, da sich in früheren Studien erwiesen hatte, dass vor allem präadulte *L. sigmodontis*-Weibchen in größeren Mengen Juv-120 sezernieren.

Untersuchungszeitpunkte:

- Tag 0 p.i. - nicht infizierte Kontrollen (ca. vier Monate alt)
- Tag 24 p.i. - Häutung von L4 zum präadulten Parasiten
- Tag 38 p.i. - Beginn der starken Juv-p120-Sekretion
- Tag 44 p.i. - Ende der starken Ju-p120-Sekretion
- Tag 70 p.i. - (BALB/c-Mäuse)/ -100 p.i. (*M. coucha*) - Patenz
- Tag 160 p.i. - (BALB/c-Mäuse)/ - 300 p.i. (*M. coucha*) – Postpatenz

4.2.3. Zytokinmessungen

Im zweiten Versuch wurde gleichzeitig mit den Proliferationsassays aus mit ConA oder ankonzentriertem Überstand stimulierten Milzlymphozyten von BALB/c-Mäusen Gesamt-RNA isoliert. Hieraus sollte im Infektionsverlauf die Produktion von IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR gemessen werden.

Dafür wurden erst die RNA-Proben aus dem gesamten Versuch gesammelt, dann folgte fortlaufend die cDNA-Synthese in labortechnisch praktikablen Gruppen. Für jedes Zytokin wurde ein PCR-Lauf mit jeweils 88 Proben und identischen Reagenzien gefahren, so dass möglichst gleiche Bedingungen geschaffen waren. Nach der PCR aller Proben erfolgten die Auftrennung in der PAGE und die Auswertung der Gele.

5. Ergebnisse

5.1. Gewinnung von Juv-p120 *in vitro* aus präadulten weiblichen *L. sigmodontis* sowie Anreicherung

Um Juv-p120 von präadulten *L. sigmodontis*-Weibchen zu gewinnen, wurden 39 Tage alte Weibchen *in vitro* kultiviert. Bei der Immunoblotanalyse der gewonnenen Überstände konnte unter Verwendung von Anti-Juv immunreaktives Material in Form von zwei bis vier Banden in einem Bereich von 130-150 kDa nachgewiesen werden. Sie wurden in der Folge als Juv-p120 angesehen (Abb. 5.1.). Der Proteingehalt lag allerdings unterhalb der mit dem Bradfordtest messbaren Konzentrationen.

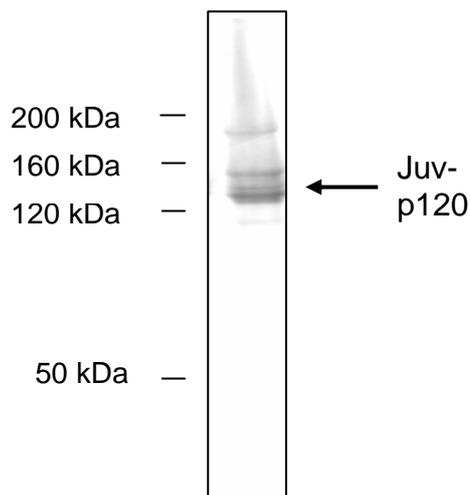


Abb. 5.1.
Immunoblot mit *in-vitro*-
Überstand von 10
präadulten *L. sigmodontis*-
Weibchen; PAGE: 5%iges
Trenngel; Antiserum:
Anti-Juv; Konjugat: Anti-
Rabbit-IgG (Fc)-AP

Die Ankonzentrierung der Überstände mit dem des Vivaspin 20[®]-System erwies sich als einfache Methode, große Mengen an Überständen auf ein kleines Volumen zu reduzieren. Dabei blieben Proteine >100 kDa, also auch Juv-p120 mit mindestens 120 kDa, in dem ankonzentrierten Überstand, während kleinere Proteine mit dem Durchlauf durch die Membran zentrifugiert und so entfernt wurden. Die Proteine im

Überstand wurden dabei ungefähr um den Faktor Hundert ankonzentriert und waren so mit dem Bradfordtest messbar. Für die Gewinnung des gesamten benötigten Materials wurden insgesamt über 14.000 Würmer *in vitro* kultiviert. Dabei wurden ca. 1,8 Liter Überstände verarbeitet und so 3,2 mg Material gewonnen.

Die ankonzentrierten Überstände und Durchläufe wurden mittels Immunoblot und PAGE (Silberfärbung) untersucht (Abb. 5.2. und 5.3.).

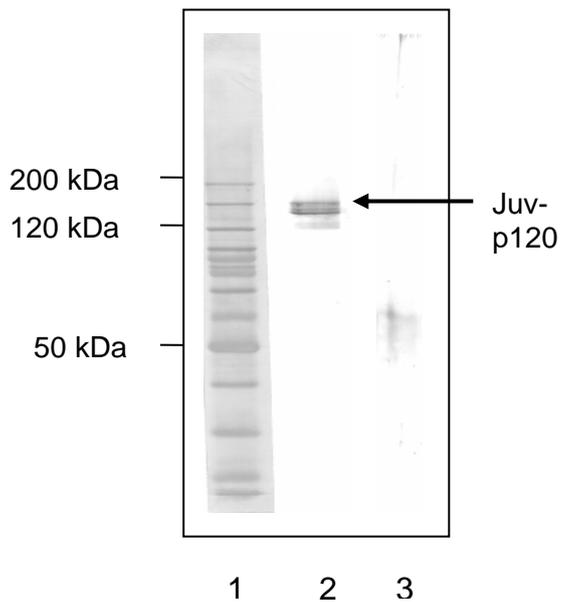


Abb. 5.2.
 Immunoblot mit ca. 100fach
 ankonzentriertem *in vitro*-
 Überstand präadulter
 weiblicher *L. sigmodontis*;
 7,5%iges Trenngel;
 Antiserum: Anti-Juv;
 Konjugat: Anti-Rabbit-IgG
 (Fc)-AP

- (1) Marker
- (2) ankonzentrierter *in vitro*-Überstand präadulter Weibchen; Auftrag: 10 ng Protein
- (3) Durchlauf aus der Vivaspin 20[®]-Zentrifugation

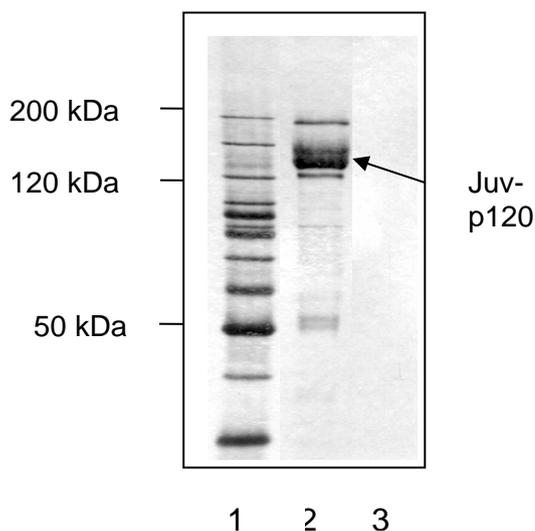


Abb. 5.3
 Überstand und
 Zentrifugationsdurchlauf in
 der PAGE (Silberfärbung);
 Auftrennung in einem
 7,5%iges Gel

- (1) Marker
- (2) ankonzentrierter *in vitro*-Überstand präadulter Weibchen; Auftrag: 10 ng Protein
- (3) Durchlauf aus der Vivaspin 20[®]-Zentrifugation

Juv-p120 war in den ankonzentrierten Überständen in deutlich nachweisbaren Mengen vorhanden; der Anteil von Juv-p120 am im Überstand enthaltenen Protein betrug nach PAGE abgeschätzt (Abb. 5.3.) über 50%. Im Durchlauf lag der Proteingehalt außerhalb des mit dem Bradfordtest messbaren Bereichs; im Immunoblot konnte kein Juv-p120 nachgewiesen werden. Nach der Ankonzentrierung lag der Proteingehalt im Überstand zwischen 0,2 und 0,4 µg Protein/ µl.

Der ankonzentrierte Überstand enthielt zwar überwiegend Juv-p120, aber es waren noch andere Proteine enthalten (vgl. Abb. 5.3.). Deshalb wurde von M. Hintz (Institut für Biochemie im Klinikum, JLU Gießen) freundlicherweise eine zusätzliche Reinigung mittels HPLC (Hintz et al. 1998) durchgeführt. Das gereinigte Material wurde im Immunoblot getestet (Abb. 5.4).

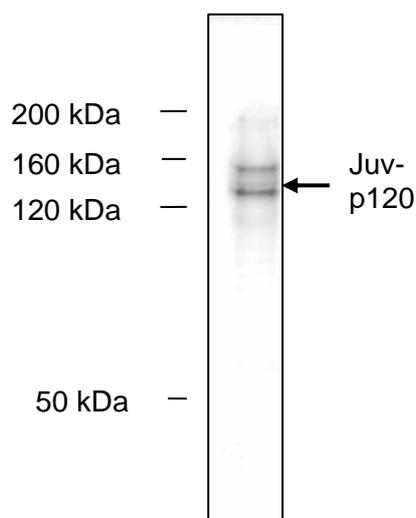


Abb. 5.4.
Immunoblot mit ankonzentriertem, HPLC-gereinigtem *in vitro*-Überstand präadulter weiblicher *L. sigmodontis*; 7,5 %iges Trenngel; Antiserum: Anti-Juv; Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP

Auch hier ließ sich Juv-p120 im Immunoblot nachweisen. Nach der Aufreinigung konnte allerdings kein Proteingehalt mehr gemessen werden, da die Probe dabei sehr stark verdünnt wurde. Weil der Anteil von Juv-p120 bereits im nicht gereinigten, ankonzentrierten Überstand relativ hoch (vermutlich >50%, sichtbar in der Silberfärbung siehe 5.3.) war und mit der HPLC-Reinigung offensichtlich ein deutlicher Materialverlust verbunden war, wurde auf eine zusätzliche Aufreinigung verzichtet.

5.2. Serologische Kreuzreaktionen von Anti-Juv und P-DMAE-Peptid

Die Reaktivität des P-DMAE-modifizierten Peptids mit Anti-Juv wurde im Dotblot überprüft (Abb. 5.5).

Als Negativkontrolle diente dabei das nicht modifizierte Peptid, als Positivkontrolle wurde Homogenat von präadulten *L. sigmodontis*-Weibchen (40 Tage p.i.) verwendet.

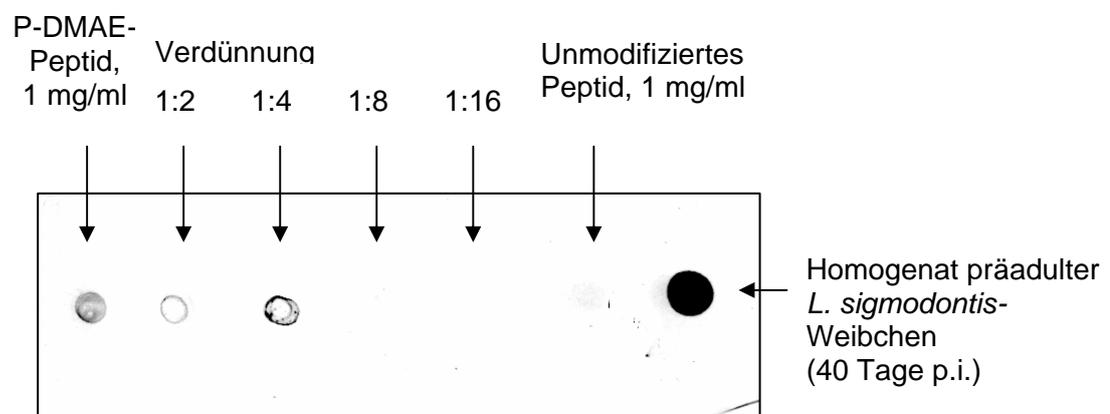


Abb. 5.5.

Immunreaktivität des P-DMAE-modifizierten und nicht modifizierten Peptids gegen Anti-Juv im Vergleich zum Homogenat aus präadulten *L. sigmodontis*-Weibchen; Antiserum: Anti-Juv; Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP

P-DMAE-Peptid reagierte bis zu einer Verdünnung von 1:4 (0,25 µg/ml) mit Anti-Juv, das nicht modifizierte Peptid band Anti-Juv nicht (Abb. 5.7).

5.3. Synthese von mit Juv-p120 kreuzreagierenden Molekülen in verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis*

Im *L. sigmodontis*-Infektionsverlauf traten bei BALB/c-Mäusen am Tag 14 p.i. bereits Antikörper gegen Juv-p120 auf (Abb. 5.11.). Hier sollte untersucht werden, ob Juv-p120 schon in L3- oder in L4-Homogenaten vorhanden ist, da offensichtlich ein Kontakt der BALB/c-Mäuse mit Juv-p120 während der Infektion schon sehr früh

stattfind. Dazu wurden Homogenate von L3 (Tag 8 p.i.) und L4 (Tag 18 p.i.) im Immunoblot untersucht (Abb. 5.6. und 5.7.). Da die Homogenate durch Aufkochen mit Probenpuffer hergestellt wurden (vgl. 3.2.10.), konnte keine Proteinmessung nach Bradford vorgenommen werden. Um die Proteinmenge beurteilen zu können, wurde parallel zum Immunoblot eine PAGE mit der gleichen Menge Homogenat durchgeführt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Wegen der großen Menge niedermolekularer Proteine und dadurch bedingter Kreuzreaktionen wurde nur mit dem oberen Teil (>100kD) ein Immunoblot durchgeführt. Der Vollständigkeit halber wurde der untere Teil nach Coomassiefärbung mit abgebildet.

5.3.1. Synthese in L3

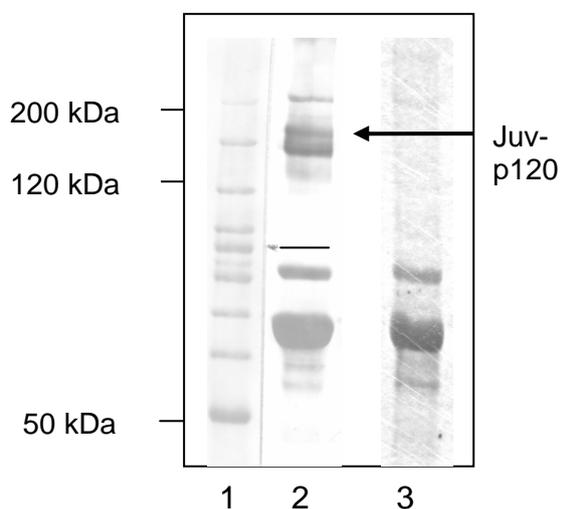


Abb. 5.6.
Immunoblot und PAGE
(Coomassiefärbung) von *L. sigmodontis*-
L3-Homogenat (8 Tage p.i.), PAGE:
7,5%iges Trenngel

- (1) Marker
- (2) Oberer Teil: Immunoblot, 20 μ l
Auftrag, Antiserum: Anti-Juv,
Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-
AP
Unterer Teil: Coomassiefärbung
der Membran
- (3) PAGE mit Coomassie gefärbt,
ebenfalls 20 μ l Auftrag

5.3.2. Synthese in L4

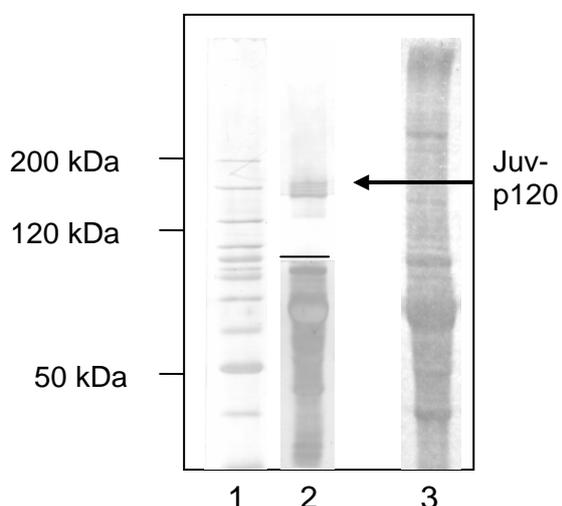


Abb. 5.7.
Immunoblot und PAGE
(Coomassiefärbung) von *L. sigmodontis*-
L4-Homogenat (18 Tage p.i.), PAGE:
7,5%iges Trenngel

- (1) Marker
- (2) Oberer Teil: Immunoblot, 4 μ l
Auftrag, Antiserum: Anti-Juv,
Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-
AP
Unterer Teil: Coomassiefärbung
der Membran
- (3) PAGE mit Coomassie gefärbt,
ebenfalls 4 μ l Auftrag

Antikörper gegen Juv-p120 reagierten sowohl mit L3- als auch L4-Homogenat, d.h. Juv-p120 wurde bereits an Tag 8 und 18 p.i. synthetisiert. Im L3-Homogenat war laut der coomassiegefärbten PAGE deutlich weniger Protein als im L4-Homogenat enthalten. Trotz der geringeren Proteinmenge trat im Immunoblot mit L3-Homogenat eine deutliche Reaktion von Juv-p120 mit Anti-Juv auf.

5.3.3. Synthese in weiblichen adulten *L. sigmodontis*

Als Kontrolle für die anschließenden Proliferationsassays war ankonzentrierter Überstand von adulten *L. sigmodontis*-Weibchen (123 Tage p.i.) vorgesehen.

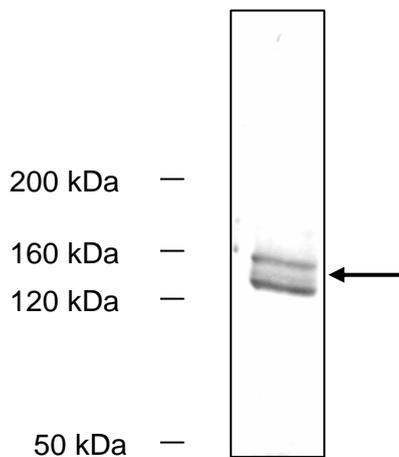


Abb. 5.8.
Immunoblot mit ankonzentriertem *in vitro*-Überstand adulter *L. sigmodontis*-Weibchen (123 Tage p.i.); 5%iges Trenngel, Auftrag: 0,1 µg Protein; Antiserum: Anti-Juv, Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP

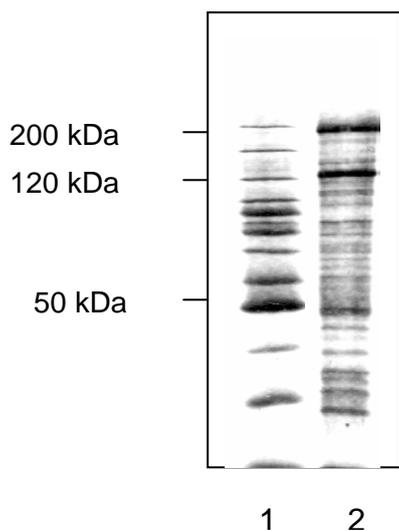


Abb. 5.9.
SDS-PAGE (7,5%iges Trenngel, Silberfärbung) mit ankonzentriertem *in vitro*-Überstand adulter *L. sigmodontis*-Weibchen (123 Tage p.i.)
(1) Marker
(2) Ankonzentrierter Überstand adulter *L. sigmodontis*-Weibchen (123 d p.i.) Auftrag: 1 µg Protein

Im ankonzentrierten *in vitro*-Überstand der adulten Weibchen ließ sich mit Anti-Juv reagierendes Material in Form von zwei bis vier Banden im Bereich von 130 bis 150 kDa nachweisen (Abb. 5.8.). Allerdings war die Menge so gering, dass ein Nachweis nur im Immunoblot gelang, nicht jedoch mit der Silberfärbung (Abb. 5.9.).

5.4. Nachweis von Juv-p120 im Blut *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse

In früheren Untersuchungen war Juv-p120 im Plasma von *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* an den Tagen 41 und 45 p.i. nachgewiesen worden (Taubert, pers. Mitteilung). Hier sollte untersucht werden, ob Juv-p120 auch im Plasma von infizierten BALB/c-Mäusen zu finden ist. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. Blutproben von jeweils sechs BALB/c-Mäusen entnommen, die vorher mit je 120 L3 infiziert worden waren. Aus den Blutproben wurde Plasma gewonnen und als Pools im Immunoblot untersucht.

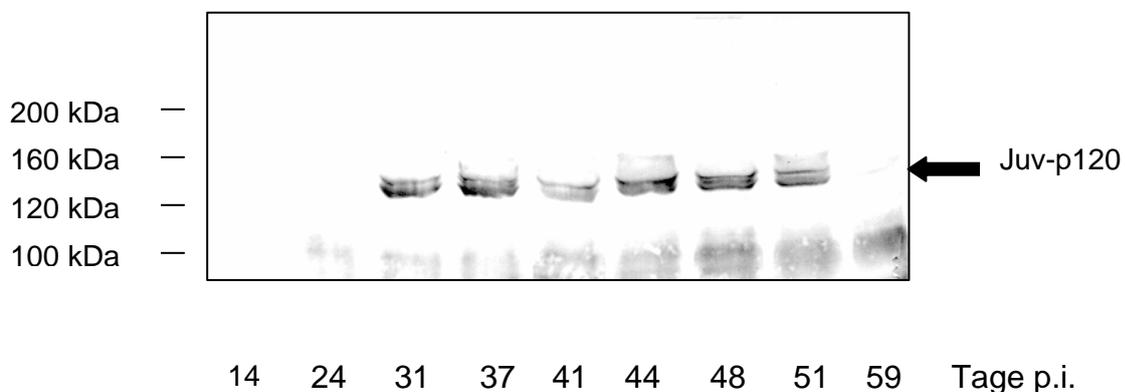


Abb. 5.10.
Nachweis von Juv-p120 im Blutplasma *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse im Immunoblot; Auftrennung von 14-59 Tage p.i. isolierten gepoolten Plasmaproben; Antiserum: Anti-Juv; Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP.

Juv-p120 war von Tag 31 bis Tag 51 p.i. im Plasma von BALB/c-Mäusen nachweisbar (Abb. 5.10.).

5.5. Nachweis von Antikörpern gegen Juv-p120 in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c-Mäusen und *M. coucha*

Um die Antikörperproduktion von mit 120 L3 quantitativ infizierten BALB/c-Mäusen und natürlich infizierten *M. coucha* gegen Juv-p120 im Verlauf der Infektion zu überprüfen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. Serumproben von jeweils 4 Einzeltieren genommen und im Immunoblot gegen Juv-p120 untersucht (Abb. 5.11.). Im Präinfektionsserum waren keine Antikörper gegen Juv-p120 enthalten; dagegen wiesen die BALB/c-Sera am Tag 14 p.i. bereits geringe Mengen an Antikörpern gegen Juv-p120 auf. Am Tag 21 p.i. waren dann deutlich höhere Mengen an Antikörpern vorhanden. Diese Konzentrationen blieben bis einschließlich Tag 56 p.i. etwa konstant. An den Tagen 70 und 160 p.i. fanden sich nur noch sehr geringe Mengen an Antikörpern gegen Juv-p120.

Bei *M. coucha* konnten Antikörper an den Tagen 35 und 56 p.i. nachgewiesen werden, an den übrigen Tagen waren keine Antikörperspiegel messbar (nicht abgebildet).

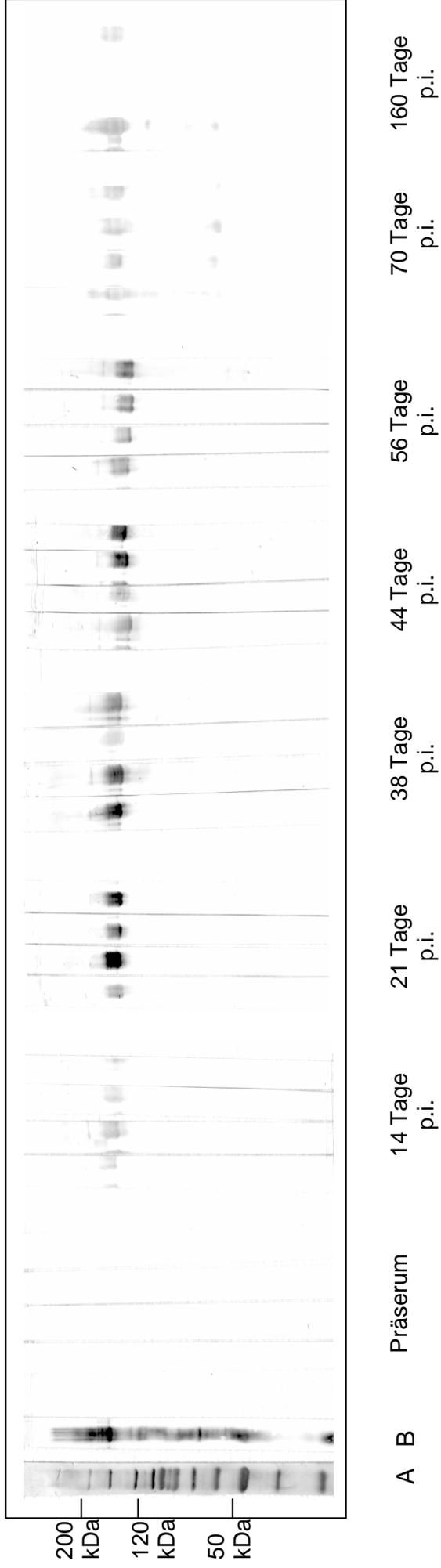


Abb. 5.11.
 Nachweis von Antikörpern gegen Juv-p120 im Serum *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse im Immunoblot;
 Antigen: nÜP (je 250 ng Protein pro Spur); Antiserum: BALB/c-Sera (Verdünnung 1: 1.000) von je vier Einzeltieren
 zu verschiedenen Zeitpunkten (14-160 Tage p.i.); Konjugat: Anti-Mouse-IgG (H&L)-AP; A: Marker; B: *L.*
sigmodontis-Weibchenantigen (40 Tage p.i.)

5.6. Effekte einer Immunisierung von *M. coucha* und BALB/c-Mäusen mit Juv-p120

5.6.1. Produktion von Antikörpern gegen Juv-p120 nach der Immunisierung

Die Antikörperantwort von *M. coucha* und BALB/c-Mäusen gegen Juv-p120 wurde mit nÜP-immunisierten und danach durch eine experimentelle, quantitative Infektion (s. 4.2.1.) belasteten Tieren überprüft. Zur Kontrolle dienten Tiere, die vor der Infektion mit PBS immunisiert wurden. In Abb. 5.12. wurde beispielhaft die Reaktion je eines Tieres pro Gruppe dargestellt, da innerhalb der Gruppen nahezu identische Reaktionen auftraten.

In den Präimmunseren waren bei keinem der Tiere Antikörper gegen Juv-p120 vorhanden. Alle mit nÜP immunisierten Tiere wiesen eine Woche nach der zweiten Immunisierung unmittelbar vor der Belastungsinfektion Antikörper gegen Juv-p120 auf. Die Antikörperkonzentration nahm bei BALB/c-Mäusen nach der Infektion bis zu letzten Messung am Tag 56 p.i. zu; bei infizierten *M. coucha* kam es zwischen dem 35. und 56. Tag p.i. zum Abfall der Antikörperspiegel. Auch die mit PBS immunisierten Tiere entwickelten nach der Infektion Antikörper. Die Antikörperspiegel waren abgesehen vom letzten Untersuchungstermin stets niedriger als bei den mit nÜP immunisierten Gruppen.

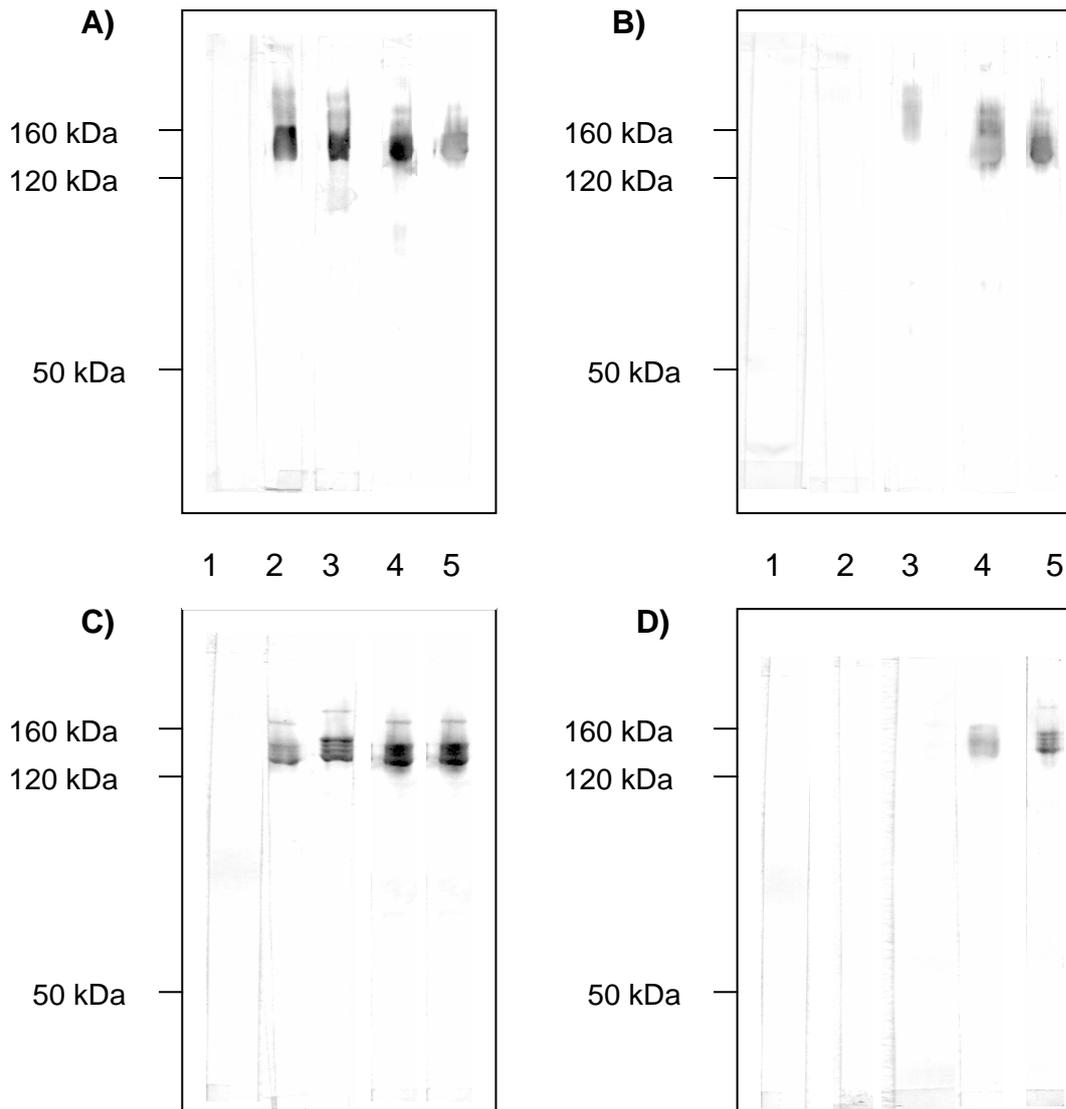


Abb. 5.12.

Nachweis von Antikörpern gegen Juv-p120 im Serum *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse und *M. coucha* im Immunoblot; Antigen: nÜP (je 250 ng Protein pro Spur), Antiserum: Serum einer

- A)** *M. coucha*, immunisiert mit nÜP; 2. Antikörper: Anti-Mastomys-IgG-Serum; Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP
 - B)** *M. coucha*, immunisiert mit PBS; 2. Antikörper: Anti-Mastomys-IgG-Serum; Konjugat: Anti-Rabbit-IgG (Fc)-AP
 - C)** BALB/c-Maus, immunisiert mit nÜP; Konjugat: Anti-Mouse-IgG (H&L)-AP
 - D)** BALB/c-Maus, immunisiert mit PBS, Konjugat: Anti-Mouse-IgG (H&L)-AP
- (1) Präserum
 (2) Tag 0 (vor der Infektion)
 (3) Tag 14 p.i.
 (4) Tag 35 p.i.
 (5) Tag 56 p.i.

5.6.2. Einfluss der Immunisierung auf die Parasitämie nach Belastungsinfektion

Die durchschnittliche Mikrofilariämie bei mit PBS immunisierten, infizierten *M. coucha* nahm nach einer Präpatenz von 49 Tagen bis zum Tag 91 p.i. kontinuierlich auf eine Dichte von ca. 75 Mikrofilarien/ μ l Blut zu und ging danach bis zum Untersuchungsende 119 Tage p.i. auf etwa die Hälfte zurück (Abb. 5.13.).

5.6.2.1. Effekte bei *M. coucha*

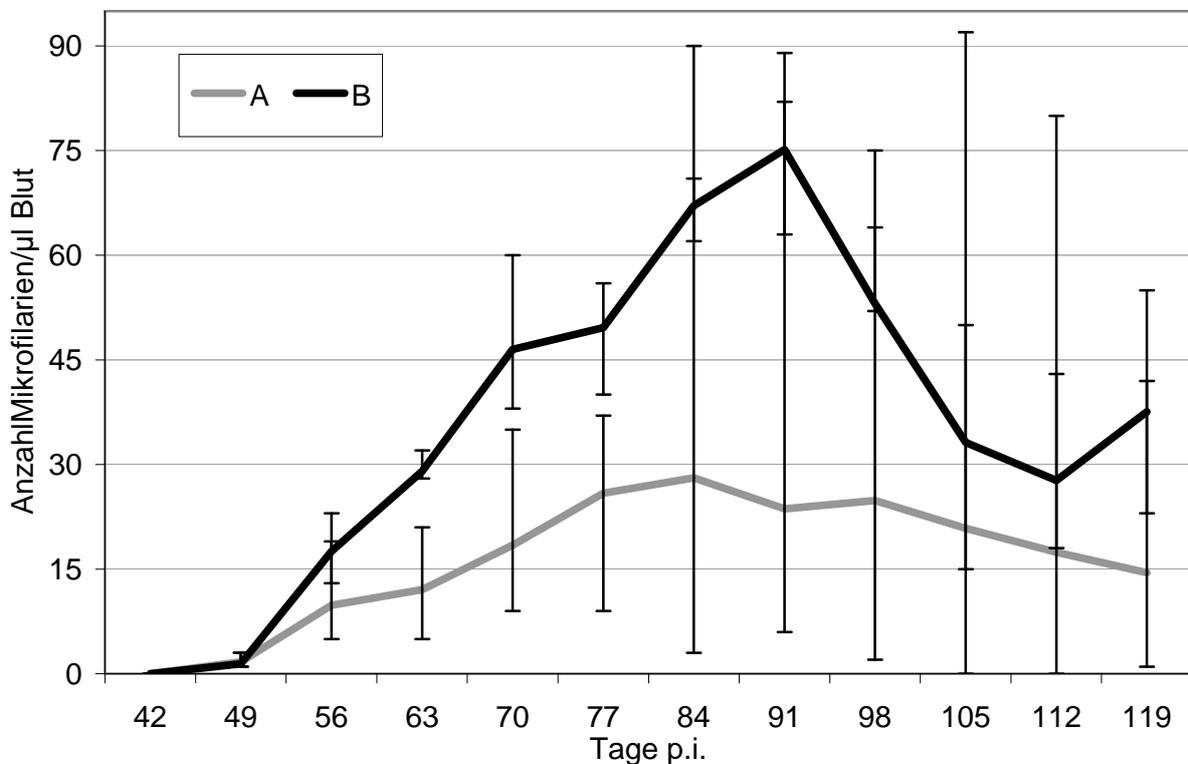


Abb. 5.13.

Mikrofilariämie nach Immunisierung von *M. coucha* und anschließender Belastungsinfektion mit 120 *L. sigmodontis*-L3

(A) mit nÜP immunisierte Gruppe

(B) mit PBS immunisierte Kontrollgruppe

Die Abbildung gibt die modifizierten Medianwerte und die Quartilsabstände wieder.

Bei der mit nÜP immunisierten Gruppe (Gr. A) war die Mikrofilariämie gegenüber der Kontrollgruppe (Gr. B) deutlich reduziert, doch erreichten die Unterschiede wegen der großen individuellen Schwankungen und der Gruppengröße ($n=5$) kein

signifikantes Niveau. Am deutlichsten zeigten sich diese Unterschiede zwischen Tag 84 und 98 p.i. in der Hochphase der Patenz (Abb. 5.13). Ab Tag 105 p.i. waren sie nicht mehr deutlich ausgeprägt.

5.6.2.2. Effekte bei BALB/c-Mäusen

Bei mit 120 L3 infizierten BALB/c-Mäusen waren im Infektionsverlauf nur vereinzelt und unregelmäßig Mikrofilarien im Blut nachweisbar (ohne Abb.).

5.6.3. Einfluss der Immunisierung auf die Anzahl adulter *L. sigmodontis* nach Belastungsinfektion

Am Tag 80 p.i. (BALB/c-Mäuse) bzw. Tag 120 p.i. (*M. coucha*) wurden die Tiere getötet und die Wurmbürden getrennt nach männlichen und weiblichen *L. sigmodontis* bestimmt. Verkapselte Parasiten wurden getrennt erfasst. Zur Berechnung der Rückfindungsraten wurden nur lebende Würmer einbezogen.

5.6.3.1. Effekte bei *M. coucha*

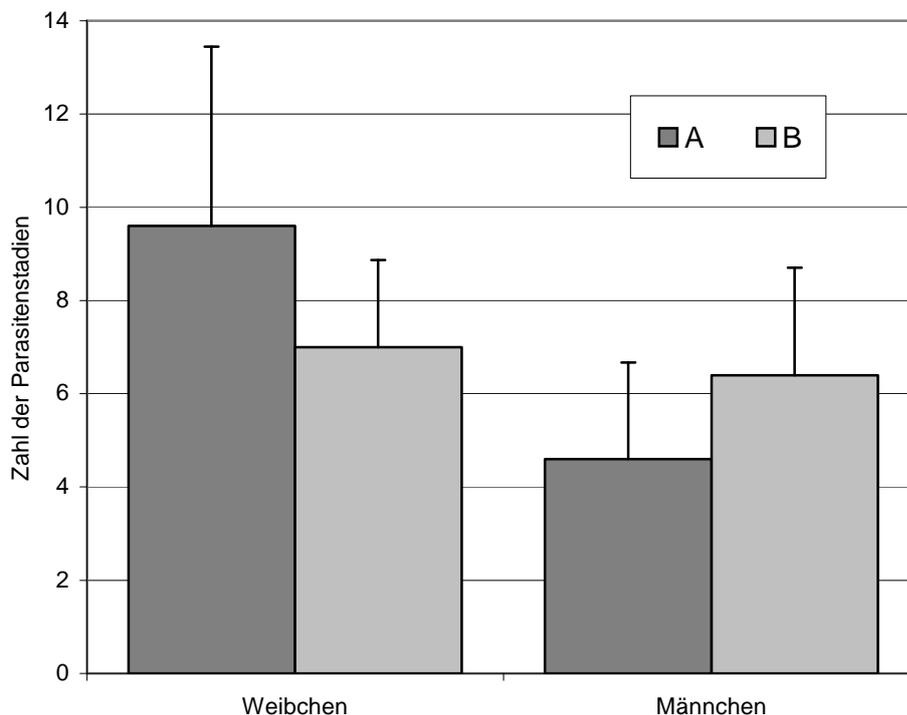


Abb. 5.14. Wurmbürden bei *M. coucha* nach Immunisierung und anschließender Belastungsinfektion mit 120 L3 von *L. sigmodontis* am Tag 120 p.i.

(A) Gruppe A, Immunisierung mit nÜP

(B) Gruppe B, Immunisierung mit PBS

Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen wieder.

Alle Tiere des Versuches waren infiziert. Die Rückfindungsrate lag mit durchschnittlich 23% (Gruppe A: 23,7%; Gruppe B: 22,3%) deutlich höher als bei den BALB/c-Mäusen. Verkapselte Parasiten traten nicht auf (Abb. 5.14.).

Die Anzahl an Weibchen bzw. Männchen unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant. Auffällig erschien bei der mit nÜP immunisierte Gruppe ein Tier (A3), bei welchem im gesamten Infektionsverlauf keine Mikrofilarien nachweisbar waren, das aber bei der Sektion adulte Filarien (5 Weibchen, 2 Männchen) aufwies.

5.6.3.1. Effekte bei BALB/c-Mäusen

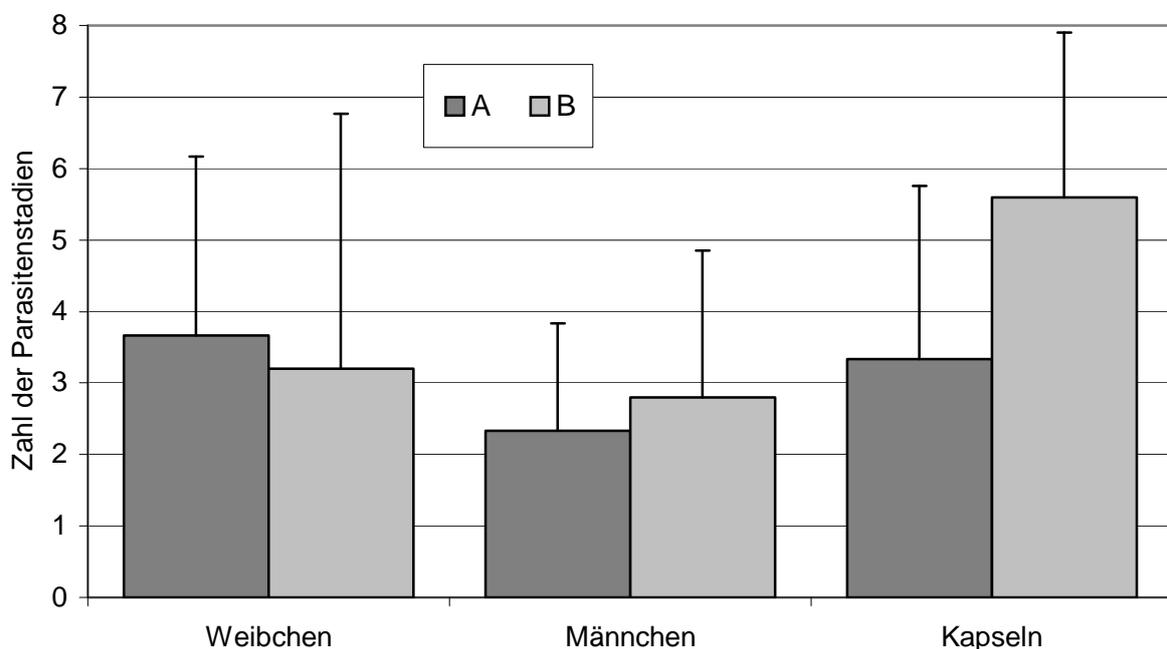


Abb. 5.15.

Wurmbürden bei Balb/c-Mäusen nach Immunisierung und anschließender Belastungsinfektion mit 120 L3 von *L. sigmodontis* an Tag 80 p.i.

(A) Gruppe A, Immunisierung mit nÜP

(B) Gruppe B, Immunisierung mit PBS

Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen wieder.

Alle BALB/c-Mäuse des Versuches waren infiziert. Die Rückfindungsrate war mit 5 % in beiden Gruppen sehr niedrig. Fast alle BALB/c-Mäuse enthielten verkapselte Parasitenstadien (Abb. 5.15.) die Zahl lag mit 3,3 Kapseln in Gruppe A niedriger als in Gruppe B mit 5,6 Kapseln (nicht signifikant). Die Anzahl an weiblichen bzw. männlichen Parasiten differierte nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

5.6.4. Einfluss der Immunisierung auf intrauterine Entwicklungsstadien von *L. sigmodontis* nach Belastungsinfektion

Nach der Bestimmung der Wurmbürde wurde aus je zwei *L. sigmodontis*-Weibchen pro Tier ein Embryogramm angefertigt.

5.6.4.1. Effekte bei *M. coucha*

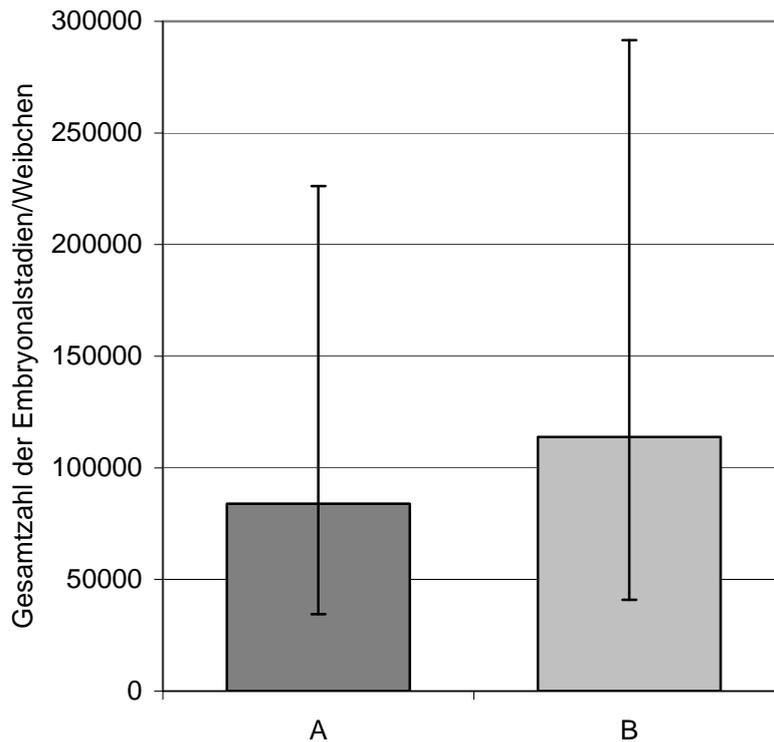


Abb. 5.16.
Embryogramm:
Anzahl intrauteriner Entwicklungsstadien pro weibliche *L. sigmodontis* aus immunisierten *M. coucha* nach Infektion mit 60 L3, 120 Tage p.i.
(A) Gruppe A, Immunisierung mit nÜP
(B) Gruppe B, Immunisierung mit PBS
Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

Die Gesamtzahl der Embryonalstadien war in Gruppe A (83.960 Embryonalstadien/Weibchen) geringfügig und nicht signifikant gegenüber Gruppe B (113.833 Embryonalstadien/Weibchen) vermindert (Abb. 5.16.).

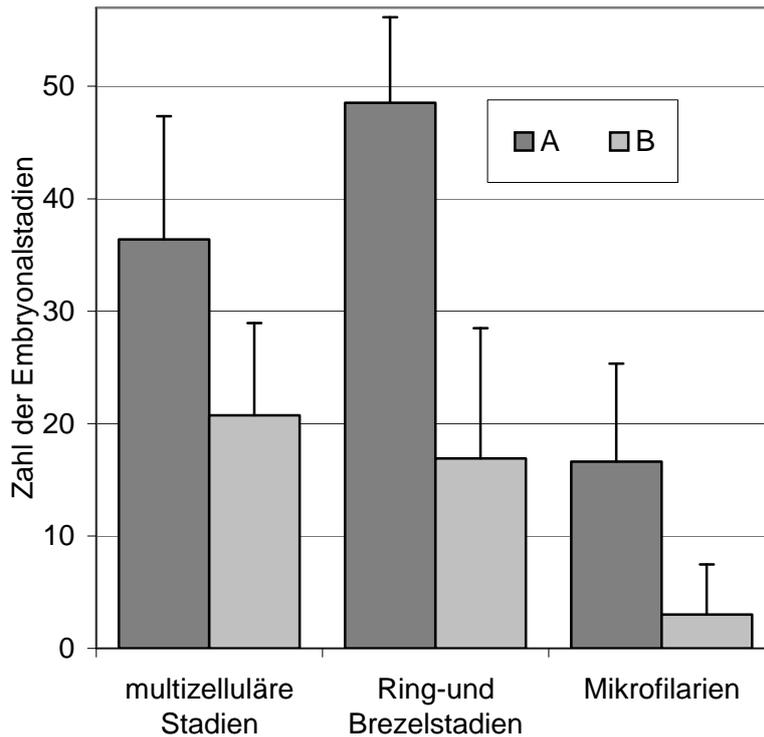


Abb. 5.17. Embryogramm: Prozentualer Anteil pathologischer intrauteriner Entwicklungsstadien in weiblichen *L. sigmodontis* an multizellulären Stadien, Ring- und Brezelstadien und Mikrofilarien aus immunisierten *M. coucha* nach Infektion mit 60 L3, 120 Tage p.i. (A) Gruppe A, Immunisierung mit nÜP (B) Gruppe B, Immunisierung mit PBS Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen wieder.

Der Anteil an pathologischen Embryonalstadien war bei der mit nÜP immunisierten Gruppe (Gr. A) signifikant erhöht (Abb. 5.17.). Bei den multizellulären Stadien lag der Anteil an pathologisch veränderten Embryonalstadien bei 36,4%, in der Kontrollgruppe (Gr. B) bei 20,7% ($p \leq 0,05$). Am deutlichsten war der Unterschied bei den Ring- und Brezelstadien: in Gruppe A lag der Anteil bei 48,5%, in Gruppe B bei 16,9% ($p \leq 0,01$). Der Anteil an pathologisch veränderten Mikrofilarien war in Gruppe A ebenfalls signifikant erhöht (16,6%), in Gruppe B lag er bei 3% ($p \leq 0,01$).

5.6.4.2. Effekte bei BALB/c-Mäusen

In den Embryogrammen bei BALB/c-Mäusen fanden sich in beiden Gruppen nur einzellige Strukturen, andere Embryonalstadien waren nicht vorhanden.

5.7. Stimulierbarkeit von Milzlymphozyten (Proliferationsassay) *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse und *M. coucha* mit ConA, Juv-p120 und P-DMAE-Peptid sowie Beeinflussung der ConA-Stimulation durch Juv-p120 und P-DMAE-Peptid

5.7.1. Vorversuche zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen von Juv-p120 und P-DMAE-Peptid

Es sollte ein Einfluss von nÜP und P-DMAE-Peptid auf die ConA-stimulierte Proliferation überprüft werden. Die geeigneten Konzentrationen der Substanzen in den Proliferationsassays mit simultaner ConA-Stimulation wurden in Vorversuchen mit Milzlymphozyten von infizierten (120 Tage p.i.) *M. coucha* ermittelt. Für das P-DMAE-Peptid wurden für den Hauptversuch Konzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 20 µg/ ml gewählt, bei nativen Überstand kamen Konzentrationen von 0,2, 0,5, 1, 2 und 4 µg/ ml zum Einsatz.

P-DMAE-Peptid wurde zudem in Konzentration von 5 µg/ ml als alleiniges Antigen ohne ConA-Stimulation eingesetzt, um eine mitogene Wirkung des Peptids zu überprüfen. P-DMAE-Peptid allein wirkte nicht stimulierend auf Milzlymphozyten. Bei Koinkubation von ConA und P-DMAE-Peptid kam es zu sehr variablen Ergebnissen (Abb. 5.18). Während bei einem Tier eine dosisabhängige Suppression der Proliferation nach ConA-Stimulation beobachtet werden konnte und bei 10 µg/ml eine Proliferation unterblieb, waren bei den anderen Tieren 40 µg/ml (Tier B) bzw. 20 und 40 µg/ml (Tier C) nötig, um die Proliferation zu unterbinden.

Im Falle von nÜP war kein klarer negativer Einfluss auf die ConA-induzierte Proliferation zu erkennen (Abb. 5.19 A-C); bei einem Tier deutete sich eher eine Steigerung an (Abb. 5.19 A).

Für die Hauptversuche wurden folgende Konzentrationen gewählt:

- P-DMAE-Peptid: 2, 5, 10 und 20 µl/ml
- nÜP: 0,2; 0,5; 1; 2 und 4 µl/ml

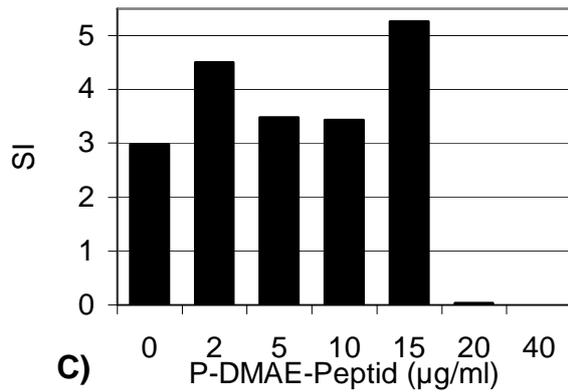
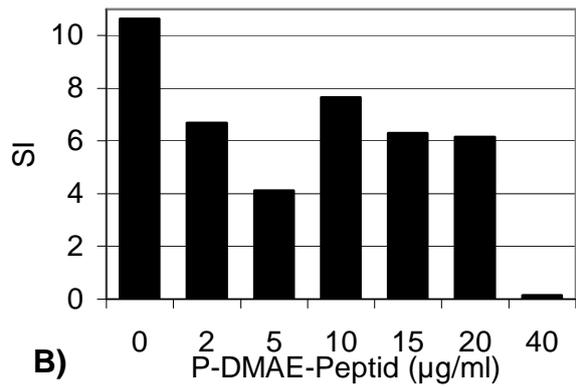
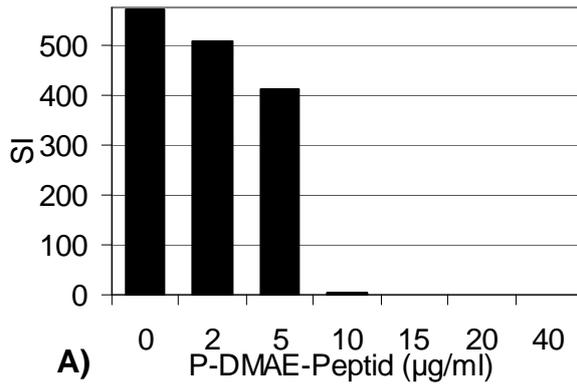


Abb. 5.18.

Einfluss von P-DMAE-Peptid auf die ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten aus *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* (120 Tage p.i.): Proliferation [dargestellt als Stimulationsindex (SI)] unter dem Einfluss ansteigender Mengen an P-DMAE-Peptid bei Zellen aus drei Einzeltieren (A, B, C)

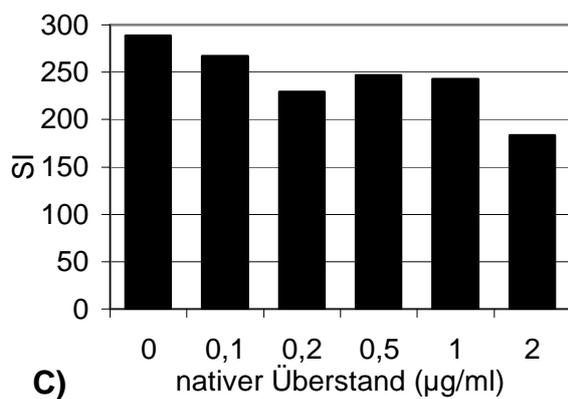
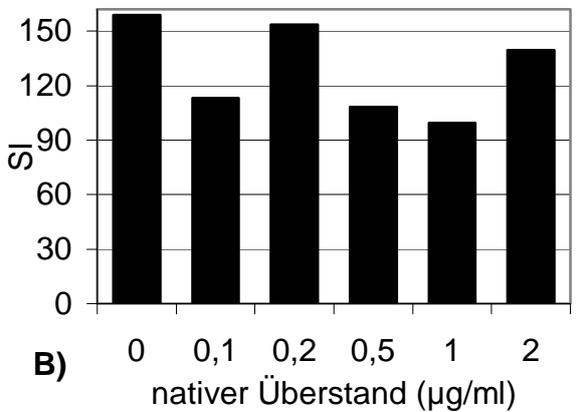
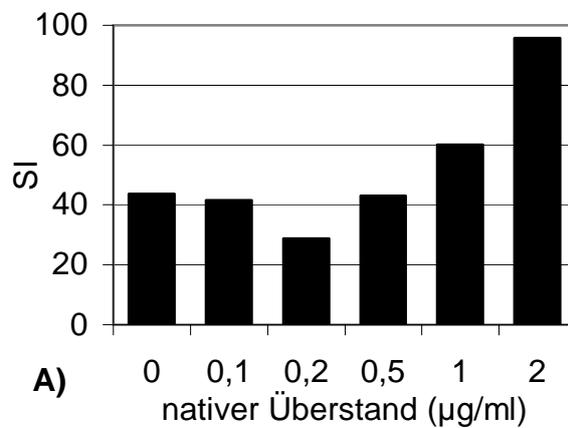


Abb. 5.19.

Einfluss von nÜP auf die ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten aus *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* (120 Tage p.i.): Proliferation [dargestellt als Stimulationsindex (SI)] unter dem Einfluss ansteigender Mengen an nÜP bei Zellen aus drei Einzeltieren (A, B, C)

5.7.2. Wurmbürde der Versuchstiere

5.7.2.1. *M. coucha*

Die Wurmbürden der natürlich infizierten, für die Experimente eingesetzten *M. coucha* sind in Abb. 5.20 verzeichnet. Für Experimente in der Patenz wurden Tiere ausgewählt, die um die 100 Mikrofilarien/ μ l Blut aufwiesen. 300 Tage p.i. wurden nur mikrofilarienfreie Tiere (Postpatenz) herangezogen. Alle Tiere des Versuches waren infiziert und enthielten weibliche und männliche Filarien (Abb. 5.20.) in der Brusthöhle. Die Gesamtzahl der Parasiten war bei den einzelnen Tieren sehr unterschiedlich. Ab Tag 38.p.i. wurden die Parasiten nach Geschlechtern differenziert. Am Tag 300 p.i. wurde eine geringe Anzahl von verkapselten Parasitenstadien gefunden.

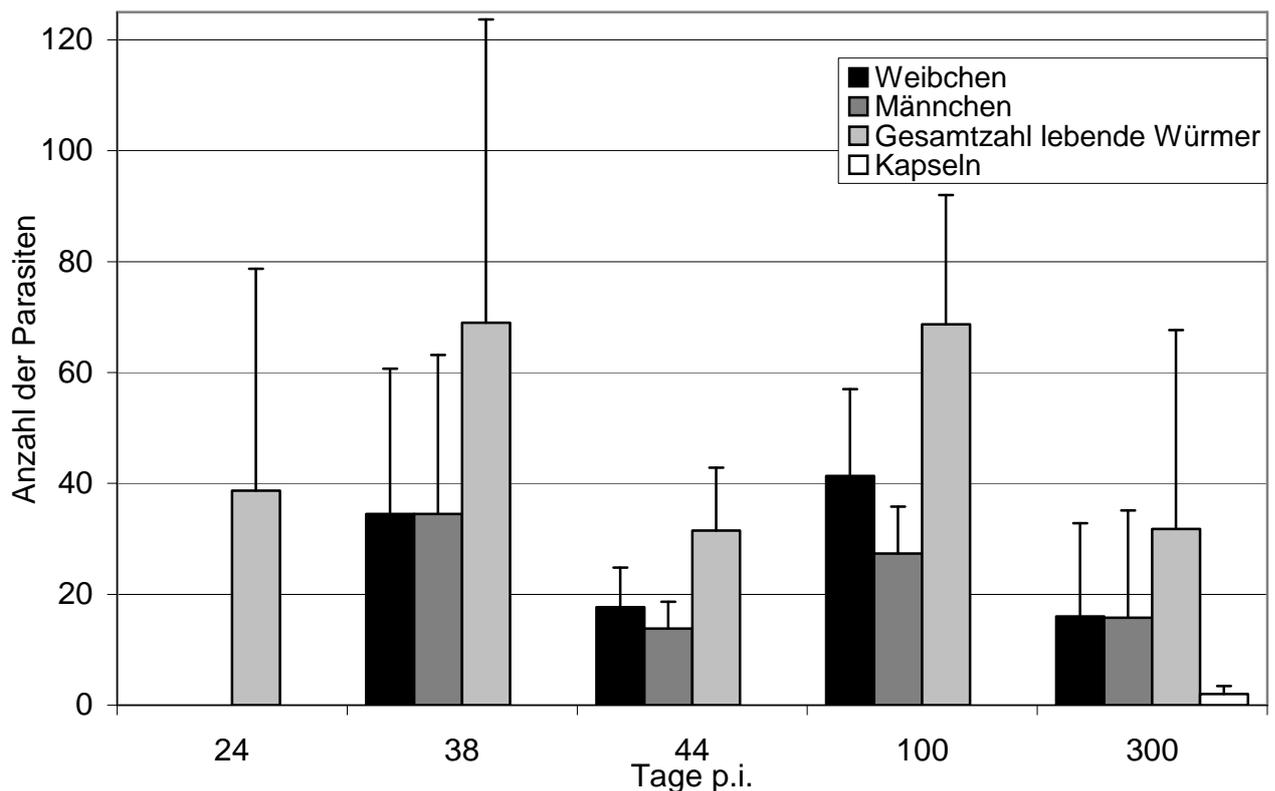


Abb. 5.20. Wurmbürden bei *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* (natürliche Infektion) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i.; angegeben sind Anzahl der Weibchen und Männchen, Gesamtzahl der lebenden Würmer und Kapseln. Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen wieder.

5.7.2.2. BALB/c-Mäuse

Alle Tiere des Hauptversuches waren infiziert und enthielten Parasiten. Die Anzahl der Parasiten war relativ niedrig (Abb. 5.21.). Am Tag 24 p.i. konnten die Würmer noch nicht nach Geschlechtern differenziert werden. Ab Tag 70 p.i. wurden verkapselte Parasitenstadien gefunden. Die Rückfindungsrate verringerte sich mit zunehmender Infektionsdauer von 23 % (Tag 24 p.i.) auf 4,7% (Tag 70 p.i.) (Abb. 5.22.). 160 Tage p.i. wurden keine lebenden Parasiten mehr gefunden. Bei der Überprüfung der Parasitämie zeigte sich, dass die Tiere nur vereinzelt Mikrofilarien aufwiesen (nicht abgebildet).

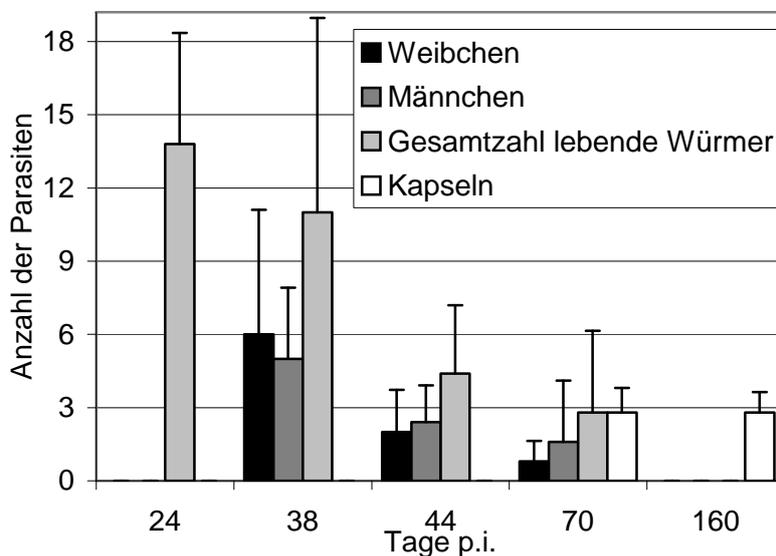


Abb. 5.21. Wurmbürde bei mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i., angegeben sind die Anzahl der Weibchen und Männchen, Gesamtzahl der lebenden Würmer und Kapseln. Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen wieder.

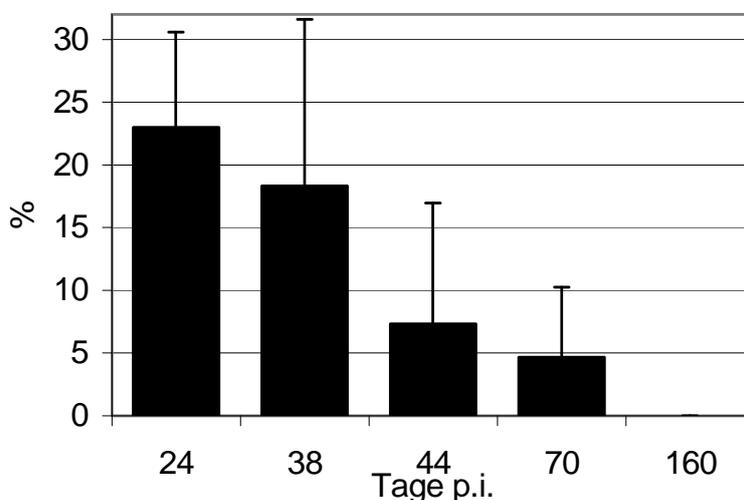


Abb. 5.22. Rückfindungsrate lebender Würmer bei mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i.. Die Abbildung gibt die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen wieder.

5.7.3. Reaktion von Milzlymphozyten auf Stimulation mit ConA und Juv-p120 im Infektionsverlauf

5.7.3.1. *M. coucha*

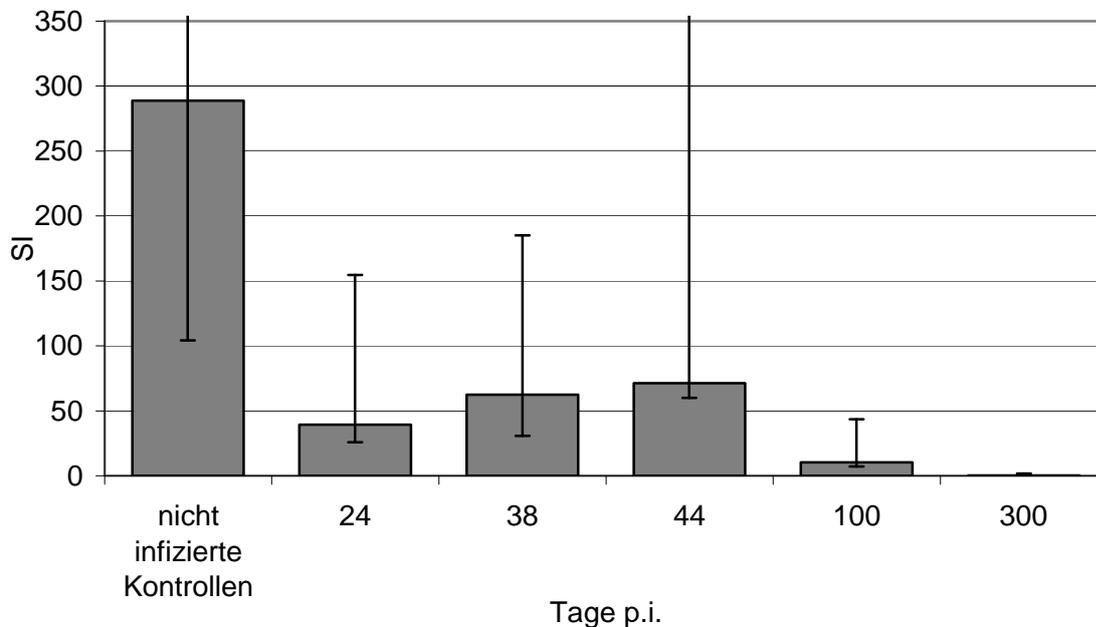


Abb. 5.23.

ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter *M. coucha* (natürliche Infektion, 6 Tiere/Gruppe) zu unterschiedlichen Zeiten p.i. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren für den Stimulationsindex (SI) wieder.

Nach ConA-Stimulation konnten bei nicht infizierten *M. coucha* hohe Proliferationswerte gemessen werden (Abb. 5.23.). Zellen aus infizierten Tieren reagierten dagegen unabhängig vom Zeitpunkt p.i. signifikant ($p \leq 0,0001$) schwächer. Bereits in der frühen Präpatenz waren die Werte um 86% reduziert und fielen mit Beginn der Patenz und der Postpatenz noch weiter ab. Am Tag 300 p.i. isolierte Milzlymphozyten ließen sich mit ConA nicht mehr stimulieren ($\text{SI} < 2$).

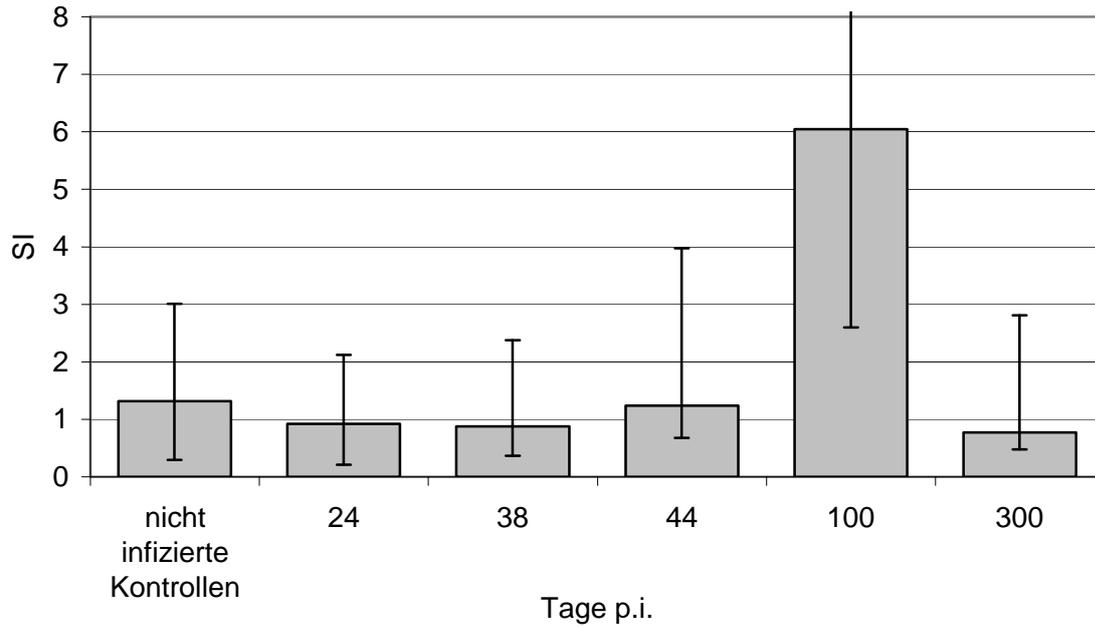


Abb. 5.24.
nÜP-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter *M. coucha* (natürliche Infektion, 6 Tiere/Gruppe) zu unterschiedlichen Zeiten p.i. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren für den Stimulationsindex (SI) wieder.

Juv-p120-haltiger *in-vitro*-Überstand (nÜP) stimulierte ausschließlich die 100 Tage p.i. isolierten Lymphozyten ($p \leq 0,01$ im Vergleich mit den übrigen Gruppen; vgl. Abb. 5.24).

5.7.3.2. BALB/c-Mäuse

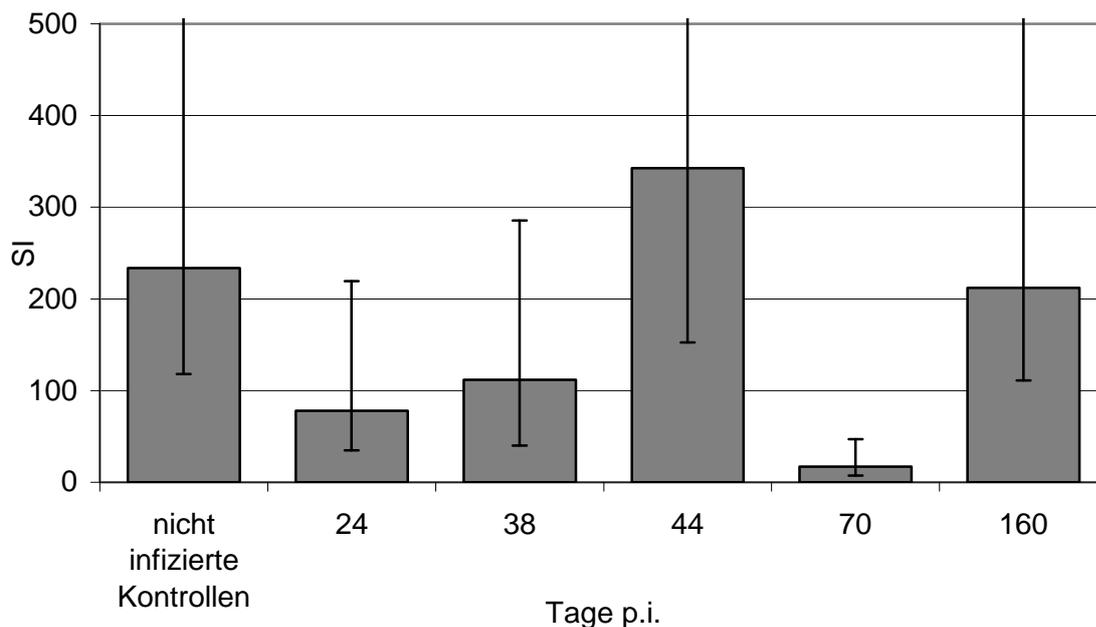


Abb. 5.25.

ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse (Infektion mit 60 L3, 5 Tiere/Gruppe) zu unterschiedlichen Zeiten p.i. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren für den Stimulationsindex (SI) wieder.

Nach ConA-Stimulation proliferierten die Lymphozyten nicht infizierter BALB/c-Mäuse in ähnlich hohem Maß wie die aus *M. coucha* (Abb. 5.25.). In der frühen Präpatenz (an den Tagen 24 und 38 p.i.) fielen die Werte um bis zu 67% deutlich ab. Am Tag 44 p.i. war die ConA-induzierte Proliferation gegenüber der der nicht infizierten Tiere gesteigert. In der Patenz kam es zu einem drastischen Abfall der Proliferationswerte ($p \leq 0,01$) um 93%. Am Tag 160 p.i. lagen die Werte wieder auf dem Niveau der nicht infizierten Kontrolltiere.

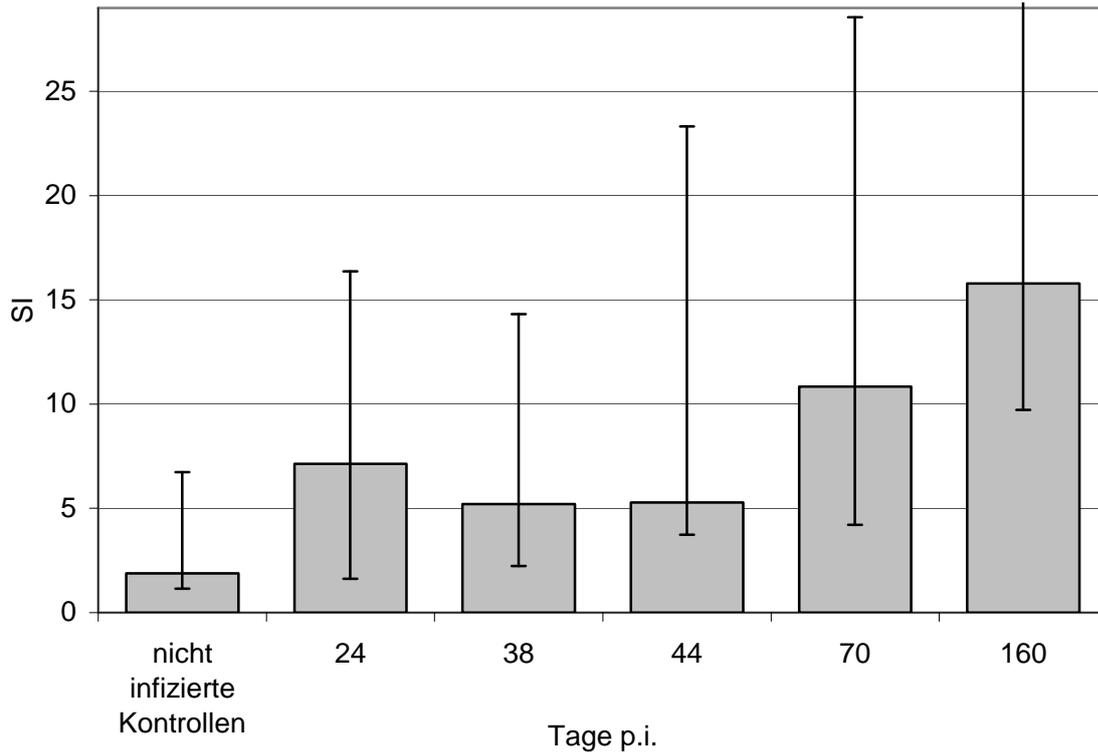


Abb. 5.26.

nÜP-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse (Infektion mit 60 L3, 5 Tiere/Gruppe) zu unterschiedlichen Zeiten p.i. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren für den Stimulationsindex (SI) wieder.

Die Milzlymphozyten von nicht infizierten Tieren proliferierten nach Stimulation mit nÜP nicht (SI<2) (Abb. 5.26.). Während der Präpatenz waren die durchschnittlichen Proliferationsraten im Vergleich zu den Kontrollen gesteigert. In der Patenz und Postpatenz nahm der Effekt von nÜP auf letztlich das Achtfache gegenüber den nicht infizierten Tieren zu (p≤ 0,0001).

5.7.4. Einfluss von Juv-p120 und P-DMAE-Peptid auf die ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten

5.7.4.1. Lymphozyten von *M. coucha*

1. Lymphozyten aus nicht infizierten *M. coucha*:

Bei den nicht infizierten Tieren erreichte die Milzlymphozytenproliferation nach ConA-Stimulation das erwartete hohe Niveau (SI um 300). Einflüsse von P-DMAE-Peptid und nÜP auf die Proliferation der Zellen waren nicht erkennbar (Abb. 5.27.). Auch das nicht mit P-DMAE modifizierte Kontrollpeptid (Lys-Peptid) sowie der bei der nÜP-Anreicherung entstandene Durchlauf (Filtrat vgl. 3.2.8.) beeinflussten die Zellproliferation nicht.

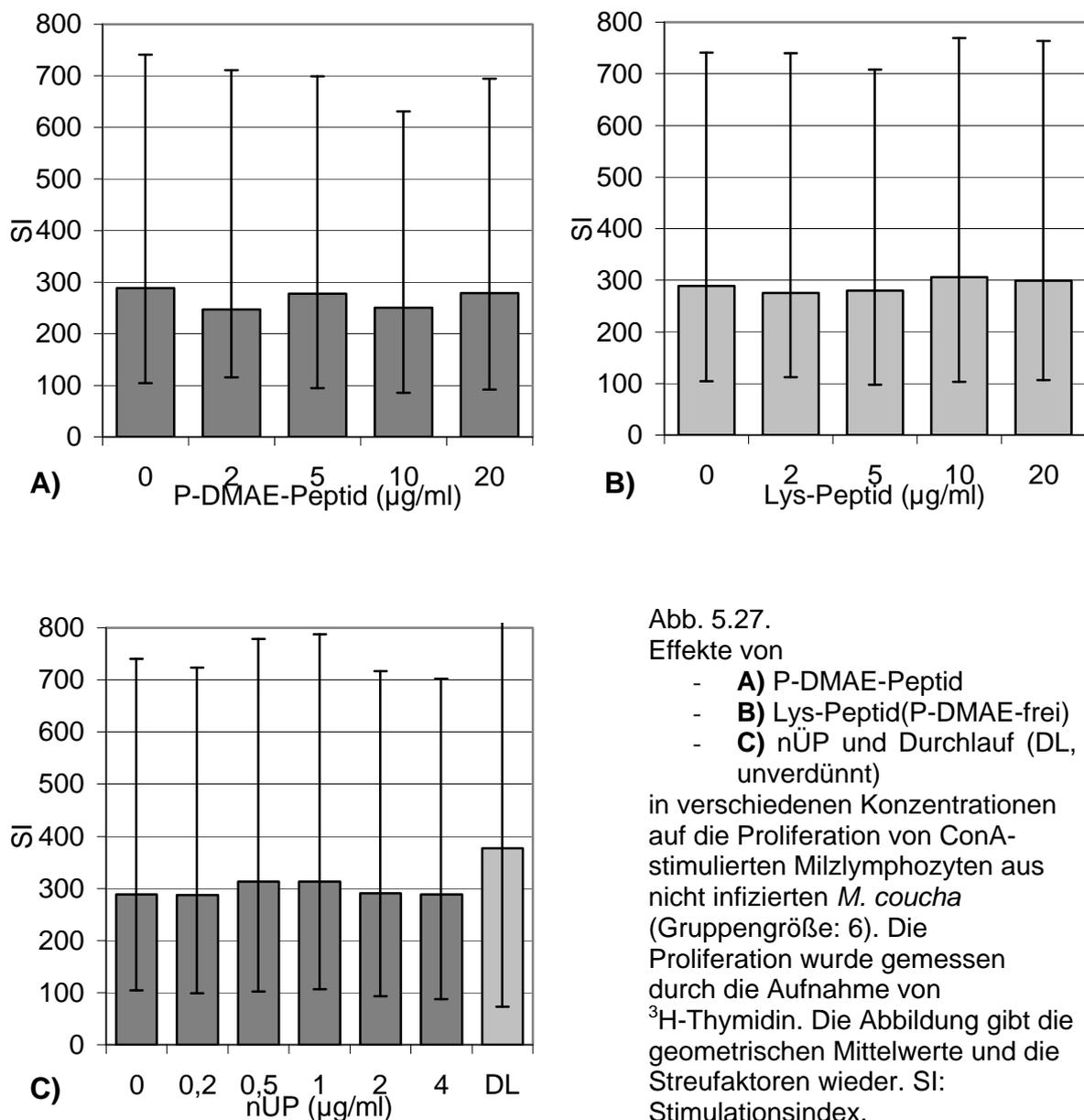


Abb. 5.27.

Effekte von

- **A)** P-DMAE-Peptid
- **B)** Lys-Peptid(P-DMAE-frei)
- **C)** nÜP und Durchlauf (DL, unverdünnt)

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten aus nicht infizierten *M. coucha* (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

2. Lymphozyten isoliert 24 Tage p.i. (frühe Präpatenz)

Erwartungsgemäß (vgl. 5.7.3.1.) war hier der ConA-Effekt geringer als bei Milzzellen nicht infizierter Tiere (Abb. 5.28.). Bei Zugabe von P-DMAE-Peptid in Konzentrationen von 2 und 5 µg/ml war die ConA-stimulierte Milzlymphozytenproliferation leicht, aber nicht signifikant erhöht; bei höheren Konzentrationen war kein Einfluss erkennbar (Abb. 5.28.). Auch das Kontrollpeptid hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. nÜP wirkte mit steigender Konzentration leicht stimulierend, jedoch war der Effekt nicht statistisch absicherbar.

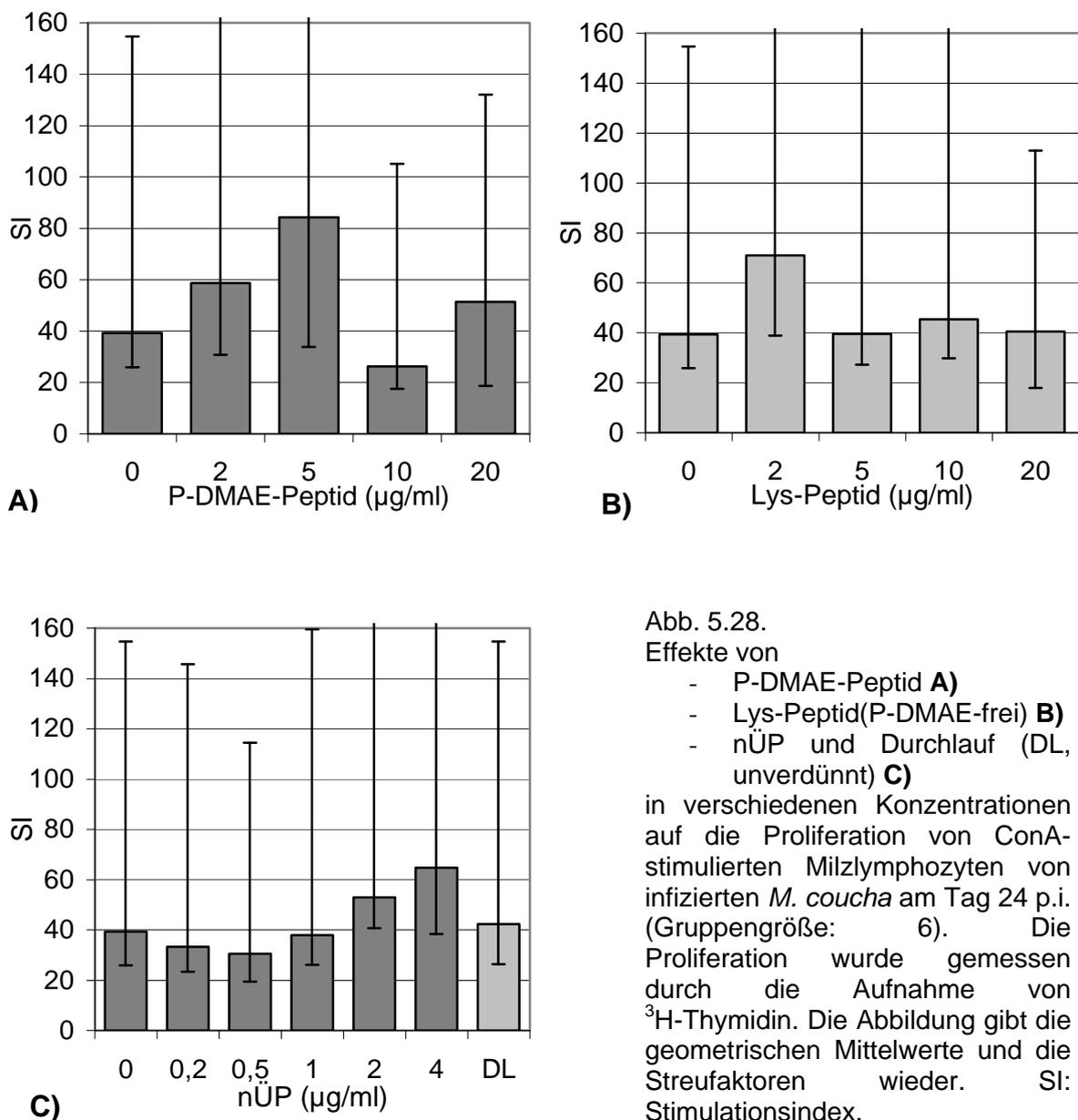


Abb. 5.28.

Effekte von

- P-DMAE-Peptid **A)**
- Lys-Peptid(P-DMAE-frei) **B)**
- nÜP und Durchlauf (DL, unverdünnt) **C)**

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* am Tag 24 p.i. (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

3. Lymphozyten isoliert 38 Tage p.i. (mittlere Präpatenz)

ConA stimulierte die Zellen relativ schwach. Bei Zugabe von 2 bis 10 µg/ml P-DMAE-Peptid ergaben sich zwar niedrigere Gruppenschlusswerte, doch waren die Veränderungen nicht signifikant (Abb. 5.29.). Weder das Kontrollpeptid noch nÜP hatte einen nachweisbaren Einfluss auf die ConA-induzierte Proliferation.

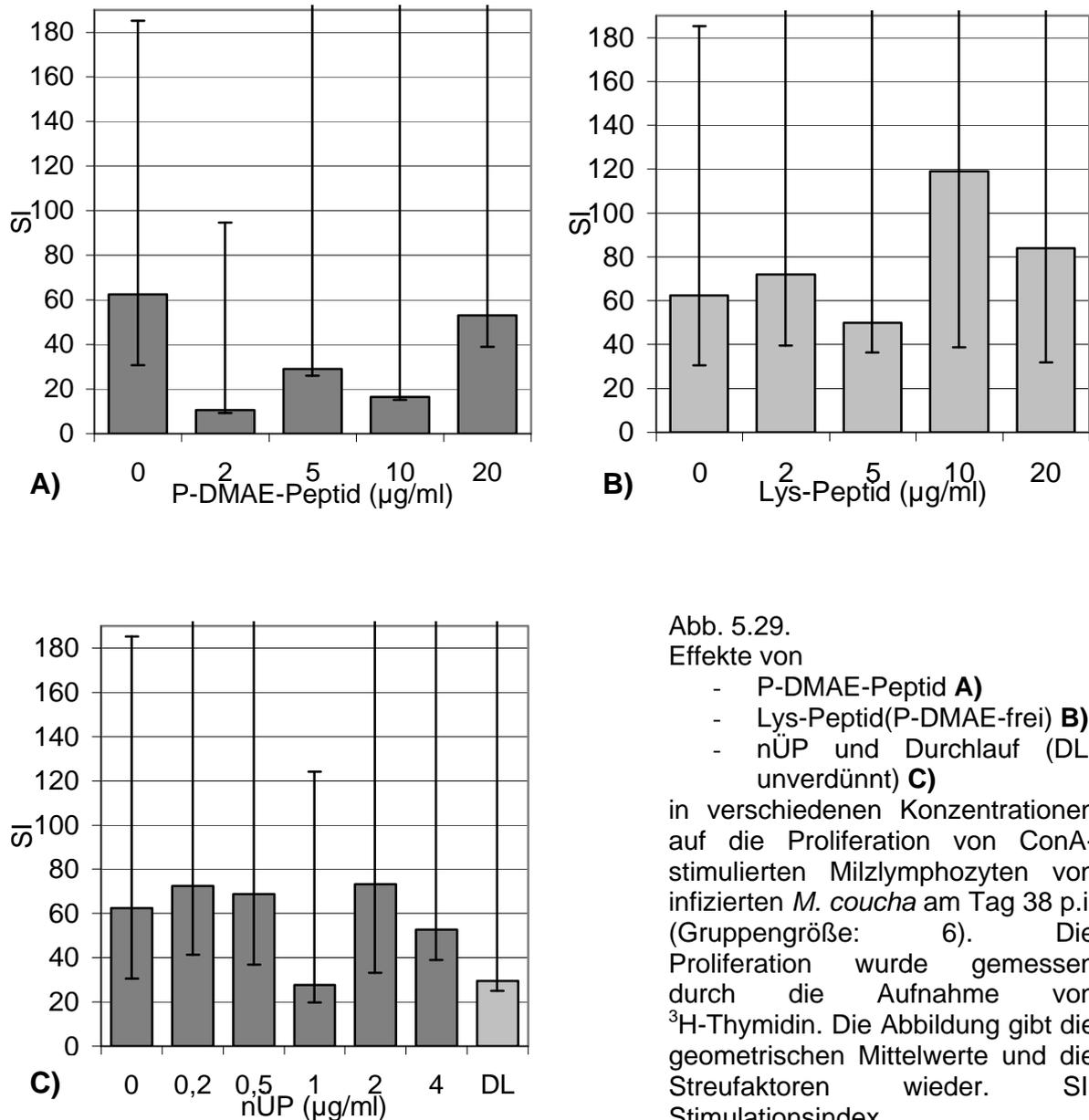


Abb. 5.29.

Effekte von

- P-DMAE-Peptid **A)**
- Lys-Peptid(P-DMAE-frei) **B)**
- nÜP und Durchlauf (DL, unverdünnt) **C)**

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* am Tag 38 p.i. (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimationsindex.

4. Lymphozyten isoliert 44 Tage p.i. (späte Präpatenz)

ConA stimulierte die Proliferation der Lymphozyten wie an den übrigen Zeitpunkten in der Präpatenz nur schwach. P-DMAE-Peptid hemmte in einer Konzentration von 10 µg/ml die Reaktion nahezu komplett ($p \leq 0,0001$), hatte jedoch in der doppelten Konzentration keinen signifikanten Einfluss. Im Fall des Kontrollpeptids wurden reduzierte Durchschnittswerte beobachtet, die jedoch kein signifikantes Niveau erreichten. Bei Zugabe von nÜP waren zwar ab einer Konzentration von 1 µg/ml die durchschnittlichen Proliferationswerte reduziert, jedoch waren die Unterschiede gegenüber der Kontrolle nicht signifikant. Auch bei Zugabe des Juv-p120-freien Durchlaufs war die Proliferation beeinträchtigt (Abb. 5.30.).

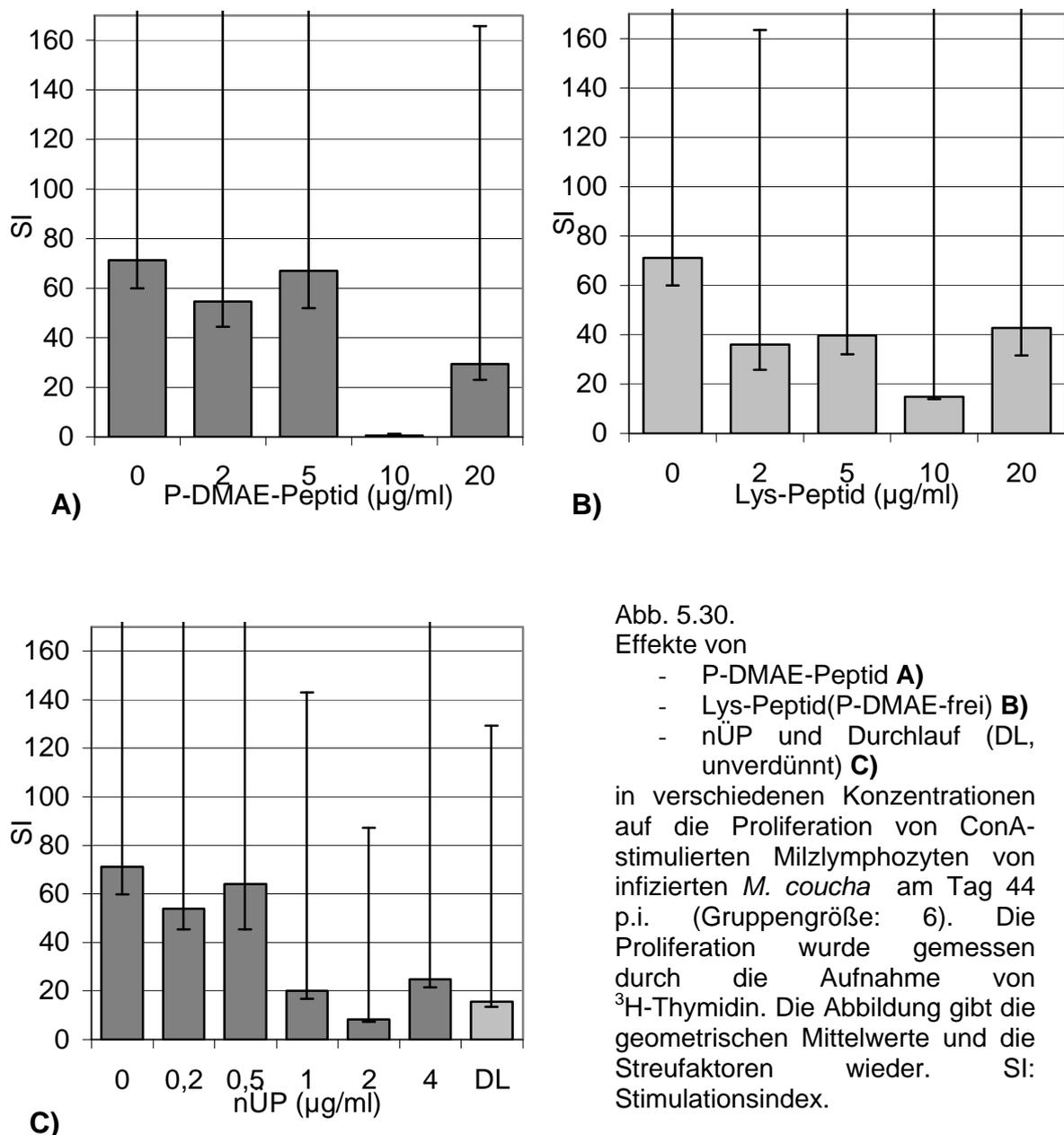


Abb. 5.30.

Effekte von

- P-DMAE-Peptid **A)**
- Lys-Peptid(P-DMAE-frei) **B)**
- nÜP und Durchlauf (DL, unverdünnt) **C)**

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* am Tag 44 p.i. (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

5. Lymphozyten isoliert 100 Tage p.i. (Patenz)

Die Proliferation lag insgesamt auf einem sehr niedrigen Niveau (SI um 15). Sie ließ sich auch durch keines der eingesetzten Präparate signifikant beeinflussen (Abb. 5.31.).

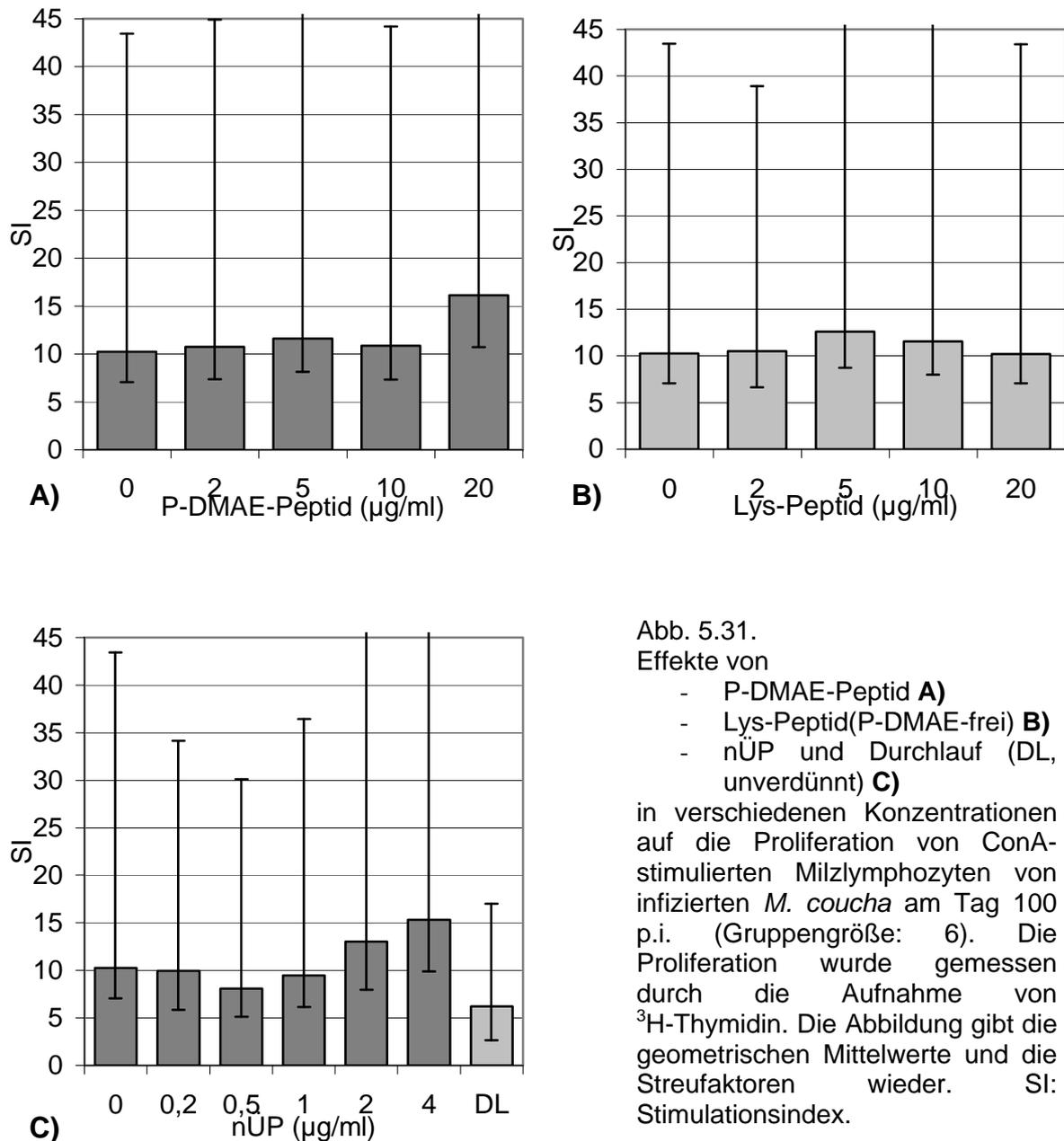


Abb. 5.31.

Effekte von

- P-DMAE-Peptid **A)**
- Lys-Peptid(P-DMAE-frei) **B)**
- nUP und Durchlauf (DL, unverdünnt) **C)**

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* am Tag 100 p.i. (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

6. Lymphozyten isoliert 300 Tage p.i. (Postpatenz)

Zu diesem Zeitpunkt isolierte Lymphozyten ließen sich durch ConA allein kaum mehr stimulieren ($SI < 2$). Bei Zugabe von P-DMAE-Peptid stieg die Proliferationsrate jedoch dosisabhängig auf bis das 50fach an ($p \leq 0,0001$). Durch das Kontrollpeptid sowie durch nÜP ließ sich die Reaktion der Lymphozyten dagegen nicht steigern (Abb. 5.32.).

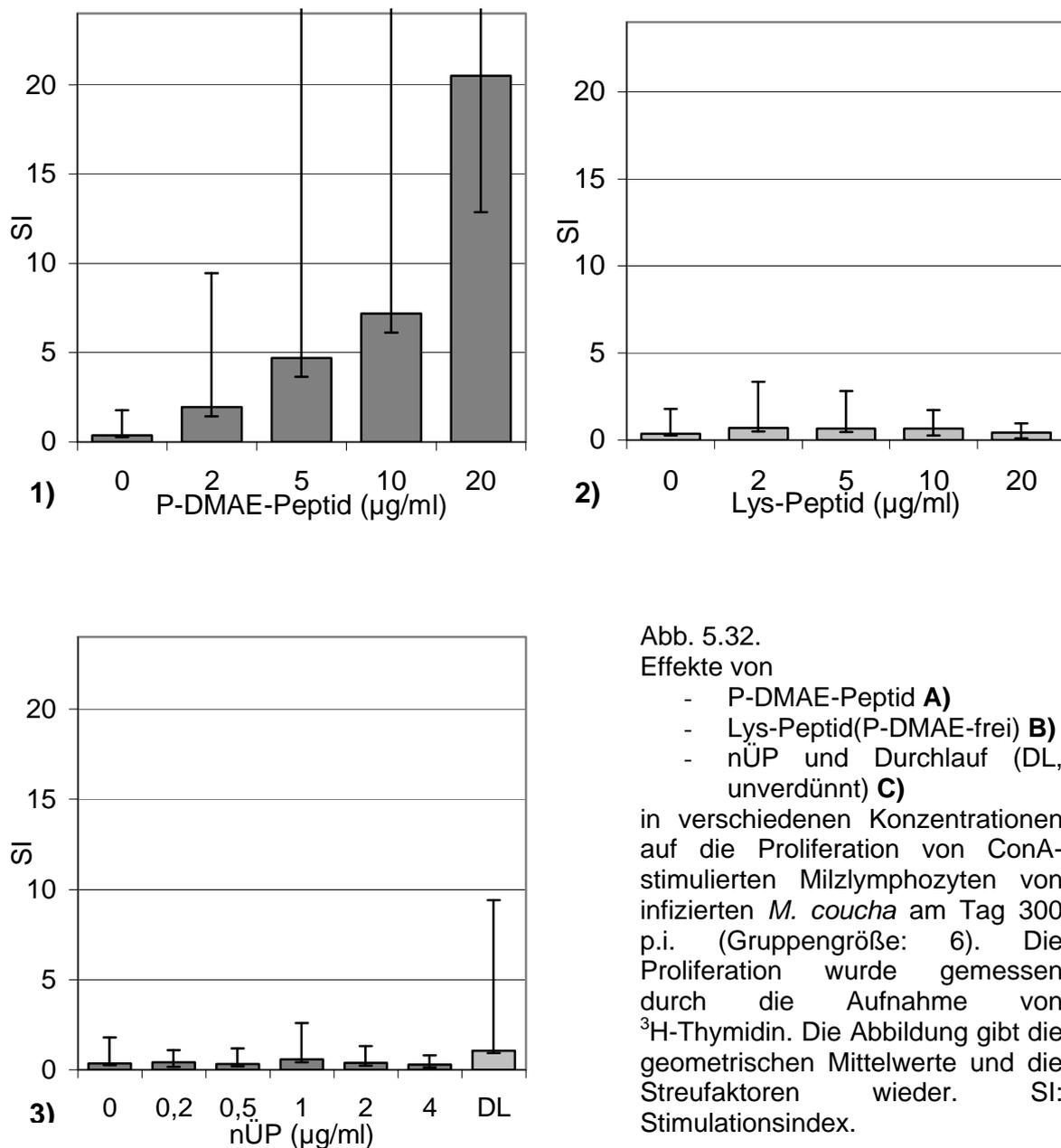


Abb. 5.32.

Effekte von

- P-DMAE-Peptid **A)**
- Lys-Peptid(P-DMAE-frei) **B)**
- nÜP und Durchlauf (DL, unverdünnt) **C)**

in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* am Tag 300 p.i. (Gruppengröße: 6). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

5.7.4.2. Lymphozyten aus BALB/-Mäusen

Aus den Untersuchungen mit Lymphozyten von BALB/c-Mäusen wurden nur die Ergebnisse aus den Versuchen mit nÜP verwendet. Die Tests mit dem P-DMAE-Peptid und Kontrollpeptid sind nicht dargestellt, da hier keinerlei signifikante Veränderungen beobachtet wurden.

1. Lymphozyten aus nicht infizierten BALB/c-Mäusen

Die Proliferation von Milzlymphozyten nicht infizierter BALB/c-Mäuse nach ConA-Stimulation wurde durch gleichzeitige Inkubation mit nÜP um bis zu 50% gehemmt (Abb. 5.33.) ($p \leq 0,0001$ bei 4 $\mu\text{g/ml}$). Diese Hemmung war konzentrationsabhängig, d.h. mit steigender Konzentration von nativem Überstand nahm die hemmende Wirkung zu. Allerdings kam es auch bei Zugabe des Juv-p120-freien Durchlaufs zu reduzierter Proliferation. Dieser Effekt war aber nicht signifikant.

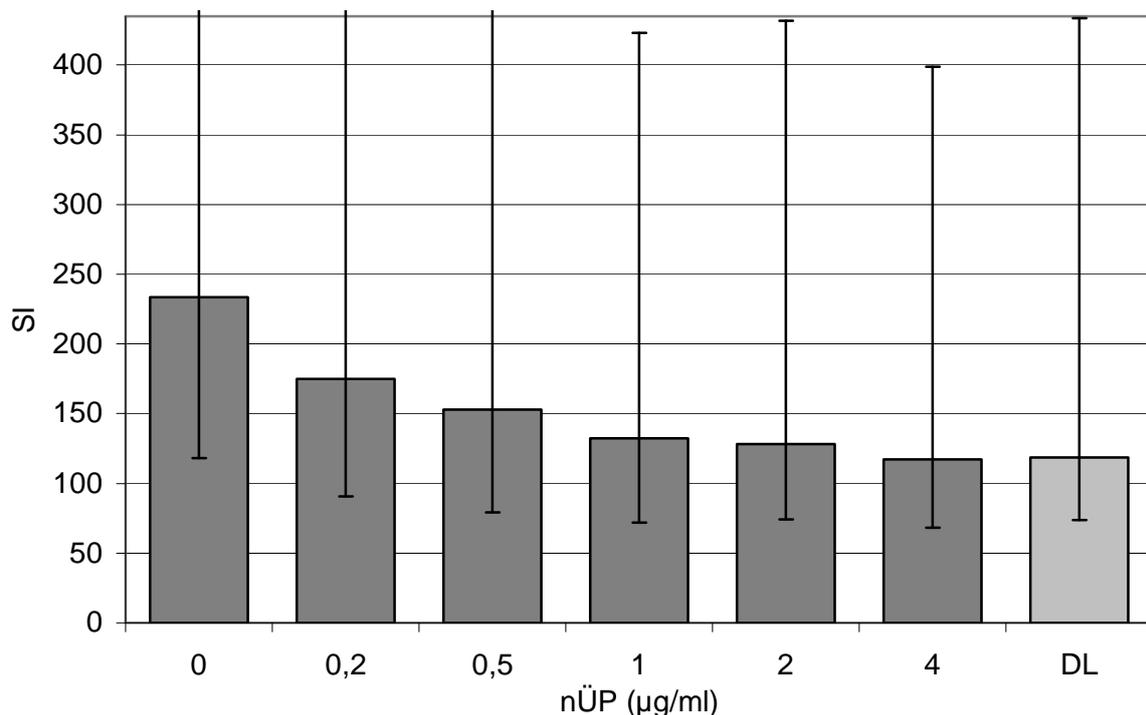


Abb. 5.33.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von nicht infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5). Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

2. Lymphozyten isoliert 24 Tage p.i. (frühe Präpatenz)

In der frühen Präpatenz zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Einfluss von nÜP auf die Milzlymphozytenproliferation nach ConA-Stimulation. Die Proliferation wurde durch Zugabe von nÜP um bis zu 65% gehemmt (Abb. 5.34.). Beim Einsatz von 0,2 bis 1 µg/ml nÜP nahm die beobachtete Hemmung der ConA-induzierten Proliferation mit steigender Konzentration zu ($p \leq 0,0001$); ab einer Konzentration von 1 µg/ml blieb sie dann relativ konstant. Der Durchlauf hemmte Proliferation zwar noch signifikant aber deutlich schwächer ($p \leq 0,01$).

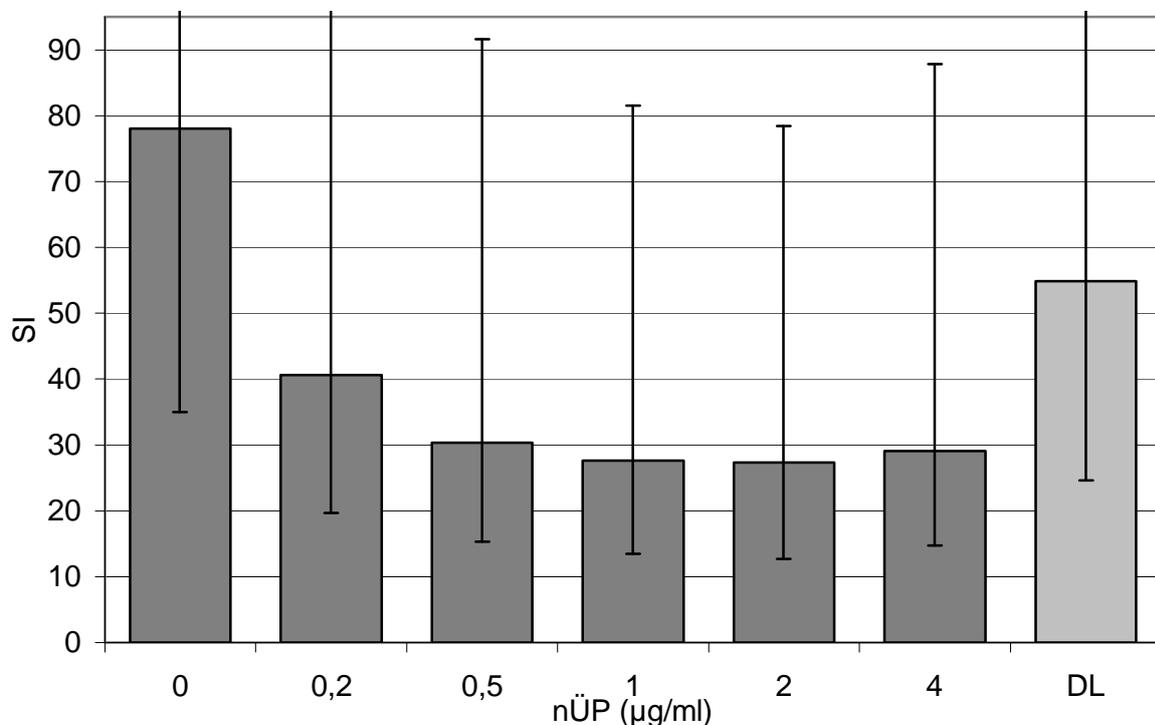


Abb. 5.34.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) Am Tag 24 p.i.. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex

3. Lymphozyten isoliert 38 Tage p.i. (mittlere Präpatenz)

Bei Zellen vom Tag 38 p.i. war die Hemmung der ConA-stimulierten Milzlymphozytenproliferation durch nÜP im Vergleich zu anderen Terminen am deutlichsten ausgeprägt; sie betrug maximal 71% ($p \leq 0,0001$) (Abb. 5.35.). Auch hier erschien die Hemmung der ConA-induzierten Milzlymphozytenproliferation dosisabhängig. Durchlauf wirkte im Verhältnis dazu nur gering hemmend auf die Proliferation (nicht signifikant).

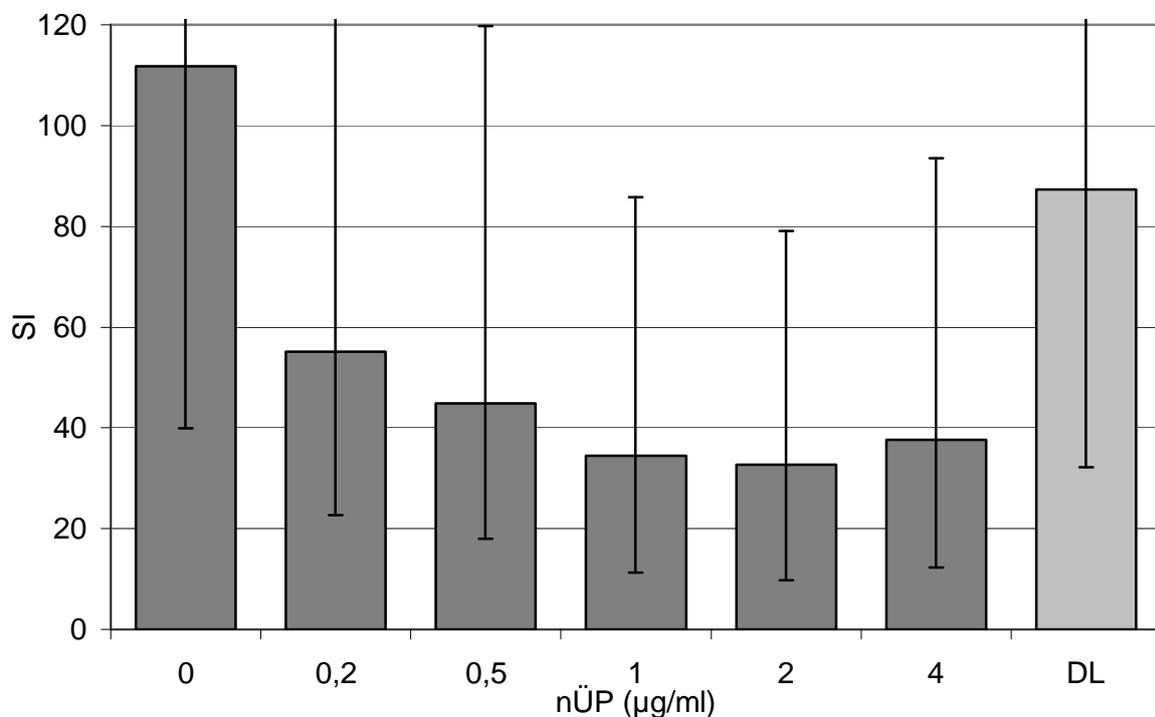


Abb. 5.35.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) am Tag 38 p.i.. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

4. Lymphozyten isoliert 44 Tage p.i. (späte Präpatenz)

Eine Hemmung der ConA-stimulierten Milzlymphozytenproliferation durch Koinkubation mit nÜP war in der späten Präpatenz nicht signifikant (Abb. 5.36.). Auch bei Verwendung des Durchlaufs war kein signifikanter Effekt zu erreichen.

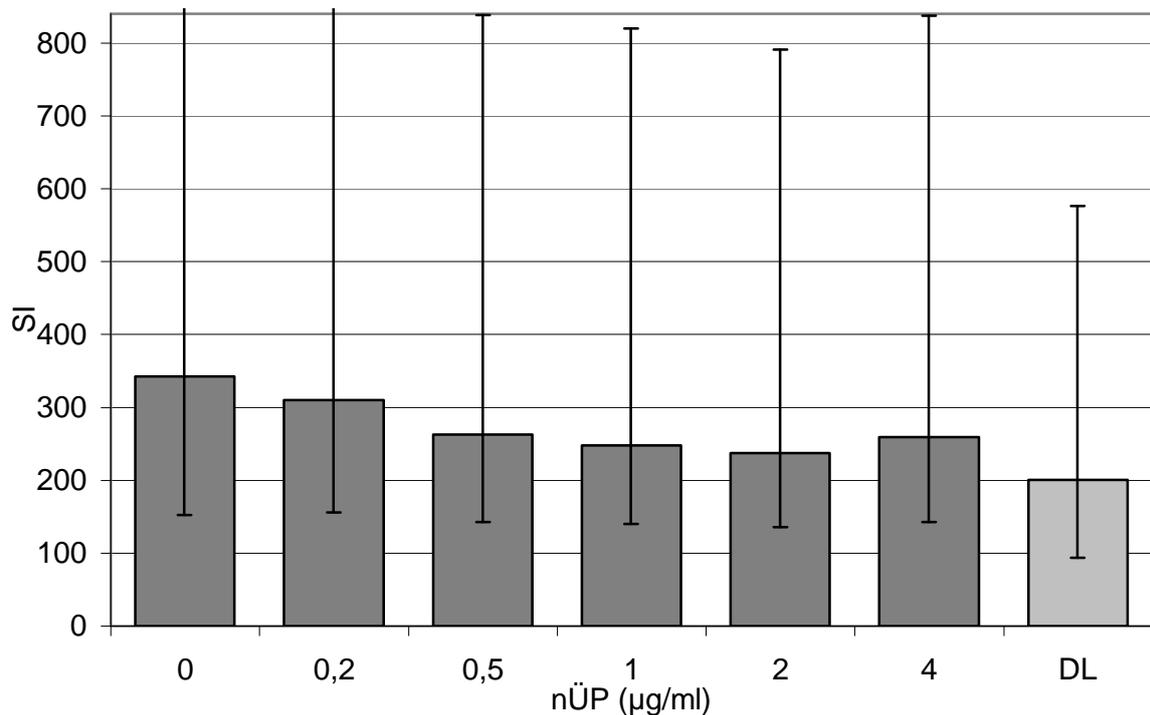


Abb. 5.36.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) am Tag 44 p.i.. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ³H-Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

5. Lymphozyten isoliert 70 Tage p.i. (Patenz)

Am Tag 70 p.i. isolierte Zellen proliferierten nach alleiniger ConA-Stimulation kaum (Abb. 5.37.). Dagegen war die Proliferation bei Zugabe von nÜP unabhängig von der Konzentration fast um das 30fache gesteigert ($p \leq 0,0001$). Die gemessenen Stimulationsindizes lagen dabei etwa zweifach über denen, die bei Zellen nicht infizierter Tiere nach alleiniger Stimulation mit ConA erreicht wurden (vgl. Abb. 5.33). Der Durchlauf aus der nÜP-Präparation hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

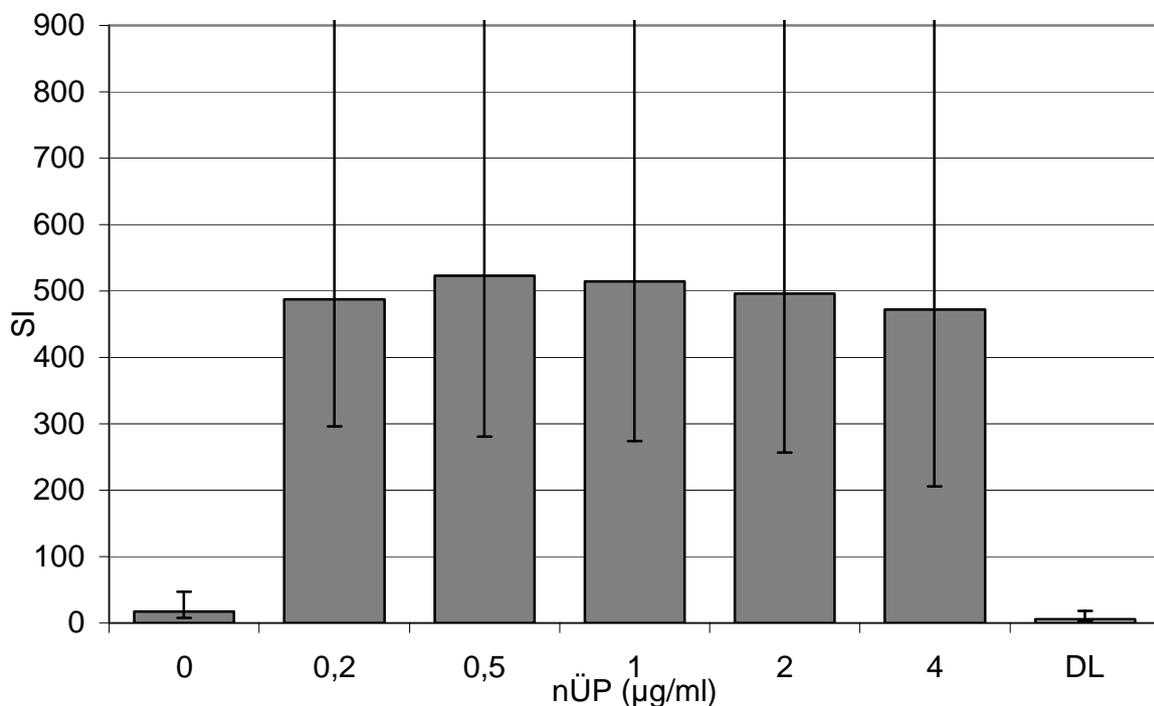


Abb. 5.37.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) am Tag 70 p.i.. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

6. Lymphozyten isoliert 160 Tage p.i. (Postpatenz)

In der Postpatenz proliferierten die Milzlymphozyten nach alleiniger ConA-Stimulation wieder stärker als in der Patenz (s. Abb. 5.38.). nÜP führte zusammen mit ConA-Stimulation zu einer im Durchschnitt gesteigerten Proliferation, wobei die Unterschiede aber nicht signifikant waren. Koinkubation mit Durchlauf hemmte die Proliferation geringfügig (nicht signifikant).

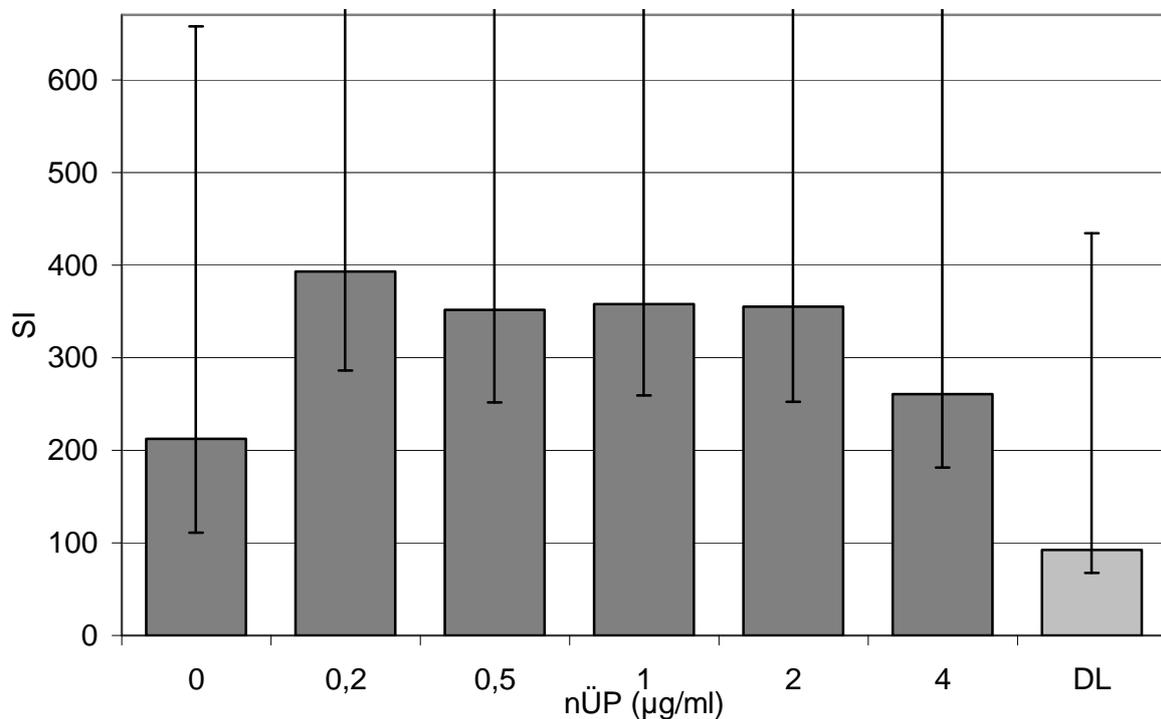


Abb. 5.38.

Effekte von nÜP in verschiedenen Konzentrationen und Durchlauf (DL, unverdünnt) auf die Proliferation von ConA-stimulierten Milzlymphozyten von mit 60 *L. sigmodontis*-L3 infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) am Tag 160 p.i.. Die Proliferation wurde gemessen durch die Aufnahme von ^3H -Thymidin. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder. SI: Stimulationsindex.

5.8. Effekte von ConA und Juv-p120 auf die Transkription ausgewählter Zytokingene bei der BALB/c-Maus im Verlauf der *L. sigmodontis*-Infektion

5.8.1. Vorversuche

a) Optimierung der Plasmidkonzentration

Für IL-2 wurde eine Konzentration von 10 pg pMus3-cDNA pro 50 µl PCR-Ansatz im Hauptversuch eingesetzt, für IL-10 waren es 5 pg pMus3-cDNA, für alle anderen konnten die Konzentrationen aus der Arbeit von Taubert und Zahner (2001) verwendet werden (vgl. 3.12.1).

b) RNA-Präparation und Nachweis der β 2-Mikroglobulin-Transkripte

Nur eine von 88 RNA-Proben aus dem Hauptversuch war degradiert; bei dieser Probe konnte in der PCR kein β 2-Mikroglobulin-Transkript nachgewiesen werden. Die aus den Milzzellen isolierten RNA-Mengen variierten relativ stark. Aus mit ConA stimulierten Zellen konnten die größten RNA-Mengen gewonnen werden. Da bei den meisten mit nÜP und RPMI stimulierten Zellen die Ausbeute an cDNA relativ gering war, wurde bei diesen Proben für die Bestimmung von IL-5 und IL-13 eine zweite DNA-Synthese durchgeführt.

Als Referenzwert für die Berechnung der Ausgleichsfaktoren wurde willkürlich der Wert für das β 2-Mikroglobulin-Transkriptes der Proben 59 (erste cDNA-Synthese) und 33 (zweite cDNA-Synthese für IL-5 und IL-13) gewählt.

5.8.2. IFN- γ -Gen-Transkription

Die Werte der Mediumkontrollen blieben bei allen Tieren auf einem sehr niedrigen Niveau.

Als Reaktion auf ConA-Stimulation erfolgte bei allen Tieren eine gegenüber der RPMI-Kontrolle stark erhöhte IFN- γ -Gentranskription ($p \leq 0,0001$) (Abb. 5.39.). Die Werte nach der Infektion waren kaum erhöht und variierten relativ wenig, wenn die großen Individuellen Schwankungen berücksichtigt wurden. Allenfalls in der Spätphase ließ sich ein Anstieg der Transkription von IFN γ annehmen.

Im Vergleich zu den Mediumkontrollen war nach Stimulation mit nÜP eine signifikant gesteigerte IFN- γ -Gentranskription messbar ($p \leq 0,01$). Verglichen mit den nicht infizierten Tieren aber wurde nur an den Tagen 24 p.i. und 160 p.i. eine gesteigerte Transkription induziert; wegen der hohen individuellen Streuungen wurde aber kein signifikantes Niveau erreicht. An den übrigen Tagen blieben die Werte niedrig.

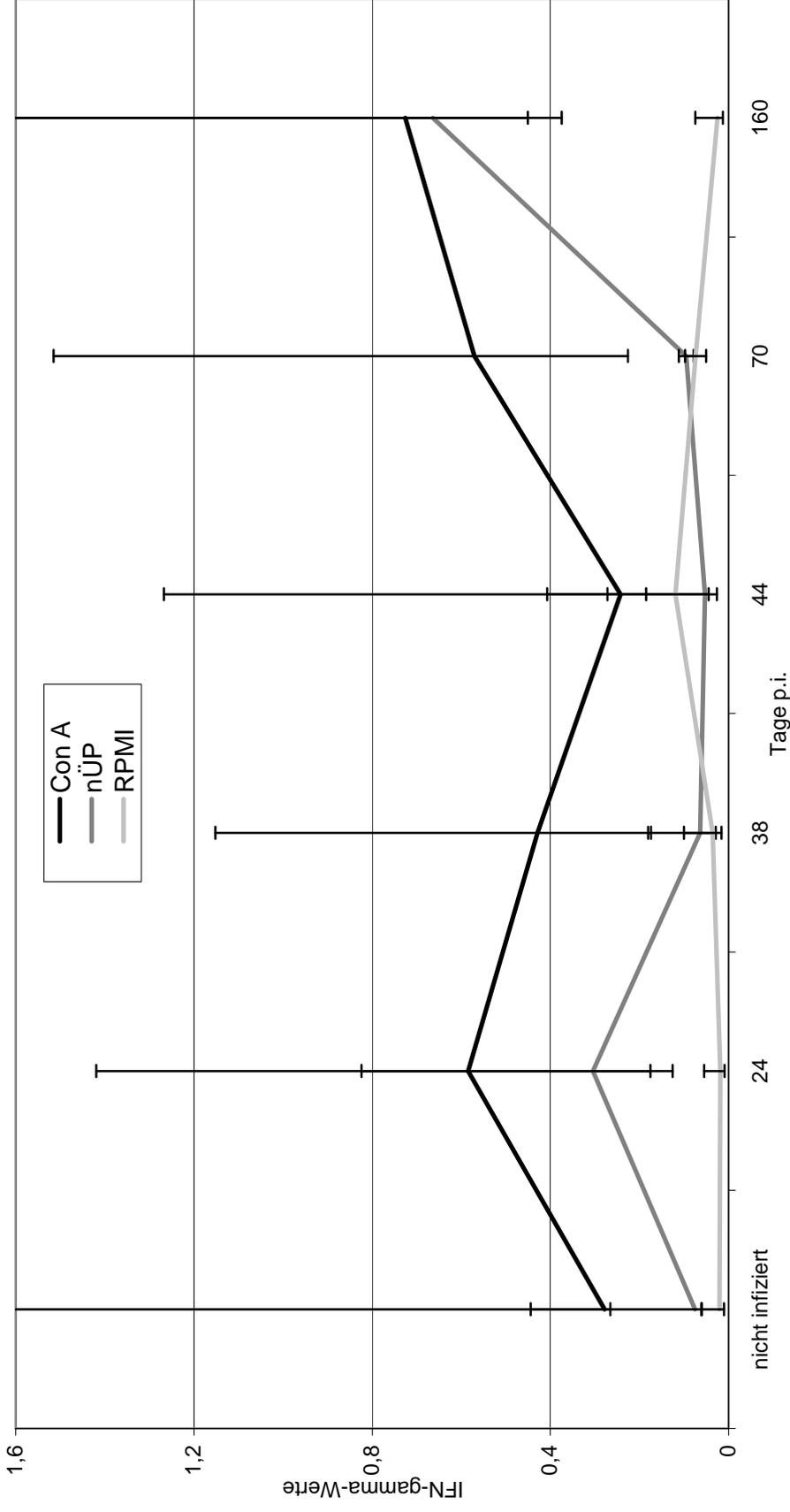


Abb. 5.39. IFN- γ -Gentranskription in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

5.8.3. IL-2-Gentranskription

Die Werte der Mediumkontrollen blieben bei allen Tieren auf einem sehr niedrigen Niveau.

Nach ConA-Stimulation zeigte sich besonders bei nicht infizierten Tieren gegenüber den Mediumkontrollen eine stark gesteigerte IL-2-Gentranskription ($p \leq 0,0001$) (Abb. 5.40.). Am Tag 24 und 38 p.i. wurde auf ConA-Stimulation deutlich weniger IL-2 Gen transkribiert. Am Tag 44 p.i. stieg die IL-2-Gentranskription wieder an, ging am Tag 70 p.i. etwas zurück und erreichte am Tag 160 p.i. den höchsten Wert im Infektionsverlauf.

Nach Stimulation mit nÜP war im Vergleich zu den Mediumkontrollen keine signifikant gesteigerte IL-2-Gentranskription messbar. Allenfalls bei 44 Tage p.i. isolierten Zellen deuteten sich höhere Werte an.

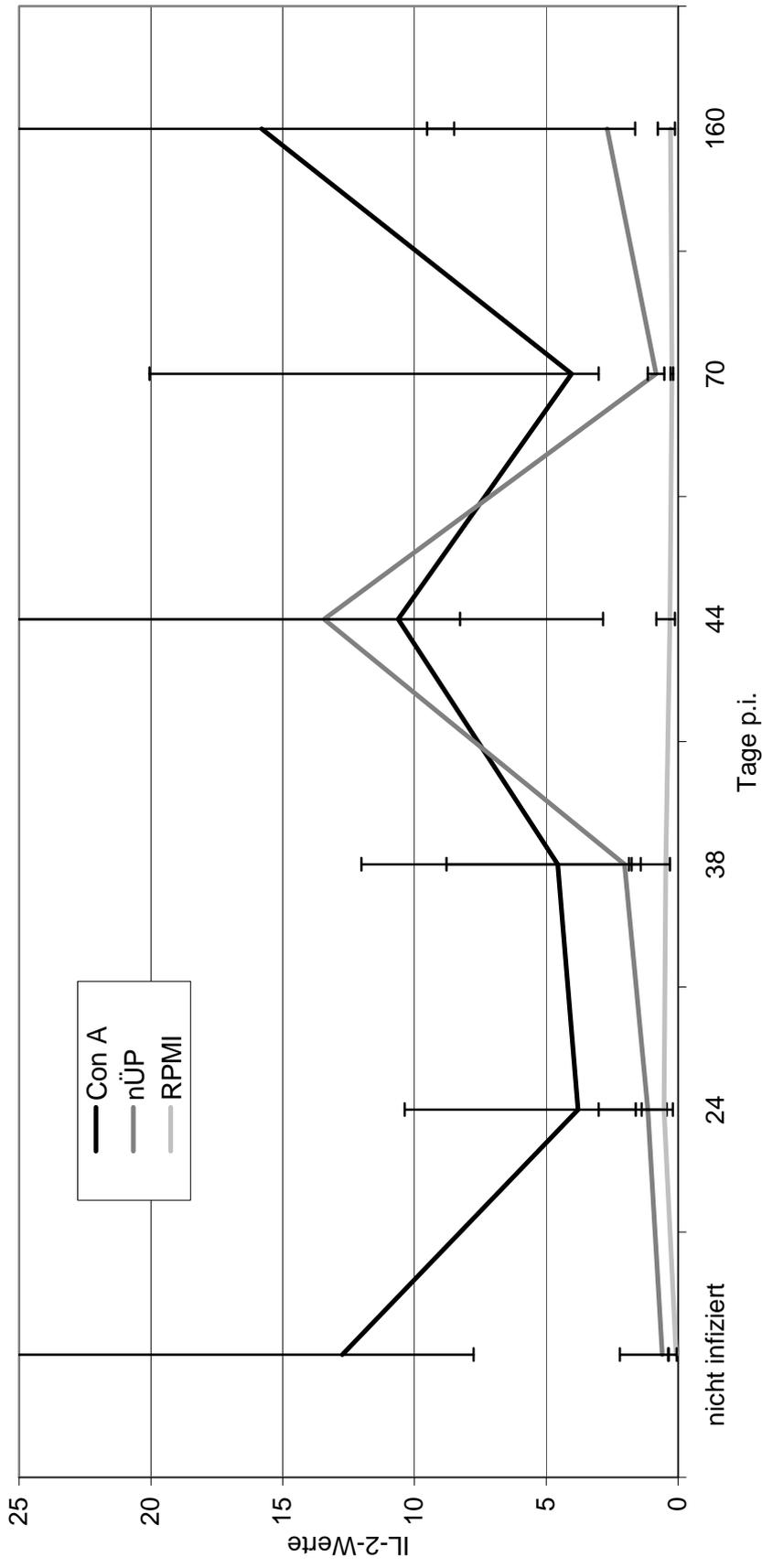


Abb. 5.40. IL-2-Gentranskription in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

5.8.4. IL-4-Gentranskription

Die Werte der Mediumkontrollen blieben bei allen Tieren auf einem sehr niedrigen Niveau.

Nach ConA-Stimulation erfolgte gegenüber den Mediumkontrollen eine stark gesteigerte IL-4-Gentranskription ($p \leq 0,0001$) (Abb. 5.41.). In der Präpatenz (Tag 24, 38 und 44 p.i.) ergaben sich gegenüber den Werten bei nicht infizierten Tieren keine signifikanten Veränderungen. Am Tag 70 p.i. sank die IL-4-Gentranskription signifikant gegenüber der Transkription bei nicht infizierten Tieren ab ($p \leq 0,05$), erreichte aber am Tag 160 p.i. das Anfangsniveau bei nicht infizierten Tieren.

Nach Stimulation mit nÜP war die IL-4-Gentranskription gegenüber der der Mediumkontrollen zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht ($p \leq 0,0001$) (s. Abb. 5.40). Zusätzlich zeigten sich signifikant erhöhte der Transkriptionswerte am Tag 24 p.i. im Vergleich zu nicht infizierten Tieren ($p \leq 0,05$). Der Wert lag hier noch über dem Wert bei ConA-Stimulation. Am Tag 70 p.i. war die IL-4-Transkription bei beiden Stimulanzen relativ niedrig.

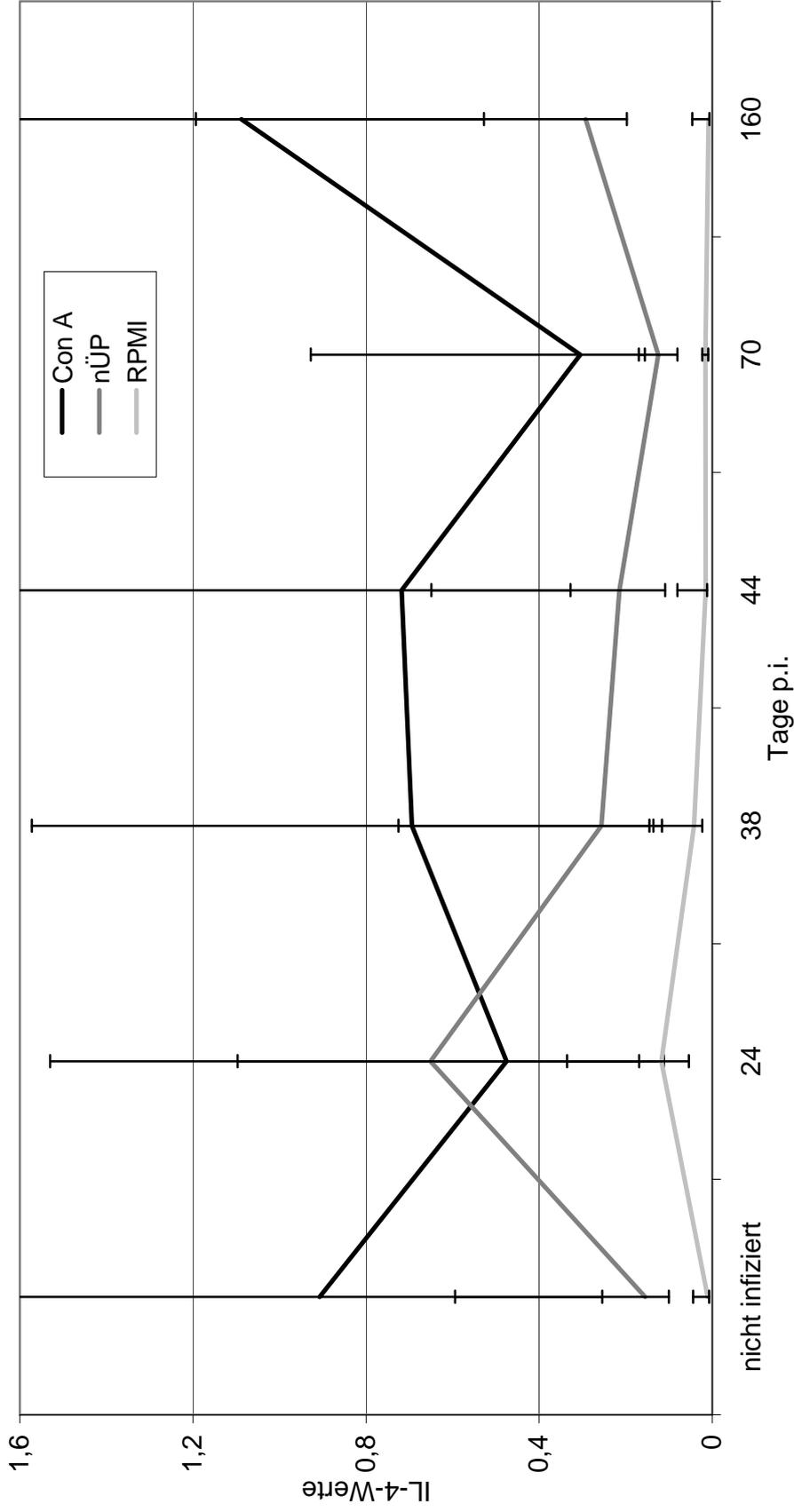


Abb. 5.41.
 IL-4-Genexpression in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

5.8.5. IL-5-Gentranskription

Die Werte der Mediumkontrollen blieben bei allen Tieren auf einem sehr niedrigen Niveau.

Die Transkription des IL-5-Gens war insgesamt zwar relativ niedrig, doch lagen die Werte sowohl bei Stimulation mit ConA als auch mit nÜP signifikant über denen der Mediumkontrollen ($p \leq 0,0001$, bzw. $p \leq 0,05$).

Bei nicht infizierten Tieren ließ sich weder mit ConA noch mit nÜP eine gesteigerte IL-5-Gentranskription induzieren. Nach der Infektion reagierten die Zellen sowohl nach ConA- als auch nach nÜP-Stimulation bis zum Tag 44 p.i. zunehmend stärker, allerdings bestanden gegenüber den Mediumkontrollen nur an den Tagen 24 und 38 p.i. signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede. Später ließen sich keine Unterschiede zwischen stimulierten und in Medium inkubierten Zellen nachweisen. Am Tag 70 p.i. ging die IL-5-Gentranskription bei beiden Stimulanzen zurück.

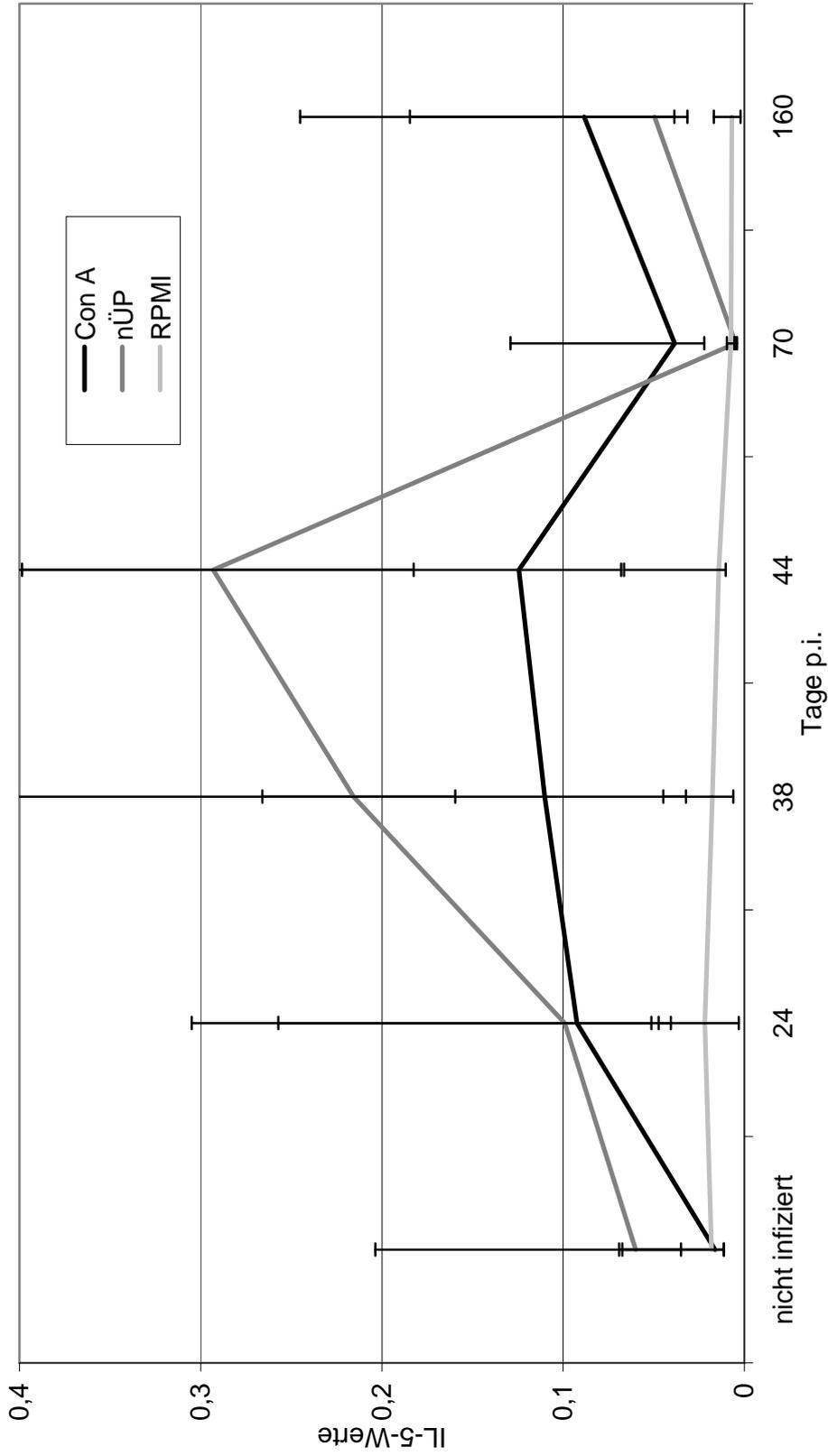


Abb. 5.42.
 IL-5-Genexpression in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

5.8.6. IL-10-Gentranskription

Die Werte der Mediumkontrollen blieben bei allen Tieren auf einem niedrigen Niveau.

Nach ConA-Stimulation zeigte sich eine insgesamt gesteigerte IL-10-Gentranskription gegenüber den Mediumkontrollen ($p \leq 0,0001$) (Abb. 5.43.). Die bereits bei nicht infizierten Tieren gesteigerte Transkription stieg bis Tag 24 p.i. an, und ging danach bis zum Tag 70 p.i. auf Werte zurück, die denen der Mediumkontrolle entsprachen. Am Tag 160 p.i. erreichten die Werte wieder das Anfangsniveau.

nÜP stimulierte bei nicht infizierten Tieren praktisch keine IL-10-Gentranskription. Auch bei infizierten Tieren waren die Effekte gering, doch ließ sich über den gesamten Infektionsverlauf gesehen dennoch eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Mediumkontrollen messen ($p \leq 0,01$). An den Tagen 24 p.i. und 160 p.i. waren gegenüber denen der nicht infizierten Tiere signifikant ($p \leq 0,05$) gesteigerte Transkriptionswerte für IL-10 zu verzeichnen.

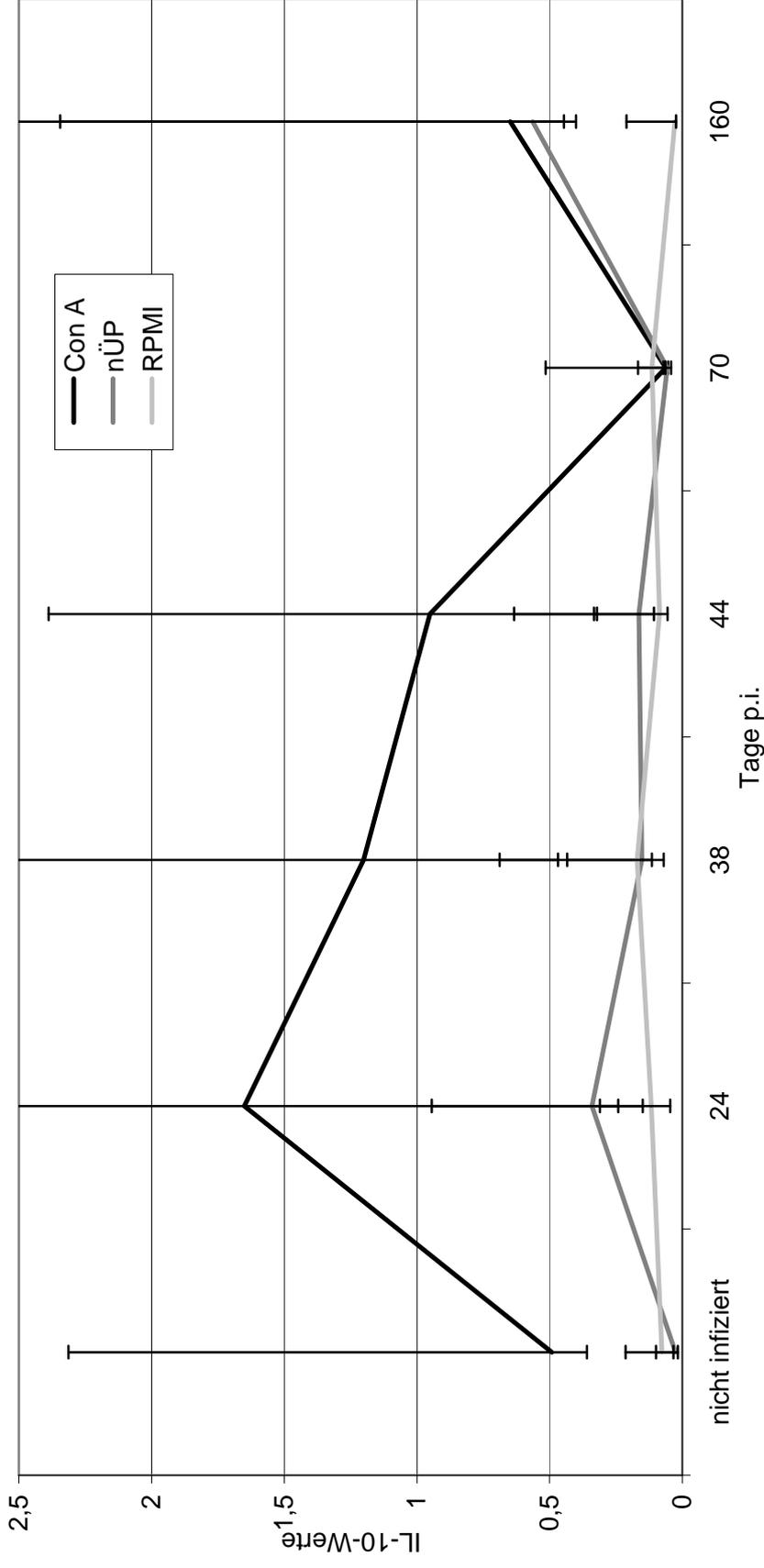


Abb. 5.43.
 IL-10-Gentranskription in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

5.8.7. IL-13-Gentranskription

Der Verlauf der IL-13-Gentranskription (Abb. 5.44.) ähnelte stark dem Verlauf für IL-10. ConA bewirkte unter Berücksichtigung aller Werte eine signifikante Steigerung der Transkription gegenüber den Mediumkontrollen ($p \leq 0,0001$). Im Infektionsverlauf ließen sich gegenüber nicht infizierten Tieren vor allem in der Präpatenz gesteigerte Effekte beobachten.

Nach nÜP-Stimulation lagen die Werte insgesamt gering aber signifikant über denen der Mediumkontrollen ($p \leq 0,01$) und änderten sich im Verlauf der Präpatenz nicht. Auffällig ist jedoch, dass sowohl für ConA als auch für nÜP ein Abfall der Transkription am Tag 70 p.i. auftrat, gefolgt von wieder leicht erhöhten Werten in der Postpatenz.

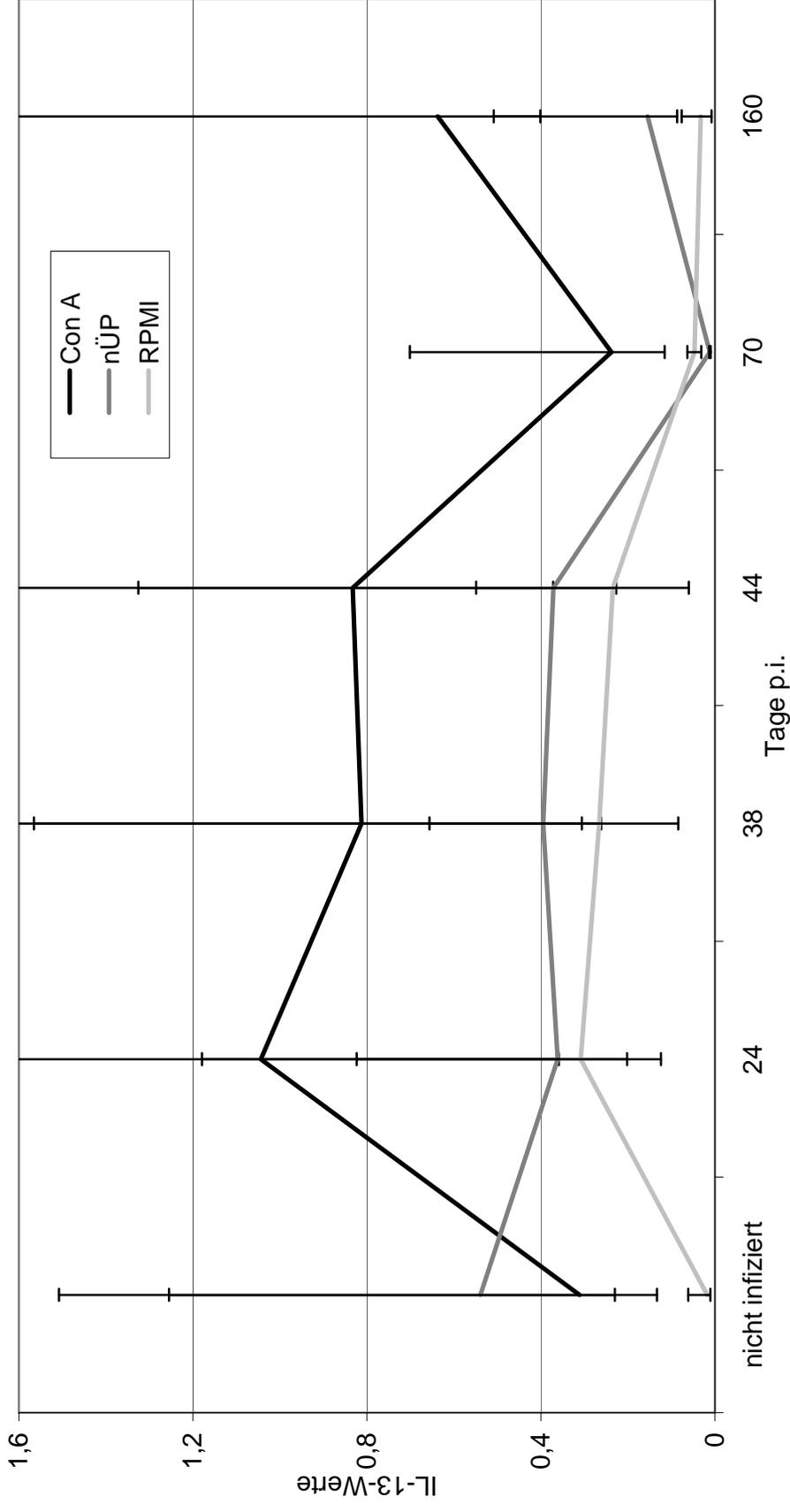


Abb. 5.44.
 IL-13-Genexpression in Milzzellen von mit 60 *L. sigmodontis* L3-infizierten BALB/c-Mäusen (Gruppengröße: 5) zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach Stimulation mit ConA und nÜP, dazu im Vergleich die Mediumkontrollen. Die Abbildung gibt die geometrischen Mittelwerte und die Streufaktoren wieder.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften des ES-Produktes Juv-p120 im Verlauf der *L. sigmodontis*-Infektion bei BALB/c-Mäusen und *M. coucha* untersucht. Hierfür wurde die zellulären Reaktionen von Milzzellen infizierter Tiere auf Juv p-120-haltigen *in-vitro*-Überstand mittels Proliferationsassays und der Erfassung von Zytokinprofilen mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR Taubert und Zahner (2001) gemessen. Weiterhin wurde der Einfluss einer Immunisierung mit Juv-p120-haltigem *in-vitro*-Überstand auf den Verlauf der *L. sigmodontis*-Infektion überprüft.

Für die relativ großen Mengen an nativem Juv-p120, die für die Versuche benötigt wurden, musste ein Verfahren gefunden werden, mit dem Juv p-120 in größeren Mengen gewonnen werden konnte. Hierfür wurde zunächst eine große Menge an präadulten Weibchen isoliert und *in vitro* kultiviert, da diese Juv p-120 sezernieren (Taubert, pers. Mitteilung). Um eine Beimengung von eventuell im Überstand störenden Fremdproteinen zu vermeiden, wurden die Parasiten in serumfreiem Medium inkubiert. Diese Methode war auch von anderen Autoren zur Gewinnung von ES-Produkten von Nematoden eingesetzt worden (Harnett et al. 1986; Harnett et al. 1989b; Allen und MacDonald 1998; Pastrana et al. 1998). In den Inkubationsmedien ließen sich im Bereich von 120-140 kDa Proteine nachweisen, die mit den Juv-p120-spezifischen Antikörpern reagierten. Es wurde daher davon ausgegangen, dass im Inkubationsüberstand Juv-p120 enthalten war. Da der Proteingehalt im nativen *in-vitro*-Überstand der präadulten Weibchen sehr niedrig war, war eine Ankonzentrierung der Überstände erforderlich. Das von Harnett et al. (1986) angewendete Verfahren einer Ankonzentrierung mittels eines Amicon[®]-Filtersystems, erwies sich aufgrund der hier vorliegenden großen Volumina an *in vitro*-Überständen als nicht praktikabel. Mit dem Vivaspin 20[®]-System, welches eine Ausschlussgrenze von 100 kDa hat, konnten die Überstände dagegen auf eine einfache Weise um etwa das 100fache ankonzentriert werden. Gleichzeitig erfolgte eine Teilreinigung der Überstände, da Proteine mit einer Größe von weniger als 100 kDa entfernt wurden. Erwartungsgemäß konnte im Durchlauf kein Juv-p120 mehr nachgewiesen werden. Da der ankonzentrierte Überstand außer Juv-p120 noch andere Proteine enthielt,

wurde in Vorstudien eine Reinigung mittels HPLC durchgeführt (Hintz et al. 1998). Damit war allerdings neben einer erneuten Verdünnung auch ein erheblicher Verlust an Juv-p120 verbunden. Da der Anteil von Juv-p120 am Protein im nicht HPLC-gereinigten, ankonzentrierten Überstand mit deutlich über 50% relativ hoch war, wurde er ohne zusätzliche Aufreinigung in den weiteren Versuchen verwendet.

Das für Juv-p120 kodierende Gen wurde von Wagner (1998) als streng stadienspezifisch expremiertes Gen angesehen, nachdem Transkripte des Gens in präadulten Weibchen, nicht aber in präadulten Männchen, adulten Parasiten oder Mikrofilarien nachweisbar waren. Das Auftreten von Molekülen in L3 und L4, welche mit dem Antiserum gegen Juv-p120 reagieren, könnte bedeuten, dass es bereits in diesen frühen Stadien zur Synthese von Juv-p120 kommt. Hier bleibt zu prüfen, ob sich korrespondierend Transkripte des Gens in diesen Stadien nachweisen lassen. Eine früh in der Parasitenentwicklung einsetzende Synthese wird aber auch in Anbetracht des frühen Auftretens von Antikörpern in infizierten Tieren wahrscheinlich. Bei dem von adulten Parasiten in den Überstand freigesetzten immunreaktiven Material ist nach den Northern-Blot-Ergebnissen von Wagner (1998) eher unwahrscheinlich, dass es sich um Juv-p120 handelt. Nachdem das Antiserum mit dem P-DMAE-modifizierten Peptid reagiert hatte, könnten auch andere DMAE-modifizierte Proteine die Ursache sein, eventuell sogar das auf die Scheidenoberfläche sezernierte ca. 120 kDa große Shp3. Zur Klärung sollten letztlich sensitive RNA-Nachweisverfahren, wie die RT-PCR, eingesetzt werden. Unabhängig von dieser Frage musste allerdings nach obigen Ergebnissen darauf verzichtet werden, Überstand adulter Weibchen als Kontrollüberstand für Reaktionen mit Juv-p120 zu verwenden. Stattdessen wurde der Juv-p120-freie Durchlauf des Anreicherungsverfahrens dazu verwendet.

Um zu überprüfen, ob eine eventuelle immunmodulatorische Wirkung von Juv-p120 durch Dimethylaminoethanol (DMAE), mit dem Juv-p120 hochgradig posttranslational modifiziert ist (Hintz et al. 1998), bedingt ist, wurde ein mit Juv-p120 nicht verwandtes Peptid mit P-DMAE modifiziert. Die Modifizierung des Peptids mit P-DMAE erwies sich als einfach und gut durchführbar. So konnte das P-DMAE-Peptid in genügend großen Mengen als Vergleichsmolekül für die Proliferationsassays hergestellt werden. Im Dotblot kam es zu einer Reaktion von Anti-Juv-p120-Hyperimmunserum mit dem P-DMAE-Peptid, die P-DMAE-Modifikationen des Peptids wurden also vom

Anti-Juv erkannt. Allerdings ist nicht vollständig geklärt, ob das polyklonale Antiserum gegen Juv-p120 auch Epitope aus der Peptidsequenz erkennt. Zwei Serin- und Threoninreiche N-terminale Wiederholungssequenzen sind reich an potentiellen O-Glykolisierungsstellen (Wagner 1998) und dürften von posttranslationalen Modifikationen abgedeckt sein. Weder ein 18 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich enthaltendes Oligopeptid noch zwei Oligopeptide aus dem C-Terminus reagierten jedoch mit dem Antiserum gegen Juv-p120 (Wagner 1998). Zudem ist das gesamte Molekül ausgesprochen hydrophob (Wagner 1998), so dass insgesamt eher von einer geringen Antigenität auszugehen sein dürfte.

Juv-p120 wird offensichtlich in erheblichen Mengen von präadulten weiblichen Parasiten freigesetzt, da es in messbaren Konzentrationen im Plasma infizierter Endwirte auftritt, wie vorangegangene Untersuchungen bei *M. coucha* zeigten. Das hierbei auf die späte Präpatenz beschränkte Auftreten von Juv-p120 ließ auf eine stadienspezifische Expression des Moleküls schließen (Taubert, pers. Mitteilung). Die hier vorliegenden Studien an infizierten BALB/C-Mäusen entsprechen in den Ergebnissen annähernd denen bei *M. coucha*. Das Vorkommen von ES-Produkten im Blut wurde auch schon bei anderen Filarienarten beschrieben, wie z. B. bei ES-62 bei *A. viteae* (Harnett et al. 1989b; Harnett et al. 1990). Dass Juv-p120 im Unterschied zu den Verhältnissen bei *M. coucha* bei BALB/c-Mäusen schon deutlich früher im Plasma erschien (an Tag 31 statt an Tag 41 p.i.) und auch länger nachweisbar blieb (bis Tag 51 im Gegensatz zu Tag 45 p.i.), könnte durch die unterschiedliche Reinigung der Plasmaproben bedingt gewesen sein. Die Plasmaproben von *M. coucha* waren mittels HPLC aufgereinigt und dabei verdünnt worden (Taubert, pers. Mitteilung).

In Übereinstimmung mit einer wie angenommen früh in der Entwicklung der Parasiten einsetzenden Expression von Juv-p120 ließen sich bereits drei Wochen p.i. in Mäusen Antikörper dagegen nachweisen. Auffallend war, dass die Antikörper nur kurzzeitig auftraten. Vorausgesetzt, dass sie im Wesentlichen DMAE-Modifikationen erfassen, könnte dies mit einer Neutralisation dieser Antikörper durch die nach Parasitämiebeginn auftretenden Scheidenproteine der Mikrofilarien Shp3 und Shp3a zusammenhängen, da diese ja in gleicher Weise wie Juv-p120 modifiziert sind. Dies

könnte insbesondere bei *M. coucha*, die während einer *L. sigmodontis*-Infektion eine hohe Parasitämie entwickeln, von Bedeutung sein.

In die Überlegungen einbezogen werden muss auch, dass es sich bei den nachgewiesenen Antikörpern ausschließlich um IgM-Antikörper gehandelt hat, d.h. eine Überleitung zur Produktion von IgG-Antikörpern ausblieb. Eine Bestimmung der beteiligten Antikörperklasse war bei den Untersuchungen nicht vorgenommen worden, doch erfasste das verwendete Konjugat sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper. Die Vermutung liegt nahe, nachdem (Al-Qaoud et al. 1998) in *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c-Mäusen als PC-spezifische Antikörper ausschließlich solche aus der IgM-Klasse fand. Auch von ES-62, einem stark mit PC modifizierten ES-Produkt von *A. viteae* ist bekannt, dass es abhängig von der Modifikation klassenspezifisch Antikörper induziert. So induziert PC-depletiertes ES-62 die Bildung von IgG1- und IgG2a-Antikörpern gegen PC-freie Epitope, während PC-haltiges ES-62 nur zur Produktion von IgG1-Antikörpern führte und die Produktion von IgG2a-Antikörpern blockierte (Houston et al. 2000).

Auch durch die Immunisierung mit nÜP wurden bei *M. coucha* und BALB/c-Mäusen Antikörperspiegel gegen Juv-p120 induziert, wobei zunehmende Konzentrationen im Infektionsverlauf sowie gegenüber mit Puffer immunisierten Tieren erhöhte Antikörperspiegel für Boostereffekte sprechen. Der auf *M. coucha* beschränkte Rückgang der Antikörperkonzentrationen zwischen den Tagen 35 und 56 p.i. stützt die oben geäußerte Ansicht, dass durch Shp3 und Shp3a auf den Scheiden der Mikrofilarien ein Neutralisationseffekt entsteht. Die im Rahmen der Immunisierungsversuche durchgeführten Belastungsinfektionen über die subkutane Verabreichung von L3 waren bei beiden Versuchstierarten erfolgreich. Die Rückfindungsraten waren bei *M. coucha* erwartungsgemäß höher als bei den BALB/c-Mäusen. Im ersten Fall entsprechen sie den Daten von Zahner und Wegerhof (1986). Die bei BALB/c-Mäusen beobachteten Rückfindungsraten decken sich im Prinzip mit denen, die Marechal et al. (1996) und Taubert und Zahner (2001) berichteten. Auch die unterschiedliche Lebensdauer der Parasiten mit langer Persistenz bei *M. coucha* und früh einsetzender Verkapselung bei BALB/c-Mäusen hatte sich schon in den früheren Studien gezeigt. Die Parasitämie bei den quantitativ infizierten *M. coucha*-Kontrollen war verhältnismäßig niedrig gegenüber natürlichen

Infektion mit gewöhnlich mehr Parasiten. Dies entspricht aber durchaus früheren Befunden bei derartig schwach infizierten Tieren (Zahner et al. 1974). Auch die minimale Parasitämie bei BALB/c-Mäusen unterscheidet sich nicht von den Angaben aus der Literatur (Marechal et al. 1996; Taubert und Zahner 2001). Die hochvariablen Rückfindungsraten und Parasitämien bei natürlich infizierten *M. coucha* erklären sich durch den dort verwendeten Infektionsmodus: Infektionen über das Saugenlassen infizierter Milben sind naturgemäß nicht weiter zu standardisieren.

Ein Einfluss der Immunisierung auf eine Belastungsinfektion ließ sich nur bei *M. coucha* beobachten, wirkte sich aber auch da nicht auf die Rückfindungsraten der Parasiten aus. Auch ein Effekt auf die Parasitämie, der aufgrund der gegenüber den Kontrollen um bis zu zwei Drittel reduzierten Mikrofilariämiedichten bei den mit nÜP immunisierten Tieren wahrscheinlich erscheint, ließ sich nicht statistisch absichern. Als signifikant erwies sich lediglich ein erhöhter Anteil an pathologisch veränderten intrauterinen Entwicklungsstadien bei den mit nÜP immunisierten Tieren.

Die Mechanismen, über die bei mit nÜP immunisierten Tieren ein Einfluss auf die Belastungsinfektion zustande kam, sind derzeit nur bedingt zu erklären. Im Falle der tendenziell reduzierten Parasitämie kann angenommen werden, dass die über DMAE mit den Scheidenoberflächenantigenen kreuzreagierenden Antikörper gegen Juv-p120 zur teilweisen vorzeitigen Elimination der Mikrofilarien führten. Zusätzlich dürfte sich der negative Effekt auf die intrauterinen Entwicklungsstadien von *L. sigmodontis* ausgewirkt haben, infolge dessen die Freisetzung viabler Mikrofilarien reduziert war. Wie es dagegen zur Beeinträchtigung der Embryogenese kam, ist vom Mechanismus unklar. Allerdings haben sich auch in Untersuchungen von Zahner und Wegerhof (1985) und Zahner und Wegerhof (1986) die intrauterinen Entwicklungsstadien von *L. sigmodontis* als sensibler Indikator von Immuneffekten erwiesen.

Um den Einfluss von Juv-p120 auf zelluläre Immunreaktionen zu erfassen, wurde in einer ersten Versuchsserie die Proliferationsleistung von Milzlymphozyten aus nicht infizierten und *L. sigmodontis*-infizierten *M. coucha* und BALB/c-Mäusen nach Stimulation mit Con A und Juv-p120-haltigem Inkubationsüberstand überprüft.

Die Wurmbürden der im versuch verwendeten Tiere variierten im Falle der *M. coucha* stark, weil die Tiere einer natürlichen Infektion durch Saugen lassen infizierter Milben

unterzogen wurden. Der Wurmbefall bei den infizierten BALB/c-Mäusen entsprach den Erwartungen.

Sowohl *L. sigmodontis*-infizierte *M. coucha* als auch BALB/c-Mäuse zeigten, gemessen als Proliferation von Milzlymphozyten nach ConA-Stimulation, eine unspezifische Immunsuppression. Im Falle von *M. coucha* bestand diese über den gesamten Untersuchungszeitraum von 300 Tagen p.i. Die Ergebnisse entsprechen in Bezug auf Präpatenz und Patenz denen früherer Untersuchungen (Mistry et al. 1985; Schönfeld und Zahner 2000), nicht aber in der Spätphase der Infektion, wo hier eine anhaltende Hyporeaktivität der Lymphozyten festgestellt wurde.

Mistry et al. (1985) und Schönfeld und Zahner (2000) hatten die von ihnen um 300 Tage p.i. beobachtete teilweise Restitution der Lymphozytenreaktivität als Folge der zurückgehenden Parasitämie gesehen. Nachdem in der vorliegenden Studie zu diesem Termin nur mikrofilarienfreie Tiere einbezogen worden waren und sich die Lymphozyten in Bezug auf ConA völlig anergisch verhielten, muss diese Interpretation in Frage gestellt werden. Bei BALB/c-Mäusen war eine statistisch gesicherte Hyporeaktivität der Milzlymphozyten auf die Patenz beschränkt. Die gleiche Beobachtung wurde von Nurmi (1998) gemacht, während in Studien von Marechal et al. (1997) die Reaktion der Zellen auf ConA durch die *L. sigmodontis*-Infektion nicht beeinflusst war.

Die Unterschiede zwischen *M. coucha* und der BALB/c-Maus könnten mit der unterschiedlichen Eignung der beiden Arten als Wirtstiere für *L. sigmodontis* in Zusammenhang stehen, entweder in dem Sinn, dass der Wirt, bei dem das Immunsystem weniger negativ beeinflusst wird – die Maus – die Parasiten besser kontrolliert oder dass in der Maus der Stoffwechsel das Parasiten so beeinträchtigt ist, dass die Einflüsse auf den Wirt geringer sind.

Eine Hyporeaktivität von T-Zellen ist im Falle der humanen Filariosen, insbesondere bei Mikrofilarienträgern eines der am häufigsten beschriebenen Merkmale. Allerdings betrifft sie gewöhnlich nur die spezifische, d.h. über Filarienantigene auslösbaren Reaktionen. Lediglich bei schweren Infektionen erstreckt sich die Hyporeaktivität auch auf polyklonale Stimulationen mit Mitogenen (Lawrence 2001; Maizels et al.

2004; Hoerauf et al. 2005). In letztere Gruppen sind sicherlich auch die Infektionen bei Nagern einzuordnen.

nÜP stimulierte im Prinzip sowohl Milzlymphozyten von infizierten *M. coucha* als auch die der infizierter BALB/c-Mäuse, allerdings ergab sich ein unterschiedliches Bild im Zeitverlauf. So zeigte sich im ersteren Fall nur 100 Tage p.i. eine signifikante Reaktion, während die Zellen infizierter Mäuse in der Präpatenz schwach und dann mit zunehmender Infektionsdauer stärker reagierten. Diese Befunde sind aus mehreren Gründen schwer zu interpretieren. Im Prinzip ließen sich damit T-Zellen infizierter Tiere erst dann signifikant mit nÜP stimulieren, wenn - nach den hier vorliegenden Ergebnissen - die Juv-p120-Konzentrationen im Plasma abfallen und zirkulierende Antikörper verschwunden waren. Im Fall der Mäuse ging die Zunahme der spezifischen T-Zellantwort mit der Elimination der adulten Filarien einher, im Fall der *M. coucha* könnte angenommen werden, dass dies mit dem Rückgang der Parasitämie assoziiert war, doch lassen die zur Verfügung stehenden Daten, die nur in größeren zeitlichen Abständen, d.h. 44, 100 und 300 Tage p.i., erhoben wurden, keinen sicheren Schluss auf eine solche zeitabhängige Dynamik zu. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen bei den Mäusen ist daher nicht möglich. Eine polyklonale Aktivierung, wie sie ES-62 in Bezug auf B-Lymphozyten aus der Maus zugeschrieben wird (Harnett et al. 1999), war für Juv-p120 anhand der Reaktion weder bei Maus- noch bei *M. coucha*-Lymphozyten (aus nicht infizierten Tieren) auszumachen. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass dazu im Fall von ES-62 Konzentrationen von 25-50 µg/ml nötig waren (Harnett et al. 1999), die in den eigenen Untersuchungen mit nÜP aus Materialmangel nicht eingesetzt werden konnten. Auch das P-DMAE-Peptid, das durchaus in höheren Konzentrationen – bis 20 µg/ml – herangezogen wurde, hatte nicht die Effekte, wie sie für PC-modifizierte Proteine beschrieben wurden (Harnett und Harnett 1993; Harnett et al. 1999; Harnett und Harnett 2001; Egan et al. 2006). Trotz struktureller Verwandtschaft unterschieden sich demnach DMAE und PC als posttranslationale Modifikation in ihrer immunmodulatorischen Wirkung.

Auf Zytokinebene dagegen wirken sowohl Con A als auch nÜP weitaus differenzierter auf Mauslymphozyten als bei der Proliferationsinduktion. Das von ConA in Zellen nicht infizierter BALB/c-Mäuse induzierte Profil der

Zytokingentranskription entspricht weitgehend anderweitig publizierten Daten (Antúnez und Cardoni 2001; Geiger et al. 2001; Gudmundsdóttir und Gudmundsdóttir 2001; Callahan und Moynihan 2002; Ritchie et al. 2003; Toenjes und Kuhn 2003; Piva et al. 2005; Rodríguez-Sosa et al. 2005; Powell und Sonnenfeld 2006). Bei Zellen infizierter Tiere variierten die IFN γ -Gentranskriptspiegel im Zeitverlauf relativ wenig; allenfalls mit der beginnenden Elimination der Parasiten war ein Anstieg zu verzeichnen. Dagegen glich im Fall des IL-2-Gens der Verlauf weitgehend dem Profil, das sich bei Proliferationsstudien ergeben hatte, d.h. eine besondere Stimulation zum Ende der Präpatenz und in der letzten Beobachtungsphase, in der keine lebenden Parasiten mehr vorzufinden waren. Die Spiegel der IL-4-Gentranskripte verliefen bis auf einen signifikanten Rückgang mit dem vermehrten Auftreten abgekapselten Parasiten und einem anschließenden Anstieg relativ gleichförmig. Unterschiedlich davon stellte sich der Verlauf bei der Transkription des IL-5-Gens mit einem deutlichen Maximum in der späten Präpatenz dar. IL-10- und IL-13-Gentranskripte waren eher in der frühen Präpatenz vermehrt. Die hier vorgelegten Daten zur Reaktion auf ConA im Infektionsverlauf entsprechen weitgehend denen von Taubert und Zahner (2001). Unterschiede bestehen allenfalls in einer hier zu vermutenden Zunahme der IL-2- und IL-4-Gentranskripte in der Postpatenz. Ein Vergleich der Wurmbürden in den eigenen Versuchen und denen von Taubert und Zahner (2001) ergab keine Unterschiede, die hier als Ursache in Frage kämen. Die Ergebnisse zeigen aber in Übereinstimmung mit Taubert und Zahner (2001) eindeutig, dass Proliferationsreaktionen und Zytokinsynthese von/ in Lymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse als Antwort auf eine unspezifische, polyklonale Stimulation voneinander weitgehend unabhängige Effekte sind.

nÜP hatte abgesehen von IL-13 keinen Einfluss auf die Zytokingentranskription in Zellen nicht infizierter Tiere. Die Effekte bei Zellen infizierter Mäuse können daher als spezifische Antwort im Sinne einer antigenen Wirkung der Präparation gesehen werden. Gesteigerte Werte waren vor allem in der Präpatenz zu beobachten, also in dem Zeitraum, in dem sich nÜP im Hinblick auf die Proliferation als unwirksam erwiesen hatte. Auch hierin dokumentiert sich wieder, dass proliferative Aktivitäten und Zytokinsynthese divergent verlaufen. Bemerkenswert ist hierbei, dass das in der vorliegenden Studie eingesetzte Antigenpektrum relativ klein war. Sicherlich

bestand nÜP, wie oben bemerkt, nicht ausschließlich aus Juv-p120, doch kann davon ausgegangen werden, dass dieses Molekül den wesentlichen Teil ausmachte.

Das Spektrum der Zytokingene, deren Transkription induziert wurde, tendiert in Richtung einer sog. TH2-Reaktion - bei praktisch fehlender IL-2-Gentranskription waren erhöhte Transkriptwerte für IL4 zu verzeichnen [vgl. (Mosmann und Coffman 1989; Romagnani 1999; Romagnani 2000)] – doch waren auch Transkripte, die einer TH1-Reaktion zuzurechnen sind, nachweisbar. Wie bei der menschlichen Filariose (vgl. Maizels et al. 2004) sind bei Verwendung komplexer Antigene im Fall *L. sigmodontis*-infizierter Mäuse Mischformen der TH1/TH2-Reaktion die Regel (Marechal et al. 1997; Nurmi 1998; Taubert und Zahner 2001). Nach den vorliegenden Daten ergibt sich aber auch bei Verwendung weitgehend aufgereinigter Antigene keine strikte TH1/TH2-Polarisierung, die eventuell Hinweise auf eine bestimmte immunmodulatorische Wirkung von Juv-p120 hätte ergeben können. Es wäre von Interesse, wie sich das von der Arbeitsgruppe um Harnett analysierte PC-haltige, immunmodulatorische ES-62 aus *A. viteae* (Harnett et al. 1999) in dieser Fragestellung verhält; solche Studien liegen allerdings nicht vor.

Unabhängig von diesen Fragen zeigen die Befunde, dass Juv-p120 in infizierten Tieren nicht nur spezifische Antikörper induziert, sondern wahrscheinlich auch in der Lage ist, zelluläre Immunreaktionen anzustoßen.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Beeinflussung der ConA-induzierten T-Zellproliferation durch Juv-p120-haltigen-*in vitro*-Überstand zu messen. Insbesondere interessierte eine mögliche Hemmung der Proliferation, wie es auch von Harnett et al. (1998, 1999) für das mit PC modifizierte ES-62 für B- und T-Zellen gezeigt wurde.

Dass Juv-p120 mit seiner DMAE-Modifikation auch immunmodulierende Eigenschaften hat, ließ sich anhand der Beeinflussung der ConA-induzierten Zellproliferation durch nÜP demonstrieren. Allerdings bestanden für diesen Effekt ausgeprägte Unterschiede zwischen den beiden eingesetzten Wirtstierspezies und offensichtlich insgesamt sehr komplizierte Zusammenhänge.

Bei BALB/c-Mäusen ließ sich in der frühen Präpatenz eine deutliche Hemmung der ConA-induzierten Zellproliferation durch nÜP induzieren. Kurz vor Patenzbeginn eingesetzt, hatte nÜP keinen Einfluß mehr auf die Proliferation, während es in der

Patenz und Postpatenz steigernd auf die T-Zellproliferation wirkte. Dies war besonders 70 Tage p.i. ausgeprägt, d.h. zu dem Zeitpunkt, zu dem Zellen ohne nÜP praktisch nicht mehr stimulierbar waren. Bei *M. coucha* konnte keine signifikante Beeinflussung der Proliferation durch nÜP gemessen werden. Aufgrund zu niedriger Konzentrationen könnte hier eine eventuelle Wirkung von nÜP hier verborgen geblieben sein.

Bei den Versuchen mit dem P-DMAE-modifizierten Peptid konnte lediglich bei Milzlymphozyten aus *M. coucha* ein signifikanter Einfluss gemessen werden. Dieser war nur bei Zellen von postpatenten Tieren, deren Zellen ohne Peptidzusatz überhaupt nicht mit Con A stimulierbar waren nachweisbar. Es führte nicht zu einer Hemmung, wie es nach den Vorversuchen, in denen Zielzellen 100 Tage p.i. isoliert worden waren, sondern zu einer signifikanten Steigerung der Con A-Wirkung. Die klare Konzentrationsabhängigkeit im letzteren Fall spricht gegen ein mögliches Artefakt. Hinsichtlich eines wie in den Vorversuchen möglichen negativen Effekts kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Peptidkonzentration mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml nicht ausreichend waren, da bei einem von drei Tieren erst eine Konzentration von 40 µg/ml zur Suppression führte. Leider erlaubte die zur Verfügung stehende Peptidmenge den Einsatz höherer Konzentrationen nicht. Bei BALB/c-Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein Effekt des P-DMAE-Peptids auf die Proliferation gemessen werden.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass Juv-p120 weniger stadienspezifisch als bisher angenommen von L3, L4 sowie in geringen Mengen von adulten Weibchen synthetisiert wird und im Plasma infizierter Wirte auftritt. Es induziert im Wirt vorübergehend nachweisbare Antikörper und zelluläre Immunreaktionen, hat aber, zur Immunisierung verwendet, allenfalls geringen Einfluss auf Belastungsinfektionen. Juv-p120 müssen immunmodulatorische Eigenschaften in Bezug auf die ConA-induzierte Proliferation von Milzlymphozyten zugeschrieben werden, jedoch dürften diese höchst komplex sein. So kann es sich nicht nur supprimierend, sondern auch abhängig von der eingesetzten Wirtsspezies und vom Zeitpunkt p.i. auch stimulierend auswirken.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese und den Wirkungen eines exkretorisch-sekretorischen Produkts, Juv-p120, aus der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis*, für das eine immunmodulatorische Funktion vermutet wurde.

Es handelt sich um ein hochgradig mit über Phosphatbrücken gebundenem Dimethylaminoethanol (DMAE) modifiziertes Molekül mit einer molekularen Masse von ca. 130 kDa. Es wurde von *in vitro* in proteinfreiem Milieu gehaltenen, 39 Tage alten präadulten Parasiten gewonnen. Es lässt sich mittels eines polyklonalen, in erster Linie gegen die Modifikation gerichteten Antiserums in Form einer Doppelbande im Bereich von 130 - 150 kDa nachweisen. Das Molekül wurde angereichert durch Filtration durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden teils vergleichend mit *Mastomys coucha* und BALB/c-Mäusen durchgeführt. In *M. coucha* betrug die Rückfindungsrate 120 Tage nach quantitativer *L. sigmodontis*-Infektion 23 %, bei BALB/c-Mäusen 80 Tage p. i. 5 %. Daneben fanden sich bei Mäusen in etwa gleicher Menge tote, abgekapselte Parasiten. *M. coucha* entwickelten eine ausgeprägte Parasitämie, in den Mäusen ließen sich nur vereinzelt Mikrofilarien nachweisen.

Juv-p120 wird von L3, L4 sowie in geringen Mengen von jungen Weibchen synthetisiert und konnte im Blutplasma *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse 31 bis 51 Tage p. i. nachgewiesen werden. Antikörper gegen Juv-p120 ließen sich in infizierten Mäusen ab Tag 14 p. i., in *M. coucha* ab Tag 35 p.i., in geringen Mengen noch 70 und 160 Tage p. i. nachweisen. Mit angereichertem Juv-p120 (nÜP) immunisierte *M. coucha* zeigten nach Belastungsinfektion eine tendenziell reduzierte Parasitämie. Die Wurmzahl war nicht beeinträchtigt, doch entwickelten die weiblichen Würmer einen erhöhten Anteil an pathologisch veränderten Embryonen. Bei immunisierten Mäusen ließ sich kein Einfluss auf eine Belastungsinfektion nachweisen.

Milzlymphozyten infizierter *M. coucha* proliferierten anders als die nicht infizierter Tiere nach Stimulation mit ConA in der Präpatenz kaum, in der Patenz und Postpatenz nicht mehr. nÜP induzierte lediglich in der frühen Patenz eine Proliferation. Zellen aus infizierten BALB/c-Mäusen reagierten auf ConA in der frühen Präpatenz und beginnenden Patenz schwächer als nicht infizierte Kontrollen, proliferierten aber dann mit der Infektionsdauer zunehmend nach Stimulation mit nÜP.

Die Transkription von Genen, kodierend für IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, wurde in Milzlymphozyten *L. sigmodontis*-infizierter BALB/c-Mäuse nach Stimulation mit ConA und nÜP mittels einer semiquantitativen RT-PCR bis 160 Tage p. i. bestimmt. Die Stimulierung mit ConA induzierte in allen Fällen eine gesteigerte Gentranskription, wobei IFN γ -, IL-10- und IL-13-Gentranskripte in der frühen Präpatenz und in der Postpatenz gesteigert waren. IL-2- und IL-4-Gentranskripte waren bei Zellen aus der frühen Präpatenz im Vergleich zu anderen Infektionsphasen eher erniedrigt. Im Fall des IL-5-Gens ließ sich nur in der späten Präpatenz eine erhöhte Transkription nachweisen. nÜP steigerte die Transkription des IFN γ -Gens allenfalls in der Postpatenz, die des IL-2- und IL-4-Gens in der späten bzw. frühen Präpatenz, hatte bei den übrigen untersuchten Genen dagegen kaum einen Einfluss.

Um den Einfluss von Juv-p120 und P-DMAE auf die Proliferationsfähigkeit von Milzlymphozyten zu überprüfen, wurden Zellen infizierter *M. coucha* und BALB/c-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten p. i. mit ConA im Beisein von nÜP (a), einem synthetischen, Juv-p120-unabhängigen, P-DMAE-modifizierten Peptid (b) sowie (c) dem nicht modifizierten Kontrollpeptid stimuliert. Das letztere Peptid hatte keinen Einfluss auf die Proliferation. Bei *M. coucha*-Milzlymphozyten ließ sich die Reaktion mit den verwendeten Mengen auch durch nÜP nicht signifikant modifizieren. Das P-DMAE-Peptid steigerte die Reaktion auf ConA in dosisabhängiger Weise bei Zellen aus der Postpatenz, die ansonsten refraktär gegen ConA waren. Maus-Milzlymphozyten wurden dagegen durch das P-DMAE-Peptid nicht in ihrer Proliferation auf ConA-Stimulierung beeinflusst, während nÜP die Reaktion von Zellen aus der Präpatenz supprimierte. Bei Lymphozyten aus der Patenz und Postpatenz führte es zu einer gesteigerten Proliferation.

8. Summary

The thesis deals with the synthesis and effects of Juv-p120, a secretory-excretory product of the rodent filaria *Litomosoides sigmodontis*, which was supposed to act in an immunomodulatory manner. Juv-p120 is a protein of a molecular mass of approximately 130 kDa which is intensely postranslationally modified by dimethyl-aminoethanol (DMAE) bound by phosphate bonds. It was collected from 39 days old, preadult female worms, incubated in protein-free medium. Using a polyclonal rabbit antiserum which was mainly directed against the modification Juv-p120 could be demonstrated by immunoblotting as a double band of 130 - 150 kDa. The molecule was enriched by filtration of the incubation supernatant through a membrane with an exclusion limit of 100 kDa.

Subsequent studies were in part performed comparatively in *Mastomys coucha* and BALB/c mice as experimental hosts. The developmental rate in *M. coucha*, determined 120 days p. i., was 23 %, in BALB/c mice, determined 80 days p. i., 5 %. In addition mice contained almost the same numbers of dead, encapsulated parasites. *M. coucha* showed an intense parasitaemia whereas microfilariae in the mice were found only occasionally.

Juv-p120 was synthesized by L3 and L4 and, in small amounts, by young female worms and was demonstrated in the blood of *L. sigmodontis*-infected BALB/c mice 31 - 51 days p. i. Antibodies to Juv-p120 were found in infected mice as early as 14 days p. i. and occurred in *M. coucha* at day 35 p.i. and in low concentration still 70 and 160 days p. i.. *M. coucha* and BALB/c-mice were immunized with enriched Juv-p120 (nÜP) and challenged with L3 of *L. sigmodontis*. Immunized *M. coucha*, as a tendency, showed reduced parasitaemia levels but numbers of adult parasites, found 120 days p. i., did not differ from controls. However, female parasites contained increased proportions of pathologically altered intrauterine stages. Immunized BALB/c mice did not differ from controls by parasitological data.

Spleen lymphocytes of *L. sigmodontis* infected *M. coucha* responded to ConA in contrast to uninfected only weakly by proliferation and were found non-reactive

during patency and postpatency. nÜP stimulation induced lymphocyte proliferation only in early patency. Cells of infected mice isolated during prepatency and early patency responded weaker to ConA than non infected controls but later on proliferated increasingly with time after infection.

Transcriptions of IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 genes induced by ConA and nÜP stimulation were studied in infected BALB/c mice up to 160 days p. i. employing a semiquantitative RT-PCR. ConA induced enhanced transcription of the genes tested, whereby increased transcript levels of IFN γ , IL-10 and IL-13 genes were found during early patency and in the stage of postpatency. In case of IL-2 and IL-4 gene transcription was rather decreased during prepatency when compared to other phases of the infection. IL-5 gene transcripts were particularly enhanced in the late prepatency. nÜP caused increased IFN γ gene transcription only in cells isolated during postpatency. IL-2 and IL-4 gene transcripts were enhanced by nÜP during late and early prepatency, respectively. In case of the other genes tested, nÜP was ineffective.

To study the influence of Juv-p120 and DMAE on the proliferative capacity of spleen lymphocytes cells were isolated from *L. sigmodontis* infected *M. coucha* and BALB/c mice at various dates p.i. and exposed to ConA in the presence of (i) nÜP, (ii) a Juv-p120-independent synthetic P-DMAE-modified peptide and (iii) the non-modified control peptide. The latter peptide did not affect ConA-induced proliferation at all. Also nÜP in the applied concentrations failed to influence the response of *M. coucha* lymphocytes. However, P-DMAE-peptide increased the proliferative response of spleen cells isolated from postpatent *M. coucha* which were otherwise non-responsive to ConA in a dose dependent manner. In contrast, the proliferation of mouse lymphocytes was not influenced by P-DMAE-peptide, whereas nÜP depressed the response of mouse lymphocytes, isolated during prepatency, but enhanced the proliferation of cells of patent and postpatent mice which otherwise did not respond to ConA at all.

9. Literaturverzeichnis

- Ah, HS and Burke, TM (1976). "Litomosoides carinii: an approach to quantitatively controlled infections in jirds." J Parasitol **62**(4): 651-2.
- Allen, JE, Lawrence, RA and Maizels, RM (1996). "APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production." Int Immunol **8**(1): 143-51.
- Allen, JE and MacDonald, AS (1998). "Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes." Parasite Immunol **20**(5): 241-7.
- Allen, JE and Loke, P (2001). "Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis." Parasite Immunol **23**(7): 345-52.
- Al-Qaoud, KM, Taubert, A, Zahner, H, Fleischer, B and Hoerauf, A (1997). "Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*: role of CD4+ T cells in controlling larval development." Infect Immun **65**(6): 2457-61.
- Al-Qaoud, KM, Fleischer, B and Hoerauf, A (1998). "The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis- -association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine." Int Immunol **10**(1): 17-25.
- Antúñez, M and Cardoni, R (2001). "Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections." Immunol Lett. Dec **3**(79(3)): 189-96.
- Atmadja, AK, Atkinson, R, Sartono, E, Partono, F, Yazdanbakhsh, M and Maizels, RM (1995). "Differential decline in filaria-specific IgG1, IgG4, and IgE antibodies in *Brugia malayi*-infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy." J Infect Dis **172**(6): 1567-72.
- Babu, S, Ganley, LM, Klei, TR, Shultz, LD and Rajan, TV (2000). "Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*." Infect Immun **68**(5): 3034-5.
- Bacharier, L and Geha, R (2000). "Molecular mechanisms of IgE regulation." J Allergy Clin Immunol. **105**(2 Pt 2): 547-58.

- Bagai, RC and Subrahmanyam, D (1968). "Studies on the host-parasite relation in albino rats infected with *Litomosoides carinii*." Am J Trop Med Hyg **17**(6): 833-9.
- Balmer, P and Devaney, E (2002). "NK T cells are a source of early interleukin-4 following infection with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*." Infect Immun **70**(4): 2215-9.
- Baltar, P, Romaris, F, Estevez, J, Leiro, J and Ubeira, FM (1998). "Carrier-dependent suppression of the anti-phosphorylcholine plaque-forming cell response in *Trichinella*-infected mice is mediated by anti-hapten IgG1 antibodies." Exp Parasitol **90**(1): 95-102.
- Bayer, M and Wenk, P (1988). "Homologous and crossreacting immune response of the jird and cotton rat against microfilariae of *Dipetalonema viteae* and *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea)." Trop Med Parasitol **39**(4): 304-8.
- Bendelac, A, Hunziker, R and Lantz, O (1996). "Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1.1 T cells." J Exp Med **184**: 1285-93.
- Bertram, D, Unsworth, K and Gordon, R (1946). "The biology and maintenance of *Liponyssus bacoti* Hirst, 1913, and investigation into its role as a vector of *Litomosoides carinii* to cotton rats and white rats, together with some observations on the life cycle." Ann Trop Med Parasit. **40**(228-55).
- Bertram, D (1966). "Dynamics of parasitic equilibrium in cotton rat filariasis." Adv Parasitol. **4**: 255-319.
- Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Callahan, T and Moynihan, J (2002). "Contrasting pattern of cytokines in antigen-versus mitogen-stimulated splenocyte cultures from chemically denervated mice." Brain Behav Immun. **Dec**(16(6)): 764-73.
- Chandler, A (1931). "New genera and species of nematode worms." Proc. U.S. Nat. Mus. **78**: 1-11.
- Chandrashekar, R, Rao, UR, Rajasekariah, GR and Subrahmanyam, D (1984). "Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients." J Helminthol **58**(1): 69-70.

- Conraths, F (1996). "Zur Struktur der Mikrofilarienscheide von *Litomosoides carinii* und ihrer Funktion in der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Wirtes." Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Cottrez, F, Hurst, SD, Coffman, RL and Groux, H (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." J Immunol **165**(9): 4848-53.
- Culbertson, J and Rose, H (1944). "Chemotherapy of filariasis in the cotton rat by administration of neostam." Science **99**: 245.
- D'Andrea, A, Aste-Amezaga, M, Valiante, N, Ma, X, Kubin, M and Trinchieri, G (1992). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells." J Exp Med. **178**(3): 1041-8.
- de Almeida, AB, Silva, MC, Braga, C and Freedman, DO (1998). "Differences in the frequency of cytokine-producing cells in antigenemic and nonantigenemic individuals with bancroftian filariasis." Infect Immun **66**(4): 1377-83.
- de Waal Malefyt, R, Yssel, H and de Vries, J (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-65.
- Deehan, MR, Frame, MJ, Parkhouse, RM, Seatter, SD, Reid, SD, Harnett, MM and Harnett, W (1998). "A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways." J Immunol **160**(6): 2692-9.
- Devaney, E, Gillan, V, Wheatley, I, Jenson, J, O'Connor, R and Balmer, P (2002). "Interleukin-4 influences the production of microfilariae in a mouse model of *Brugia* infection." Parasite Immunol **24**(1): 29-37.
- Dimock, KA, Eberhard, ML and Lammie, PJ (1996). "Th1-like antifilarial immune responses predominate in antigen-negative persons." Infect Immun **64**(8): 2962-7.
- Dissanayake, S, Watawana, L and Piessens, WF (1995). "Lymphatic pathology in *Wuchereria bancrofti* microfilaraemic infections." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(5): 517-21.

- Egan, C, Houston, K, Alcocer, M, Solovyova, A, Tate, R, Lochnit, G, McInnes, I, Harnett, M, Geyer, R, Byron, O and Harnett, W (2006). "Lack of immunological cross-reactivity between parasite-derived and recombinant forms of ES-62, a secreted protein of *Acanthocheilonema viteae*." Parasitology. 2006 **Feb**(132(Pt 2)): 263-74.
- el-Sharkawy, I, Haseeb, A and Saleh, WA (2001). "Serum levels of endothelin-1 (ET-1), interleukin-2 (IL-2) and aminoterminal propeptide type III procollagen (PIII NP) in patients with acute and chronic filariasis." J Egypt Soc Parasitol **31**(1): 169-76.
- Falcone, FH, Loke, P, Zang, X, MacDonald, AS, Maizels, RM and Allen, JE (2001). "A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection." J Immunol **167**(9): 5348-54.
- Fiorentino, D, Bond, M and Mosmann, T (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med. **170**(6): 2081-95.
- Freedman, D (1998). "Immune Dynamics in the pathogenesis in Human Filariasis." Parasitology Today **14**(6): 229-234.
- Freedman, DO, de Almeida Filho, PJ, Besh, S, Maia e Silva, MC, Braga, C and Maciel, A (1994). "Lymphoscintigraphic analysis of lymphatic abnormalities in symptomatic and asymptomatic human filariasis." J Infect Dis **170**(4): 927-33.
- Gascan, H, Gauchat, J, Roncarolo, MG, Yssel, H, Spits, H and de Vries, JE (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**: 747-750.
- Geiger, S, Abrahams-Sandi, E, Soboslay, P, Hoffmann, W, Pfaff, A, Graeff-Teixeira, C and Schulz-Key, H (2001). "Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection." Acta Trop. **Sep 1**(80(1)): 59-68.
- Goodridge, HS, Wilson, EH, Harnett, W, Campbell, CC, Harnett, MM and Liew, FY (2001). "Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*." J Immunol **167**(2): 940-5.

- Gopinath, R, Hanna, LE, Kumaraswami, V, Pillai, SV, Kavitha, V, Vijayasekaran, V, Rajasekharan, A and Nutman, TB (1999). "Long-term persistence of cellular hyporesponsiveness to filarial antigens after clearance of microfilaremia." Am J Trop Med Hyg **60**(5): 848-53.
- Groux, H, O'Garra, A, Bigler, M, Rouleau, M, Antonenko, S, de Vries, JE and Roncarolo, MG (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Gudmundsdóttir, S and Gudmundsdóttir, B (2001). "Vet Immunol Immunopathol." Aug 30 **81**(1-2)(71-83).
- Haarbrink, M, Terhell, AJ, Abadi, K, Asri, M, de Medeiros, F and Yazdanbakhsh, M (1999). "Anti-filarial IgG4 in men and women living in Brugia malayi-endemic areas." Trop Med Int Health **4**(2): 93-7.
- Harnett, MM, Deehan, MR, Williams, DM and Harnett, W (1998). "Induction of signalling anergy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product." Parasite Immunol **20**(11): 551-63.
- Harnett, W, Meghji, M, Worms, MJ and Parkhouse, RM (1986). "Quantitative and qualitative changes in production of excretions/secretions by Litomosoides carinii during development in the jird (Meriones unguiculatus)." Parasitology **93**(Pt 2): 317-31.
- Harnett, W, Grainger, M, Worms, MJ and Parkhouse, RM (1989a). "Evaluation of the potential of excretions-secretions (E-S) of Litomosoides carinii to substitute for human filarial E-S." Parasitol Res **76**(1): 39-44.
- Harnett, W, Worms, MJ, Kapil, A, Grainger, M and Parkhouse, RM (1989b). "Origin, kinetics of circulation and fate in vivo of the major excretory- secretory product of Acanthocheilonema viteae." Parasitology **99 Pt 2**: 229-39.
- Harnett, W, Worms, MJ, Grainger, M, Pyke, SD and Parkhouse, RM (1990). "Association between circulating antigen and parasite load in a model filarial system, Acanthocheilonema viteae in jirds." Parasitology **101 Pt 3**: 435-44.
- Harnett, W and Harnett, MM (1993). "Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of protein kinase C levels by a phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product." J Immunol **151**(9): 4829-37.

- Harnett, W, Houston, KM, Amess, R and Worms, MJ (1993). "Acanthocheilonema viteae: phosphorylcholine is attached to the major excretory-secretory product via an N-linked glycan." Exp Parasitol **77**(4): 498-502.
- Harnett, W and Parkhouse, R (1995). "Nature and function of parasitic nematode surface and excretory-secretory antigens." Perspectives in Nematode Physiology and Biochemistry, Narenda Publishing House: 207-242.
- Harnett, W, Deehan, MR, Houston, KM and Harnett, MM (1999). "Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein." Parasite Immunol **21**(12): 601-8.
- Harnett, W and Harnett, MM (2001). "Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes." Biochim Biophys Acta **1539**(1-2): 7-15.
- Hartmann, S, Kyewski, B, Sonnenburg, B and Lucius, R (1997). "A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production." Eur J Immunol **27**(9): 2253-60.
- Hartmann, S, Schonemeyer, A, Sonnenburg, B, Vray, B and Lucius, R (2002). "Cystatins of filarial nematodes up-regulate the nitric oxide production of interferon-gamma-activated murine macrophages." Parasite Immunol **24**(5): 253-62.
- Hintz, M, Kasper, M, Stahl, B, Geyer, R, Kalinowski, HO, Karas, M, Kuhnhardt, S, Schott, HH, Conraths, F, Zahner, H and Stirm, S (1996). "Dimethylaminoethanol is a major component of the Litomosoides carinii microfilarial sheath." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 325-8.
- Hintz, M, Schares, G, Taubert, A, Geyer, R, Zahner, H, Stirm, S and Conraths, FJ (1998). "Juvenile female Litomosoides sigmodontis produce an excretory/secretory antigen (Juv-p120) highly modified with dimethylaminoethanol." Parasitology **117**(Pt 3): 265-71.
- Hirzmann, J, Hintz, M, Kasper, M, Shresta, TR, Taubert, A, Conraths, FJ, Geyer, R, Stirm, S, Zahner, H and Hobom, G (2002). "Cloning and expression analysis of two mucin-like genes encoding microfilarial sheath surface proteins of the parasitic nematodes Brugia and Litomosoides." J Biol Chem **277**(49): 47603-12.

- Hoerauf, A, Satoguina, J, Saefel, M and Specht, S (2005). "Immunomodulation by filarial nematodes." Parasite Immunol. 2005 ;27(10-11):27(10-11) **Oct-Nov**(27(10-11)): 417-429.
- Hoffmann, W, Petit, G, Schulz-Key, H, Taylor, D, Bain, O and Le Goff, L (2000). "Litomosoides sigmodontis in mice: reappraisal of an old model for filarial research." Parasitol Today **16**(9): 387-9.
- Hoffmann, WH, Pfaff, AW, Schulz-Key, H, Soboslay, PT and Soboslav, PT (2001). "Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in Litomosoides sigmodontis filariasis." Parasitology **122**(Pt 6): 641-9.
- Houston, KM, Wilson, EH, Eyres, L, Brombacher, F, Harnett, MM, Alexander, J and Harnett, W (2000). "Presence of phosphorylcholine on a filarial nematode protein influences immunoglobulin G subclass response to the molecule by an interleukin-10- dependent mechanism." Infect Immun **68**(9): 5466-8.
- Hussain, R, Grogl, M and Ottesen, EA (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.
- Janeway, C and Travers, P (2002). Immunologie. Heidelberg-Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Janeway, C, Travers, P, Walport, M and Shlomchik, M (2002). Immunologie. Heidelberg, Gustav Fischer.
- Jenson, JS, O'Connor, R, Osborne, J and Devaney, E (2002). "Infection with Brugia microfilariae induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis." Eur J Immunol **32**(3): 858-67.
- Kasper, M (2000). "Analyse der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen in den Mikrofilarienscheiden von Litomosoides sigmodontis." Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- King, CL, Ottesen, EA and Nutman, TB (1990). "Cytokine regulation of antigen-driven immunoglobulin production in filarial parasite infections in humans." J Clin Invest **85**(6): 1810-5.
- King, CL, Kumaraswami, V, Poindexter, RW, Kumari, S, Jayaraman, K, Alling, DW, Ottesen, EA and Nutman, TB (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, CL, Mahanty, S, Kumaraswami, V, Abrams, JS, Regunathan, J, Jayaraman, K, Ottesen, EA and Nutman, TB (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, CL (2001). "Transmission intensity and human immune responses to lymphatic filariasis." Parasite Immunol **23**(7): 363-71.
- King, CL, Connelly, M, Alpers, MP, Bockarie, M and Kazura, JW (2001). "Transmission intensity determines lymphocyte responsiveness and cytokine bias in human lymphatic filariasis." J Immunol **166**(12): 7427-36.
- Kurniawan, A, Yazdanbakhsh, M, van Ree, R, Aalberse, R, Selkirk, ME, Partono, F and Maizels, RM (1993). "Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis." J Immunol **150**(9): 3941-50.
- Kwan-Lim, GE, Forsyth, KP and Maizels, RM (1990). "Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection." J Immunol **145**(12): 4298-305.
- Lal, RB, Kumaraswami, V, Steel, C and Nutman, TB (1990). "Phosphocholine-containing antigens of *Brugia malayi* nonspecifically suppress lymphocyte function." Am J Trop Med Hyg **42**(1): 56-64.
- Lammie, PJ, Hightower, AW, Richards, FO, Jr., Bryan, RT, Spencer, HC, McNeeley, DF, McNeeley, MB and Eberhard, ML (1992). "Alterations in filarial antigen-specific immunologic reactivity following treatment with ivermectin and diethylcarbamazine." Am J Trop Med Hyg **46**(3): 292-5.
- Lämmle, G, Saupe, E and Herzog, H (1968). "[Infection experiments with the cotton rat filaria *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis* (Smith, 1834)]." Z Parasitenkd **30**(4): 281-90.
- Lawrence, RA, Allen, JE, Osborne, J and Maizels, RM (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, RA, Allen, JE, Gregory, WF, Kopf, M and Maizels, RM (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, RA (2001). "Immunity to filarial nematodes." Vet Parasitol **100**(1-2): 33-44.
- Le Goff, L, Loke, P, Ali, HF, Taylor, DW and Allen, JE (2000a). "Interleukin-5 is essential for vaccine-mediated immunity but not innate resistance to a filarial parasite." Infect Immun **68**(5): 2513-7.
- Le Goff, L, Martin, C, Oswald, IP, Vuong, PN, Petit, G, Ungeheuer, MN and Bain, O (2000b). "Parasitology and immunology of mice vaccinated with irradiated *Litomosoides sigmodontis* larvae." Parasitology **120**(Pt 3): 271-80.
- Levings, M, Sangregorio, R, Galbiati, F, Squadrone, S, de Waal Malefyt, R and Roncarolo, M (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-9.
- Loke, P, MacDonald, AS and Allen, JE (2000a). "Antigen-presenting cells recruited by *Brugia malayi* induce Th2 differentiation of naive CD4(+) T cells." Eur J Immunol **30**(4): 1127-35.
- Loke, P, MacDonald, AS, Robb, A, Maizels, RM and Allen, JE (2000b). "Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact." Eur J Immunol **30**(9): 2669-78.
- MacDonald, AS, Maizels, RM, Lawrence, RA, Dransfield, I and Allen, JE (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 and Nutman, TB (1995). "Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10." Parasite Immunol **17**(8): 385-92.
- Mahanty, S, Luke, HE, Kumaraswami, V, Narayanan, PR, Vijayshekar, V and Nutman, TB (1996a). "Stage-specific induction of cytokines regulates the immune response in lymphatic filariasis." Exp Parasitol **84**(2): 282-90.
- Mahanty, S, Mollis, SN, Ravichandran, M, Abrams, JS, Kumaraswami, V, Jayaraman, K, Ottesen, EA and Nutman, TB (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, Ravichandran, M, Raman, U, Jayaraman, K, Kumaraswami, V and Nutman, TB (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.

- Maizels, R, Sartono, E, Kurniawan, A, Partono, F, Selkirk, M and Yazdanbakhsh, M (1995). "T-cell Activation and the Balance of Antibody Isotypes in Human Lymphatic Filariasis." Parasitology Today **11**(2): 50-55.
- Maizels, R, Balic, A, Gomez-Escobar, N, Nair, M, Taylor, M and Allen, J (2004). "Helminth parasites--masters of regulation." Immunol Rev. **2004 Oct**(201): 89-116.
- Maizels, RM, Kennedy, MW, Meghji, M, Robertson, BD and Smith, HV (1987). "Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*." J Immunol **139**(1): 207-14.
- Manoury, B, Gregory, WF, Maizels, RM and Watts, C (2001). "Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing." Curr Biol **11**(6): 447-51.
- Marechal, P, Le Goff, L, Petit, G, Diagne, M, Taylor, DW and Bain, O (1996). "The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice." Parasite **3**(1): 25-31.
- Marechal, P, Le Goff, L, Hoffman, W, Rapp, J, Oswald, IP, Ombrouck, C, Taylor, DW, Bain, O and Petit, G (1997). "Immune response to the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and resistant mice." Parasite Immunol **19**(6): 273-9.
- Martin, C, Le Goff, L, Ungeheuer, MN, Vuong, PN and Bain, O (2000). "Drastic reduction of a filarial infection in eosinophilic interleukin-5 transgenic mice." Infect Immun **68**(6): 3651-6.
- Michael, E, Grenfell, BT and Bundy, DA (1994). "The association between microfilaraemia and disease in lymphatic filariasis." Proc R Soc Lond B Biol Sci **256**(1345): 33-40.
- Michael, E, Bundy, D and Grenfell, B (1996). "Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis." Parasitology **112**: 409-428.
- Mistry, SS and Subrahmanyam, D (1985). "Cellular immune competence in bancroftian filariasis." J Trop Med Hyg **88**(6): 383-8.
- Mistry, SS, Tatake, RJ and Subrahmanyam, D (1985). "Cellular immune status in rodents infected with *Litomosoides carinii*." Indian J Med Res **82**: 133-8.
- Mistry, SS and Subrahmanyam, D (1986). "Unresponsiveness of lymphocytes in patent filarial infection: modulation by diethylcarbamazine." Trop Med Parasitol **37**(1): 25-7.

- Moore, K, de Waal Malefyt, R, Coffman, R and O'Garra, A (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-763.
- More, SJ and Copeman, DB (1990). "A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis." Trop Med Parasitol **41**(4): 403-6.
- Mosman, T and Moore, K (1991). "The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses." Immunol today: A49-A53.
- Mosman, T (1995). "Cytokines, Differentiation and Functions of Subsets of CD4 and CD8 T cells." Behring Inst Mitt **96**: 1-6.
- Mosman, T and Sad, S (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more." Immunol today **17**(3): 138-146.
- Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA and Coffman, RL (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.
- Mosmann, TR and Coffman, RL (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Nair, M, Cochrane, D and Allen, J (2003). "Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro." Immunol Lett **85**(2): 173-80.
- Nielsen, NO, Bloch, P and Simonsen, PE (2002). "Lymphatic filariasis-specific immune responses in relation to lymphoedema grade and infection status. II. Humoral responses." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(4): 453-8.
- Nurmi, V (1998). "Zelluläre und humorale Immunantwort bei der Infektion von BALB/c-Mäusen mit *Litomosoides sigmodontis*." Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Nutman, TB, Kumaraswami, V and Ottesen, EA (1987). "Parasite-specific anergy in human filariasis. Insights after analysis of parasite antigen-driven lymphokine production." J Clin Invest **79**(5): 1516-23.
- Nutman, TB and Kumaraswami, V (2001). "Regulation of the immune response in lymphatic filariasis: perspectives on acute and chronic infection with *Wuchereria bancrofti* in South India." Parasite Immunol **23**(7): 389-99.

- Osborne, J and Devaney, E (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.
- Ottesen, E, Duke, BO, Karam, M and Behbehani, K (1997). "Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis." Bulletin of the World Health Organisation **75**(6): 491-503.
- Ottesen, EA, Weller, PF and Heck, L (1977). "Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis." Immunology **33**(3): 413-21.
- Ottesen, EA, Skvaril, F, Tripathy, SP, Poindexter, RW and Hussain, R (1985). "Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis." J Immunol **134**(4): 2707-12.
- Pastrana, DV, Raghavan, N, FitzGerald, P, Eisinger, SW, Metz, C, Bucala, R, Schleimer, RP, Bickel, C and Scott, AL (1998). "Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor." Infect Immun **66**(12): 5955-63.
- Paul, W and Seder, R (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**: 241-251.
- Petit, G, Diagne, M, Marechal, P, Owen, D, Taylor, D and Bain, O (1992). "Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains." Ann Parasitol Hum Comp **67**(5): 144-50.
- Petrynyi, G and Mieth, H (1972). "[A rational method for the quantitative infection of susceptible hosts with the filarial nematode *Litomosoides carinii*]." Z Tropenmed Parasitol **23**(1): 2-9.
- Pfaff, AW, Schulz-Key, H, Soboslay, PT, Taylor, DW, MacLennan, K and Hoffmann, WH (2002). "*Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis." Int J Parasitol **32**(2): 171-8.
- Piessens, WF, McGreevy, PB, Piessens, PW, McGreevy, M, Koiman, I, Saroso, JS and Dennis, DT (1980). "Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: specific cellular unresponsiveness to filarial antigens." J Clin Invest **65**(1): 172-9.

- Piessens, WF, Ratiwayanto, S, Piessens, PW, Tuti, S, McGreevy, PB, Darwis, F, Palmieri, JR, Koiman, I and Dennis, DT (1981). "Effect of treatment with diethylcarbamazine on immune responses to filarial antigens in patients infected with *Brugia malayi*." Acta Trop **38**(3): 227-34.
- Piessens, WF, Partono, F, Hoffman, SL, Ratiwayanto, S, Piessens, PW, Palmieri, JR, Koiman, I, Dennis, DT and Carney, WP (1982). "Antigen-specific suppressor T lymphocytes in human lymphatic filariasis." N Engl J Med **307**(3): 144-8.
- Piva, M, Moreno, J, Jenkins, F, Smith, J, Thomas, J, Montgomery, C, Wilson, C and Sizemore, R (2005). "In vitro modulation of cytokine expression by enkephalin-derived peptides." Neuroimmunomodulation. **2005**(12(6)): 339-47.
- Platzer, C and Blankenstein, T (1995). Polymerase chain reaction to quantitative cytokine mRNA, IRL press.
- Powell, J and Sonnenfeld, G (2006). "The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production." J Interferon Cytokine Res. 2006 ;26(1):34- **Jan**(26(1)): 34-9.
- Pringle, G and King, DF (1968). "Some developments in techniques for the study of the rodent filarial parasite *Litomosoides carinii*. I. A preliminary comparison of the host efficiency of the multimammate rat, *Praomys* (*Mastomys*) *natalensis*, with that of the cotton rat, *Sigmodon hispidus*." Ann Trop Med Parasitol **62**(4): 462-8.
- Raether, W and Meyerhofer, W (1967). "[Quantitative study methods for the demonstration of microfilaria (*Litomosoides carinii*) with the help of the Fuchs-Rosenthal and Jessen counting chamber as well as concentration tests]." Z Tropenmed Parasitol **18**(1): 99-108.
- Ramzy, RM, Helmy, H, el-Lethy, AS, Kandil, AM, Ahmed, ES, Weil, GJ and Faris, R (1999). "Field evaluation of a rapid-format kit for the diagnosis of bancroftian filariasis in Egypt." East Mediterr Health J **5**(5): 880-7.
- Ravichandran, M, Mahanty, S, Kumaraswami, V, Nutman, TB and Jayaraman, K (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.

- Ritchie, A, Yam, A, Tanabe, K, Rice, S and Cooley, M (2003). "Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone." Infect Immun. 2003 **Aug**(71(8)): 4421-31.
- Rodríguez-Sosa, M, Elizondo, G, López-Durán, R, Rivera, I, Gonzalez, F and Vega, L (2005). "Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice." FEBS Lett. 2005 **Nov 21**(579(28)): 6403-10.
- Romagnani, S (1999). "Th1/Th2 cells." Inflamm Bowel Dis. **5**(4): 285-94.
- Romagnani, S (2000). "T-cell subsets (Th1 versus TH2)." Ann Allergy Asthma Immunol **85**: 9-21.
- Saeftel, M, Volkmann, L, Korten, S, Brattig, N, Al-Qaoud, K, Fleischer, B and Hoerauf, A (2001). "Lack of interferon-gamma confers impaired neutrophil granulocyte function and imparts prolonged survival of adult filarial worms in murine filariasis." Microbes Infect **3**(3): 203-13.
- Sartono, E, Kruize, YC, Partono, F, Kurniawan, A, Maizels, RM and Yazdanbakhsh, M (1995). "Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms." Parasite Immunol **17**(11): 587-94.
- Sartono, E, Kruize, YC, Kurniawan, A, Maizels, RM and Yazdanbakhsh, M (1997). "Depression of antigen-specific interleukin-5 and interferon-gamma responses in human lymphatic filariasis as a function of clinical status and age." J Infect Dis **175**(5): 1276-80.
- Sartono, E, Lopriore, C, Kruize, YC, Kurniawan-Atmadja, A, Maizels, RM and Yazdanbakhsh, M (1999). "Reversal in microfilarial density and T cell responses in human lymphatic filariasis." Parasite Immunol **21**(11): 565-71.
- Satoguina, J, Mempel, M, Larbi, J, Badusche, M, Loliger, C, Adjei, O, Gachelin, G, Fleischer, B and Hoerauf, A (2002). "Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis)." Microbes Infect **4**(13): 1291-300.
- Schaes, G, Schutzle, B, Zahner, H and Conraths, FJ (1994). "Surface antigens of *Litomosoides carinii* microfilariae: agglutinating antibodies react with sheath components of 40 and 120 kilo Dalton molecular mass." Parasitology **109**(Pt 1): 73-82.

- Schares, G and Zahner, H (1994). "IgG subclasses of the multimammate rat, *Mastomys coucha*: isolation and characterization of IgG1 and IgG2." J Exp Anim Sci **36**(2-3): 55-69.
- Schierack, P, Lucius, R, Sonnenburg, B, Schilling, K and Hartmann, S (2003). "Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin." Infect Immun **71**(5): 2422-9.
- Schonemeyer, A, Lucius, R, Sonnenburg, B, Brattig, N, Sabat, R, Schilling, K, Bradley, J and Hartmann, S (2001). "Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*." J Immunol **167**(6): 3207-15.
- Schönemeyer, A, Lucius, R, Sonnenburg, B, Brattig, N, Sabat, R, Schilling, K, Bradley, J and Hartmann, S (2001). "Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*." J Immunol **167**(6): 3207-15.
- Schönfeld, K and Zahner, H (2000). "Immunomodulatory effects in *Litomosoides sigmodontis*-infected *Mastomys coucha*." Parasitol Res **86**(2): 101-8.
- Scott, J (1946). "Observations on the rate of growth and maturity of *Litomosoides carinii*, a filarial worm of the cotton rat." J Parasitol. **32**(570-73).
- Seder, R and Paul, W (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol **12**: 635-73.
- Sher, A, Fiorentino, D, Caspar, P, Pearce, E and Mosmann, T (1991). "Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection." J Immunol. **147**(8): 2713-6.
- Steel, C, Guinea, A, McCarthy, JS and Ottesen, EA (1994). "Long-term effect of prenatal exposure to maternal microfilaraemia on immune responsiveness to filarial parasite antigens." Lancet **343**(8902): 890-3.
- Steel, C and Ottesen, EA (2001). "Evolution of immunologic responsiveness of persons living in an area of endemic bancroftian filariasis: a 17-year follow-up." J Infect Dis **184**(1): 73-9.
- Steppek, G, Auchie, M, Tate, R, Watson, K, Russell, DG, Devaney, E and Harnett, W (2002). "Expression of the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein, ES62, is stage specific." Parasitology **125**(Pt 2): 155-64.

- Taga, K and Tosato, G (1992). "IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production." J Immunol **148**(4): 1143-8.
- Taubert, A and Zahner, H (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.
- Terhell, AJ, Stolk, WA, Haarbrink, M, Mangali, A, Van Oortmarssen, GJ and Yazdanbakhsh, M (2002). "Regulation of anti-filarial IgE by infection pressure." Parasitology **124**(Pt 5): 509-19.
- Toenjes, S and Kuhn, R (2003). "The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type." Parasitol Res. **2003 Mar**(89(5)): 407-13.
- Volkman, L, Saefel, M, Bain, O, Fischer, K, Fleischer, B and Hoerauf, A (2001). "Interleukin-4 is essential for the control of microfilariae in murine infection with the filaria *Litomosoides sigmodontis*." Infect Immun **69**(5): 2950-6.
- Volkman, L, Bain, O, Saefel, M, Specht, S, Fischer, K, Brombacher, F, Matthaei, KI and Hoerauf, A (2003). "Murine filariasis: interleukin 4 and interleukin 5 lead to containment of different worm developmental stages." Med Microbiol Immunol (Berl) **192**(1): 23-31.
- Wagner, U (1998). "Klonierung und Charakterisierung des stadienspezifisch exprimierten ES-Proteins Juv-p120 aus *Litomosoides sigmodontis* und ähnlicher Sequenzen aus *Brugia malayi*." Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Wamae, CN, Roberts, JM, Eberhard, ML and Lammie, PJ (1992). "Kinetics of circulating human IgG4 after diethylcarbamazine and ivermectin treatment of bancroftian filariasis." J Infect Dis **165**(6): 1158-60.
- Wegerhof, P (1977). "Die Beeinflussung des Parasit-Wirt-Verhältnisses zwischen der Nagetierfilarie *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea) und der Baumwollratte *Sigmodon hispidus* durch Injektion von Mikrofilarien." Biol. Dissertation. Tübingen.
- Weil, GJ, Jain, DC, Santhanam, S, Malhotra, A, Kumar, H, Sethumadhavan, KV, Liftis, F and Ghosh, TK (1987). "A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis." J Infect Dis **156**(2): 350-5.

- Weil, GJ, Chandrashekar, R, Liffis, F, McVay, CS, Bosshardt, SC and Klei, TR (1990). "Circulating parasite antigen in *Brugia pahangi*-infected jirds." J Parasitol **76**(1): 78-84.
- Wenk, P (1967). "[The invasion route of the metacyclical larvae of *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae)]." Z Parasitenkd **28**(3): 240-63.
- Wenk, P and Heimburger, L (1967). "[Infection experiments with the cotton rat filaria *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae) in inadequate hosts]." Z Parasitenkd **29**(3): 282-98.
- Whelan, M, Harnett, MM, Houston, KM, Patel, V, Harnett, W and Rigley, KP (2000). "A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells." J Immunol **164**(12): 6453-60.
- WHO (2002). "Global Programme to eliminate Lymphatic Filariasis, Annual Report on Lymphatic Filariasis 2001." World Health Organisation.
- Williams, R (1948). "Studies on the life cycle of *Litomosoides carinii* filariid parasite of the cotton rat, *Sigmodon hispidus litoralis*." J Parasitol. **34**: 24-43.
- Yamaoka, KA, Kolb, JP, Miyasaka, N, Inuo, G and Fujita, K (1994). "Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fc epsilon RII/CD23 expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from T cells." Immunology **81**(4): 507-12.
- Yazdanbakhsh, M, Paxton, WA, Kruize, YC, Sartono, E, Kurniawan, A, van het Wout, A, Selkirk, ME, Partono, F and Maizels, RM (1993a). "T cell responsiveness correlates differentially with antibody isotype levels in clinical and asymptomatic filariasis." J Infect Dis **167**(4): 925-31.
- Yazdanbakhsh, M, Sartono, E, Kruize, YC, Kurniawan, A, van der Pouw-Kraan, T, van der Meide, PH, Selkirk, ME, Partono, F, Hintzen, RQ, van Lier, RA 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.
- Zahner, H, Lammler, G and Schutze, HR (1974). "[*Litomosoides carinii* infection of *Mastomys natalensis*: relationship between microfilaraemia and adult worm population (author's transl)]." Z Parasitenkd **43**(2): 115-21.

- Zahner, H and Wegerhof, PH (1985). "Immunity to *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*. I. Effect of immunization with microfilariae and existing primary infections on the parasitaemia after microfilariae injection and challenge infection." Z Parasitenkd **71**(5): 583-93.
- Zahner, H and Wegerhof, PH (1986). "Immunity to *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*. II. Effects of chemotherapeutically abbreviated and postpatent primary infections on challenges with various stages of the parasite." Z Parasitenkd **72**(6): 789-804.
- Zahner, H, Soulsby, EJ, Weidner, E, Sanger, I and Lammler, G (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, Sanger, I, Chatterjee, RK and Seibold, G (1989). "Altered immune response (humoral and delayed-type hypersensitivity reactions) to sheep red blood cells in the course of experimental filarial infections (*Litomosoides carinii*, *Brugia malayi*, *Acanthocheilonema viteae*) of *Mastomys natalensis*." Parasitol Res **75**(5): 401-11.
- Zang, X, Yazdanbakhsh, M, Jiang, H, Kanost, MR and Maizels, RM (1999). "A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases." Blood **94**(4): 1418-28.
- Zang, X, Atmadja, AK, Gray, P, Allen, JE, Gray, CA, Lawrence, RA, Yazdanbakhsh, M and Maizels, RM (2000). "The serpin secreted by *Brugia malayi* microfilariae, Bm-SPN-2, elicits strong, but short-lived, immune responses in mice and humans." J Immunol **165**(9): 5161-9.
- Zang, X, Taylor, P, Wang, JM, Meyer, DJ, Scott, AL, Walkinshaw, MD and Maizels, RM (2002). "Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure." J Biol Chem **277**(46): 44261-7.
- Zhang, S, Li, B and Weil, GJ (1999). "Human antibody responses to *Brugia malayi* antigens in brugian filariasis." Int J Parasitol **29**(3): 429-36.

10. Anhang

Anhang 1:

Werte der Angleichungsfaktoren der β_2 -Mikroglobulin-Transkripte

Tab. A 1: Der Angleichungsfaktor wurde aus dem Quotienten des Wertes des jeweiligen β_2 -Mikroglobulin-Transkriptes und dem Referenzwert 4,58 errechnet.

Tier	Stimulans		
	ConA	Juv	RPMI
Gruppe 1: Tag 0			
1	1,44936709	1,44936709	0,73162939
2	1,32753623	0,8740458	0,62059621
3	0,89980354	0,78156997	0,95416667
4	1,39209726	1,33527697	0,59791123
5	1,20526316	1,2311828	0,33528551
Gruppe 2: Tag 24			
1	0,60263158	1,10895884	1
2	0,60183968	1,15365239	
3	0,67352941	1,16243655	1,1308642
4	0,71007752	1,49185668	1,01777778
5	0,86907021	1,47266881	0,98920086
Gruppe 3: Tag 38			
1	0,88932039	7,26984127	1,26869806
2	1,18041237	1,03386005	2,63218391
3	0,8267148	0,70788253	1,20209974
4	0,76460768	0,77234401	1,47741935
5	0,93852459	0,83576642	1,3431085
Gruppe 4: Tag 44			
1	0,8657845	1,12530713	1,56849315
			1,35905045
3	0,67952522	1,40490798	2,27860697
4	0,74959083	30,53333333	1,20209974
5	1,26170799	0,74230146	1,25136612
Gruppe 5: Tag 70			
1	1,13647643	0,791019	2,29
2	1,72830189	1,30113636	7,38709677
3	0,76460768	0,90335306	1,68382353
4	0,68562874	0,76333333	1,53177258
5	0,98920086	2,11059908	1,63571429
Gruppe 6: Tag 160			
1	1,10628019	45,8	1,91631799
2	1,22133333	0,88076923	1,8247012
3	0,91053678	16,962963	1,28651685
4	1,51655629	4,92473118	0,52402746
5	0,28341584	91,6	0,75081967

Anhang 2:

Statistische Analysen

1. Immunisierung mit Juv-p120-haltigem-*in vitro*-Überstand (nÜP)

Mastomys coucha		Vergleich Gr. A und B
Mikrofilarien	Gruppe	n.s.
	Zeit	$p \leq 0,0001$
	WW Gr./Zeit	n.s.
Wurmbürde	Weibchen	n.s.
	Männchen	n.s.
	Kapseln	n.s.
Gesamtzahl Embryonalst.		n.s.
Embryogramm	multizelluläre Stadien	$p \leq 0,05$
	Ring- und Brezelstadien	$p \leq 0,01$
	Mikrofilarien	$p \leq 0,01$
BALB/c-Mäuse		Vergleich Gr. A und B
Wurmbürde	Weibchen	n.s.
	Männchen	n.s.
	Kapseln	n.s.

WW: Wechselwirkung

Gr.: Gruppe

Gr. A: mit nÜP immunisierte Gruppe

Gr. B: Kontrollgruppe

2. Proliferationsessays

Tab. A 3: Mastomys coucha: Vergleiche der verschiedenen in den Proliferationsessays zu prüfenden Substanzen

Tage p.i.	Koinkubation von ConA mit			
	nÜP	Durchlauf	P-DMAE	Lys-Peptid
0	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
24	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
38	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
44	n. s.	n. s.	p≤ 0,0001	n. s.
70	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
160	n. s.	n. s.	p≤ 0,0001	n. s.
Vergleich der Stimulanzen gegen die Kontrollgruppe				
ConA		nÜP		
p≤ 0,0001		p≤ 0,01		

Tab. A 4: BALB/c-Mäuse: Vergleiche der verschiedenen in den Proliferationsessays zu prüfenden Substanzen

Tage p.i.	Koinkubation von ConA mit	
	nÜP	Durchlauf
0	p≤ 0,0001	n. s.
24	p≤ 0,0001	p≤ 0,01
38	p≤ 0,0001	n. s.
44	n. s.	n. s.
70	p≤ 0,0001	n. s.
160	n. s.	n. s.
Vergleich der Stimulanzen gegen die Kontrollgruppe		
ConA	nÜP	
p≤ 0,01	p≤ 0,0001	

Tab. A 5: Zytokinbestimmungen: Vergleich der Stimulanzen

Zytokin	Einfluß von	Vergleich der Stimulanzen		
		nÜP/RPMI	ConA/RPMI	ConA/nÜP
IFN- γ	Gruppe	n. s.	n. s.	$p \leq 0,05$
	Behandlung	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,05$
	WW Gr./Beh.	$p \leq 0,05$	n. s.	n. s.
IL-2	Gruppe	$p \leq 0,05$	n. s.	n. s.
	Behandlung	n. s.	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,001$
	WW Gr./Beh.	n. s.	$p \leq 0,01$	n. s.
IL-4	Gruppe	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$
	Behandlung	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$
	WW Gr./Beh.	n. s.	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$
IL-5	Gruppe	n. s.	n. s.	n. s.
	Behandlung	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,0001$	n. s.
	WW Gr./Beh.	n. s.	n. s.	n. s.
IL-10	Gruppe	n. s.	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$
	Behandlung	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,001$
	WW Gr./Beh.	$p \leq 0,05$	n. s.	$p \leq 0,01$
IL-13	Gruppe	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,0001$
	Behandlung	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,0001$	$p \leq 0,001$
	WW Gr./Beh.	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,05$

WW: Wechselwirkung

Gr.: Gruppe

Beh.: Behandlung

Tab. A 6: Zytokinbestimmungen: Paarvergleiche der infizierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe

Zytokin	Tage p.i.	Vergleich Infektionsverlauf gegen die Kontrollgruppe	
		ConA	nÜP
IFN- γ	24	n. s.	n. s.
	38	n. s.	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	n. s.	n. s.
	160	n. s.	n. s.
IL-2	24	n. s.	n. s.
	38	n. s.	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	n. s.	n. s.
	160	n. s.	n. s.
IL-4	24	n. s.	n. s.
	38	n. s.	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	$p \leq 0,05$	n. s.
	160	n. s.	n. s.
IL-5	24	$p \leq 0,01$	n. s.
	38	$p \leq 0,01$	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	n. s.	n. s.
	160	n. s.	n. s.
IL-10	24	n. s.	$p \leq 0,05$
	38	n. s.	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	n. s.	n. s.
	160	n. s.	$p \leq 0,05$
IL-13	24	n. s.	n. s.
	38	n. s.	n. s.
	44	n. s.	n. s.
	70	n. s.	$p \leq 0,01$
	160	n. s.	n. s.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. H. Zahner für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit
- Dr. Anja Taubert für die praktische Betreuung der Arbeit und die immerwährende Hilfsbereitschaft
- Dr. Jörg Hirzmann, Dr. Tarig Dafa'alla und Dr. Martin Hintz für die guten Ratschläge und hilfreichen Diskussionen während der gesamten Zeit
- Christina Scheld und Brigitte Hofmann für die Unterstützung bei der Infektion, Behandlung und Sektion der *M. coucha* und BALB/c-Mäuse
- Dr. Klaus Failing und seinen Mitarbeitern für die statistische Auswertung der nicht unerheblichen Datenmengen
- Allen Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie für die gute Zusammenarbeit und eine nette Arbeitsatmosphäre
- Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich gar nicht in die Lage gekommen wäre, eine Doktorarbeit zu schreiben

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5257-9

