

**Charakterisierung von *Mansonella perstans* und  
*Litomosoides sigmodontis* induzierten  
Immunantworten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Judith Feid**

aus Neuwied

2019

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Hörauf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 30.04.2019

Aus dem Institut of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology  
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Das Immunsystem	11
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	11
1.1.2 Das erworbene Immunsystem	14
1.2 Parasiten	16
1.2.1 Filarien	17
1.2.1.1 <i>Mansonella spp</i>	20
1.2.1.2 Lebenszyklus	21
2.1.3 Die Immunantwort während einer Filarieninfektion	23
1.2.2 Das <i>Litomosoides sigmodontis</i> Mausmodell	24
1.2.3 Die Immunantwort bei einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion	27
1.3 Zielsetzung	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Geräte	31
2.1.3 Verbrauchsmaterial	32
2.1.4 Reagenzien	33
2.1.5 Kit/Assay Systeme	35
2.1.6 Puffer und Lösungen	35
2.1.6.1 Puffer für die Zytokin PCR	35
2.1.6.2 Puffer und Lösungen für den ELISA	36
2.1.6.3 Zellkulturmedium und Puffer	36
2.1.7 Primer für die qPCRs	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Gewinnung des Patientenmaterials	38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.2.1 Gewinnung der RNA aus Lungen- und Diaphragmagewebe	39
2.2.2.2 Synthesen der cDNA aus RNA	39
2.2.2.3 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	40

2.2.2.4 Die Etablierung einer spezifischen <i>M. perstans</i> qPCR	44
2.2.3 Immunologische Methoden	45
2.2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
2.2.3.2 Ready-Set-Go ELISA Kits (eBioscience)	46
2.2.3.3 Duo Set <sup>®</sup> ELISA kits (R&D)	47
2.2.3.4 Multiplex auf Beads basierende Typisierung	48
2.2.4 Parasitologische Methoden	49
2.2.4.1 Mausstämme	49
2.2.4.1.1 <i>Litomosoides sigmodontis</i> Infektion	49
2.2.4.1.2 Die T <sub>reg</sub> Depletion während der <i>L. sigmodontis</i> Infektion	50
2.2.4.2 Pleuraspülung, Gewinnung der Würmer und des Probenmaterials	51
2.2.4.3 Die Analyse von Mf Ausschüttung	51
2.2.4.4 Die Bestimmung der Wurmanzahl	52
2.2.4.5 Die Zellzahlbestimmung in der Pleuraflüssigkeit	52
2.2.4.6 Zytospins, Zellfärbung und Zelldifferenzierung	53
2.2.4.7 <i>M. perstans</i> Antigen Herstellung	53
2.2.5 Histologische Methoden	54
2.2.5.1 Die Präparation des Gewebes	54
2.2.5.2 Färbetechnik	54
2.2.5.3 Die Bestimmung der Immunzellinfiltration und Pathologie	55
2.2.6 Statistische Analyse	56
2.2.7 Anmerkung zu experimentellen Analysen	56
3. Ergebnisse	57
3.1 Die Etablierung einer <i>M. perstans</i> qPCR	57
3.1.1 Validierung der <i>M. perstans</i> qPCR	57
3.1.2 <i>M. perstans</i> infizierte Patientenproben	61
3.1.3 Spezifitätsoptimierung der <i>M. perstans</i> qPCR	62
3.1.4 Die Erhöhung der Annealing Temperatur zur Spezifitätsoptimierung	63
3.2 Das Immunprofil von <i>M.perstans</i>	65
3.2.1 Der Zytokinspiegel in den Serumproben	66
3.2.2 Erhöhtes systemisches MIP-1 $\beta$ in <i>M.perstans</i> -infizierten Individuen	67
3.2.3 Die Bestimmung von Immunglobulinen im Serum	68

3.3 Die <i>L. sigmodontis</i> Infektion	70
3.3.1 Die Pathologie der <i>L. sigmodontis</i> Infektion	70
3.3.1.1 Die Immunzellen und ihre Zusammensetzung in der Pleurahöhle	71
3.3.1.2 Die Zytokinlevel in der Pleuraflüssigkeit während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion	72
3.3.1.3 Die Chemokinelevel während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der BALB/c Maus	73
3.4 Die Immuninfiltration während der <i>L. sigmodontis</i> Infektion	74
3.4.1 Das Zytokinprofil im Gewebe der Lunge und des Diaphragmas während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion	77
3.5 Die Rolle von T <sub>regs</sub> während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion	78
3.5.2 Die Zytokin- und Chemokinproduktion nach T <sub>reg</sub> Depletion	79
3.5.3 Die Entzündungsreaktion im Pleuraspalt bei einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der Dereg Maus	81
3.6 Die Infektion mit <i>L. sigmodontis</i> im IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> BALB/c Mausstamm	83
3.6.1 <i>L. sigmodontis</i> infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse weisen eine erhöhte Wurmlast und Mf Anzahl auf	83
3.6.3 Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse zeigen erhöhte Chemokinlevel	85
4. Diskussion	90
4.1 <i>M. perstans</i> : Eine vernachlässigte tropische Krankheit	90
4.1.1. Entwicklung einer spezifischen <i>M. perstans</i> qPCR	92
4.1.2 Das Immunprofil von <i>M. perstans</i>	92
4.2 <i>L. sigmodontis</i> Infektion als Mausmodell für lymphatische Filariose und Mansonellose	97
4.2.1 Pathologie und Immunantwort	98
4.2.2 Die Rolle der T <sub>regs</sub>	99
4.2.3 Die Rolle des IL-4/IL-5 Signalwegs während der <i>L. sigmodontis</i> Infektion	100
5. Zusammenfassung	103
6. Abbildungsverzeichnis	105
7. Tabellenverzeichnis	107

8. Literaturverzeichnis	108
9. Danksagung	128

## Abkürzungsverzeichnis

AAM	alternative aktivierte Makrophagen
Abb.	Abbildung
ACT	Ammonium Chlorid Tris Puffer
A. dest	destilliertes Wasser
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
BSA	Kälber Serum Albumin
ca.	circa
CCL	Cysteine-Cysteine-Ligand Chemokine
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNA	Colisitn-Nalidixinsäure-Agar
Ct	Cycle Treshold
CTLA-4	Zytotoxisches T-lymphozyten-assoziiertes Protein 4
CXCL	Cysteine-X-Cysteine Chemokine
d	Tag
Dereg	Depletion von regulatorischen T Zellen
dKO	double Knockout
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Diphtherietoxin
DtR	Diphtherintoxin Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EDN	Eosinophiles-derived Neurotoxin
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetatsäure
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPO	Eosinophile Peroxidase
FCS	Fetales Kälberserum
Fg	femtogramm
Foxp3	Forkhead box Protein 3
GFP	Grün fluoreszierende Protein
GITR	Glucocorticoid-induzierter TNF Rezeptor
	Familie verwandte Gene
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
h	Stunden
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma-induziertes Protein-10
ITS1	Internal transcribed spacer 1
kDa	Kilodalton
KO	knockout
LF	lymphatische Filariose
<i>L. sigmodontis</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
LsAg	<i>Litomosoides sigmodontis</i> Antigen



Lsg	Lösung
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
<i>Mp</i> <i>Mf</i> <sup>+</sup> / <i>Mf</i> <sup>-</sup>	<i>Mansonella perstans</i> Mikrofilarien positiv/negativ
<i>M. perstans</i>	<i>Mansonella perstans</i>
max.	maximal
MBP	Major Masic Protein
<i>Mf</i>	Mikrofilarie
<i>Mf</i> <sup>+</sup>	Mikrofilarien positiv
<i>Mf</i> <sup>-</sup>	Mikrofilarien negativ
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MIP-2	Makrophagen Inflammations Protein-2
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
ng	Nanogram
NK	natürliche Killerzellen
NRW	Nordrhein-Westfalen
NTC	Negativkontrolle
OD	optische Dichte
OligodT	einzelsträngige DNA-Sequenzen aus Thymidin-Nukleotiden
OT	Objektträger
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Real-time

pg	Polymerasekettenreaktion
POD	Pikogram
PW	Peroxidase
RANTES	Pleuraflüssigkeit
	Reguliert durch Aktivierung, von normalen T Zellen expremiert und sekretiert
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	Pleurahöhle
TCR	spezifischen T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
T <sub>H</sub>	T Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMB	3,3',5,5' Tetramethylenbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
T <sub>regs</sub>	T regulatorische Zelle
U	Units
UKB	Universitätsklinikum Bonn
<i>W. bancrofti</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
[v/v]	[Volumen/Volumen]
[w/v]	[Gewicht/Volumen]

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bildet den zellulären und humoralen Schutzmechanismus des Körpers und ist in der Lage unterschiedlichste Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen. Zur Erfüllung dieser Aufgabe muss das Immunsystem in der Lage sein, zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Dies geschieht mittels spezieller Oberflächenantigene (Murphy et al. 2014). Pathogene haben Strategien entwickelt, dem Immunsystem zu entkommen. Einfache Mechanismen hierfür finden sich in Bakterien, die enzymatische Systeme (Defensine, Methylierung) nutzen, um sich gegen Viren zu schützen. Komplexere Strategien und Wirkmechanismen finden sich in Säugetieren (Klinke et al. 2010). Sie nutzen verschiedene Proteine, Zellen, Gewebe und Organe, die in einem komplexen Netzwerk agieren und zur Abwehr von Pathogenen dienen. Um die Abwehr bereits bekannter Pathogene zu beschleunigen, werden immunologische Gedächtniszellen entwickelt, die bei einem erneuten Eindringen zu einer schnellen und adäquaten Immunantwort führen (Klinke et al. 2010).

Diese Immunantwort lässt sich in zwei Mechanismen gliedern, die angeborene Immunabwehr und die erworbene Immunabwehr. Um eine effektive und schnelle Beseitigung des Pathogens zu gewährleisten, müssen beide Abwehrmechanismen interagieren und zusammenarbeiten (Murphy et al. 2014).

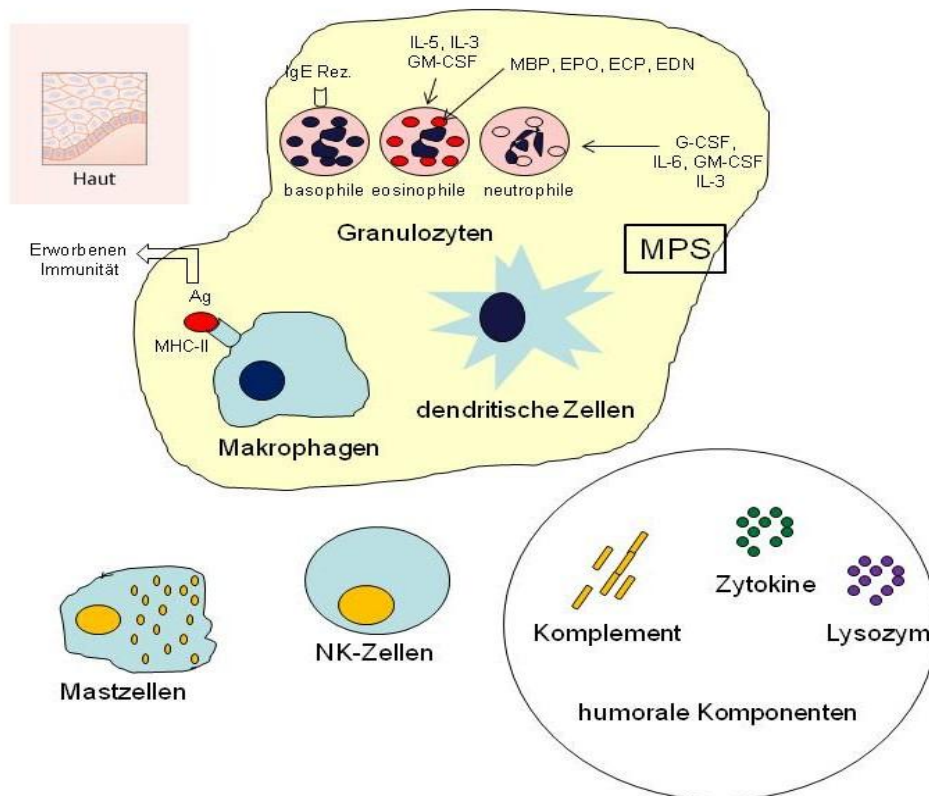
#### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Abwehr ist eine unspezifische Abwehrreaktion des Wirtes auf verschiedenste Pathogene und stellt die erste Verteidigungslinie dar. Sie wird in drei Hauptkomponenten unterteilt, deren Prozesse teilweise parallel ablaufen. Dazu gehören einerseits die mechanischen Barrieren wie Haut und Schleimhäute, die das Eindringen des Keimes verhindern sollen. Andererseits gibt es die zelluläre Komponente bestehend aus unterschiedlichen Zellen, die in der Lage sind, Keime oder infizierte Zellen zu eliminieren, wie Leukozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC). Eine weitere Komponente ist das Komplementsystem, welches zur Lyse infizierter Zellen führt und die Zytokinausschüttung beeinflusst (Murphy et al. 2014).

Wird die mechanische Barriere durch eine Verletzung geschädigt und gelingt es Keimen einzudringen, stehen ortsständige Makrophagen als erste zelluläre Verteidigungslinie zur Verfügung. Sie teilen zusammen mit den Granulozyten und den DC die Eigenschaft zu phagozytieren und gehören zum mononukleär-phagozytären System (MPS). Eine weitere Funktion haben Makrophagen auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC). Makrophagen präsentieren mithilfe des Haupthistokompatibilitätskomplex II (Major Histokompatibilitätskomplex II, MHC-II) Peptidfragmente des phagozytierten Pathogens an der Zelloberfläche. Diese Fragmente werden von T-Helferzellen erkannt. Sie aktivieren B-Lymphozyten und es kommt zur Produktion spezifischer Antikörper (Ak) (Klinke et al. 2010) und somit auch zur Aktivierung der erworbenen Immunantwort (siehe 1.1.2).

Die angeborene Abwehr zeichnet sich durch schnelle aber unspezifische Reaktionen auf Eindringlinge aus (Murphy et al. 2014). Unter anderem spielen hier Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle. Zytokine sind kleine Moleküle (~25 kDa), die ausgelöst durch bestimmte Stimuli von verschiedensten Zellen produziert werden und in der Lage sind, autokrin und parakrin zu wirken (Murphy 2012). Chemokine spielen bei der Abwehrreaktion eine entscheidende Rolle. Sie sorgen dafür, dass die Immunzellen an den Ort der Entzündung gelangen. Dieser Vorgang wird Chemotaxis genannt und es gibt unterschiedliche Substanzen, die als Anlockstoffe dienen. Sind die in den Körper eingedrungenen Pathogene zu groß, wie z. B. parasitäre Larven, dann spielen eosinophile und basophile Granulozyten eine wichtige Rolle. Eosinophile Granulozyten sind assoziiert mit allergischen Reaktionen (z. B. Asthma), viralen Infekten oder Helmintheninfektionen. Sie besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren (Chemokin-, Zytokin-, Komplementrezeptoren und Serinproteasen), die eine Rekrutierung in das entzündete Gewebe ermöglichen und für eine Freisetzung der Granula sorgen (Shamri et al. 2011). Hauptsächlich Interleukin 5 (IL-5), aber auch IL-3 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) sorgen für die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten, während Chemokinligand 11 (CCL11) und Eotaxin (CCL26) für die Rekrutierung sorgen. Allerdings können auch andere Faktoren sie aktivieren, unter anderem Toll-like-Rezeptoren, (TLR)-Liganden, Zytokine und Chemokine (Makepeace et al. 2012; Shamri et al. 2011). Die Aktivierung führt zur Freisetzung der Granula, die zur Eliminierung des Parasiten beitragen und besteht aus folgenden zytotoxischen Proteinen: Major Basic Protein (MBP), Eosinophile Peroxidase (EPO), Eosinophiles kationisches Protein

(ECP) und Eosinophiles-derived Neurotoxin (EDN) (Shamri et al. 2011). Neutrophile Granulozyten stellen die größte Anzahl an Leukozyten dar. Die wichtigsten Differenzierungsmediatoren sind G-CSF, IL-6, GM-CSF und IL-3, wobei eine Vielzahl an inflammatorischen Mediatoren in der Lage sind, eine Neutrophilie auszulösen (Summers et al. 2010). Basophile Granulozyten finden sich nur in geringer Anzahl im peripheren Blut. Sie besitzen ebenfalls Granula und können neben Chemokinen, Zytokinen und Komplement auch IgE binden (Stone et al. 2010). Neben der angeborenen Immunabwehr spielt allerdings auch die erworbene Immunantwort eine entscheidende Rolle (siehe 1.1.2).

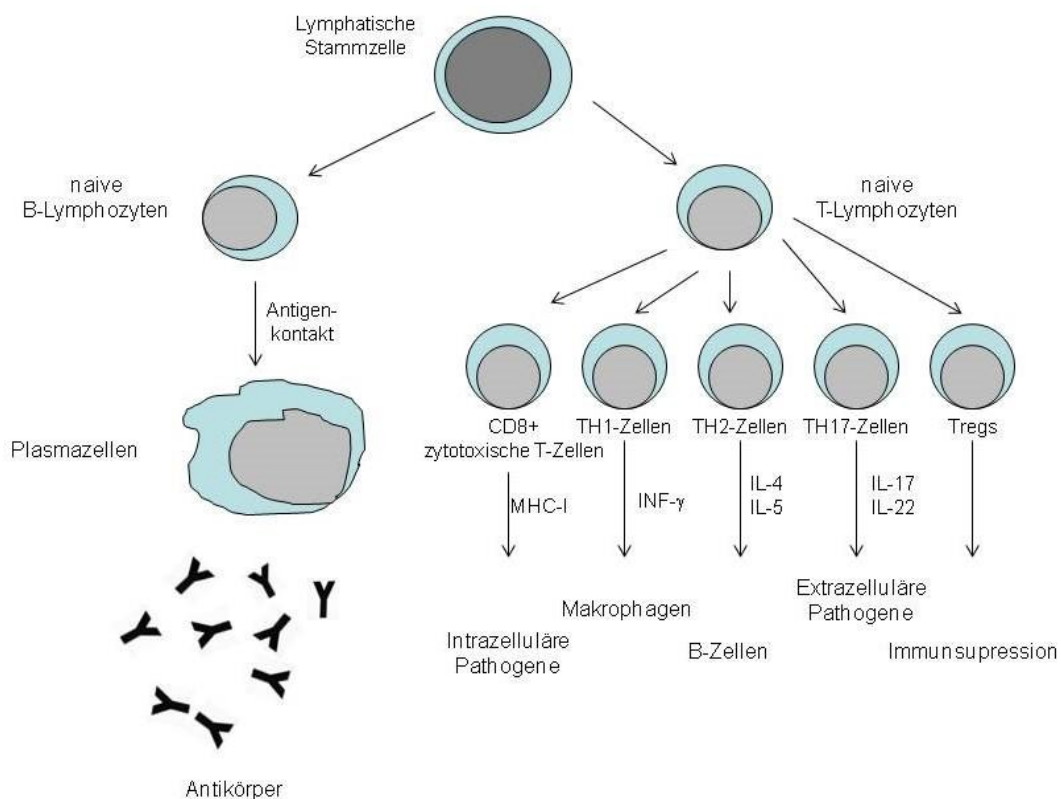


**Abb. 1:** Die angeborenen Immunzellen. Die Haut und Schleimhäute stellen die erste Barriere in der Abwehr von Pathogenen dar. Zum mononukleär-phagozytären System gehören Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. Andere wichtige Zellen zur Abwehr sind Mastzellen und NK-Zellen. Zu den humoralen Komponenten der angeborenen Immunantwort zählen die Zytokine, Lysozyme und das Komplementsystem.

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die erworbene Immunität wird hauptsächlich durch die Lymphozyten getragen und ist durch hohe Spezifität in der Erkennung von Antigenen, ein immunologisches Gedächtnis sowie die Fähigkeit, eigen und fremd zu unterscheiden, charakterisiert.

Antigenpräsentierende Zellen spielen zusammen mit dem MHC-II-Molekül in Form von Peptidfragmenten eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen (Ag). Zu den APCs gehören neben den Makrophagen auch DC in den Keimzentren der sekundären Lymphorgane und B-Zellen (Klinke et al. 2010).



**Abb. 2:** Die Entwicklung der erworbenen Immunzellen. Für die spezifische humorale Abwehr sind die B-Zellen und für die spezifische zelluläre Abwehr die T-Zellen verantwortlich. B-Zellen produzieren nach Antigenpräsentation Antikörper, die spezifisch gegen Epitope des Erregers gerichtet sind. T-Zellen werden in zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ) und in T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) eingeteilt. Die T-Helferzellen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Funktionen und unterschiedlichen Zytokinmusters in T-Helfer-1- ( $T_H1$ -), T-Helfer-2- ( $T_H2$ -), T-Helfer-17- ( $T_H17$ -) Zellen und regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) differenzieren.

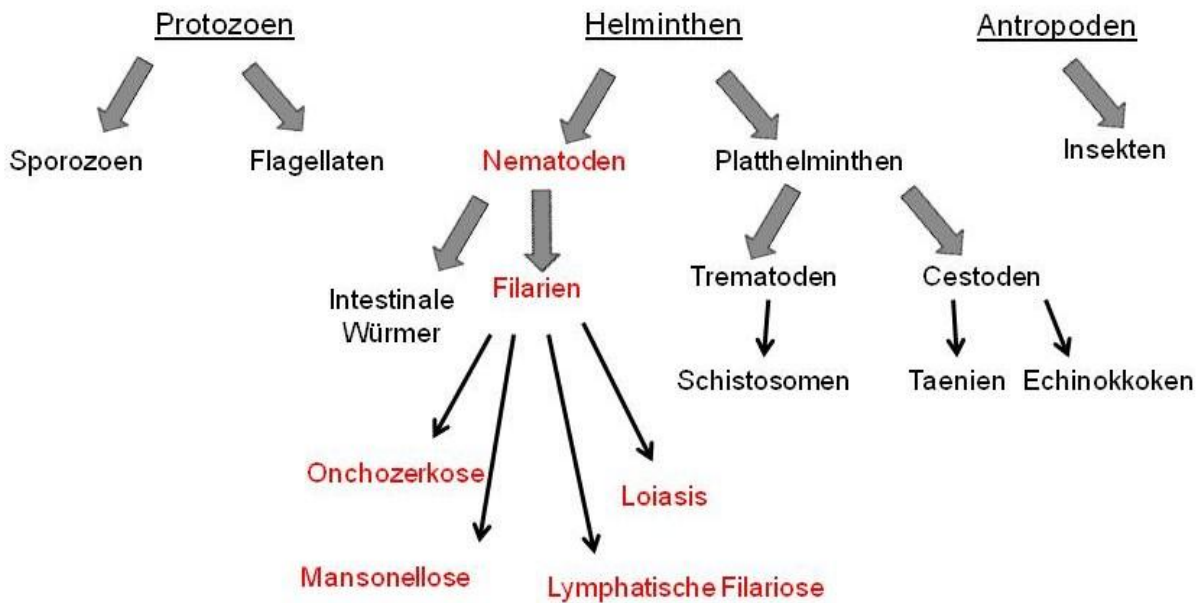
Abbildung 2 zeigt die für die spezifische humorale Abwehr verantwortlichen B-Zellen und die für die spezifische zelluläre Abwehr verantwortlichen T-Zellen. Nachdem eine aktivierte T-Zelle die B-Zellen mit passendem Oberflächenantigen stimuliert hat, produziert diese Antikörper, welche spezifisch gegen Epitope des Erregers gerichtet sind. Insbesondere IgE spielt bei der Abwehr von Parasiten und Allergien eine wichtige Rolle (Maizels et al. 2004). Die T-Lymphozyten können sich nach Antigenstimulation zu T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen differenzieren. Die T-Effektorzellen lassen sich in Cluster of Differentiation (CD) 8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen unterteilen. Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage virusinfizierte Zellen und auch Tumorzellen zu erkennen. Infizierte Zellen präsentieren fremde Antigene mit dem MHC-I-Komplex, wodurch die zytotoxischen Zellen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) binden und Enzyme (Perforine) und Proteasen (Granzyme) freisetzen (Klinke et al. 2010). Die T-Helferzellen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Funktionen und ihres Zytokinmusters in T-Helfer-1-(T<sub>H</sub>1-), T-Helfer-2-(T<sub>H</sub>2-), T-Helfer-17-(T<sub>H</sub>17-) Zellen und regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) einteilen. T<sub>H</sub>1-Zellen sind essentiell für die Abwehr intra- und extrazellulärer Infektionen durch Bakterien oder Viren. Diese Immunantwort ist durch die Sezernierung von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) charakterisiert, welches Makrophagen aktiviert (Schoenborn und Wilson 2007). Somit findet sich an dieser Stelle auch eine Interaktion mit der angeborenen Immunantwort. T<sub>H</sub>2-Zellen hingegen sind effektiver gegen extrazelluläre Infektionen, insbesondere bei Parasiten wie Helminthen. Sie sind zuständig für die Aktivierung der B-Zellen und somit wichtig für die Produktion von Ak. Neben der Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 zählt auch die Mobilisierung von Eosinophilen und Basophilen zur T<sub>H</sub>2 Immunantwort (Klinke et al. 2010; Maizels et al. 2004). Ebenfalls zu erwähnen sind T<sub>reg</sub> Zellen, die auf ihrer Oberfläche CD4 und CD25 exprimieren. CD bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen. Bei diesen Merkmalen handelt es sich zumeist um membrangebundene Glykoproteine. Zusätzlich besitzen T<sub>reg</sub> Zellen den Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (Foxp3) (Fontenot et al. 2003). Sie stellen eine Subpopulation der T-Zellen dar, die in der Lage sind das Immunsystem zu modulieren. Sie wirken immunsuppressiv und spielen eine wichtige Rolle in der Toleranz körpereigener Antigene und Autoimmunkrankheiten (Bettelli et al. 2006). Allerdings scheint ihnen auch eine Rolle in der Immunmodulation, während einer parasitären Infektion zuzukommen (Maizels und Smith 2011). Die T<sub>H</sub>17

Zellen sezernieren IL-17A, IL-17F und IL-22 und sind für die Beseitigung extrazellulärer Pathogene, Gewebsentzündungen und Autoimmunkrankheiten wie experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose und Psoriasis nötig (Bettelli et al. 2008; Harrington et al. 2005).

## 1.2 Parasiten

Die medizinische Parasitologie stellt ein wichtiges Feld der Biologie dar und beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen Parasiten und Wirt. Parasitäre Lebensformen sind erfolgreich und weltweit verbreitet. Per Definition ist Parasitismus eine Form der Antibiose, bei der ein Organismus (Parasit) auf Kosten des Anderen (Wirt) einseitig Nutzen zieht. Es besteht eine physiologische Abhängigkeit des Parasiten von seinem Wirt. Er ernährt sich von dessen organischer Substanz, wobei er den Wirt zwar schädigt, allerdings nicht zwingend tötet (Combes 2001). Die Klassifikation der Parasiten richtet sich primär nach ihrem Reproduktionsmechanismus. Die humanen Parasiten lassen sich in drei große Gruppen einteilen und sind in Abbildung 3 dargestellt: Protozoen (z. B. Sporozoen (Sporontierchen) und Flagellaten (Geißeltierchen)), Helminthen (Würmer) und Anthropoden (z. B. Insekten) (Garcia 1995). Helminthen werden weiterhin in zwei große Stämme unterteilt. Die Nematoden (auch Fadenwürmer) mit den intestinalen Würmern, sogenannte Boden-übertragende Helminthen und die Filarien, welche lymphatische Filariose (LF), Onchozerkose (Flußblindheit), Loiasis oder Mansonelliasis verursachen. Zu den Plathelminthen (Plattwürmer) gehören die Trematoden (Saugwürmer) mit Schistosomen und die Cestoden (Bandwürmer) mit den Taenien und Echinokokken (Hotez et al. 2008).





**Abb. 3:** Übersicht über humanpathogene Parasiten. Es gibt drei große Gruppen. Protozoen, Helminthen und Anthropoden. Helminthen werden weiterhin in zwei große Stämme unterteilt: Die Nematoden mit den intestinalen Würmern und die Filarien. Die wichtigsten Filariosen sind unter anderem die lymphatische Filariose (LF), Onchozerkose (Flussblindheit), Loiasis und die Mansonellose (verändert nach Hotez et al. 2008).

Weltweit sind etwa zwei Milliarden Menschen mit Helminthen infiziert. (World Health Organization 2016). Die Würmer sind in der Lage in ihrem Wirt lange zu überleben, da sie das Immunsystem des Wirts modulieren können, um ihr eigenes Überleben zu sichern. Diese Fähigkeit der Helminthen scheint Therapiemöglichkeiten bei Autoimmunerkrankheiten und Allergien zu bieten, stellt aber gleichzeitig ein Problem bei Co-Infektionen oder Impfungen dar, bei denen eine aktive Immunantwort gewünscht ist (Hartmann et al. 2015).

### 1.2.1 Filarien

Gemäß des Berichts der World Health Organization (2016) leiden über 120 Millionen Menschen an lymphatischer Filariose (LF), Onchozerkose oder Loiasis, wobei die Filariosen eine der Hauptursachen der globalen Morbidität darstellen (Hotez und Kamath 2009; Taylor et al. 2010; Ramaiah und Ottesen 2014; WHO 2016). Im Laufe der Evolution ist es den Filarien gelungen das Immunsystem des Wirts so zu modulieren, dass sie

eine Homeostase erreichten (Pfarr et al. 2009; Arndts et al. 2012; Arndts et al. 2014; Arndts et al. 2015). Daher entwickeln nur einige Individuen schwere Krankheitsformen der Infektion, wobei der Entstehungsmechanismus nicht eindeutig geklärt ist (Babu and Nutman 2012; Babu and Nutman 2014). Infektionen mit Helminthen sind meist nicht tödlich, haben aber einen großen Einfluss auf die Lebensqualität des Betroffenen.

Der Infektions- und Übertragungszyklus der einzelnen Filariosen funktioniert nach einem ähnlichen Grundprinzip. In einem Vektor (Insekt) entwickeln sich die Mikrofilarien (Mf) von der L1 Larve bis zur infektiösen L3 Larve. In diesem Stadium sind die Larven reif und bereit zur Übertragung auf den Endwirt (Mensch). Dies geschieht durch eine Blutmahlzeit. Die infektiösen L3 Larven siedeln sich in Körperflüssigkeiten oder Körperhöhlen an und entwickeln sich zum adulten Wurm. Die Weibchen produzieren Millionen von Mikrofilarien (Mf) die ins Blutsystem gelangen und dort vom Zwischenwirt durch eine Blutmahlzeit aufgenommen werden und sich in ihm entwickeln.

LF wird durch *Wuchereria bancrofti* (*W. bancrofti*) und *Brugia* Arten verursacht. Adulte Würmer der *Wuchereria*- und *Brugia*-Arten haben eine lange Reproduktionsaktivität (5-8 Jahre) (Taylor et al. 2010). Die Mf treten in periodischem Rhythmus im peripheren Blut auf. Eine Erklärung für diese Periodik könnte die Anpassung an die Blutmahlzeiten des Vektors darstellen (Taylor et al. 2010). Betroffene Patienten sind zumeist asymptomatisch und zeigen eher selten Fieberschübe, Lymphangitis und Elephantiasis (Abb. 4 A, B).



**Abb. 4:** Krankheiten ausgelöst durch verschiedene Filarien. (A, B) Ein seltenes Krankheitsbild ist die Elephantiasis, die durch *W. bancrofti* und *Brugia* Arten verursacht werden kann. Die Patienten sind stark eingeschränkt. Die Mf verstopfen die Lymphgefäße und verhindern so den Abfluß der Lymphe. Beide Bilder zeigen unterschiedlich stark ausgeprägte Formen der Krankheit. (Quelle: <http://diseasespictures.com/elephantitis/>) (C) Onchocerkose ausgelöst durch *Onchocerca volvulus* kann über eine Entzündung bis zur Blindheit führen. (D) Loiasis, eine durch *Loa loa* verursachte Erkrankung, die auch das Auge befallen kann. In diesem Fall spricht man auch vom African eyeworm. (Quelle: <http://rollingplanet.net/malaria-flussblindheit-und-lymphathische-filariose/>; [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2014/seidel\\_xaar/reproduction.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2014/seidel_xaar/reproduction.htm))

Die Symptome werden unter anderem durch die hohe Anzahl lebender Würmer in den Lymphgefäßen ausgelöst. Dort führen sie zu einer Schädigung der Gefäßwand und durch einen Lymphstau zu Ödemen. Das Absterben von Würmern und Mf wirkt als Trigger und führt so zu einer chronischen Stimulation des angeborenen (siehe 1.1.1) und erworbenen Immunsystems (siehe 1.1.2) (Hoerauf et al. 2011).

Wie im Flussdiagramm (Abb. 3) zu sehen, ist die Onchozerkose ein weiteres Krankheitsbild, das durch Filarien verursacht wird. Sie wird durch *Onchocerca volvulus* ausgelöst und symptomatische Patienten zeigen Hautveränderungen und Augenentzündungen (Abb. 4 C). Auch hier werden die Symptome durch absterbende Würmer ausgelöst (Taylor et al. 2010). Bei der Loiasis, einer durch *Loa loa* verursachten Infektion, finden sich zwei typische klinische Ausprägungen. Da der Wurm durch das Unterhautfettgewebe wandert kann es vorkommen, dass er unter der Bindehaut im Auge entlang wandert. Dort ist er dann sichtbar und wird als Augewurm (African eyeworm) bezeichnet (Abb. 4 D). Alternativ zeigt sich das Bild einer Loiasis („Kamerunbeule“), welche mit einer Schwellung zumeist an den Extremitäten einhergeht, jedoch auch im Gesicht auftreten kann (Rakita et al. 1993). Besonders interessant für diese Arbeit ist *Mansonella perstans* (*M. perstans*), auch zu den Helminthen gehörend, welche allerdings eher einen sehr milden Verlauf der Klinik hat und von der bisher keine eindeutigen Krankheitsbilder bekannt sind (Hoerauf 2009; Simonsen et al. 2011).

Ein anderer wichtiger Fakt ist die endosymbiotische Beziehung zwischen dem Bakterium *Wolbachia* und den Nematoden. *Wolbachien* finden sich bei Infektionen mit *Onchocerca volvulus* und lymphatischer Filariose, wohingegen *Loa loa* keine Koinfektion aufweist (Taylor et al. 2005b; Buttner et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *Wolbachien* eine essentielle Rolle für das Wurmwachstum und das Überleben des Parasiten im Wirt bei *Onchocerca volvulus* und lymphatischer Filariose hat. Dies konnte auch schon für die Therapie genutzt werden. Durch die Gabe von Doxycylin (Antibiotikum) konnte die Mikrofilarienanzahl signifikant reduziert werden und die adulten weiblichen Würmer wurden steril (Hoerauf et al. 2011).

Bei Infektionen mit *M. perstans* fanden sich bis jetzt widersprüchliche Ergebnisse. In Gabon, Mali und Zentralafrika konnten *Wolbachien* in den Filarien nachgewiesen werden (Keiser et al. 2008; Coulibaly et al. 2009; Gehringer et al. 2014), wohingegen bei anderen Studien in Uganda und Gabon keine nachweisbar waren (Grobusch et al. 2003).

#### 1.2.1.1 *Mansonella spp*

Die *Mansonella*-Filarien gehören zu den parasitären Fadenwürmern. Die L3 Larve entwickelt sich zur adulten Form, welche sich in den Körperhöhlen ansiedeln, insbesondere

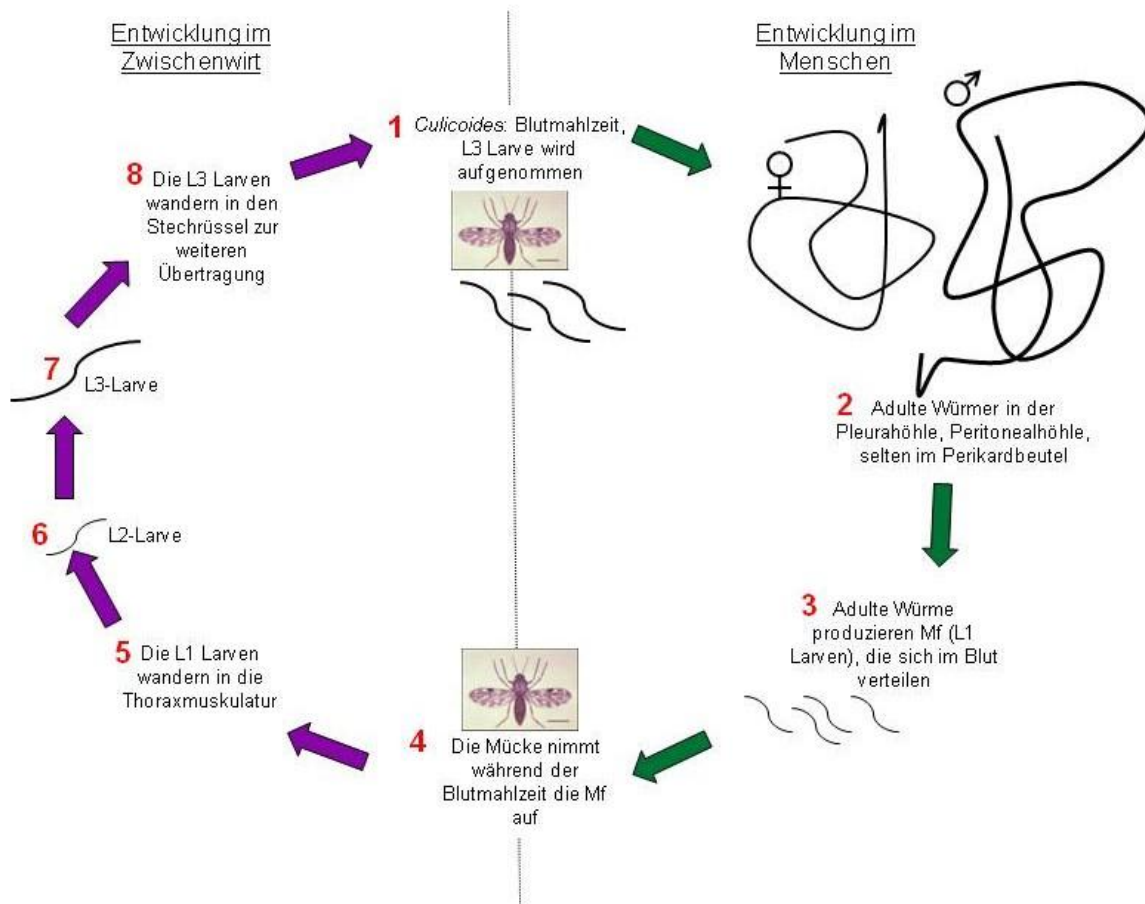
der Pleura- und Peritonealhöhle. Adulte Würmer leben ebenfalls im Mesenterium, im Perirenalraum, Retroperitonealraum oder im Perikardraum.

Es gibt drei wichtige Vertreter: *Mansonella ozzardi* und *Mansonella perstans* im Bindegewebe des Bauchfells (Peritoneum) und *Mansonella streptocerca* im Unterhautzellgewebe. *M. perstans* findet sich weit verbreitet in der Subsahara (Simonsen et al. 2011; Stensgaard et al. 2016). Die Durchseuchung in diesen Gebieten ist besonders hoch und findet bereits im Kindesalter statt. Wie zuvor erwähnt, treten bei einer Infektion mit *M. perstans* keine eindeutigen Symptome auf, weshalb diesem Parasiten kaum Beachtung geschenkt wurde. Generell werden allerdings Symptome wie abdominale Schmerzen, allergische Hautreaktionen mit Juckreiz sowie subkutane Schwellungen und Rötungen im Zusammenhang mit einer *M. perstans* Infektion beobachtet (Adolph et al. 1962; van Hoegaerden et al. 1987). Auch eine Eosinophilie zeigt sich, ähnlich wie bei anderen Filariosen (Gelfand und Bernberg 1959; Clarke et al. 1971). Es ist zu bedenken, dass Mansonelliasis in den gleichen Gebieten wie die Onchozerkose und die lymphatische Filariose auftreten. Daher sollte die Infektion mit *M. perstans* nicht unberücksichtigt bleiben, selbst wenn nur milde Symptome auftreten, da sie einen Störfaktor oder sogar einen Trigger für diese Krankheitsbilder darstellen könnte. Diese Koinfektionen erschweren zusätzlich auch die Diagnostik. Nicht nur in dieser Hinsicht gebührt *M. perstans* eine gewisse Aufmerksamkeit, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass sich hinter den zwar milden Verlaufsformen der Infektion eine Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts zeigt. Diese Interaktion könnte einen Einfluss auf dieses haben und es so modulieren, dass der Wirt anfälliger für andere Infektionen ist. Insbesondere Koinfektionen mit Mykobakterien (*Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium tuberculosis*) (Phillips et al. 2014) sind in Afrika keine Seltenheit und auch Einflüsse auf andere Krankheiten wie Malaria oder HIV scheint es zu geben (Brown et al. 2004; Brown et al. 2006; Hillier et al. 2008). Außerdem scheint es die Effizienz der BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) Impfung zu beeinflussen (Elliott et al. 2010).

#### 1.2.1.2 Lebenszyklus

*Mansonella perstans* benötigt zwei Wirte für eine vollständige Entwicklung. Als Zwischenwirt dient eine Mücke, *Culicoides*, eine Gattung der Gnitzen. In dieser entwickeln sich die Mf vom L1 Stadium bis zum L3 Stadium (Abb. 5). Mit der Blutmahlzeit überträgt

der Vektor (*Culicoides*) L3 Larven auf den Endwirt (Mensch). Es ist anzunehmen, dass die Körpertemperatur die Larven aktiviert und sie antreibt, den Vektor zu verlassen und aktiv durch die Hautschichten vorzudringen (Simonsen et al. 2011). Die weitere Entwicklung bis zum adulten Stadium und die zeitliche Dauer (präpatente Periode) sind nicht genau bekannt. Im Wirt entwickeln sich die L3 Larven zu L4 Larven und schließlich zu adulten Würmern. Die Weibchen produzieren Mf, die ihren Weg in den Blutkreislauf finden und dort dann tageszeitunabhängig nachweisbar sind (Simonsen et al. 2011). Die Mf werden vom Vektor während der Blutmahlzeit aufgenommen und gelangen im Vektor vom Magen durch die Magenwand in die Thoraxmuskulatur, wo sie sich weiterentwickeln. Wenn sie das L3 Larvenstadium erreicht haben, wandern die Larven in Richtung Stechrüssel und können so erneut übertragen werden (Simonsen et al. 2011).



**Abb. 5:** Der Lebenszyklus von *Mansonella perstans*. 1) Der Zwischenwirt (*Culicoides*) gibt die L3 Larven während der Blutmahlzeit an den Endwirt (Mensch) ab. 2) Dort entwickeln sich L3 Larven zu adulten Würmern. 3) Die Weibchen produzieren Mf, die sich im

Blut verteilen. 4) *Culicoides* nimmt bei der Blutmahlzeit die Mf (L1 Larven) auf. 5) - 7) In der Mücke entwickeln sich die L1 Larven bis zu L3 Larven. 8) Diese wandern in den Stechrüssel und können bei der nächsten Blutmahlzeit an den Endwirt übertragen werden (verändert nach CDC Centers for Disease Control and Prevention).

### 1.2.1.3 Die Immunantwort während einer Filarieninfektion

Filariosen sind komplexe Parasit-Wirt-Beziehungen, in denen eine Vielzahl von Zellen, Zytokinen und Chemokinen eine Rolle spielen. Es gibt große Bemühungen, dieses Netzwerk an Interaktionen zu verstehen und zu erforschen. Ein tieferes Verständnis dieser Mechanismen könnte neue Strategien zur Bekämpfung der Infektionen liefern.

Die Immunantwort des Wirts wird auf verschiedenste Weisen durch eine Filarieninfektion beeinflusst. Grundsätzlich verursachen Würmer eine Immunregulation und Modifikation, die dem Parasiten ein Überleben ermöglicht und auch dessen Reproduktion. Gleichzeitig wird auch der Wirt vor einer überschießenden pro-inflammatorischen Reaktion geschützt. Regulatorische Mechanismen beinhalten Zytokinproduktion, den Klassenwechsel der Immunglobuline und alternativ aktivierte Makrophagen (AAM). Für die Immunsuppression von Zellen spielen die  $T_{regs}$  und die anti-inflammatorischen Zytokine (IL-10 und TGF- $\beta$ ) eine wichtige Rolle (Babu und Nutman 2014). Eine modifizierte  $T_H2$ -Antwort ist für die Immunreaktion bei Filarieninfektionen charakteristisch. Diese Immunantwort wird durch bestimmte Zytokine gekennzeichnet, unter anderem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 (Koyasu et al. 2010). Die Anzahl an AAM, Mastzellen, basophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten steigt erheblich an. Auch Ak wie IgE, IgG1 und nicht inflammatorisches IgG4 werden vermehrt produziert. Die  $T_H2$ -Antwort wird durch die Interaktion des Parasiten mit den Abwehrzellen des Wirts wie DC und Makrophagen getriggert (Babu und Nutman 2014). Erhöhte IgE Level, induziert durch IL-4 und IL-13, sind für eine parasitäre Immunantwort charakteristisch (Hussain et al. 1981). Polyklonales IgE kann noch Jahre nach der Infektion nachgewiesen werden und lässt daher vermuten, dass IgE antigenunspezifisch produziert wird und sich Gedächtniszellen bilden. Der parasitäre Einfluss auf das Immunsystem bewirkt ein hyposensitives Immunsystem und asymptomatische Infektionen und ermöglicht dem Wurm, lange zu überleben (Babu und Nutman 2014).

Diese Fähigkeit ist hilfreich, da es bei Betroffenen auch unterschiedliche Verlaufsformen und Ausprägungen gibt. Zum Beispiel weisen ca. 50% der asymptomatischen

*Wuchereria bancrofti* infizierten Individuen keine Mf im peripheren Blut auf. Diese Mf Patienten zeigten keine starke Pathologie und blieben daher lange Zeit unentdeckt. Allerdings ist diese Kohorte epidemiologisch interessant, da sie einen Endpunkt bezüglich der Helminthenübertragung und damit einen Stopp des Lebenszyklus darstellt (Arndts et al. 2012). Durch die Erforschung des immunologischen Profils dieser Patienten und durch das Verständnis, wie sie die Mf an ihrer Entwicklung hindern, könnte es neue therapeutische Möglichkeiten geben (Arndts et al. 2012).

Des Weiteren zeigten frühere Studien, dass es einen Zusammenhang zwischen Wurm-Infektionen und chronischen Infektionen wie Asthma oder Koinfektionen wie Malaria gibt. Diese Erkenntnisse könnten dazu dienen, auch in anderen Bereichen therapeutische Erfolge zu erzielen (Hoerauf et al. 2005). Um diese Parasit-Wirt-Beziehungen zu erforschen ist ein geeignetes Mausmodell unabdingbar. Das *Litomosoides sigmodontis* (*L. sigmodontis*) Mausmodell (siehe 1.2.2) erweist sich als das beste Modell, um eine patente Infektion, also den kompletten Entwicklungszyklus vom Larvenstadium zum adulten Wurm von LF zu untersuchen.

### 1.2.2 Das *Litomosoides sigmodontis* Mausmodell

Es wurde eine Vielzahl von Mausmodellen entwickelt, um die klinischen Symptome, die Parasiten und auch die entsprechende Immunantwort im Wirt zu erforschen (Denham et al. 1983; Graham et al. 2005). Diese Mausmodelle lieferten einen Weg, die Interaktion zwischen Wirt und Parasit zu analysieren. Allerdings gelang es dem Parasit nicht, sich natürlich und vollständig zu entwickeln, da die Immunabwehr des Wirts zu stark war (Graham et al., 2005). Ein voller Entwicklungszyklus ist nur im natürlichen Wirt (Baumwollratte) möglich. Um die immunmodulatorischen Mechanismen von Filarien zu untersuchen benutzen Forscher das gut etablierte Mausmodell von *L. sigmodontis*, welches zur selben Familie gehört, wie die human pathologischen Filarien, die die lymphatische Filariose verursachen.

Somit können auch Immunantworten und Immunzellinfiltration untersucht werden (Hubner et al. 2009; Petit et al. 1992; Layland et al. 2015). Diese Nematode gehört zu der Familie der *Onchocercidae* (pathogene humane Filarien), welche bezogen auf das Migrationsverhalten der Larven, genomische und biochemische Struktureigenschaften



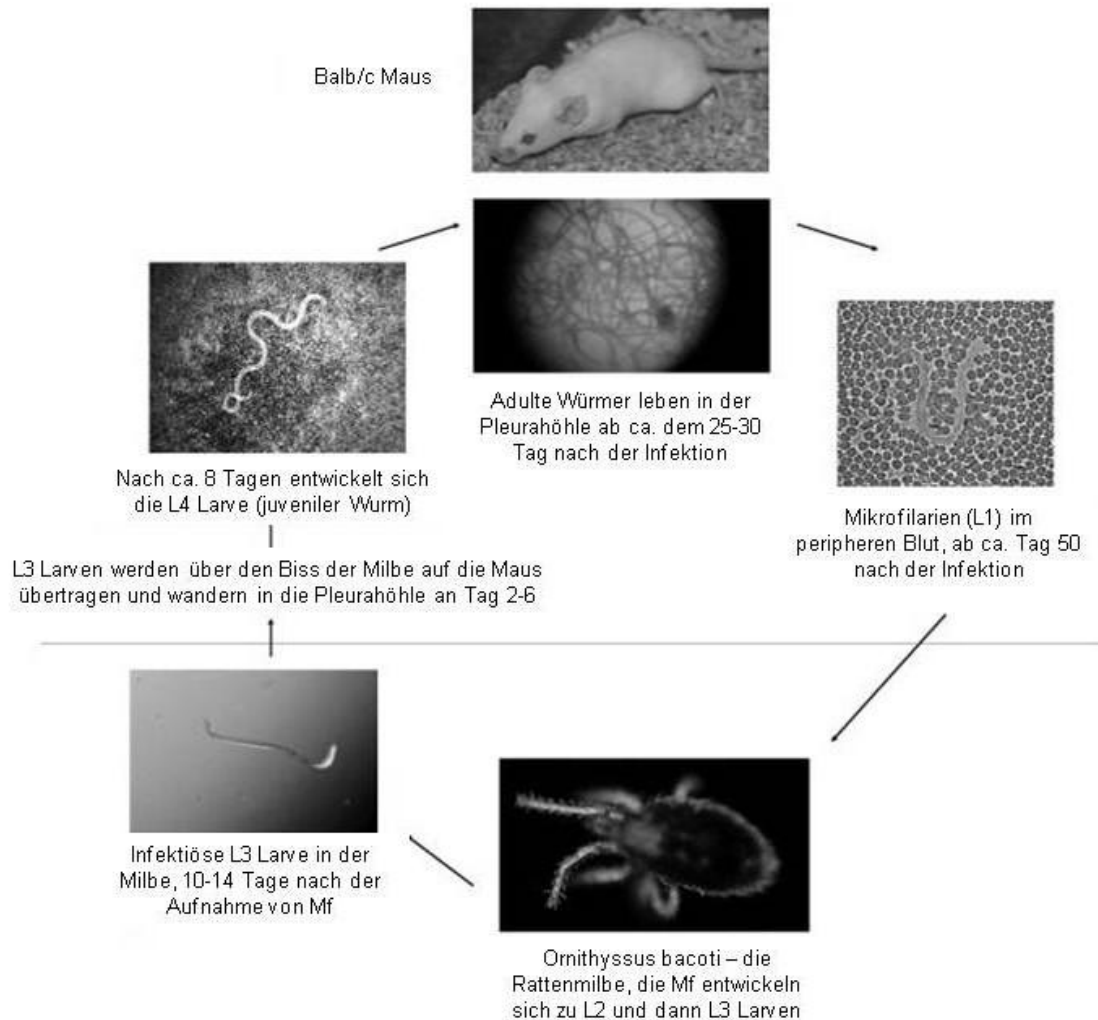
sowie immunologische Kreuzreaktionen viele überschneidende Aspekte aufweisen (Graham et al. 2005).

Die Baumwollratte *Sigmodon hispidus* (Zahner und Wegerhof 1986) oder die mongolische Rennmaus *Meriones unguiculatus* (Diagne et al. 1990) wurden als natürlicher Wirt genutzt, um *L. sigmodontis* im Labor zu erhalten. Die Übertragung von *L. sigmodontis* findet durch die tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti* während einer Blutmahlzeit von infizierten Baumwollratten oder Rennratten statt. Die aufgenommenen Mf entwickeln sich in unterschiedlichem Gewebe, wie intestinalem Gewebe, Speicheldrüsen und Coxaldrüsen (Nieguitsila et al. 2013).

Innerhalb der ersten 5-7 Tage entwickeln sich die Mf zu L2-Larven und innerhalb von 9-11 Tagen zu L3-Larven. Die infektiösen L3-Larven wandern zurück in das Haemocoel der Milbe (Hugues E.T 1950; Diagne et al. 1990), von wo aus sie bei der nächsten Blutmahlzeit an den Endwirt abgegeben werden (Nieguitsila et al. 2013). Wie in Abbildung 6 zu sehen, migriert die L3-Larve durch die lymphatischen Gefäße in die Pleurahöhle zwischen Lunge und Zwerchfell (Hoffmann et al. 2000). An diesem Ort entwickelt sich die L3-Larve über das L4-Stadium zum adulten Wurm. Männliche und weibliche adulte Würmer paaren sich und produzieren Mf, die ca. 50 bis 55 Tage nach der Infektion im peripheren Blut nachweisbar sind (Hoffmann et al. 2000).

*L. sigmodontis* ist in der Lage, verschiedene Mausstämme zu infizieren, wobei sich die Entwicklung des Parasiten unterschiedlich darstellt. Semi-resistente C57BL/6 Mäuse sind imstande, die adulten Würmer zu eliminieren (ca. Tag 40 nach Infektion) und entwickeln keine patente Infektion (die Phase ab dem Zeitpunkt der vollständigen Entwicklung zum adulten, Eier legenden Wurm und dem ersten Auftreten von Mf im peripheren Blut) (Le Goff et al. 2000; Layland et al. 2015). Durch die Entdeckung, dass *L. sigmodontis* in BALB/c Mäusen alle Entwicklungsstadien durchläuft und eine patente Infektion stattfinden kann, ergaben sich neue Möglichkeiten der Analyse (Petit et al. 1992). Die Unterschiede in der *L. sigmodontis* Resistenz der beiden Mausstämme sind durch unterschiedliche Immunantworten bedingt. Während C57Bl/6 Mäuse eher eine dominierende T<sub>H</sub>1-Antwort zeigen, entwickeln BALB/c Mäuse eine T<sub>H</sub>2 Immunantwort. Deshalb ist der Parasit in der Lage, sich in BALB/c Mäusen aus der infektiösen L3-Larve bis zum adulten Wurm zu entwickeln und Mf zu produzieren (L1-Larve), welche sich in 40-60% der

Fälle im Blut des Wirts nachweisen lassen (Petit et al. 1992; Le Goff et al. 2000; Hoffmann et al. 2000; Rodrigo et al. 2016).



**Abb. 6:** Der Lebenszyklus von *L. sigmodontis*. *L. sigmodontis* benutzt die Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti* als Zwischenwirt. Während der Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt werden Mikrofilarien (L1) aufgenommen und wandern in unterschiedliche Gewebe, wo sie sich bis zur infektiösen L3-Larve weiterentwickeln. In diesem Stadium wandern die Larven in die Mundhöhle. Nach Übertragung der L3-Larven an den Endwirt wandern diese über die Lymphgefäße in die Pleurahöhle, wo sie sich über das L4-Stadium in adulte Würmer entwickeln, Mf produzieren und somit den Kreislauf wieder schließen (verändert nach Hübner et al. 2009).

### 1.2.3 Die Immunantwort bei einer *L. sigmodontis* Infektion

Wie bereits dargestellt kann *L. sigmodontis* nur im BALB/c Labor-Mausstamm eine patente Infektion entwickeln. Verschiedene genetisch veränderte Mausstämmen stellen einen großen Wert für die Forschung dar und helfen bei dem Verständnis, wie die Parasiten das Wirts-Immunsystem regulieren. Mausstämmen mit Defiziten in bestimmten Zelltypen oder Zytokinen sind besonders wichtig, um die regulatorischen Effekte von Helminthen zu erforschen.

In der Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* spielen  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$  und  $T_{regs}$  eine wichtige Rolle (Hoerauf et al. 2005; Diaz und Allen 2007). So wurde gezeigt, dass sich bei *L. sigmodontis* Infektionen in BALB/c Mäusen hauptsächlich eine  $T_{H2}$ -Immunantwort zeigt, welche von spezifischem IgG und Eosinophilie begleitet wird. Außerdem scheint die  $T_{H2}$ -Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Entwicklung der L3-Larven zum adulten Wurm zu spielen (Al-Qaoud et al. 1997). Studien konnten zeigen, dass Mäuse, denen  $IFN-\gamma$  fehlt, nicht in der Lage waren eine Infektion mit *L. sigmodontis* zu bekämpfen (Saefel et al. 2001). Dies lässt den Schluss zu, dass auch  $T_{H1}$  Mechanismen in der Abwehr von Parasiten involviert sind (Babu und Nutman 2014). Es ist wohl bekannt, dass es während der Helmintheninfektion zu einer erhöhten Produktion von IL-4 und IL-5 ( $T_{H2}$ ) kommt (Marechal et al. 1997) und diese Zytokine eine signifikante Rolle bei der Entwicklung der patenten Infektion übernehmen. Bezüglich eines der beiden Zytokine in defizienten Mäusen zeigten sich eine höhere Mikrofilarienanzahl und eine verlängerte Überlebenszeit. In Erstinfektionen scheint IL-5 in der Entwicklung zum adulten Wurm involviert zu sein (Martin et al. 2000; Saefel et al. 2001; Volkmann et al. 2003). Dies zeigte sich durch Experimente, in welchen IL-5 defiziente Mäuse eine höhere Wurmlast hatten, wohingegen Mäuse die IL-5 überexprimierten in der Lage waren, die Parasiten schneller als Wildtypmäuse zu eliminieren (Martin et al. 2000). IL-4 scheint eine wichtige Rolle in der Reifung der Helminthen in C57BL/6 Mäusen zu spielen. In infizierten Mäusen, die kein IL-4 bilden können, entwickeln sich die Helminthen bis zur patenten Infektion. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass IL-4 und somit die  $T_{H2}$ -Immunantwort eine Schlüsselrolle bei der patenten Infektion und auch bei der Immunabwehr spielen (Le Goff et al. 2000). IL-2 fördert die Produktion von  $T_{H1}$ -Zellen und der Zytokine  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\beta$ , die für das Rekrutieren von Makrophagen, die Hochregulati-

on verschiedener Zytokine sowie die Einleitung der Apoptose essentiell sind (Trautmann et al. 2002).

Das T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN- $\gamma$  hat einen wichtigen Einfluss während der Infektion mit *L. sigmodontis*, da defiziente Mäuse während einer Infektion mit *B. malayi* eine höhere Wurmlast haben als Wildtyp Mäuse (Babu et al. 2000).

Sowohl IL-5 als auch IFN- $\gamma$  haben einen Effekt auf die Knotenbildung und die Beseitigung der Würmer (Osborne et al. 1996; SaefteI et al. 2003). Dieser Synergismus der beiden Zytokine wurde mithilfe von knockout (KO) Mäusen untersucht und zeigte eine erhöhte Wurmlast im Vergleich zu defizienten Mäusen für nur eins der beiden Zytokine (SaefteI et al. 2003). Je nach Entwicklungsstufe des Parasiten spielen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Immunantworten eine Rolle und können diese kontrollieren. Die Effektorzellen agieren während einer Helmintheninfektion synergistisch (SaefteI et al. 2003).

Eines der wichtigsten Zytokine für die Immunsuppression ist IL-10. Auch während einer Filariose reguliert es die Proliferation von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen (Taylor et al. 2006). Bei *L. sigmodontis* Infektionen scheint es einen Einfluss auf die Anfälligkeit der Filarien zu haben (Hoffmann et al. 2001). Studien haben gezeigt, dass hohe Spiegel von IL-10 das Überleben von adulten Würmern und Mf begünstigen (Specht et al. 2012). Regulatorische Eigenschaften werden sowohl IL-10 als auch TGF- $\beta$  zugeschrieben (Babu et al. 2006) und sind in die Aktivierung und Induktion von T<sub>reg</sub> Zellen verwickelt (Roncarolo et al. 2006). T<sub>reg</sub> Zellen sind in der Lage die Pathologie zu limitieren, indem sie die Inflammation drosseln und die Autoimmunreaktion kontrollieren. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen sind während einer *L. sigmodontis* Infektion aktiv und sorgen durch die Suppression der Immunantwort des Wirts für ein Überleben des adulten Parasiten (Taylor et al. 2007).

Auch neutrophile Granulozyten haben eine große Bedeutung bei der Bekämpfung der Parasiten. Sie sind unter anderem für die Einkapselung der Würmer mit verantwortlich (Al-Qaoud 2000). In Studien wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  KO Mäuse eine geringere Chemotaxis und Phagozytose im Vergleich zu Wildtyp Mäusen hatten (SaefteI et al. 2001) und IL-5 KO Mäuse eine geringere Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Pleurahöhle aufwiesen (Al-Qaoud 2000). Beide Zytokine (IL-5 und IFN- $\gamma$ ) fördern die Produktion von TNF- $\alpha$  (SaefteI et al. 2001), welches für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine essentielle Rolle spielt (Al-Qaoud 2000). Neben den patenten Infekti-

onen in den BALB/c Mäusen lässt sich in anderen Mausstämmen die Immunmodulation bei kompletter Eradikation von *L. sigmodontis* untersuchen.

Durch die Erforschung des immunologischen Profils verschiedener Patienten und durch das Verständnis, wie sie die Mf an ihrer Entwicklung hindern, könnten sich neue therapeutische Möglichkeiten ergeben (Arndts et al. 2012).

### 1.3 Zielsetzung

Individuen, die mit *M. perstans* infiziert sind zeigen im Gegensatz zu Infektionen mit anderen Filarienarten oft nur milde Symptome und kaum eine Pathologie. Dies lässt auf eine gute Adaptation des Parasiten an den Wirt und eine Immunregulation schließen. Zurzeit existieren wenige Daten bezüglich der spezifischen Immunantwort in *M. perstans* infizierten Individuen. Um eine *M. perstans* Infektion zu diagnostizieren ist es nötig, die Mikrofilarien im Blut zu erkennen. Zur Detektion von geringen Mf Anzahlen ist ein geschultes Auge nötig, wobei eine genaue Differenzierung zwischen verschiedenen Arten oder die Analyse der fortschreitenden Infektion mikroskopisch kaum möglich sind. Molekulare Techniken sind von großer Bedeutung, um die Diagnostik und Analyse zu erleichtern und sollten Mittel der Wahl sein. Daher ist die Etablierung einer quantitativen real-time PCR (qPCR) für *M. perstans* Infektionen im Blut von enormem Interesse und stellt einen großen Fortschritt in der Diagnostik von infizierten Personen und auch von infizierten *Culicoides* Mücken (Vektor) dar. Die Analyse der *Culicoides* Spezies kann Aufschluss über die Vektorprävalenz von *M. perstans* geben und könnte somit hilfreich bei der Eindämmung der Infektion sein. Zudem würde eine Verbesserung der qPCR zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität führen und eine Infektion sicher diagnostizieren. Epidemiologische Studien wären mittels qPCR möglich. Somit stellte die Etablierung und Optimierung der qPCR eines der Ziele dieser Arbeit dar.

Zusätzlich konnte im Rahmen des Kooperationsprojekts mit Kamerun und Ghana mit dem Akronym MaP2Co *M. perstans* Antigen gewonnen werden und es gelang *in vitro* eine Infektion mit *M. perstans* zu simulieren (Njouendou et al. 2017; Ritter et al. 2018). Dies stellt einen wichtigen Schritt in der Analyse der Fähigkeiten des Immunsystems zu modulieren von *M. perstans* dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Pathologieentwicklung, die während einer Filarieninfektion entsteht. Da es *in vivo* nicht möglich ist, die genaue Immunzellinfiltration und histologische Veränderungen zu beurteilen, sollte mithilfe des *Litomosoides sigmodontis* Mausmodells als Modell für humane Filariosen die Pathologie im Verlauf einer Infektion von BALB/c Mäusen untersucht werden. Dabei sollte besonderes die Infiltration von Immunzellen und daraus resultierende Entzündungs- und Pathologieentwicklung beurteilt werden. In diesem Rahmen wurde eine Inflammationsskala zur Beurteilung etabliert, um verschiedene Infektionen miteinander vergleichen zu können. Neben BALB/c Wildtyp Mäusen wurden auch  $T_{\text{regs}}$  und  $IL-4R\alpha/IL-5^{-/-}$  Mäuse analysiert.  $IL-4R\alpha/IL-5^{-/-}$  Mäuse zeigten im Vergleich eine starke Entzündungsreaktion. Ebenfalls wurde das Immunprofil in den Mausmodellen analysiert. Bisher sind nur Daten zu Single knockout Mäusen bekannt, aber beide Zytokine, IL-4 und IL-5, spielen eine wichtige Rolle bei parasitären Infektionen bezogen auf die Wurmlänge und Wurmanzahl.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Automatische Eismaschine (Scotsman MF26)	HTG Trading, Ipswich, UK
Cycler Corbett Rotor-Gene 6000	Qiagen, Hilden, Deutschland
ELISA Mikroplattenleser (SpectraMax <sup>®</sup> )	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Glasware	Schott, Frenchs Forest, Australia
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Homogenisator (Precellys <sup>®</sup> 24 )	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kühlplatte (COP 20)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte (COP 30)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Kühlschrank	Amica, Ascheberg, Deutschland
MAGPIX Luminex System	Luminex Cooperation, Texas, USA
Mikroskop (Axioscop)	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Leitz DMRXE	Leica Mikroskopsysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
NanoVue	Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland
Paraffineinbettungssystem (TB 588)	Medite, Burgdorf, Deutschland
Paraffin Ofen	Memmert, Schwabach, Deutschland
PCR Workstation Pro	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter (SevenEasy <sup>™</sup> )	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Pipetboy	Integra, Biebertal, Deutschland
QiaCube <sup>®</sup>	Qiagen, Hilden, Deutschland

Rotationsmikrotom automatic (RM 2245)	Leica Mikroskopsysteme GmbH, Wetzlar Deutschland
Scheren	Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
Shandon Excelsior ES tissue processor	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
Superdex™ 75 column	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Thermomagnetic stirrer (IKAMAG® REO)	IKA, Staufen, Deutschland
Ultrazentrifuge (Optima™ L-100 XP)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortex Mixer (RS-VA 10)	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Vortex Mixer (Minishaker)	VWR International, Radnor, USA
Waage	Kern KB, Balingen, Deutschland
Wasser Purification System	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge (Eppendorf 5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Hettich Mikro 200; 1610)	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 4 R)	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
2.1.2 Software	
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego USA
Corbett Rotor-Gene 6000 Software	Qiagen, Hilden, Deutschland
ProcartaPlex Analyst 1.0 Software	eBioscience, Heidelberg, Deutschland
Simplicity 2.1	Berthold Technologies
DISKUS Software	Hilgers, Königswinter, Deutschland
2.1.3 Verbrauchsmaterial	
Abfalltüten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
BD BBL™ Columbia CNA Agarplatte	BD, Heidelberg, Deutschland



ELISA Platten (96 well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0.5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Gaze (0,5/0,5 mm)	Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
Handschuhe	Ansell Healthcare, Bruessel, Belgien
Kanülen	BD Microlance™, Heidelberg, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Parafilm	Bemis, Kalifornien, USA
Petrischalen Greiner	Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (5-50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
12-Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Lochplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
 2.1.4 Reagenzien	
Acetone	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
AE Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Assay diluents	eBioscience, Heidelberg, Deutschland
BSA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Chloroform (HPLC grade)	AppliChem Panreac, Barcelona, Spanien
Coating Puffer (10x)	eBioscience, Heidelberg, Deutschland

Deoxynucleosid Triphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Dithiothreitol (MDTT)	Invitrogen, Kalifornien, USA
Dnase Puffer I (10x)	Ambion GmbH, Kaufungen, Deutschland
Dnase Inaktivator Reagenz	Ambion GmbH, Kaufungen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
Eosin yellow	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %-99.8 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
First Strand Puffer (5x)	Invitrogen, Kalifornien, USA
Fixative Lösung	Medion Diagnostics, Gräfelfin, Deutschland
Forene <sup>®</sup>	AbbVie GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyde Lösung 10 % (v/v)	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Haematoxylin	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Oligo dt	Invitrogen, Kalifornien, USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
rDNase I	Ambion GmbH, Kaufungen, Deutschland
Rnase out <sup>™</sup>	Invitrogen, Kalifornien, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Super Script <sup>®</sup> III	Invitrogen, Kalifornien, USA
SYBR <sup>®</sup> Green I	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	eBioscience, Heidelberg, Deutschland
Trizol <sup>®</sup>	Ambion GmbH, Kaufungen, Deutschland

Trypan blue	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tween <sup>®</sup> 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Weigert`s Haematoxylin	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Xylol	AppliChem Panreac, Barcelona, Spanien

### 2.1.5 Kit/Assay Systeme

Advanced Protein Assay	Cytoskeleton, ORT, USA
Diff-Quik staining set	Medion Diagnostics, Gräfelfin, Deutschland
Dnase-free <sup>™</sup> Kit	Ambion GmbH, Kaufungen, Deutschland
Hot Start Taq <sup>®</sup> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mouse ELISA Kits (Ready-Set-Go) (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-13)	eBioscience, Heidelberg, Deutschland
Mouse ELISA Kits (Duo Set <sup>®</sup> ; IL-5, IL-10)	R&D GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Pierce <sup>®</sup> LAL Chromogenic Endotoxin-Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Precelly's Glas Kit (0,5 mm)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
ProcartaPlex Mouse Chemokine Panel 1 (9 plex)	eBioscience, Heidelberg, Deutschland
QIAamp's DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt.

#### 2.1.6.1 Puffer für die Zytokin PCR

AE Puffer	40 mM	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (pH 8.3)
	1 mM	EDTA

## 2.1.6.2 Puffer und Lösungen für den ELISA

eBioscience:

Coating Puffer	10 x Coating Puffer verdünnt mit A.dest → 1x Coating Puffer
Waschpuffer	1 x PBS (pH 7.2-7.4) 0.05 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
Blocking Lösung	1 x Assay diluents
Enzyme	Arvidin-HRP (1:250 verdünnt mit A. dest)
Substrate	3, 3, 5,5 Tetramethylbenzidin (TMB)
Stopplösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

R&amp;D:

Coating Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit A. dest; pH 9,0 mit HCL
Waschpuffer	1 x PBS (pH 7.2-7.4) 0.05 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
Blocking Lösung	1 x PBS 1 % BSA
Enzyme	Streptavidin-POD 1:5000 mit 1 x PBS/1 % BSA
Substrat	10 ml Lsg 4: 0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit A. dest., pH 5,5 mit NaOH 200 µl TMB 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Stopplösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

## 2.1.6.3 Zellkulturmedium und Puffer

ACT Puffer	17 mM Tris 160 mM NH <sub>4</sub> Cl pH 7.2
Hinkelmann Lösung	0.5 % Eosin yellow 0.5 % Phenol 0.185 % Formaldehyd

TBE-Puffer (10x)	108 g Trisbase
	55 g Borsäure
	9,3 g Na <sub>2</sub> EDTA 2 H <sub>2</sub> O
	pH 8,3 in 1 Liter H <sub>2</sub> O

### 2.1.7 Primer für die qPCRs

Alle Primer wurden bei Microsynth AG bestellt und in AE Puffer gelöst. Die Primer hatten eine Stockkonzentration von 100 µM und wurden je nach Bedarf mit AE Puffer verdünnt (siehe Mastermix).

Primer und Fluoreszenz-Farbstoff für die Zytokinbestimmung:

#### β-Aktin Primer

Fwd Primer 5`-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3'

Rev Primer 5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC GGT-3'

#### IL-4 Primer

Fwd Primer 5'-TGT ACC AGG AGG CAT ATC CAC-3'

Rev Primer 5'-GTT CTT GGT TGC TGT GAG GAC-3'

#### IL-10 Primer

Fwd Primer 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3'

Rev Primer 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3'

#### IL-17a Primer

Fwd Primer 5'CCG CAA TGA AGA CCC TGA TA-3'

Rev Primer 5'-TCC CTC TTC AGG ACC AGG AT-3'

#### TNF-α Primer

Fwd Primer 5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3'

Rev Primer 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC-3'

IFN- $\gamma$  Primer

Fwd Primer 5'-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3'

Rev Primer 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'

SYBR<sup>®</sup> Green I von Thermo Fisher wurde als Fluor-Farbstoff verwendet.

Primer und Sonden für die *M. perstans* PCR:

Mp\_ITS1\_fwd 5'- GGT GAT ATT CGT TGG TGT CTA T-3'

Mp\_ITS1\_rev 5'- AGC TAT CGC TTT ATC TTC ATC A-3'

Mp\_ITS1\_hybe 5' Fam-TCC AAA TTA TCG CCT AAA CCG TCG A-BHQ 3'

mIFN $\gamma$ \_fwd 5'- TCA AGT GGC ATA GAT CTG GAA GAA-3'

mIFN $\gamma$ \_rev 5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'

mIFN $\gamma$ \_hybe 5' HEX-TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG-BHQ1-3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung des Patientenmaterials

Im Rahmen des MaP2Co Projekts des "African-German Cooperation Projects in Infectiology" zwischen Ghana, Kamerun und Deutschland (Düsseldorf und Bonn), welches von der DFG gefördert wurde (HO 2009/10-1), wurden die benötigten Humanproben für die Etablierung der qPCR und die Analyse von *M. perstans* spezifischen Immunantworten in Ghana bzw. Kamerun gewonnen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Protokoll der „DNA purification from blood or body fluids“ (Spin protocol) von QIAamp's DNA Mini Kit (QIAamp's DNA Mini and Blood Mini Handbuch 11/2007; Seite 27-29) wurde benutzt, um die DNA vom Vollblut und Sediment der einzelnen Proben zu extrahieren. Dies geschah in Ghana und die extrahierte DNA wurde nach Deutschland geschickt.

Für die spezifische Kontrolle der *M. perstans* qPCR wurde die DNA von 1000 Mf von *W. bancrofti* und *M. perstans* benötigt. Die Mf wurden in Ghana gefiltert und die DNA nach dem Protokoll für die „DNA purification from tissues“ von QIAamp's DNA Mini Kit (QIAamp's DNA Mini and Blood Mini Handbuch 04/2010; Seite 33-36) extrahiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Gewinnung der RNA aus Lungen- und Diaphragmagewebe

Gewebestücke von Lunge und Diaphragma wurden am Analysetag entnommen und bei -20 °C eingefroren (siehe 2.2.4.3). Für die RNA-Gewinnung wurden die gefrorenen Proben in Homogenisatorröhrchen (Preceely's Glas Kit 0,5 mm) überführt und mit 1 ml Trizol aufgefüllt. Mithilfe des Homogenisators (Precellys® 24) wurde das Gewebe zerkleinert (2 x 30 s). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben in frische Eppendorfgefäße (1,5 ml) transferiert, mit 0,2 ml Chloroform für ca. 15 s vermischt und bei RT für 2-3 min inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (12000 g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und der Rest verworfen. 0,5 ml Isopropanol wurden hinzupipettiert und zuerst für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12000 g, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Die RNA wurde so ausgefällt und befand sich in einem kleinen Pellet am Boden des Gefäßes. Nun folgten zwei Waschschrte mit jeweils 75 % Ethanol (1 ml) und 5 minütigem Zentrifugieren (7500 g, 4 °C). Der Überstand wurde jedes Mal verworfen und am Ende wurde die Probe im Heizblock (37 °C) für 5-10 min getrocknet. Anschließend wurden 20 µl Rnase freies Wasser hinzugefügt und das Ganze im Heizblock bei 55-60 °C für 10-15 min inkubiert. Die Konzentration der fertige RNA wurde im NanoVue bei 260/280 nm gemessen und entweder bei -80 °C weggefroren oder weiter zur cDNA verarbeitet (siehe 2.2.2.2).

### 2.2.2.2 Synthesen der cDNA aus RNA

Vor der Synthese von cDNA wurde mit dem Dnase-free™ Kit von Ambion jegliche DNA entfernt. Dazu wurden 0,1 Volumenprozent (bei 20 µl Probe 2 µl) 10x Dnase 1 Puffer und 1 µl rDnase zur RNA hinzugefügt, gevortext und bei 37 °C 20-30 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0,1 Volumenprozent (2 µl) Dnase Inactivation Reagent und eine Inkubation von 2 min bei RT mit gelegentlichem Vortexen. Zum Schluss wurde alles bei 10000 g für 1,5 min zentrifugiert und die im Überstand befindliche gereinigte RNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun erfolgte die First-Strand cDNA Synthese (Invitrogen). Dazu wurden je nach RNA Menge in der Probe 250 ng bis 5 µg der RNA eingesetzt und auf ein Volumen von 11 µl mit Rnase freiem Wasser aufgefüllt. Zu dem Gemisch wurden 1 µl Oligo(dT) und 1 µl dNTPS (10 mM) hinzugefügt. Somit entstand

ein Endvolumen von 13 µl, das für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gestellt wurde. Nach der Inkubation wurden 4 µl 5x First-Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RnaseOUT™ und 1 µl Super Script® III RT (200 units/µl) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch gevortext, zentrifugiert und erneut für 45 min bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Nach den 45 min erfolgte eine weitere Inkubation von 15 min bei 70 °C und es wurden 40 µl Rnase freies Wasser hinzugefügt. Nun konnte die cDNA in der qPCR-Analyse eingesetzt werden (siehe 2.2.2.3).

### 2.2.2.3 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die real-time PCR (qPCR) basiert auf dem Grundprinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, ermöglicht allerdings zusätzlich die Quantifizierung der DNA. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA Sequenzen. Für eine PCR werden mehrere grundlegende Komponenten benötigt. Zunächst wird die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält (Template), benötigt. Die Primer müssen komplementär zum 3' Ende der DNA Einzelstränge, die das zu amplifizierende Template enthalten, sein. Sie bilden den Startpunkt der DNA-Synthese. Da die Reaktion bei hohen Temperaturen ablaufen muss, wird ein Enzym zur Synthese benötigt (DNA-Polymerase), welches nicht durch sie zerstört wird, die sogenannte Taq-Polymerase. Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP's) dienen als Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang. Zusätzlich werden noch Magnesiumionen (MgCl<sub>2</sub>) und Pufferlösungen benötigt, um das richtige Milieu für das Enzym zu schaffen. Die Vervielfältigungsreaktion wird in fünf spezifische Schritte eingeteilt (Initiation, Denaturierung, Annealing, Elongation und finale Elongation). Jeder Schritt benötigt seine eigene spezifische Reaktionstemperatur. In der Initiationsphase wird die DNA-Polymerase aktiviert, wie zum Beispiel die Taq-Polymerase bei 94-98 °C. Die Taq-Polymerase wird häufig in der PCR verwendet, da sie sehr thermostabil ist und eine hohe Amplifikationsrate besitzt. Nach der Aktivierung der Polymerase kommt es zur Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden komplementären DNA-Strängen und somit zur Denaturierung bei 90-95 °C. Nach der Denaturierung erfolgt ein rascher Temperatursturz auf 48-65 °C, je nach Temperaturoptimum der eingesetzten Primer. Dies ist die Annealingphase, in der sich die Primer an die komplementären



ren Einzelstränge lagern und somit einen DNA-Primer-Hybrid bilden. In der Elongation wiederum nutzt die Taq-Polymerase diesen DNA-Primer-Hybrid als Ansatzpunkt für die Synthese eines neuen DNA-Stranges. Dieser Prozess findet bei Temperaturen zwischen 70-80 °C, je nach optimaler Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase, wobei üblicherweise eine Temperatur von 72 °C zur Anwendung kommt. Um eine ausreichende Menge an amplifizierter DNA zu erhalten, werden bis zu 45 Zyklen durchlaufen, die aus Denaturierung, Annealing und Elongation bestehen. Anschließend erfolgt eine finale Elongation bei 72 °C, um sicherzugehen, dass alle Einzelstränge vervielfältigt wurden. Diese finale Elongation ist allerdings nicht zwingend nötig (Giulietti et al. 2001).

Für eine qPCR wird nun zusätzlich noch ein Fluoreszenzfarbstoff für die Quantifizierung der DNA benötigt. Dieses erfolgt in Echtzeit (real time) während eines PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Es gibt verschiedene Farbstoffe die zur Anwendung kommen, einer der häufigsten ist SYBR-Green I (Thermo Fisher). Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die DNA ein (interkalieren), wodurch seine Fluoreszenz ansteigt und es somit zu einer Zunahme dieser von Zyklus zu Zyklus kommt. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Für die Zytokin qPCR kamen folgende Mastermixe und das Cycloprofil zur Anwendung:

#### Zytokin qPCRs:

##### Mastermix $\beta$ -Aktin:

H <sub>2</sub> O	13,2 $\mu$ l
10 x Puffer	2,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,2 $\mu$ l
dNTPs	0,1 $\mu$ l
Fwd Primer (10 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
Rev Primer (10 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l
SYBR Green I	0,2 $\mu$ l
Hot Start Taq <sup>R</sup>	0,1 $\mu$ l

Der Mastermix wurde für alle Proben zusammen angesetzt. Es erfolgte eine Zugabe von 2 µl der Proben DNA für jeden Reaktionsansatz. Die Proben wurden im Doppelansatz bestimmt.

Mastermix Zytokine:

H <sub>2</sub> O	12 µl
10 x Puffer	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,4 µl
dNTPs	0,1 µl
Fwd Primer (5µM)	1,6 µl
Rev Primer (5µM)	1,6 µl
SYBR Green I	0,2 µl
Hot Start Taq <sup>R</sup>	0,1 µl

Der Mastermix wurde für alle Proben zusammen angesetzt. Es erfolgte eine Zugabe von 2 µl der Proben DNA für jeden Reaktionsansatz. Die Proben wurden im Doppelansatz bestimmt.

Cycler Profil Zytokine:

Initiation	95 °C	15 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	58 °C	20 s	
Elongation	72 °C	20 s	

*M. perstans* qPCR:

Für die *M. perstans* qPCR wurden die Primer und die Hybridisierungsprobe basierend auf der „Internal Transcribed Spacer Region 1“ (ITS 1) konstruiert (Jimenez et al. 2011).

Mastermix *M. perstans*:

H <sub>2</sub> O	5,9 µl
2 x Quantinova Puffer	10 µl
Mp_ITS1_fwd (10µM)	1 µl

Mp_ITS1_rev (10µM)	1 µl
Mp_ITS1_hybe (10µM) (green)	0,1 µl

Der Mastermix wurde für alle Proben zusammen angesetzt. Es erfolgte eine Zugabe von 2 µl der Proben DNA für jeden Reaktionsansatz. Die Proben wurden als Triplikate bestimmt.

Mastermix duplex PCR:

H <sub>2</sub> O	3,1 µl
2 x Quantinova Puffer	10 µl
Mp_ITS1_fwd (10µM)	1 µl
Mp_ITS1_rev (10µM)	1 µl
Mp_ITS1_hybe (10µM) (green)	0,1 µl
mIFN <sub>γ</sub> _fwd (10µM)	0,8 µl
mIFN <sub>γ</sub> _rev (10µM)	0,8 µl
mIFN <sub>γ</sub> _hybe (10µl) (yellow)	0,2 µl
mIFN <sub>γ</sub> Plasmid (10 <sup>6</sup> Kopien/µl)	1 µl

Der Mastermix wurde für alle Proben zusammen angesetzt. Es erfolgte eine Zugabe von 2 µl der Proben DNA für jeden Reaktionsansatz Die Proben wurden als Triplikate bestimmt.

Cycler Profil:

Initiation	95 °C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing/Elongation	62 °C	30 s	

Bei dieser *M. perstans* qPCR handelt es sich um eine sogenannte two-step PCR. Dies bedeutet, dass Annealing und Elongation bei gleicher Temperatur stattfinden.

#### 2.2.2.4 Die Etablierung einer spezifischen *M. perstans* qPCR

Wie zuvor unter 2.1.1. erwähnt, wurden für die Etablierung der *M. perstans* qPCR humane Proben sowie *Culicoides* Mücken aus Ghana, die im Rahmen des MaP2Co Projekts gesammelt wurden, verwendet. Um *M. perstans* im Vektor und dem Wirtsmaterial (Serum) nachzuweisen, wurde eine *M. perstans* spezifische Duplex PCR etabliert. Dazu wurden die unter 2.1.7 für *M. perstans* (SyB) und für die IFN- $\gamma$  Inhibitionskontrolle (yellow) aufgeführten Sonden und Primer verwendet.

Für die qPCR wurde das Zielgen (ITS 1) mittels PCR vervielfältigt und über eine Klonierung in kompetente *Escherischia coli* (*E. coli*) Bakterien mit Hilfe des TOPO Plasmids transferiert. Die Bakterien, die das Gen erfolgreich aufgenommen haben wurden über die Blau-Weiß-Selektion identifiziert und in einer Kolonie PCR bestätigt. Anschließend wurde eine positive Kolonie über Nacht in einer Suspension herangezüchtet, um das Plasmid mit dem ITS 1 Gen zu vervielfältigen. Eine erneute Bestätigung erfolgte mittels Sequenzierung. Nach Bestimmung der Plasmidkonzentration wurde eine Plasmidverdünnungsreihe angefertigt (siehe Tab. 1). Mit den bekannten Konzentrationen (pg/ $\mu$ l) in der Verdünnungsreihe lassen sich gemessene Proben mithilfe der Standardkurve umrechnen. Um eine *M. perstans* Plasmidverdünnungsreihe ( $10^{-1}$ -  $10^{-6}$ ) herzustellen wurde 1  $\mu$ l der Stockkonzentration (300.000 Kopien/2  $\mu$ l; 40380 pg/ $\mu$ l) in 9  $\mu$ l AE Puffer gelöst. Diese 1:10 Verdünnung stellte die erste Stufe mit einem ersten Standard von 4038 pg/ $\mu$ l dar. Alle weiteren Verdünnungen finden sich in Tabelle 1. Für die Inhibitionskontrolle wurde ein mIFN $\gamma$  Plasmid verwendet. Das Endvolumen des Reaktionsgemisches betrug 20  $\mu$ l mit einem Plasmidgehalt von 2  $\mu$ l des ITS1 Plasmids und 106 Kopien des mIFN $\gamma$  Plasmids.

**Tab. 1:** *M. perstans* Plasmidverdünnungsreihe zur Etablierung einer Standardkurve.

Standard	Verdünnung	pg/ml
1	1: 10 ( $10^{-1}$ )	4038 pg/ $\mu$ l
2	1: 100 ( $10^{-2}$ )	403,8 pg/ $\mu$ l
3	1: 1.000 ( $10^{-3}$ )	40,38 pg/ $\mu$ l

<b>4</b>	1: 10.000 ( $10^{-4}$ )	4,038 pg/ $\mu$ l
<b>5</b>	1: 100.000 ( $10^{-5}$ )	0,4038 pg/ $\mu$ l
<b>6</b>	1: 1.000.000 ( $10^{-6}$ )	0,04038 pg/ $\mu$ l
<b>7</b>	1: 10.000.000 ( $10^{-7}$ )	0,004038 pg/ $\mu$ l
<b>Plasmidstock: 300.000 Kopien/2 <math>\mu</math>l; 1,18 pg/<math>\mu</math>l</b>		

Für alle durchgeführten qPCR's wurde die TaqMan<sup>®</sup> Technologie verwendet. Die Plasmidverdünnungsreihe (Tab. 1) wurde für die Etablierung der Standardkurve im Dreifachansatz durchgeführt. Jede Probe wurde ebenfalls in Triplikaten gemessen und als Negativkontrolle wurde steriles Wasser anstelle der DNA eingesetzt. Die Genamplifikation wurde mit einem Cycler Rotorgene (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde im grünen Kanal (FAM) und im gelben Kanal (HEX) bei 62 °C gemessen.

## 2.2.3 Immunologische Methoden

### 2.2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde genutzt, um die Zytokinlevel in der murinen Pleuraflüssigkeit (siehe 2.2.4.2) zu bestimmen. ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Detektion verschiedener Moleküle wie zum Beispiel Zytokine. Das Verfahren beruht auf unterschiedlichen Ak. Im ersten Schritt werden die ELISA-Platten mit einem spezifischen Ak gegen das gesuchte Antigen beschichtet (gecoatet), der zweite Ak (Detektions Ak) ist ebenfalls gegen das gewünschte Ag gerichtet und bindet an dieses nach dem ersten Ak. Durch den ersten Ak wird das Ag an die Platte fixiert und durch den zweiten Ak markiert. Der zweite Ak ist mit einem Enzym gekoppelt, zumeisten werden die Meerrettichperoxidase (HRP), die Alkalische Phosphatase (AP) oder seltener auch die Glucose-Oxidase (GOD) verwendet. Nach Zugabe des entsprechenden Substrats kommt es zum Farbumschlag (blau), da das En-

zym das Substrat spaltet. Der Farbumschlag zeigt die pH Veränderung an, die durch das umgesetzte Substrat entsteht. Die Reaktion wird mithilfe einer Stopplösung unterbrochen und führt zu einem erneuten Farbumschlag (gelb). Diese Unterbrechung ist nötig, da ansonsten eine Sättigung eintritt. Diese Endreaktion kann im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 590 nm) gemessen werden (Murphy et al. 2014).

#### 2.2.3.2 Ready-Set-Go ELISA Kits (eBioscience)

Das Ready-Set-Go ELISA Kit enthält alle benötigten Reagenzien, abgesehen vom Waschpuffer und Stopplösung. Der ELISA wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die 96-well Platten wurden mit 50 µl/Well des Erst-Ak gecoated und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer (1 x PBS, 0,05 % Tween<sup>®</sup>20, pH 7,2) wurde die Platte für mindestens eine Stunde mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> geblockt (100 µl/Well) um nicht gebundene Ak abzufangen und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden der Standard und die Proben mit je 50 µl/Well aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Die Proben und der Standard wurden als Doppelansatz aufgetragen, wobei der Standard in absteigender Konzentration pipettiert wurde. Während dieser Inkubation binden die entsprechenden Zytokine an den spezifischen Erst-Ak. Durch erneutes Waschen werden nicht gebundene Moleküle entfernt. Der Detektions-Ak wird mit 50 µl/Well aufgetragen und mindestens eine Stunde bei RT inkubiert. Der Zweit-Ak bindet spezifisch an das fixierte Zytokin. Ungebundener Ak wird durch erneutes Waschen (dreimal) entfernt, bevor 50µl/Well vom Konjugat Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugefügt wird. Eine Inkubation von 45 min bei RT ist nötig, bevor die Platte erneut fünfmal gewaschen wird. Das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB Substrat, 50 µl/Well) wird durch das Enzym (HRP) umgewandelt und es kommt zum Farbumschlag (blau). HRP wandelt das chromogene TMB in seine oxidierte Form um, daher sollte der letzte Schritt möglichst unter Vermeidung von Lichtquellen durchgeführt werden. Nachdem die ersten vier bis fünf Standards gut sichtbar wurden (Farbumschlag nach blau), wurde die Reaktion mithilfe der Stopplösung (2 N Schwefelsäure) unterbrochen (Farbumschlag nach gelb). Unmittelbar danach wurde die Platte bei 450 nm im ELISA microplate reader eingelesen.

Die resultierende optische Dichte (OD) der Proben wurde mit den OD des Standards verglichen und mit deren Hilfe die Konzentration errechnet.

#### 2.2.3.3 Duo Set<sup>®</sup> ELISA Kits (R&D)

Das Duo Set ELISA Kit enthält alle benötigten Reagenzien, außer dem Waschpuffer und dem Blocking Puffer. Der ELISA wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die 96-well Platten wurden mit 50 µl/Well des Erst-Ak gecoatet (Coatingpuffer: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in A. dest., pH 9,0 mit HCl) und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Nach viermaligem Waschen mit dem Waschpuffer (1 M PBS + 0,05 % Tween<sup>®</sup>20, pH 7,0-7,3) wurde die Platte für mindestens eine Stunde mit Blocking Puffer (1 x PBS /1 % BSA; 100 µl/Well) bei RT inkubiert um nicht gebundene Ak abzufangen. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden der Standard und die Proben mit je 50 µl/Well aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Proben und der Standard wurden als Doppelanatz aufgetragen, wobei der Standard in absteigender Konzentration pipettiert wurde. Während dieser Inkubation binden die entsprechenden Zytokine an den spezifischen Erst-Ak. Durch erneutes Waschen werden nicht gebundene Moleküle entfernt. Der Detektions-Ak wird mit 1 x PBS /1 % BSA verdünnt und es werden 50 µl/Well aufgetragen, gefolgt von einer erneuten Inkubation für eine Stunde bei RT. Der Zweit-Ak bindet spezifisch an das fixierte Zytokin. Ungebundener Ak wird durch erneutes Waschen (fünfmal) entfernt, bevor 50 µl/Well vom Konjugat Streptavidin-Peroxidase (Streptavidin-POD 1:5000 mit 1 x PBS /1 % BSA verdünnen) hinzugefügt werden. Eine Inkubation von 45 min bei RT ist nötig, bevor die Platte erneut fünfmal gewaschen wird. Durch den Entwickler (10 ml Lsg.4 + 200 µl TMB + 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kommt es zu einem Farbumschlag (blau). Nachdem die ersten vier bis fünf Standards gut sichtbar wurden, wurde die Reaktion mithilfe der Stopplösung (2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Farbumschlag gelb) unterbrochen. Unmittelbar danach wurde die Platte bei 450 nm im ELISA microplate reader eingelesen. Die resultierende OD der Proben wurde mit den OD des Standards verglichen und somit die Konzentration errechnet.

#### 2.2.3.4 Multiplex auf Beads basierende Typisierung

Zur Detektion von Chemokinen im Pleurawash wurde ein ProcartaPlex Mouse Chemokine Panel 1 (9 plex, eBioscience, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dieses Kit ermöglichte die gleichzeitige Analyse von neun Chemokinen. Außerdem wurden die Zytokin- und Chemokinlevel der humanen Serumproben aus Kamerun ebenfalls mit einem ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel 1 (eBioscience, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Analyte werden an spezifische, magnetische Beads gebunden, die wiederum durch spezifische Farbkodierungen voneinander zu unterscheiden sind. Die Bindung zwischen Analyt und Bead kann durch einen sekundären Detektions-Ak mit hoher Affinität zum Analyt nachgewiesen werden. Der sekundäre Antikörper ist mit Biotin markiert und kann daher mit Streptavidin (Phycoerythrin (PE) markiert) angezeigt werden. Der Nachweis der Chemokine erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. 50 µl der magnetischen Beads wurden in jede Vertiefung der 96-Well-Platte gegeben. Die Beads werden mithilfe einer magnetischen Platte in den Vertiefungen gehalten. Dadurch gehen bei den Waschvorgängen keine Beads verloren. Die Beads wurden einmalig mit dem Waschpuffer gewaschen und es wurden 50 µl vom Standard bzw. von der Probe hinzugefügt. Die Pleurawashproben wurden unverdünnt eingesetzt. Der Proben-Bead-Mix wurde für zwei Stunden auf dem Schüttler (500 rpm) bei RT unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurden die Beads zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Der Detektions-Ak wurde 1:50 verdünnt und jeweils 25 µl in jede Vertiefung hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 min bei RT und 500 rpm wurde die Platte erneut zweimal gewaschen und 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) hinzugefügt. Die Platte wurde erneut für 30 min auf der Schüttelplatte inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Vor der Messung wurden noch 120 µl Lesepuffer (reading buffer) in jedes Well hinzugefügt. Die Daten wurden mit MAGPIX Luminex System (Luminex Cooperation, Austin, USA) akquiriert und mithilfe der ProcartaPlex Analyst software 1.0 (eBioscience) analysiert.



## 2.2.4 Parasitologische Methoden

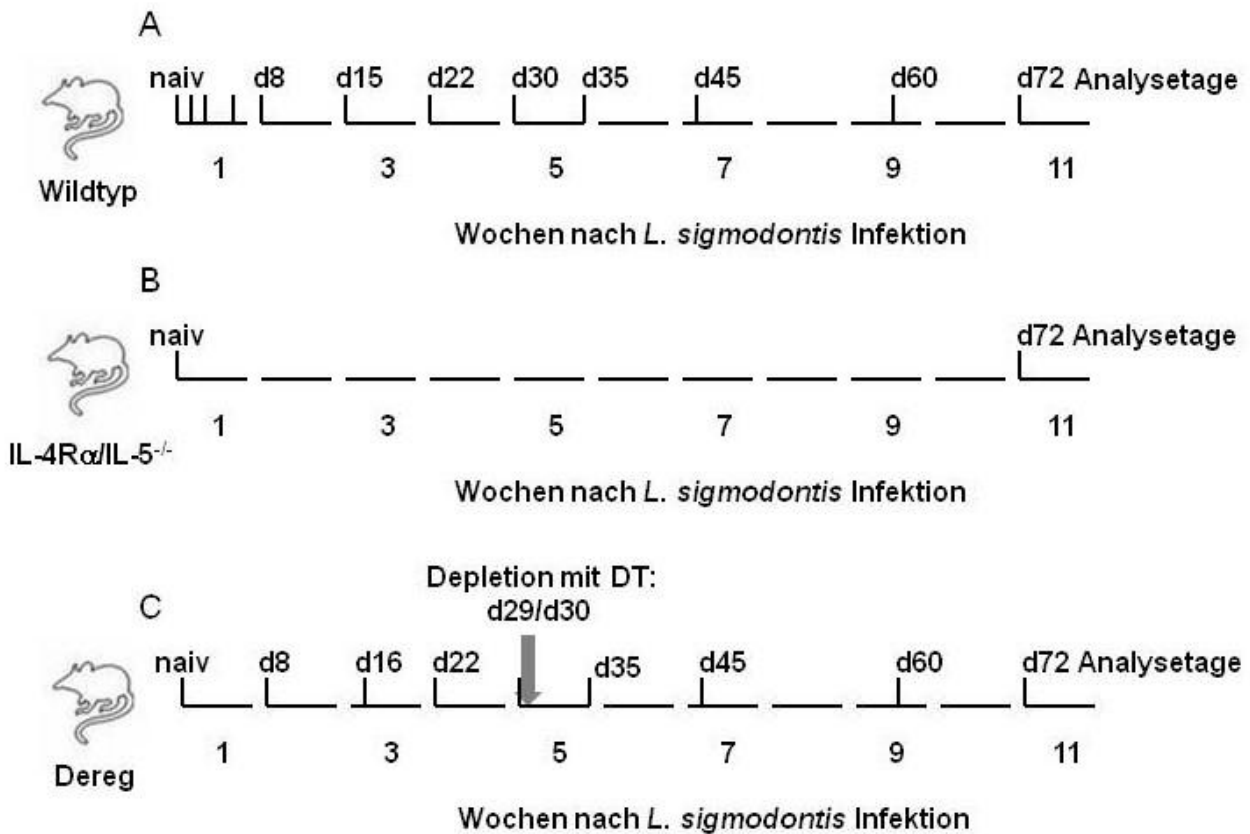
### 2.2.4.1 Mausstämme

Alle BALB/c Wildtyp (Wt) Mäuse (*Mus musculus*) sowie die knockout Mäuse Interleukin-4-Rezeptor/Interleukin-5 (IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup>) und *Depletion of regulatory T cells* (Dereg) Mäuse wurden im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) der Universität Bonn gehalten. Ursprünglich kamen die BALB/c wt Mäuse von Charles River, die Dereg Mäuse stammten aus eigener Zucht und die IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> Mäuse von Prof. Dr. Klaus Matthaei. Die Haltung erfolgte unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen im IMMIP unter der Berücksichtigung aktueller Tierschutzbestimmungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Die Experimente wurden unter Berücksichtigung der ethischen Regularien des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW und der Europäischen Union durchgeführt.

#### 2.2.4.1.1 *Litomosoides sigmodontis* Infektion

Wie in Punkt 1.2.2 erläutert erfolgte die Infektion mit *Litomosoides sigmodontis* durch eine natürliche Infektionsmethode. Als Zwischenwirt diente die tropische Rattenmilbe (*Ornithonyssus bacoti*), welche durch die Blutnahrung von infizierten Baumwollratten (>2,000 Mf/ml Blut) die Übertragung auf die jungen Mäuse sicherte. Nach zehn Tagen auf den Baumwollratten wurden die Milben mit 6-8 Wochen alten Mäusen zusammengebracht. Die Übertragung der L3 Larven fand während der Blutmahlzeit statt (Infektionstag). Parasitologische, immunologische und histologische Parameter wurden an verschiedenen Tagen (Tag 0-72 nach Infektion) analysiert.

BALB/c Wildtypmäuse wurden mit *L. sigmodontis* infiziert, um eine Infektionskinetik zu erhalten. Da sich eine patente Infektion ausbildet, diente dieses Experiment zur Analyse der Veränderungen der verschiedenen Parameter während einer Infektion. Abbildung 7 A zeigt die verschiedenen Analysetage für die Wt Mäuse. IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> Mäuse wurden an Tag 72 untersucht (Abb. 7 B) und die Dereg Mäuse (siehe 2.2.4.1.2) wurden wie in Abbildung 7 C abgebildet analysiert.



**Abb. 7:** Experimenteller Versuchsablauf für die BALB/c Wildtyp IL-4/5 dko und Dereg Mäuse. Die naiven BALB/c Mäuse mit dem jeweiligen Hintergrund Wildtyp, IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  oder Dereg, wurden an Tag 0 infiziert und an den verschiedenen Analysetagen wurden zwischen 3-5 Mäuse für Wt (Abb. 7A) und Dereg (Abb. 7C) untersucht. An Tag 72 wurden 20 IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  analysiert.

#### 2.2.4.1.2 Die T<sub>reg</sub> Depletion während der *L. sigmodontis* Infektion

Die Dereg Mäuse stellen eine andere Form der genetisch veränderten Maus dar. In dieser Mauslinie sind die regulatorischen T-Zellen durch ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) markiert, um sie von den anderen Zellen zu unterscheiden. Zusätzlich tragen sie den humanen Diphtherietoxinrezeptor (DtR). Durch den DtR kann, durch die Gabe von Diphtherietoxin (DT), eine Depletion von T<sub>regs</sub> erreicht werden (Lahl et al. 2007). Diese Depletion hält ca. sieben Tage an, bevor die T<sub>regs</sub> sich regenerieren. Um *in vivo* diese Eliminierung von T<sub>regs</sub> zu erreichen, wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 29 und 30) 200  $\mu$ l DT (1  $\mu$ g/200  $\mu$ l pro Maus) intraperitoneal injiziert. Es wurden die Tage 29 und 30 gewählt, da sich in diesem Zeitraum adulte Würmer entwickeln (Abb. 6). Zwischen Tag 25-30 häuten sich die L4 Larven und entwickeln sich zu adulten Würmern. So

lässt sich der Einfluss von  $T_{\text{regs}}$  auf die Entwicklung von parasitären/*L. sigmodontis* Stadien untersuchen.

#### 2.2.4.2 Pleuraspülung, Gewinnung der Würmer und des Probenmaterials

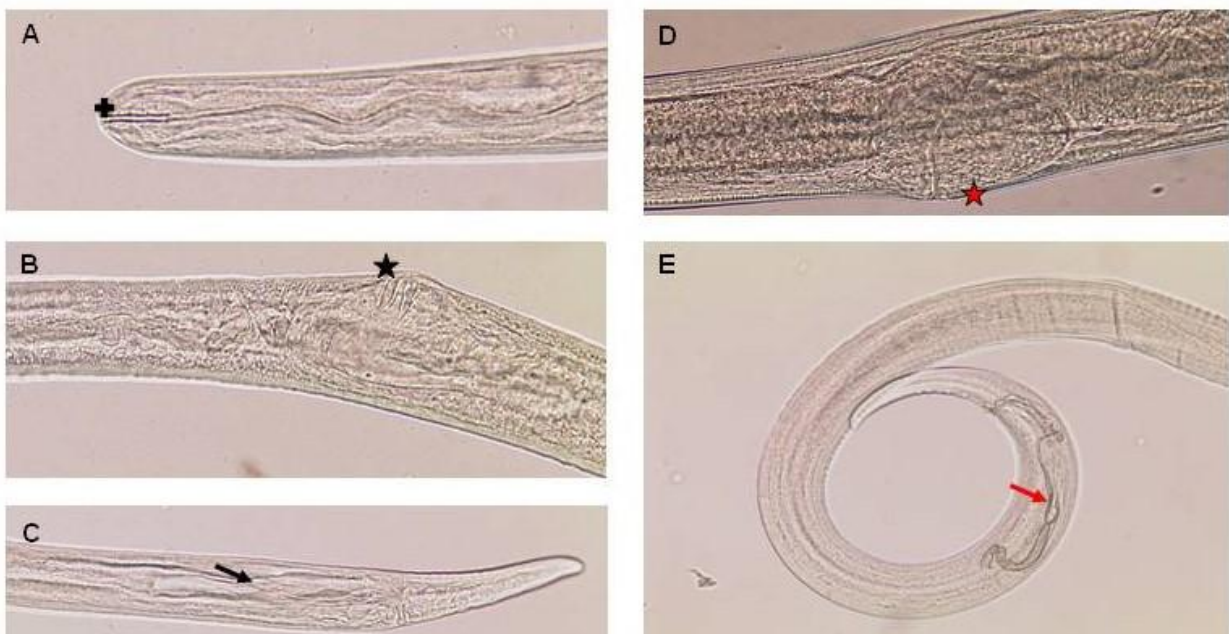
Infizierte Tiere wurden durch die Inhalation von Forene® getötet und mit sterilen Scheren und Pinzetten geöffnet. Der Schnitt erfolgte vom Bauchraum bis zum Sternum. Dieser wurde seitlich verlängert, um das Diaphragma vollständig darzustellen. Als Erstes wurde das Sternum mit einer Pinzette gehalten und nach oben gezogen, um die Pleurahöhle zu spülen. Es erfolgte ein kleiner Schnitt am oberen Rand des Zwerchfells. Mithilfe einer sterilen Pasteurpipette wurde die Pleurahöhle mit ca. 10 ml sterilem 1xPBS mehrfach über einen Filter/Gaze gespült. Dabei wurden die ersten 500 µl für die Zytokinanalyse mittels ELISA benutzt (siehe 2.2.3.1) und die restliche Pleuraflüssigkeit für die Differenzierung von Immunzellen mittels der Zytospin Technik (siehe 2.2.4.6) verwendet. Die Filter/Gaze wurden auf *L. sigmodontis* Würmer untersucht und auf Anzahl, Geschlecht und Lebensstadium analysiert (siehe 2.2.4.4). Anschließend wurde das Diaphragma entlang der Thoraxhöhle komplett entfernt und in einer Petrischale mit PBS überführt. Die Lunge wurde ebenfalls komplett entfernt und zu dem Diaphragma gelegt. Mit einer sterilen Schere wurde ein Stück sowohl vom Diaphragma als auch von der Lunge abgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Diese Stücke dienten später der Zytokinbestimmung mittels qPCR (siehe 2.2.2.3) und wurden zunächst bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die restlichen Anteile der Organe wurden für histologische Untersuchungen verwendet (siehe 2.2.5.1).

#### 2.2.4.3 Die Analyse von Mf Ausschüttung

Die mit *L. sigmodontis* infizierten Tiere wurden am Tag des Experiments zuerst sediert (Forene®), anschließend wurden 10 µl Blut retroorbital abgenommen und in 300 µl Hinkelmannlösung überführt, um die Anzahl der Mikrofilarien (Mf) im Blut zu bestimmen. Die Pleuraflüssigkeit wurde ebenfalls so behandelt. Die Proben wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 1300 g zentrifugiert. Der Überstand (300 µl) wurde verworfen und die Mf in den verbleibenden 10 µl gezählt.

#### 2.2.4.4 Die Bestimmung der Wurmanzahl

Die auf der Gaze gesammelten Würmer (siehe 2.2.4.3) wurden in eine Petrischale oder 12-Well Platte mitsamt der Gaze überführt und mit 1xPBS benetzt. Danach wurden sie für kurze Zeit im Kühlschrank aufbewahrt, um die Beweglichkeit zu vermindern und eine bessere Auszählung zu gewährleisten. Für die Bestimmung des Geschlechts und Lebensstadiums wurden die Würmer einzeln auf Objektträger (OT) transferiert und unter Zuhilfenahme der in Abbildung 8 dargestellten Kriterien mittels eines Lichtmikroskops (x20 Vergrößerung) beurteilt. Gegebenenfalls wurden Knoten und verkapselte Würmer ebenfalls vermerkt und gezählt (Abb. 8).



**Abb. 8:** Entwicklungsstadien von *L. sigmodontis*. (A) Stadium der L4 Larve. Mit dem + ist die bukkale Kapsel markiert. (B) Weibliche L4 Larve. Das \* markiert die Öffnung der Vulva, die mit einem Häutchen überzogen ist. (C) Männliche L4 Larve. Der → zeigt das prä-mordiale Spiculae. (D) Adulte weibliche Wurm mit vollständig entwickelter Vulva (\*). (E) Adulte männliche Wurm mit vollständig entwickeltem und innenliegendem Spiculae (→).

#### 2.2.4.5 Die Zellzahlbestimmung in der Pleuraflüssigkeit

Nach Gewinnung der Pleuraflüssigkeit (siehe 2.2.4.2) wurde diese zentrifugiert (5 min, 4000 g), Überstand verworfen und die Zellen anschließend in 1 ml PBS erneut gelöst. Zur Bestimmung der genauen Zellzahl wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 90 µl

Trypan Blau (1:10 Verdünnung) gefärbt und anschließend wurden 10 µl dieser Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer gezählt. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurden alle lebenden Zellen in allen 4 Quadranten ausgezählt und durch folgende Formel berechnet:

Zellen/ml = Zellzahl  $\times 10^4$  x Verdünnungsfaktor (Trypan Blau Verdünnung)

#### 2.2.4.6 Zytospins, Zellfärbung und Zelldifferenzierung

Die Zytospintechnik wurde dazu genutzt, die Immunzellen, die sich in der Pleuraspülflüssigkeit befanden, genau zu analysieren (siehe 2.2.4.2). In die Zytospinkammer wird ein OT eingelegt und mit dafür vorgesehenem Filterpapier bedeckt. Dieses Filterpapier besitzt vier Aussparungen, durch welche die Zellen nachher auf den OT gelangen. Nach dem Verschluss der Kammer wird eine genaue Menge der isolierten Zellen ( $5 \times 10^4/50$  µl) von der Pleuraspülung in die entsprechenden Öffnungen pipettiert. Durch Impulszentrifugation (340 g) ohne Bremse werden die Zellen auf den OT gebracht und können nach der vorsichtigen Entfernung der Kammer und des Filterpapiers nach dem Trocknen an der Luft entsprechend gefärbt werden. Für die optimale Färbung wurde das Diff-Quick Staining Set von Medion Diagnostics verwendet. Für die Fixierung (Diff-Fix) wurde der OT zehnmal in die Lösung getaucht. Die Färbung der sauren Bestandteile erfolgte mithilfe der zweiten Lösung (Diff-Quick I), indem der OT erneut zehnmal eingetaucht wurde. Die Färbung der basischen Bestandteile erfolgte im letzten Schritt (Diff-Quick II) durch zweimaliges Eintauchen des OT. Für die Zelldifferenzierung wurde mikroskopisch die Anzahl der Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im Doppelansatz (je 100 Zellen) bestimmt.

#### 2.2.4.7 *M. perstans* Antigen Herstellung

52 adulte *M. perstans* Würmer (männliche und weibliche) wurden aus einer *in vitro* Kultur gewonnen. Sie wurden mechanisch zerkleinert, das ganze erfolgte auf Eis und anschließend in sterilem endotoxinfreiem PBS gelöst. Nach der Zentrifugation bei 300 g für 10 min bei 4 °C wurden alle unlöslichen Komponenten entfernt. Die Proteinkonzentration des Antigen-Extrakts wurde mithilfe des Advanced Protein Assays ermittelt und Aliquots im -80 °C Kühlschrank eingefroren. Um eine bakterielle Kontamination auszuschließen

wurde das Anigen-Extrakt auf einer BD BBL™ Columbia CNA Agarplatte (BD, Heidelberg, Deutschland) ausplattiert und für 72 h bei 37 °C bebrütet. Es konnte kein Bakterienwachstum festgestellt werden. Desweiteren wurden Endotoxinlevel im Antigen-Extrakt mit Hilfe des Pierce® LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemessen und lagen unter 0.1 EU/ml (Ritter et al. 2018).

## 2.2.5 Histologische Methoden

### 2.2.5.1 Die Präparation des Gewebes

Die Lungen und Diaphragmen wurden nach der Gewinnung (siehe 2.2.4.2) für die histologische Untersuchung in Kooperation mit dem Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Bonn) fixiert und konserviert. Um zu vermeiden, dass sich das Diaphragma während der Fixierung komplett zusammenzieht, wurde es zuvor in Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Gewebeproben in Paraffinblöcke gegossen und es wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf OT gezogen.

### 2.2.5.2 Färbetechnik

Für die Beurteilung der histologischen Schnitte wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefertigt. Dadurch lassen sich unterschiedliche Gewebe darstellen, um diese zu beurteilen. Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema (Tab. 2) und wurde zunächst per Hand, anschließend im Färbeautomaten durchgeführt. Dies erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Perner (Institut für Pathologie, UKB) und Wenzel Vogel (Institut für Pathologie, UKB).

**Tab. 2:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) für die histologische Differenzierung.

Reagenzien	Produkt	Inkubationszeit	Funktion
Xylol	Engelbrecht	10 min	Entfernung des Paraffins Wässerung der Schnitte
Ethanol (96 %)	Merck KGaA	2 min	
Ethanol (96 %)	Merck KGaA	2 min	

Ethanol (80 %)	Merck KGaA	2 min	
Ethanol (70 %)	Merck KGaA	2 min	
Dest. Wasser	Merck KGaA	2 min	
Weigert`s Haematoxylin	Morphisto	10 min	Kernfärbung der sauren Bestandteile
Leitungswasser	-	5 min	Durch den pH Wechsel kommt es zur tiefblauen Färbung
Eosin	Morphisto	2 min	Färbung der basischen Bestandteile des Gewebes
Leitungswasser	-	Spülen bis das Wasser klar ist	Entfernung der Farbreste
Ethanol (96 %)	Merck KGaA	2 min	Entwässerung der Schnitte
Ethanol (96 %)	Merck KGaA	2 min	
Xylol	Engelbrecht	10 min	Fixierung
Entellan®	Merck KGaA		Eindecken der Schnitte

### 2.2.5.3 Die Bestimmung der Immunzellinfiltration und Pathologie

Die Lungen- und Diaphragmenschnitte wurden nach der Färbung mikroskopisch auf Immunzellinfiltration untersucht und mithilfe einer Skala von 0-4 (Tab. 3) ausgewertet. Die mikroskopische Analyse (Leitz DMRX Mikroskop) der visuellen Dicke der Inflammation und der Immunzellen am äußeren Rand der Lungen bzw. Diaphragmen erfolgte durch einen zertifizierten Facharzt für Pathologie (verblindet). Zur Dokumentation wurden Fotos mithilfe der DISKUS Software angefertigt. Als besondere Merkmale wurden Anschnitte von Würmern und Riesenzellen (Synzytium von Makrophagen) festgehalten.

**Tab. 3:** Inflammationsskala einer *L. sigmodontis* Infektion von Lunge und Diaphragma.

0	Keine Entzündungsreaktion
---	---------------------------

1	1-2 fache Zellschichten, (Leichte Entzündung)
2	3-4 fache Zellschichten (Mittlere Entzündung)
3	5-6 fache Zellschichten (Starke Entzündung)
4	mehr als 6 Zellschichten, Infiltration von Entzündungszellen über die Organgrenzen hinaus

### 2.2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Differenzen wurden mithilfe von GraphPrism 5 Software (San Diego, USA) dargestellt. Parametrisch verteilte Daten wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben oder mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) berechnet. Nicht-parametrisch verteilte Daten wurden mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests berechnet. Bei einer Signifikanz wurde noch ein Mann-Whitney U-Test zum weiteren Vergleich durchgeführt.

### 2.2.7 Anmerkung zu experimentellen Analysen

Die Etablierung und Testung der *M. perstans* PCR erfolgte in Zusammenarbeit mit der Praktikantin Anna-Lena Sanders.

Koautorin bin ich bei der Publikation Ritter et al. 2017, zusätzlich gingen Teile meiner Daten in die Publikation Ritter et al. 2018 mit ein.



### 3. Ergebnisse

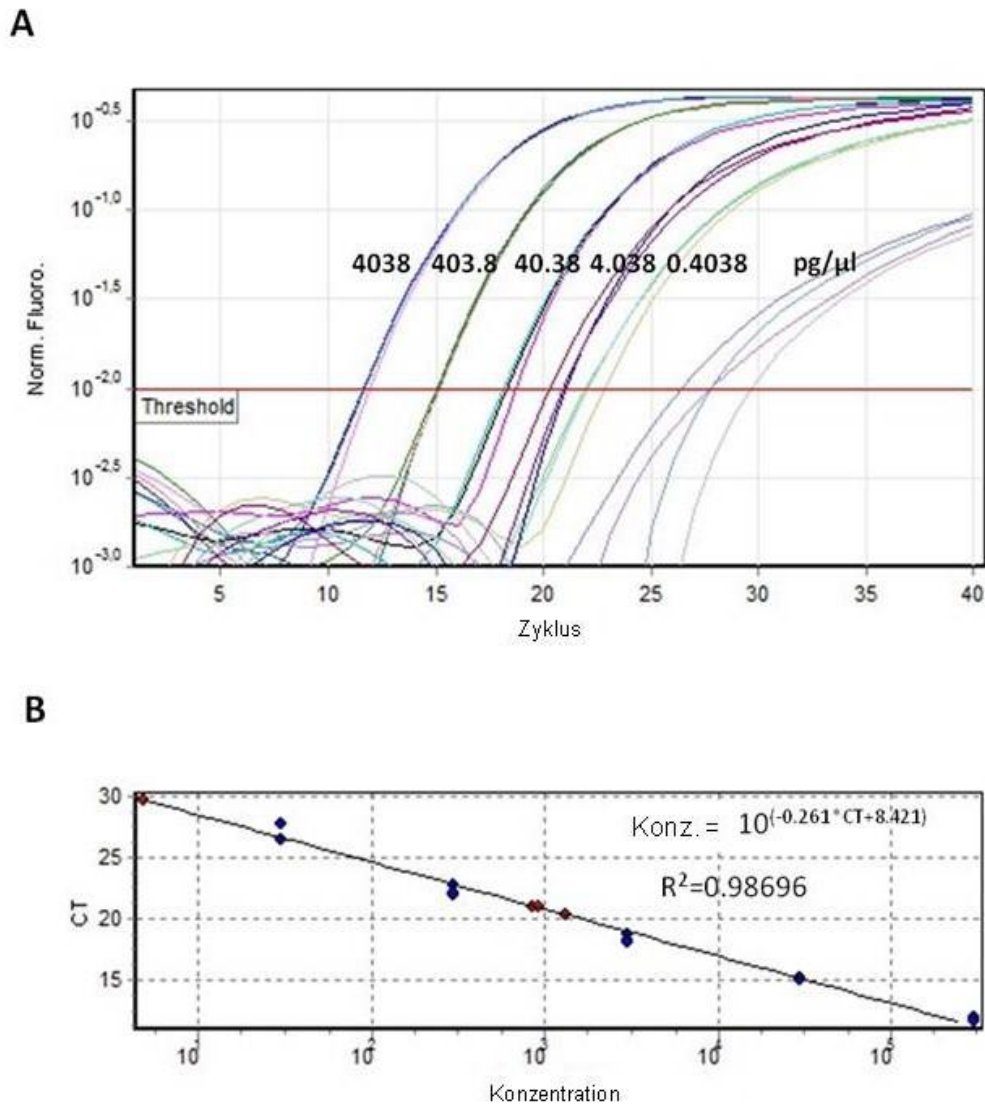
#### 3.1 Die Etablierung einer *M. perstans* qPCR

Über die Filarie *M. perstans* ist bis heute nicht viel bekannt und es wurde ihr bisher wenig Beachtung geschenkt, da sie nur bei wenigen Betroffenen überhaupt Symptome auslöst, ansonsten eher asymptomatisch verläuft. Es ist allerdings bekannt, dass Menschen mit einer Filarieninfektion ein höheres Risiko haben, an Mykobakterien zu erkranken (z.B. Tuberkulose). Deshalb ist es wichtig die Epidemiologie im Vektor sowie im Mensch zu untersuchen, um eine erfolgreiche Behandlung zu erreichen. Für die Diagnostik ist ein gut geschultes Personal nötig, die die Blutausstriche auswerten können. Um diese Diagnostik zu vereinfachen und eine standardisierte Methode zu erhalten, sollte eine spezifische qPCR für *M. perstans* entwickelt werden. Wird bei dieser Methode eine hohe Sensitivität erreicht ist es möglich, auch gering infizierte Patienten (geringe Mf Anzahl) zu detektieren. Die dafür nötige DNA aus verschiedenen *Culicoides* Spezies sowie das humane Vollblut und Blutsediment wurden in Ghana im Rahmen des oben erwähnten MaP2Co Projektes gewonnen, vor Ort verarbeitet und nach Bonn geschickt. Das Probenmaterial für das Immunprofil von *M. perstans* infizierten Patienten wurde ebenfalls im Rahmen dieses Projektes gewonnen, allerdings stammt es aus Kamerun.

##### 3.1.1 Validierung der *M. perstans* qPCR

Wie zuvor erwähnt ist bis heute die einzige Möglichkeit, eine *M. perstans* Infektion zu diagnostizieren, die Mf im peripherem Blut nachzuweisen. Sobald die infizierten Patienten eine hohe Mf Last aufweisen, ist dieser Nachweis im Blutausstrich relativ einfach. Trotzdem werden geschulte Mitarbeiter benötigt, da auch sehr niedrige Mf Anzahlen detektiert werden müssen sowie eine eindeutige Zuordnung zu *M. perstans* erfolgen muss. Daher war der spezifische Nachweis des ITS1 Gens von *M. perstans* mithilfe einer quantitativen PCR das Ziel der vorliegenden Arbeit, um die Filarien DNA im Vollblut und Sediment sowie in *Culicoides* DNA Proben zu messen. In Abbildung 9 wird ein Beispiel für eine Plasmidverdünnungsreihe (siehe 2.2.2.4) gezeigt, mit deren Hilfe eine Standardkurve etabliert werden konnte. Auch die Standardkurve mit der entsprechenden

Gleichung zur Konzentrationsberechnung (pg/μl) ist beispielhaft abgebildet. Die Standardkurve zeigt eine Regressionsgerade mit einem  $R^2$  Wert von 0,98696 zur Bestätigung, dass die Plasmidverdünnungsreihe einer linearen Standardkurve entspricht. Die Standardgleichung, die auf der Standardkurve beruht und ihre spezifischen Werte sind exemplarisch gezeigt. Anhand dieser Formel werden die Konzentrationen der einzelnen Proben vom Gerät berechnet. Für jeden einzelnen Lauf wurde eine Standard Plasmidverdünnungsreihe mitgeführt und aufgrund dessen eine spezifische Standardgleichung aufgestellt. Eine Abweichung der Plasmidkonzentration von zwei Verdünnungsstufen entspricht einer Log-Stufe und ist gleichzusetzen mit einer Ct Differenz von 3,2.



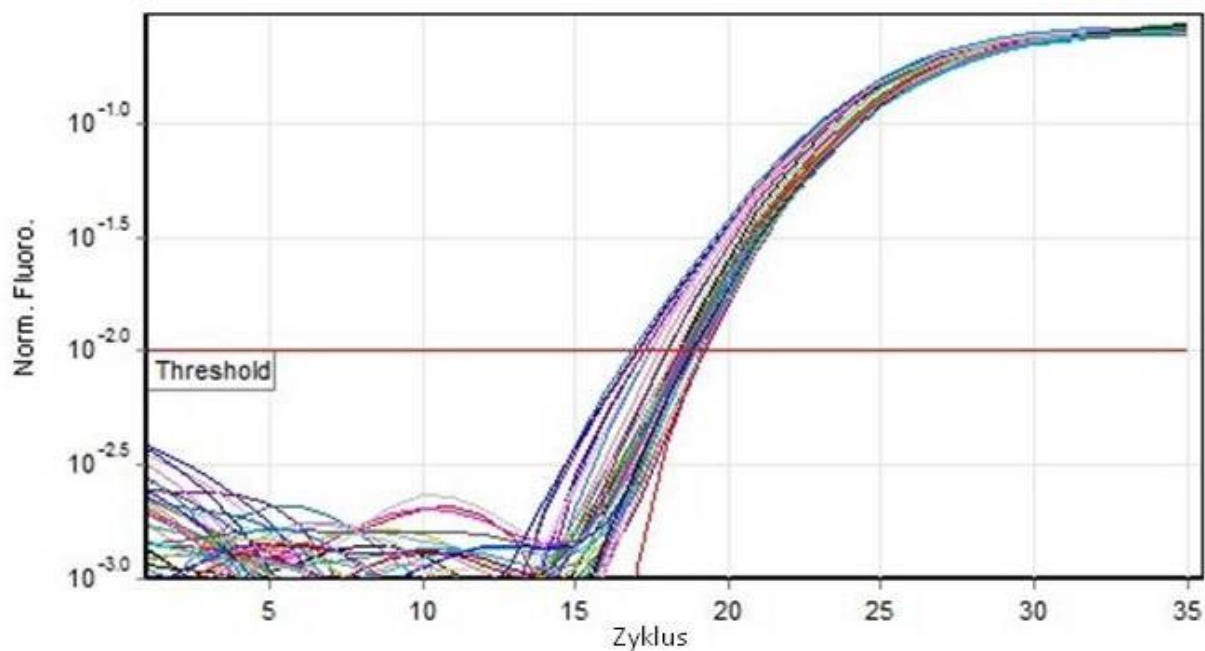
**Abb. 9:** Detektionslimit und Standardkurve der *M. perstans* ITS1 qPCR. (A) zeigt die *M. perstans* Plasmidverdünnungsreihe mit Konzentrationen von 4038 – 0,004 pg/μl. Das Detektionslimit wurde als 0,004 pg/μl (1/3 Replikate positiv) festgelegt. (B) Die als Beispiel ausgewählte Standardkurve zeigt eine Regressionsgerade mit einem R<sup>2</sup> von 0,98696 und bestätigt somit einen linearen Zusammenhang der Plasmidverdünnungsreihe.

Unterschiedlich durchgeführte Messungen zeigten einen Schwellenwert (Threshold) von 0,01, um einen Log-linearen Zusammenhang darzustellen. In allen weiteren Experimenten wurde dieser Schwellenwert manuell eingestellt. Proben, die bis zum Zyklus 35 den Schwellenwert nicht erreicht haben, wurden als negativ gewertet.

Um eine solide Standardkurve zu erhalten wurden Standardverdünnungen von 4038–0.004 pg/μl getestet. Jede Reaktion enthielt 2 μl der Plasmid-DNA im Endvolumen von 20 μl. Bei 100 % der Proben konnte eine minimale Anzahl von 0,4 pg/μl detektiert wer-

den. Die Negativkontrolle (NTC) zeigte keinerlei Reaktion. Die Effizienz der Reaktionen war 1.012 (101,2 %). Die Verdünnungen mit 0,04 und 0,004 pg/μl zeigten kein Signal, daher stellt sich das Detektionslimit mit 0,4 pg/μl für 2 μl DNA dar.

Es wurde eine duplex real-time qPCR durchgeführt, um zu zeigen, dass keine Proteine in der *Culicoides* DNA oder andere Störfaktoren von der DNA Extraktion vorhanden sind, die die Amplifikation behindern. Als Inhibitionskontrolle wurde ein Maus-IFN-γ (mIFN-γ) Plasmid verwendet und die Amplifikation im HEX Kanal gemessen. Die Detektion des Plasmids sollte innerhalb von 3 Zyklen des Ct Wertes der Negativkontrolle sein, um eine Inhibition auszuschließen. Abbildung 10 zeigt das Amplifikationssignal im HEX Kanal. Die Negativkontrollen erreichen den Schwellenwert nach 18,8 Zyklen. Alle Proben konnten innerhalb von drei Zyklen dieser Kontrolle detektiert werden.



**Abb. 10:** Inhibitionskontrolle im HEX Kanal. Die Detektion des mIFN $\gamma$  Plasmids erfolgte in allen Proben innerhalb von 3 Zyklen des Ct Wertes der Negativkontrolle (18,8 Ct) und bestätigte damit, dass keine Inhibition vorlag.

Es zeigte sich keine Inhibition und auch keine Interaktion bei den Messungen. Mithilfe dieser duplex qPCR konnten nun Patientenproben getestet werden.

### 3.1.2 *M. perstans* infizierte Patientenproben

Den im Rahmen des MaP2Co Projektes rekrutierten Patienten aus Ghana wurde Blut abgenommen, das mikroskopisch auf *M. perstans* Infektionen untersucht wurde. Vor Ort wurden die Ausstriche gefärbt (Giemsa) und die Mf gezählt sowie die DNA aus Vollblut und Blutsediment für die duplex qPCR gewonnen. Die qPCR wurde mit den validierten Einstellungen (siehe 2.2.2.3) durchgeführt und alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Ergebnisse der duplex PCR von mikroskopisch identifizierten *M. perstans* Patientenproben.

<u>Blutsediment</u>	<u>Probenanzahl</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Mf pos. Patienten	12	12
Mf neg. Patienten	0	0
<u>Vollblut</u>	<u>Probenanzahl</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Mf pos. Patienten	14	13
Mf neg. Patienten	2	2

Bei den Blutsedimentproben aus Ghana konnte bei allen Messungen ein positiver Nachweis von *M. perstans* erbracht werden. Allerdings gab es auch keine Mf negativen Proben. Im Vollblut wurden 13 von 14 Proben (92,86 %) der Mf positiven Patienten richtig detektiert. Bei einer Probe konnte das mikroskopische Ergebnis nicht bestätigt werden. Daraufhin wurde auch die DNA aus dem Sediment getestet und es zeigte sich ein positives Signal. Von den beiden negativen Patientenproben zeigte eine Probe ein klar positives Signal. Die andere Probe musste als unklare Infektion definiert werden, da eines der Triplikate ein leicht positives Signal zeigte, das sich auch nach wiederholter Messung bestätigte.

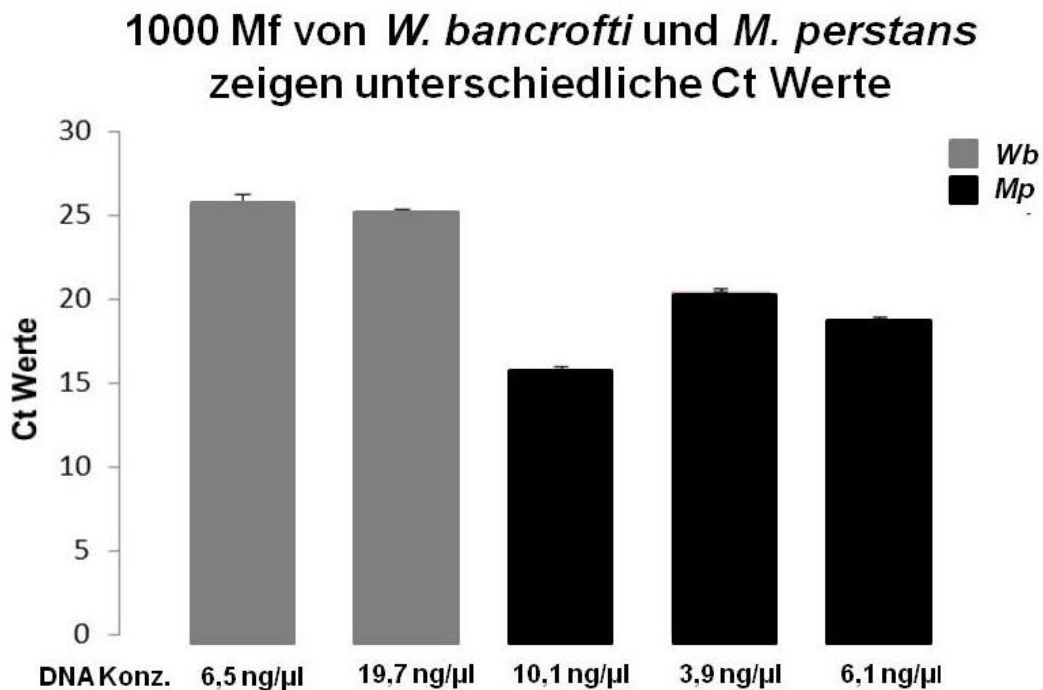
### 3.1.3 Spezifitätsoptimierung der *M. perstans* qPCR

Die positive Detektion der negativen Vollblutproben zeigte gewisse Probleme bei der duplex qPCR auf. Um dem auf den Grund zu gehen, sollte zunächst die Spezifität überprüft werden. Da in Ghana neben *M. perstans* Infektionen auch Infektionen mit *W. bancrofti* auftreten (Phillips et al. 2014), wurden zur Sensitivitätskontrolle Proben von *W. bancrofti* und koinfizierten Proben getestet. Um qualitativ hochwertige und genügend DNA zu erhalten, wurde die DNA aus 10 verschiedenen Filtern mit einer Wurmlast zwischen 80-1000 Mikrofilarien hergestellt. Dies geschah vor Ort in Ghana. Die *M. perstans* qPCR wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Tabelle 5 zeigt, dass 90% der *W. bancrofti* Proben als positiv gewertet wurden. 20 % der Kreuzreaktionen waren auch nach einer Verdünnung von 1:10 vorhanden. Erst bei einer Verdünnung von 1:100 konnte kein positives Signal mehr detektiert werden.

**Tab. 5:** Ergebnisse der *M. perstans* ITS 1 Real-time PCR für *W. bancrofti* Mf.

<u><i>W. bancrofti</i> Mf pos.10 Proben</u>	
<u>Verdünnung</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Unverdünnt (10)	9
1:10 (10)	2
1:100 (10)	0

Bei dem Vergleich von 1000 Ct Signalen von *W. bancrofti* und *M. perstans* Mf Proben konnte klar gezeigt werden, dass die DNA von *W. bancrofti* Mf weniger spezifisch detektiert wurde. In der *M. perstans* qPCR zeigten diese deutlich höhere Ct Werte, als die *M. perstans* Proben, obwohl die gleiche Menge an DNA verwendet wurde (Abb. 11).



**Abb. 11:** Die Ct Werte im Vergleich von 1000 Mf von *W. bancrofti* und *M. perstans*. Die Grafik zeigt höhere Ct Werte für die *W. bancrofti* Mf bei gleich eingesetzter Menge von Mf. Die Balken zeigen die mittlere Standardabweichung der Triplikattestungen.

#### 3.1.4 Die Erhöhung der Annealing Temperatur zur Spezifitätsoptimierung

Zunächst wurde das ursprüngliche PCR Protokoll verändert, um die Spezifität der qPCR zu verbessern und die Detektion der *W. bancrofti* DNA zu eliminieren. Bei suboptimalen Temperaturen während der Annealingphase kann es zu unspezifischen Produkten kommen. Diese entstehen durch das Anlagern der Primer an nicht spezifische Stellen der DNA. (Rychlik et al. 1990). Eine Erhöhung der Annealingtemperatur steigert dabei die Spezifität der Primerbindung an die Ziel-DNA. Eine Verkürzung der Annealingzeit führt zu dem Effekt, dass die Primer weniger Zeit haben, um spezifisch zu binden. Beide Modifikationen beeinflussen die Amplifikation und können diese optimieren.

Die Annealingtemperatur wurde von 58 °C auf 62 °C angepasst und die Zeit von 30 s auf 10 s reduziert. Ein Lauf wurde mit 62 °C und 30 s durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass eine Veränderung der Annealingzeit irrelevant ist. Daher wurden die 10 s im Protokoll vermerkt, um die Gesamtlaufzeit der PCR zu kürzen. Eine Messung von 10 Proben nach Anpassung der Annealingtemperatur wird in Tabelle 6 gezeigt. Es wird eine

komplette Eliminierung der zuvor positiv detektierten *W. bancrofti* Proben festgestellt. Durch die Erhöhung der Annealingtemperatur auf 62 °C konnte die Spezifität der *M. perstans* ITS 1 qPCR wesentlich erhöht werden. Auch alle Verdünnungsstufen zeigten kein Signal mehr.

**Tab. 6:** Die Ergebnisse der *M. perstans* ITS 1 real-time PCR mit einer Annealingtemperatur von 62 °C von *W. bancrofti* Mf.

<u><i>W. bancrofti</i> Mf pos.10 Proben</u>	
<u>Verdünnung</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Unverdünnt (10)	0
1:10 (10)	0
1:100 (10)	0

Um die erhöhte Spezifität zu überprüfen, wurde spezifische DNA von 10 *W. bancrofti* positiven Blutproben mit der PCR getestet. Zusätzlich wurden einige *M. perstans* positiv und negativ Proben mitgeführt (nicht dargestellt), um die Spezifität nach Änderung der Annealingtemperatur zu verifizieren. Die Mf Anzahl der einzelnen Proben lag zwischen 1 und 11430 Mf/ml. Es zeigte sich, dass 0 % der *W. bancrofti* Proben detektiert wurden, wobei die ITS 1 Detektion in 100 % der *M. perstans* infizierten Proben stattfand.



**Tab. 7:** Die Validierung der Annealingtemperatur von 62 °C für die *M. perstans* ITS 1 Real-time PCR für *W. bancrofti* positives Blut (A) und *M. perstans* positive Blutsedimente (B).

<u>(A) <i>W. bancrofti</i> Vollblut</u>	<u>Probenanzahl</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Mf pos. Patienten	10	0
Mf neg. Patienten	0	0
<u>(B) <i>M. perstans</i> infiziertes Blutsediment</u>	<u>Probenanzahl</u>	<u>PCR Ergebnis</u>
Mf pos. Patienten	21	21
Mf neg. Patienten	1	1

### 3.2 Das Immunprofil von *M. perstans*

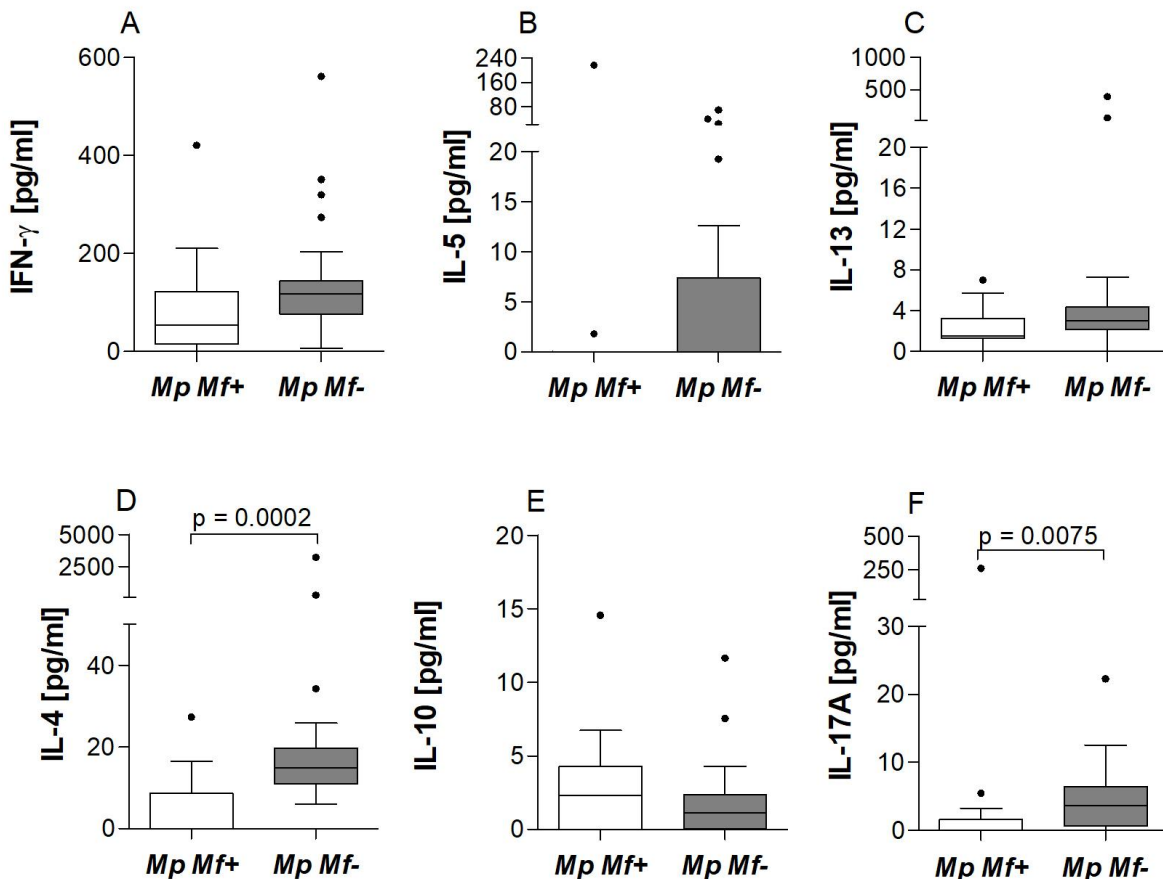
Die etablierte qPCR stellt einen großen Fortschritt in der Diagnostik von *M. perstans* infizierten Personen dar. Mithilfe der PCR und der Mikroskopie der Blutausstriche wurden *M. perstans* infizierte Menschen in Südwest-Kamerun (MaP2Co Projekt) rekrutiert und Blutproben entnommen. Ziel war, die Charakterisierung von Immunantworten bei *M. perstans* infizierten Individuen. Aus dem gewonnenen Blut wurde Serum hergestellt (in Kamerun) und mithilfe der Multiplex/Luminex Technik (siehe 2.2.3.4) und mittels ELISA (siehe 2.2.3.1) in Bonn untersucht. In Tabelle 8 sind die analysierten Proben für die qPCR aufgeführt.

**Tab. 8:** Probandendaten der Proben für die Etablierung der qPCR.

<u>Eigenschaften</u>	<u><i>M. perstans</i> infizierte Probanden (Mf<sup>+</sup>)</u>	<u><i>M. perstans</i> negative Probanden (Mf<sup>-</sup>)</u>
Probenumfang (n)	28	29
Alter [Jahren]	21-64	10-67
Geschlecht [w:m]	9:19	13:16

### 3.2.1 Der Zytokinspiegel in den Serumproben

Zunächst wurden systemische Zytokine untersucht, um das immunologische Profil von *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Individuen zu analysieren. Die Werte von IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-4, IL-13, IL-10 und IL-17A wurden im Serum gemessen und in Abbildung 12 A-F dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *M. perstans* Mf<sup>+</sup> und *M. perstans* Mf<sup>-</sup> Individuen in Bezug auf IFN- $\gamma$ , IL-5 oder IL-13 (Abb. 12 A-C) festgestellt werden. Systemische Level von IL-4 waren dagegen in *M. perstans* Mf<sup>+</sup> signifikant niedriger (Abb. 12 D). IL-10 Werte zeigten keinen großen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 12 E). Die systemischen IL-17A Werte waren in *M. perstans* Mf<sup>+</sup> signifikant niedriger als in *M. perstans* Mf<sup>-</sup> Individuen (Abb. 12 F).

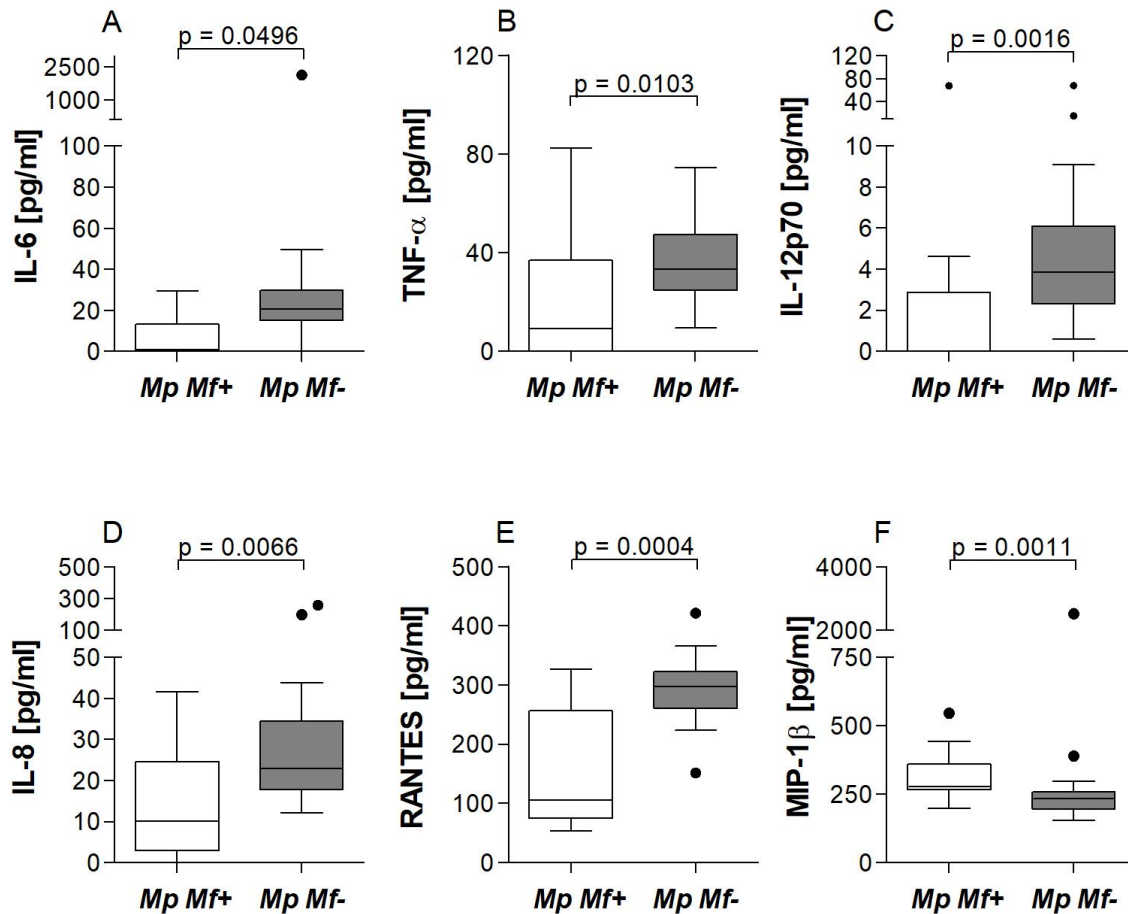


**Abb. 12:** Reduzierte systemische Zytokinlevel in *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden. Das Serum von *M. perstans* Mf<sup>-</sup> Probanden (n=28) und *M. perstans* Mf<sup>+</sup> (n=11) Probanden wurde auf IFN- $\gamma$  (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IL-4 (D), IL-10 (E) und IL-17A (F) mithilfe der Luminex Technologie analysiert. Dies wurde grafisch mit einem Box wishker plot mit Median, Interquartilbereich und Ausreißern dargestellt. Die Signifikanz wurde entweder

mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt (Ritter et al. 2018).

### 3.2.2 Erhöhtes systemisches MIP-1 $\beta$ in *M. perstans*-infizierten Individuen

Als nächstes wurden einige Zytokine und Chemokine, die dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben werden, im Serum gemessen. Es wurden erneut *M. perstans* Mf<sup>-</sup> Probanden und *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden miteinander verglichen. *M. perstans* Mf<sup>-</sup> Personen zeigten signifikant niedrigere Zytokinspiegel von IL-6 (Abb. 13 A), TNF- $\alpha$  (Abb. 13 B) und IL-12p70 (Abb. 13 C). Die Menge an systemischen IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-12p70 zeigte eine negative Korrelation mit der Mf Anzahl. *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Personen zeigten außerdem signifikant erniedrigte Chemokinspiegel für IL-8 und RANTES (Abb. 13 D und E). Die Zytokinlevel von MIP-1 $\beta$  waren dagegen signifikant höher in *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden (Abb. 13 F).

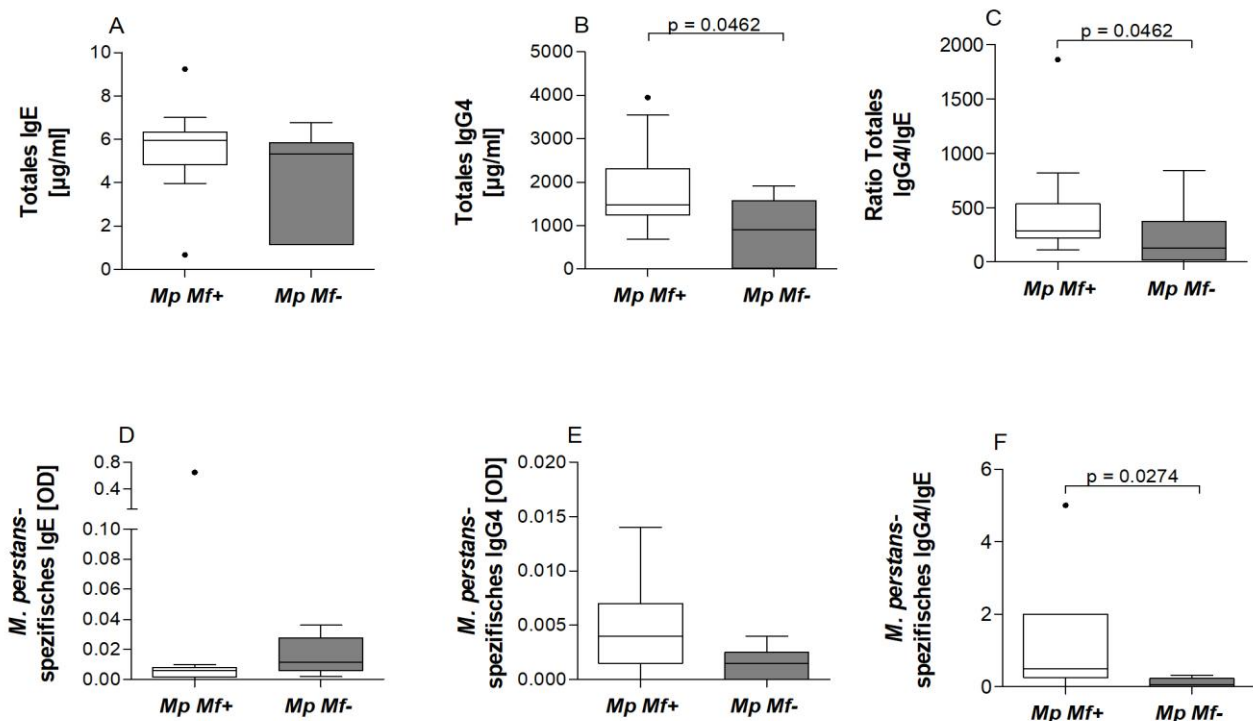


**Abb. 13:** Erhöhte MIP-1 $\beta$  Konzentrationen in *M. perstans* (Mf+) Patienten. Im Serum von *M. perstans* Mf<sup>-</sup> und *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden wurde IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-12p70 (C), IL-8 (D), RANTES (E) und MIP-1 $\beta$  (F) mithilfe der Luminex Technologie bestimmt. Dies wurde grafisch mit einem Boxplot mit Median, Interquartilbereich und Ausreißern dargestellt. Die Signifikanz wurde entweder mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt (Ritter et al. 2018).

### 3.2.3 Die Bestimmung von Immunglobulinen im Serum

Im Rahmen des oben beschriebenen MaP2Co Projekts konnte eine *in vitro* Kultur von adulten *M. perstans* Würmern etabliert werden. Mithilfe dieser adulten Würmer konnte *M. perstans* Antigen hergestellt werden (2.2.4.7) (Njouendou et al. 2017; Ritter et al. 2018). Durch dieses Ag konnte eine *M. perstans* spezifische Immunantworten hervorgerufen werden und die Filarien spezifischen Immunglobuline sowie Immunantwort untersucht werden. Dieses Ag wurde zum coating spezieller ELISA-Platten verwendet, um im Folgenden aus den Serumproben aus Kamerun Antigen-spezifisches IgG4 und IgE nachzuweisen.

Beim Vergleich der verschiedenen Gruppen bezüglich IgE fanden sich keine Unterschiede (Abb. 14 A). Wie Abbildung 14 zeigt, fanden sich erhöhte IgG4 Spiegel in *M. perstans* infizierten Individuen im Vergleich zu *M. perstans* Mf<sup>-</sup> (Abb. 14 B). Die erhöhten Level von totalem IgG4 in den *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Proben wurde auch bei der Ratio von totalem IgG4 und IgE deutlich (Abb. 14 C). Es zeigte sich ein höherer Spiegel an spezifischem IgE bei den *M. perstans* Mf<sup>-</sup> (Abb. 14 D). In Abbildung 14 zeigen *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Patienten höhere Level an spezifischem IgG4 (Abb. 14 E). Dies spiegelte sich auch in der signifikant erhöhten Ratio von IgG4/IgE wider (Abb. 14 F).



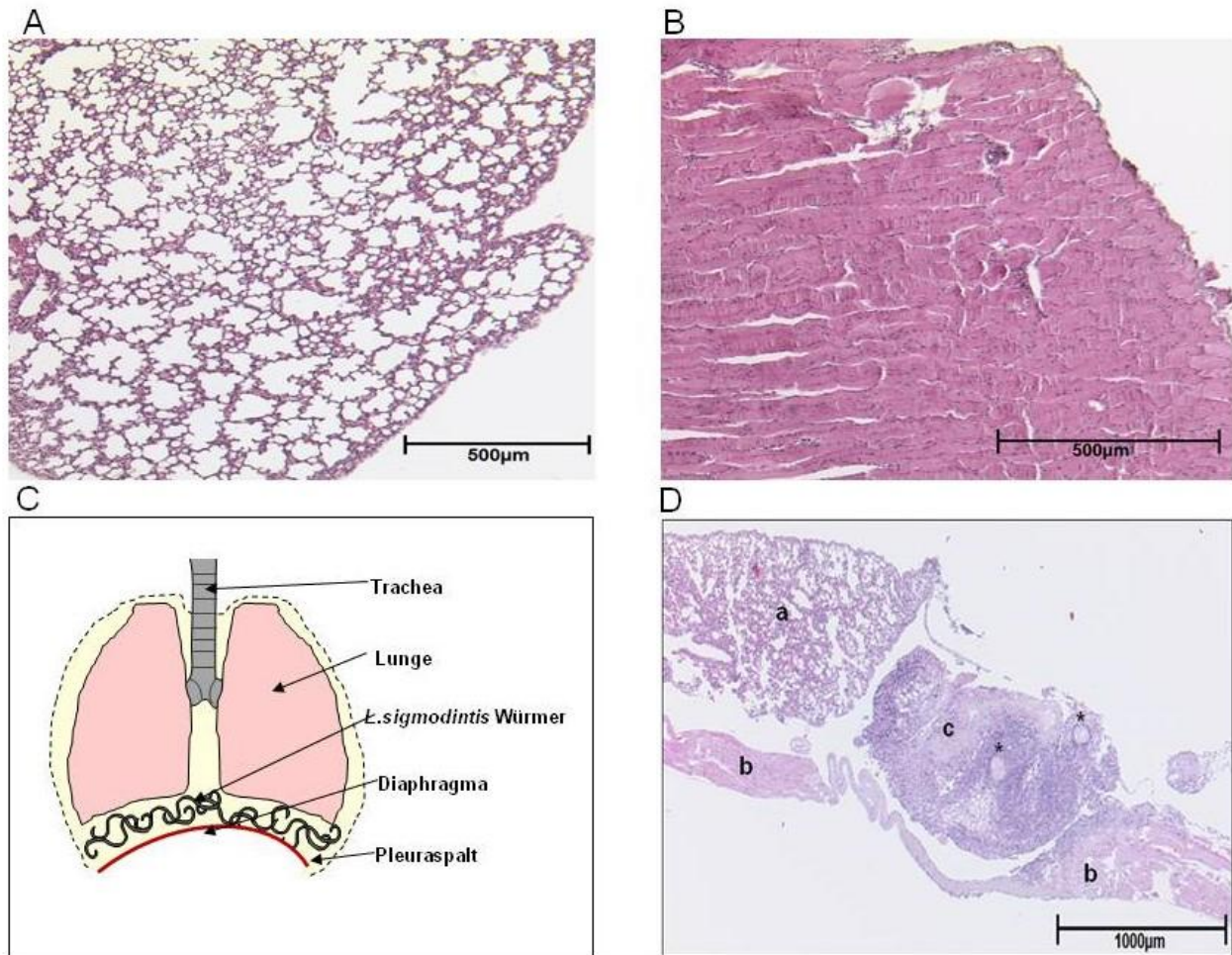
**Abb. 14:** *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden zeigten erhöhte Spiegel an spezifischem IgG4 im Serum. Das Serum von *M. perstans* Mf<sup>-</sup> (n=6) und *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Probanden (n=13) wurde auf *M. perstans* spezifische Immunglobuline, (A) totales IgE (µg/ml), (B) totales IgG4 (µg/ml), (C) Ratio von totalem IgE/IgG4, (D) *M. perstans*-spezifisches IgE (OD), (E) *M. perstans*-spezifisches IgG4 (OD) und (F) Ratio von *M. perstans*-spezifischem IgG4/IgE getestet. Dies wurde grafisch mit einem Boxplot mit Median, Interquartilbereich und Ausreißern dargestellt. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt (Ritter et al. 2018).

### 3.3 Die *L. sigmodontis* Infektion

Um die Immunmodulation bei einer parasitären Infektion genauer zu beurteilen, sind Mausmodelle nötig. Die pathologischen Veränderungen einer Infektion festzuhalten ist im Menschen nicht möglich, da die Würmer nicht isoliert werden können. Durch die Entdeckung, dass *L. sigmodontis* in BALB/c Mäusen alle Entwicklungsstadien durchläuft und eine patente Infektion stattfindet, ergaben sich neue Möglichkeiten der Forschung (Petit et al. 1992). Das *L. sigmodontis* Mausmodell stellt sich als ein gutes Mausmodell dar, weil es die Infektion im Menschen gut widerspiegelt.

#### 3.3.1 Die Pathologie der *L. sigmodontis* Infektion

Mithilfe des *L. sigmodontis* Mausmodells wurde die Pathologie und Immunantwort untersucht, um so Aufschluss über den Krankheitsverlauf zu erlangen und die Immunität während einer Filarienerkrankung zu entschlüsseln. Dazu wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1.1 beschrieben BALB/c Mäuse infiziert. Ein besonderer Fokus lag auf der Histologie der Lunge und des Diaphragmas sowie der Pathologie während der Infektion. Abbildung 15 A stellt eine naive Lunge (Tag 0) in HE (siehe 2.2.5.2) gefärbt dar. Die Lungenstruktur ist intakt und es findet sich keine Entzündungsreaktion. Abbildung 15 B zeigt das naive Diaphragma. Auch hier lassen sich keine Veränderungen feststellen. Abbildung 15 C zeigt eine schematische Darstellung der wichtigen Strukturen und den Ort der Wurmansiedlung. Zwischen Lunge und Diaphragma befindet sich der Pleuraspalt, in dem sich die adulten Würmer ansiedeln. Abbildung 15 D zeigt einen exemplarischen, histologischen Schnitt einer infizierten BALB/c Wt Maus an Tag 72. Es sind sowohl die Lunge (a) als auch das Diaphragma (b) zu erkennen und dazwischen finden sich Entzündungszellen (c). Diese befinden sich im Pleuraspalt an die Organe angelagert, nicht aber in den Organen selber. Die Struktur der Organe zeigt keine erhöhten Infiltrate auf. Auch im histologischen Schnitt wird die Lage der Würmer sichtbar (\*).

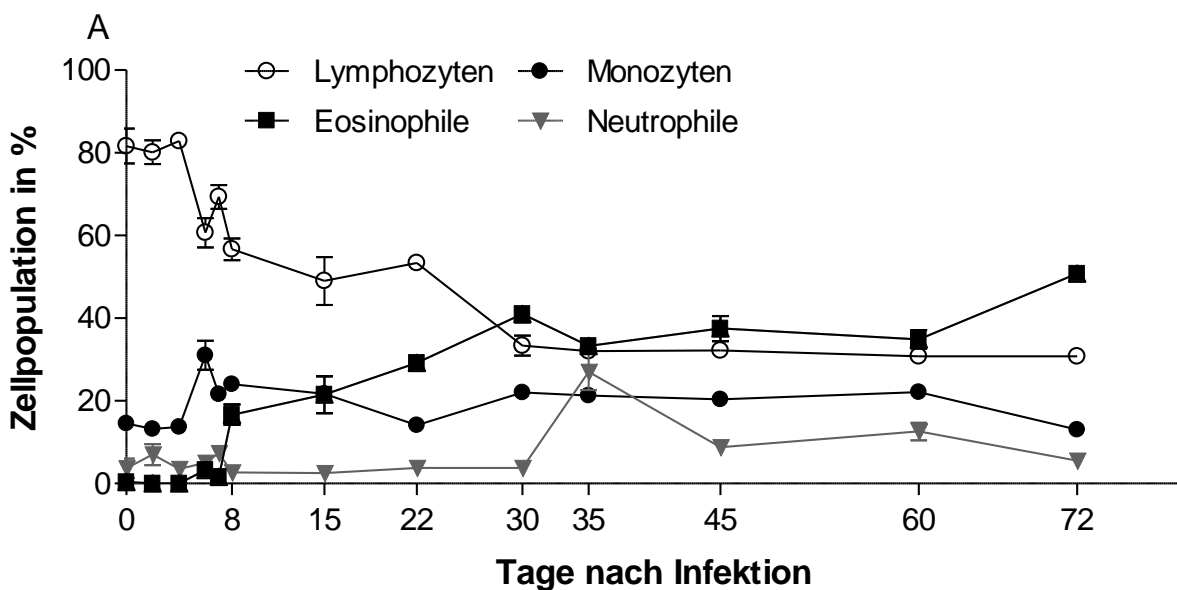


**Abb. 15:** Histologische Parameter von *L. sigmodontis*-infizierten BALB/c Mäusen. Es wurden histologische Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt. (A) zeigt eine naive Lunge ohne Entzündungszeichen oder pathologische Veränderungen. (B) Ein natives Diaphragma ohne Entzündungszeichen oder pathologische Veränderungen. (C) zeigt eine schematische Darstellung der wichtigsten Strukturen. Abgebildet sind die Trachea, die Lunge und das Diaphragma. Zwischen Lunge und Diaphragma befindet sich die Pleurahöhle, die von den Würmern besiedelt wird. (D) stellt die Lunge (a), das Diaphragma (b) und den Pleuraspalt (c) einer infizierten BALB/c Maus an Tag 72 dar. Es sind deutliche Entzündungszellen (c) zu erkennen, wobei die Struktur von Lunge und Diaphragma intakt ist. \* zeigt einen adulten Wurm (verändert nach Ritter et al. 2017).

### 3.3.1.1 Die Immunzellen und ihre Zusammensetzung in der Pleurahöhle

Um ein Bild über die Infektion und Entzündungsreaktion zu bekommen, wurden die Zellen im Pleuraspalt mithilfe einer Lavage (Pleuraflüssigkeit siehe 2.2.4.2) gesammelt und untersucht. Es wurden Zytospins angefertigt und gefärbt (siehe 2.2.4.6), um die beteiligten Zellen zu zählen und um einen zeitlichen Verlauf darzustellen. Abbildung 16 zeigt den prozentualen Anteil von Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen

Granulozyten während der Infektion. Die Anzahl der Lymphozyten nimmt mit der Zeit ab und verringert sich von 80 % auf nur noch ca. 40 %. Im Gegenzug steigt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten, die bei allergischen Reaktionen und bei parasitären Infektionen eine tragende Rolle spielen (Hübner et al. 2009), stetig an (von 1 % auf ca. 45 %). Die Anzahl der Monozyten bleibt konstant, während die der neutrophilen Granulozyten leicht ansteigt.



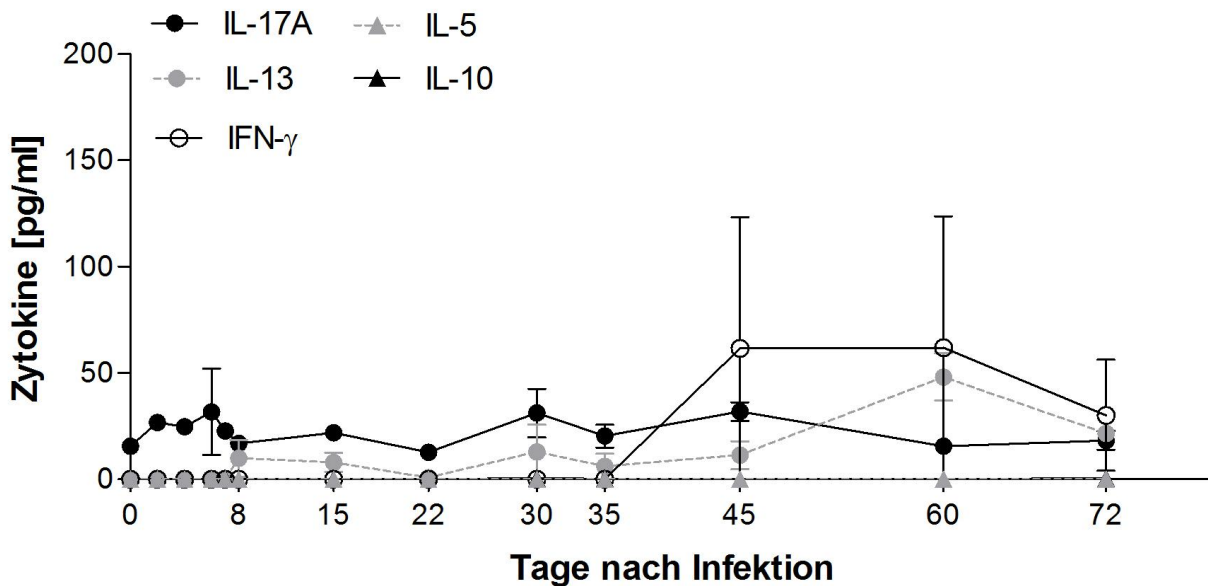
**Abb. 16:** Prozentualer Anteil von Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten während einer *L. sigmodontis* Infektion. Die Anzahl der Lymphozyten nimmt mit der Zeit ab und verringert sich von 80 % auf nur noch ca. 40 %. Im Gegenzug steigt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten stetig an (von 1 % auf ca. 45 %). Die Anzahl der Monozyten und neutrophilen Granulozyten bleibt relativ konstant. Die Daten stammen aus einem Infektionsexperiment mit  $n=50$  Tieren, wobei pro Analysetag zwischen 3-5 Tiere untersucht wurden.

### 3.3.1.2 Die Zytokinlevel in der Pleuraflüssigkeit während einer *L. sigmodontis* Infektion

Nach Analyse der Zytospins sollten auch verschiedene Zytokine untersucht werden, um festzuhalten, ob sich im Laufe der Infektion ihr Profil ändert. Dafür wurden an jedem Analysetag die ersten 500  $\mu$ l PBS von der Spülung der Pleura für die Bestimmung der Zytokine verwendet (siehe 2.2.4.2). Mittels ELISA (siehe 2.2.3.1) wurden verschiedene Zytokine im Überstand gemessen und mit einer Infektionskinetik grafisch dargestellt. In Abbildung 17 sind die gemessenen Werte für IL-17A, IL-13, IL-5 und IL-10 dargestellt.



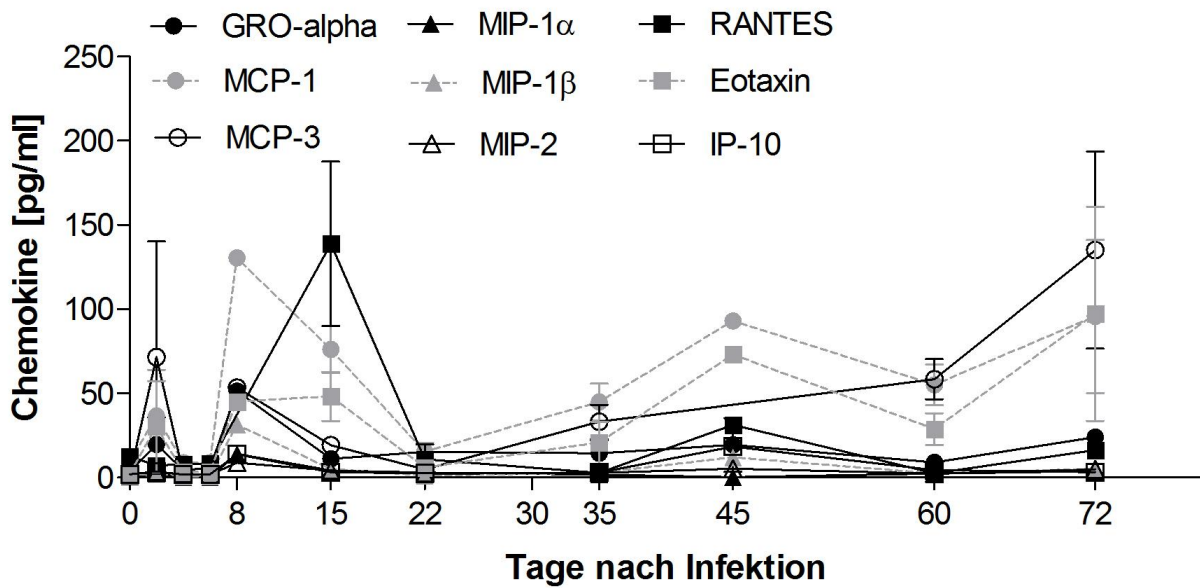
Es zeigen sich generell geringe Messwerte, die sich im Laufe der Infektion nicht wesentlich verändern. Nur die Werte von IFN- $\gamma$  steigen ab Tag 35 bis Tag 45 stark an, bleiben bis Tag 60 konstant und fallen bis Tag 72 wieder ab.



**Abb. 17:** Das Immunprofil in der Pleuraflüssigkeit während einer *L. sigmodontis* Infektion. Es wurden IL-17A, IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-5 und IL-10 Zytokine Levels in der Pleuraflüssigkeit während einer *L. sigmodontis* Infektion mittels ELISA analysiert. Die Daten stammen aus einem Experiment mit  $n=50$  Tieren, wobei von Tag 0 (naiv) bis Tag 72 pro Analysetag zwischen 3-5 Tiere untersucht wurden.

### 3.3.1.3 Die Chemokinelevel während einer *L. sigmodontis* Infektion in der BALB/c Maus

Chemokine spielen bei der Abwehrreaktion gegen Filarien, speziell neutrophile und eosinophile Granulozyten (Hübner et al. 2009; Layland et al. 2015), eine entscheidende Rolle. Sie sorgen dafür, dass die Immunzellen an den Ort der Entzündung gelangen. Dieser Vorgang wird Chemotaxis genannt und es existieren unterschiedliche Substanzen, die als Anlockstoffe dienen. Mithilfe der Multiplex/Luminex Technik (siehe 2.2.3.4) wurden die Level von neun verschiedenen Chemokinen in der Pleuraflüssigkeit (siehe 2.2.4.2) bestimmt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der gemessenen Chemokine. Insgesamt lässt sich sagen, dass sich nur geringe Mengen der Chemokine nachweisen lassen und sich keine signifikant erhöhten Werte finden.

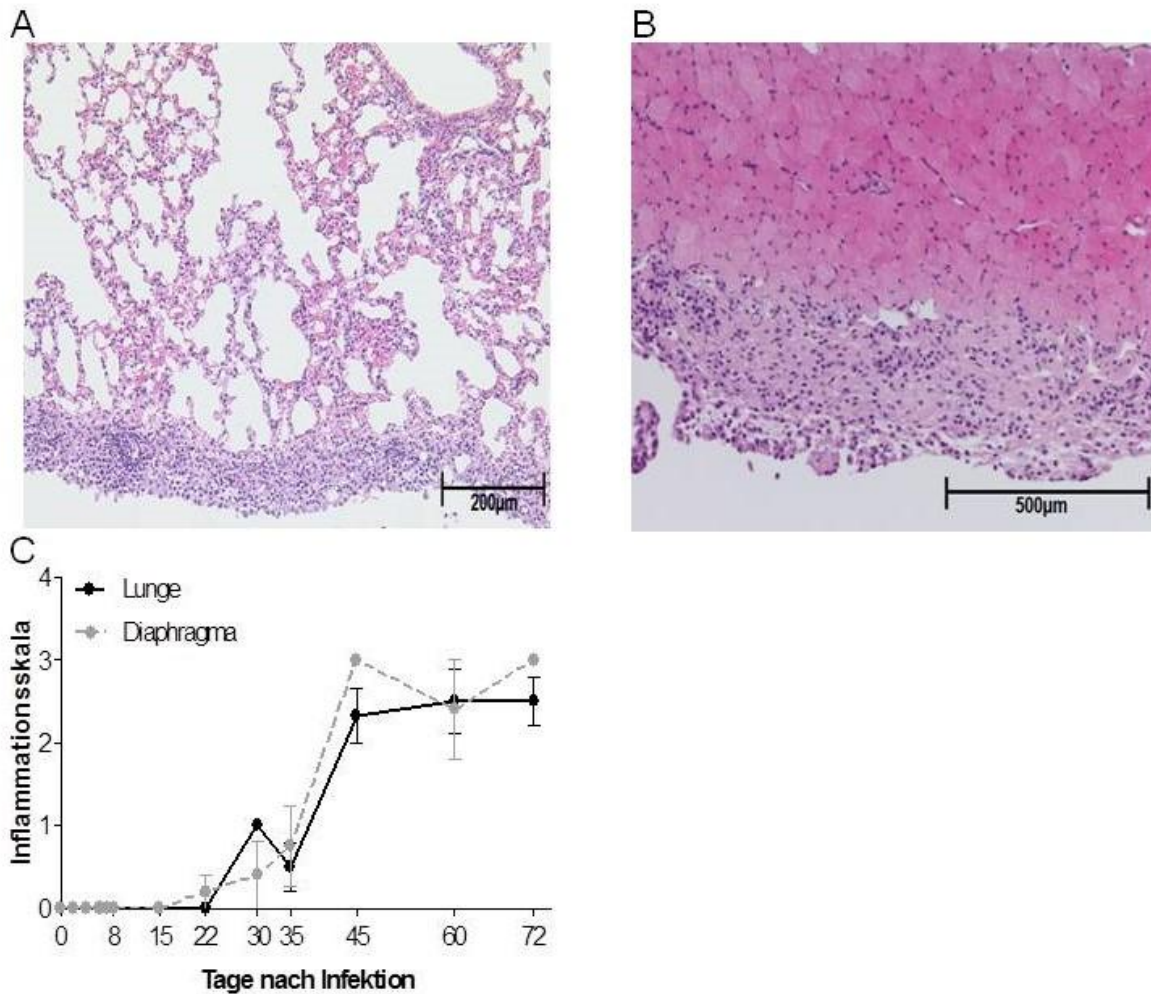


**Abb. 18:** Die beteiligten Chemokine während einer *L. sigmodontis* Infektion in der BALB/c Maus. Mithilfe der Luminex Technologie wurden die Level 9 verschiedener Chemokine Gro- $\alpha$ , MCP-1, MCP3, MIP-1 $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , MIP-2, RANTES, Eotaxin und IP-10 während einer L.s Infektion im Pleurawash bestimmt. Die Daten stammen aus einem Infektionsexperiment mit n=17 Tieren, wobei pro Analysetag zwischen 1-2 Tiere untersucht wurden.

### 3.4 Die Immuninfiltration während der *L. sigmodontis* Infektion

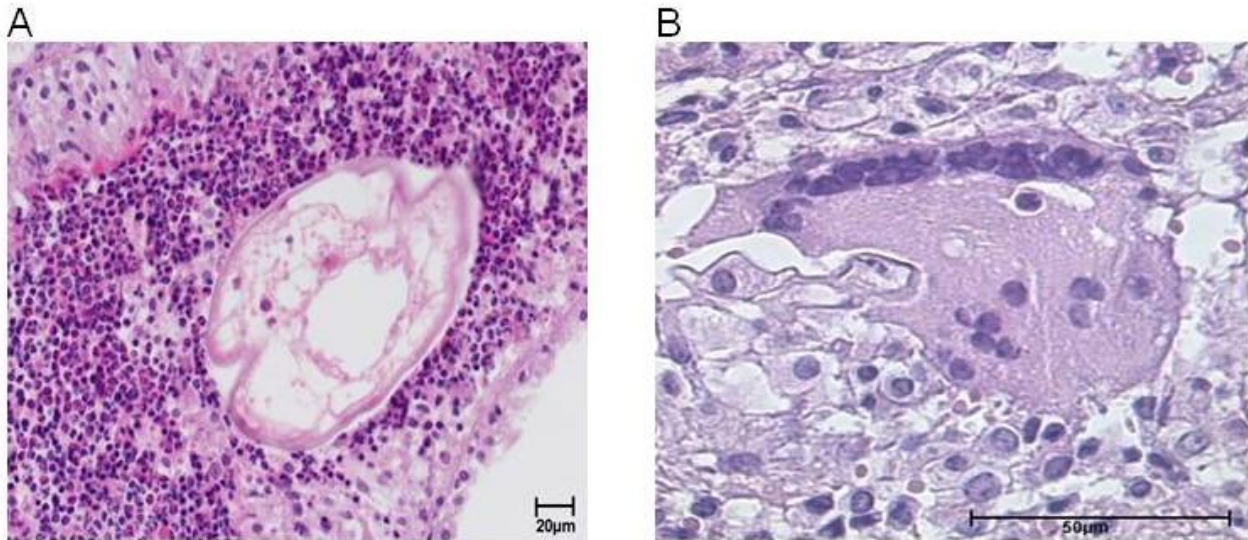
Nachdem die Analyse der Zytokine und Chemokine keine signifikanten Ergebnisse zeigten, wurde ein weiterer Fokus auf die pathologischen Veränderungen im Gewebe bzw. des umgebenden Pleuraspalts gelegt. Um die Infiltration und Pathologieentwicklung während der Infektion zu untersuchen, wurden die Gewebestücke aus Lunge und Diaphragma wie unter 2.2.4.2 beschrieben entnommen, geschnitten und gefärbt. Zur Beurteilung der Schnitte wurde das in Tabelle 4 (siehe 2.2.5.3) beschriebene Schema verwendet. Durch die Würmer im Pleuraspalt (ab ca. Tag 30) und deren Vermehrung kommt es zur Reizung der angrenzenden Gewebe. Des Weiteren reichern sich Entzündungszellen an der Lunge und am Diaphragma, allerdings nicht in den Organen selbst an. Abbildung 19 A zeigt die Lunge einer infizierten Maus an Tag 72. Die Lungenstruktur ist noch erhalten, allerdings sieht man am Rand deutlich mehr Zelllagen als normalerweise üblich. Dies deutet auf eine Entzündungsreaktion hin. Wichtig ist dabei, dass sich die Entzündung nicht in der Lunge abspielt, sondern außerhalb im Pleuraspalt. Abbildung 19 B zeigt ebenfalls ein von Tag 72 stammendes Diaphragma mit deutlich ver-

mehrten Zellschichten. Die Muskelstruktur ist ansonsten unauffällig. Wie zuvor erwähnt wurden die Proben an verschiedenen Tagen entnommen, um eine Infektionskinetik zu erstellen und mithilfe der Inflammationsskala (siehe 2.2.5.3 Tabelle 3) bewertet. Eine grafische Darstellung dieser Auswertung findet sich in Abbildung 19 C, in welcher Lunge und Diaphragma dargestellt sind. Es zeigt sich, dass ab Tag 30 die Entzündung immer deutlicher zu sehen ist. Dies geht einher mit der Entwicklung der adulten Würmer, die sich ab Tag 25-30 in der Pleurahöhle befinden. Ab Tag 45 bis Tag 72 lässt sich keine Zunahme der Entzündung mehr feststellen.



**Abb. 19:** Immuninfiltration im Pleuraspalt bei einer *L. sigmodontis* Infektion in der BALB/c Maus. Es wurden histologische Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt. (A) zeigt eine infizierte Lunge an Tag 72. Es ist eine deutliche Erhöhung der Zelllagen zu erkennen. (B) zeigt ein infiziertes Diaphragma an Tag 72. Auch hier zeigt sich eine erhöhte Zelllagenzahl, Zeichen der Entzündungsreaktion. (C) zeigt die Analyse von Lunge und Diaphragma mithilfe der Infektionsskala über den Zeitraum der Infektion mit  $n=50$  Tiere, wobei pro Analysetag zwischen 3-5 Tiere untersucht wurden (verändert nach Ritter et al. 2017).

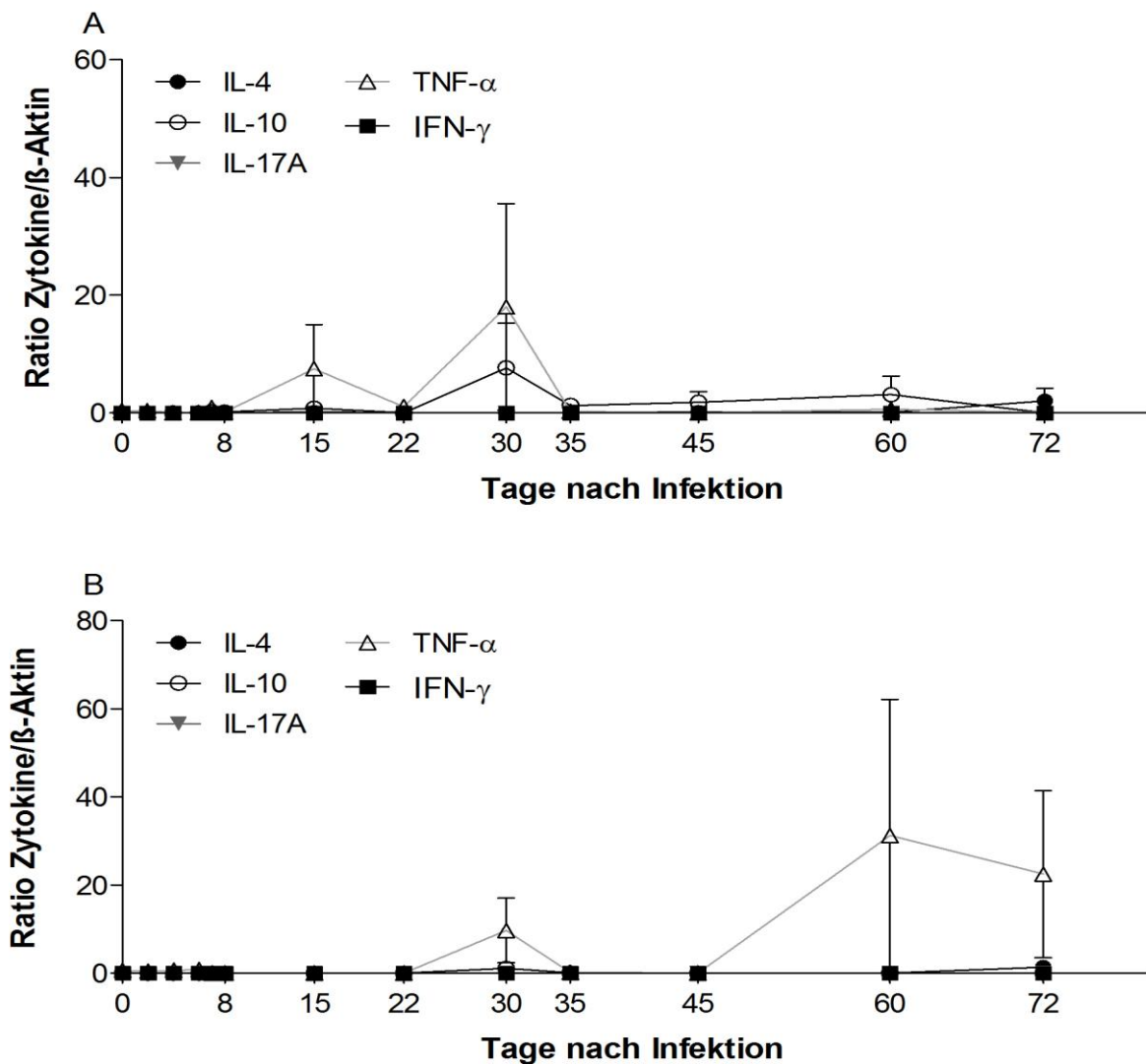
In Abbildung 20 A ist der Anschnitt eines Wurms zu sehen, der von Immunzellen eingekapselt wird. Der Wurm stellt einen Reiz dar und dies könnte zur Formation der Immunzellen führen. Insbesondere eosinophile Granulozyten finden sich bei parasitären Infektionen, aber auch neutrophile Granulozyten und Lymphozyten helfen bei der Einkapselung des Wurms. Dies ist die Grundlage von Granulombildung (Hernandez-Pando et al. 2000; Sakai et al. 2012). Die in Abbildung 20 B gezeigte Riesenzelle findet sich ebenfalls vereinzelt in den histologischen Schnitten.



**Abb. 20:** Immunzellen bei einer *L. sigmodontis* Infektion in der BALB/c Maus. (A) zeigt einen Wurm der von Immunzellen umgeben ist. Neben eosinophilen Granulozyten finden sich neutrophile Granulozyten und Lymphozyten unter ihnen. (B) zeigt eine Riesenzelle. Sie entsteht durch die Fusion mehrerer Makrophagen und zeichnet sich durch die nebeneinanderliegenden Zellkerne aus (verändert nach Ritter et al. 2017).

### 3.4.1 Das Zytokinprofil im Gewebe der Lunge und des Diaphragmas während einer *L. sigmodontis* Infektion

Durch die histologische Untersuchung der Lunge und des Diaphragmas wurde deutlich, dass eine Entzündungsreaktion existiert, welche sich im Laufe der Infektion verstärkt. Da in der Pleuraflüssigkeit keine eindeutigen Messergebnisse auftraten, wurde eine Zytokinbestimmung der Gewebeproben durchgeführt. Aus Lungen- und Diaphragmenproben (siehe 2.2.4.2) wurde cDNA (siehe 2.2.2.2) gewonnen und in der qPCR (siehe 2.2.2.3) eingesetzt, um Zytokine nachzuweisen. Da die Probengröße nicht genau standardisiert werden konnte, wurden die Messungen in Bezug zu  $\beta$ -Aktin gesetzt, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Abb. 21 zeigt die Messergebnisse für die Zytokin/ $\beta$ -Aktin Ratio von IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  über den Zeitraum der Infektion. Abbildung 21 A stellt die Werte für die Lungenproben dar, Abbildung 21 B die Ergebnisse für die Diaphragmenproben. Es zeigten sich kaum nachweisbare Zytokinlevel, einzig TNF- $\alpha$  zeigt einen leichten Anstieg in den Diaphragmenproben ab Tag 45. Insgesamt zeigt sich jedoch keine Signifikanz.



**Abb. 21:** Das Zytokinprofil im Gewebe der Lunge und des Diaphragmas während einer *L. sigmodontis* Infektion. Von den Lungen- und Diaphragmenproben wurde die Ratio von IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bestimmt. (A) zeigt die gemessenen Parameter für die Lungen und (B) für die Diaphragmen. Es zeigten sich kaum nachweisbare Zytokinlevel, einzig TNF- $\alpha$  steigt ganz leicht in den Diaphragmenproben ab Tag 45 an. An den Tagen 0-8 und 45 wurden n=3 Mäuse untersucht. An Tag 15, 22, 30 und 60 wurden n=5 Mäuse analysiert und an Tag 35 und 72 n=4 Mäuse.

### 3.5 Die Rolle von T<sub>regs</sub> während einer *L. sigmodontis* Infektion

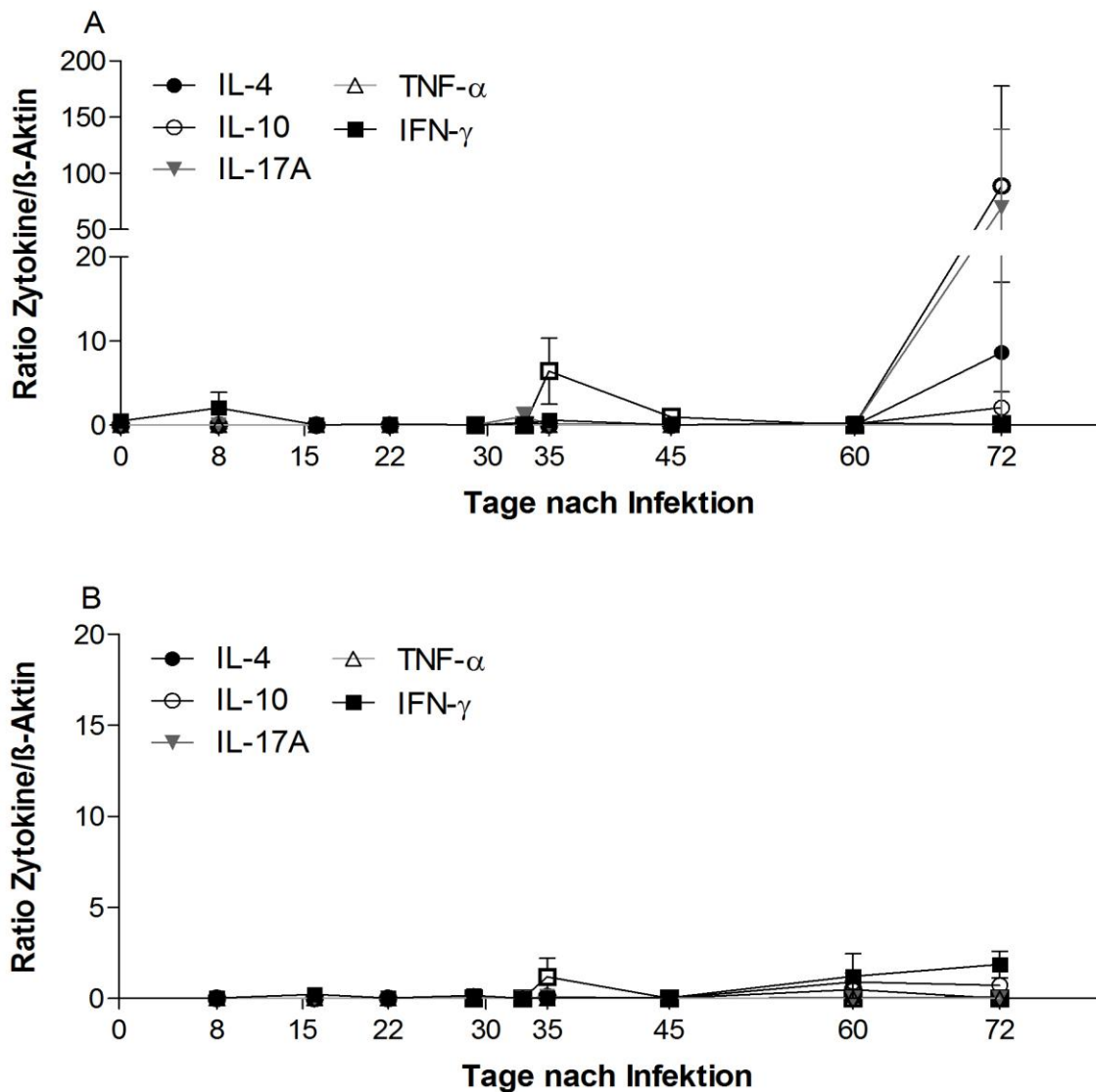
Regulatorische CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen produzieren die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ . Während einer Infektion mit Helminthen kommt es zu einer gesteigerten Produktion dieser Zytokine und somit zu einer Immunsuppression des Wirts. Dies hilft dem Parasiten im Wirt zu überleben und das abwehrende Immunsystem zu

kontrollieren (Maizels et al. 2004; Layland et al. 2010). In der Dereg Mauslinie sind die regulatorischen T-Zellen durch ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) markiert. Der FoxP3 Promoter steht unter der Kontrolle des DtR und durch die Gabe von DT kann die Produktion von FoxP3 T<sub>regs</sub> an spezifischen Zeitpunkten ausgeschaltet werden (Lahl et al. 2007). Im nächsten Experiment wurden Dereg BALB/c Mäuse mit *L. sigmodontis* infiziert, um die Rolle der T<sub>regs</sub> genauer zu analysieren und die pathologischen Veränderungen festzuhalten. Der Zeitpunkt der Depletion an den Tagen 29 und 30 wurde gewählt, da sich zu dieser Zeit die adulten Würmer in der Pleurahöhle befinden. Da die histologischen Untersuchungen gezeigt haben, dass nur adulte Würmer eine Pathologie hervorrufen, ist es wichtig, genau diesen Zeitraum, in dem die adulten Würmer entstehen, zu wählen, um eine Depletion der T<sub>regs</sub> vorzunehmen

### 3.5.2 Die Zytokin- und Chemokinproduktion nach T<sub>reg</sub> Depletion

Um den Einfluss von regulatorischen Zellen bzw. die Immunantworten zu untersuchen, wurden in der Pleuraflüssigkeit und in den Gewebeproben die Zytokine und/oder Chemokine bestimmt.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Zytokinmessung der Organproben aus der qPCR (siehe 2.2.2.3) dargestellt. Es wurde die Ratio von IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bestimmt. Die Frage war, ob T<sub>regs</sub> eine Rolle in der Zytokinausschüttung spielen. An Tag 72 konnten lediglich in den Lungenproben geringe Werte für IL-10 und IL-17A gemessen werden. Es zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede. Davon abgesehen konnten anders als zuvor bei den BALB/c Wildtypen keine Zytokinlevel gemessen werden.



**Abb. 22:** Die beteiligten Zytokine während einer *L. sigmodontis* Infektion im Dereg Mausmodell. Von den Lungen- und Diaphragmenproben wurde die Ratio von IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bezogen auf  $\beta$ -Aktin bestimmt. (A) zeigt die gemessenen Parameter für die Lungen und (B) für die Diaphragmen. Es zeigten sich kaum nachweisbare Zytokinlevel, einzig IL-10 und IL17A stiegen ganz leicht in den Lungenproben an Tag 72 an. An jedem Analysetag wurden n=3 Mäuse für Wt und Dereg analysiert.

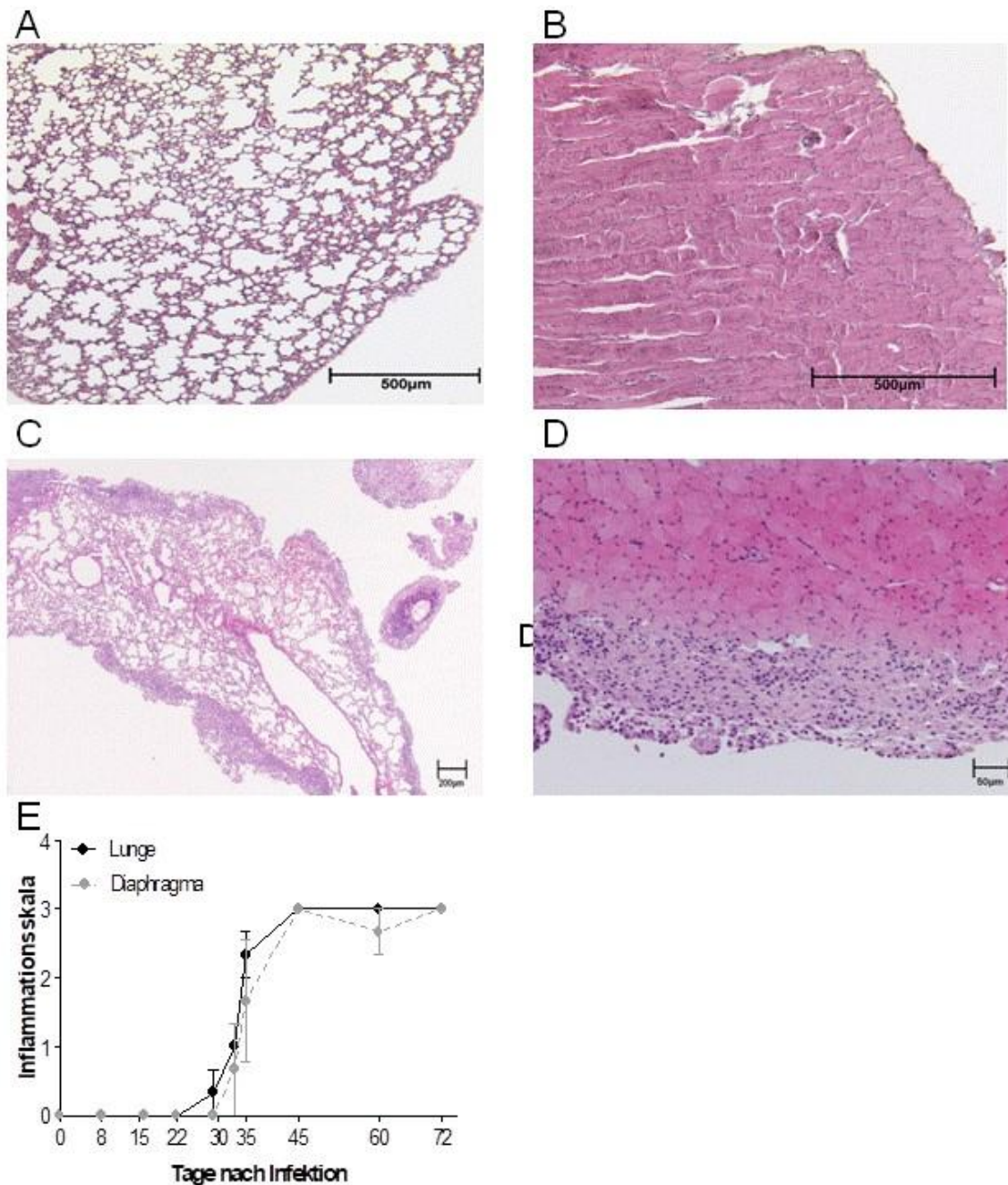
Die anderen Zytokinmessungen in der Pleuraflüssigkeit, ebenso wie die Chemokinbestimmungen zeigten keine nachweisbaren Werte und stellten daher keinen Unterschied zu den BALB/c Wildtypen dar.



### 3.5.3 Die Entzündungsreaktion im Pleuraspalt bei einer *L. sigmodontis* Infektion in der Dereg Maus

Durch das Fehlen der  $T_{\text{regs}}$  ab Tag 29/30, gerade in jenem Zeitraum, in welchem sich die L4 Larven zu adulten Würmern entwickeln, wäre es möglich, eine andere Immunreaktion zu erkennen, da die adulten Würmer für die Pathologie verantwortlich sind. Um dies zu analysieren wurden die Gewebestücke aus Lunge und Diaphragma wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben entnommen, geschnitten und HE gefärbt. Zur Beurteilung der Schnitte wurde das in Tabelle 3 (siehe 2.2.5.3) beschriebene Schema verwendet.

In Abbildung 23 werden naive Dereg Mäuse und die Veränderung in der Lunge und im Diaphragma während der Infektion gezeigt. Sowohl beim Lungen- (Abb. 23 A) als auch beim Diaphragma-Schnitt (Abb. 23 B) naiver Mäuse findet sich keine Infiltration von Immunzellen. Die histologische Struktur ist intakt und weist keine Entzündungszellen auf. Abbildung 23 C und D zeigen die Entzündungsreaktion an Tag 72. Es finden sich vermehrte Zelllagen am Rand der Organe. Diese befinden sich im Pleuraspalt. Die Organe selbst sind nicht infiltriert. In Abbildung 23 E wird die Entwicklung der Infektion nach der Analyse mithilfe der Inflammationsskala deutlich (siehe 2.2.5.3 Tab. 3). Ab Tag 30 wird eine deutliche Infiltration erkennbar, die im Laufe der Zeit stark zunimmt. Lungen- und Diaphragmenwerte sind gemeinsam abgebildet. Es zeigt sich kein Unterschied zu den BALB/c Wildtypen, das heißt eine Depletion von  $T_{\text{regs}}$  am Tag 29/30 hat keinen Einfluss auf Pathologie und Zytokin/Chemokinausschüttung.



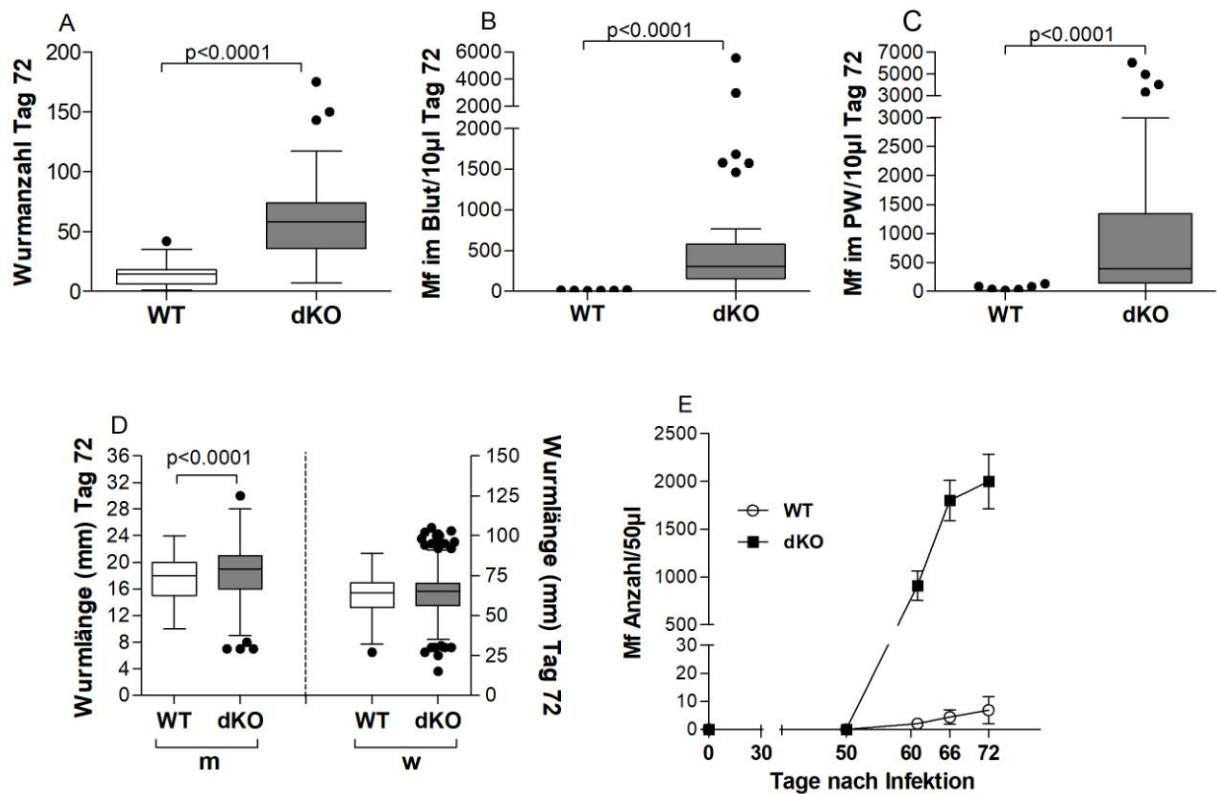
**Abb. 23:** Die Entzündungsreaktion im Pleuraspalt bei einer *L. sigmodontis* Infektion in der Dereg Maus. Die Lunge und das Diaphragma infizierter Dereg Mäuse wurde entnommen und HE gefärbt. (A) zeigt eine naive Lunge. (B) zeigt ein natives Diaphragma. Es finden sich keine histologischen Veränderungen. Die Zellstruktur ist vollkommen intakt. Während der Infektion ändert sich die Pathologie. (C) zeigt eine infizierte Lunge an Tag 72 und (D) ein Diaphragma an Tag 72. Die Organstruktur ist bei beiden intakt, allerdings finden sich ebenfalls vermehrte Zelllagen am Rande der Organe, also im Pleuraspalt. (E) zeigt die Analyse von Lunge und Diaphragma mithilfe der Inflammationsskala über den Zeitraum der Infektion mit n=3 Mäuse pro Analysetag.

### 3.6 Die Infektion mit *L. sigmodontis* im IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> BALB/c Mausstamm

Einige Studien haben gezeigt, dass die patente Infektion in BALB/c IL-5<sup>-/-</sup> Mäusen eine höhere Wurmlast hat (Saeftef et al. 2003) und dass IL-4 eine kritische Rolle bei der Entwicklung einer patenten Infektion in C57BL/6 Mäusen spielt (Le Goff et al. 2002). Daher stellt sich die Frage, inwieweit sich die Pathologie verändert, wenn sowohl IL-4 als auch IL-5 nicht mehr vorhanden sind.

#### 3.6.1 *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse weisen eine erhöhte Wurmlast und Mf Anzahl auf

Um die Infektion in IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> BALB/c Mäusen zu beurteilen, wurden die Parasitologie, Immunologie und Pathologie dieser Mäuse betrachtet. Wie zuvor erwähnt entwickelt sich in BALB/c Mäusen eine patente Infektion mit der höchsten Mikrofilarienanzahl an Tag 72 nach der Infektion. In Abbildung 24 A zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Würmern in der Pleurahöhle bei IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dies spiegelt sich auch in den signifikant erhöhten Mikrofilarien in der Peripherie (Abb. 24 B) und in der Pleuraflüssigkeit (Abb. 24 C) wider. Der Vergleich der Länge der einzelnen Würmer offenbarte, dass die männlichen Würmer der IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> Mäuse wesentlich länger sind als die männlichen Würmer der Wildtypen, es aber keinen Unterschied bei den weiblichen Würmern gab (Abb. 24 D). Abbildung 24 E stellt die Anzahl der Mf im zeitlichen Verlauf ab Tag 50 dar. Es findet sich eine deutlich erhöhte Anzahl an Mf in IL-4R $\alpha$ /IL-5<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen.

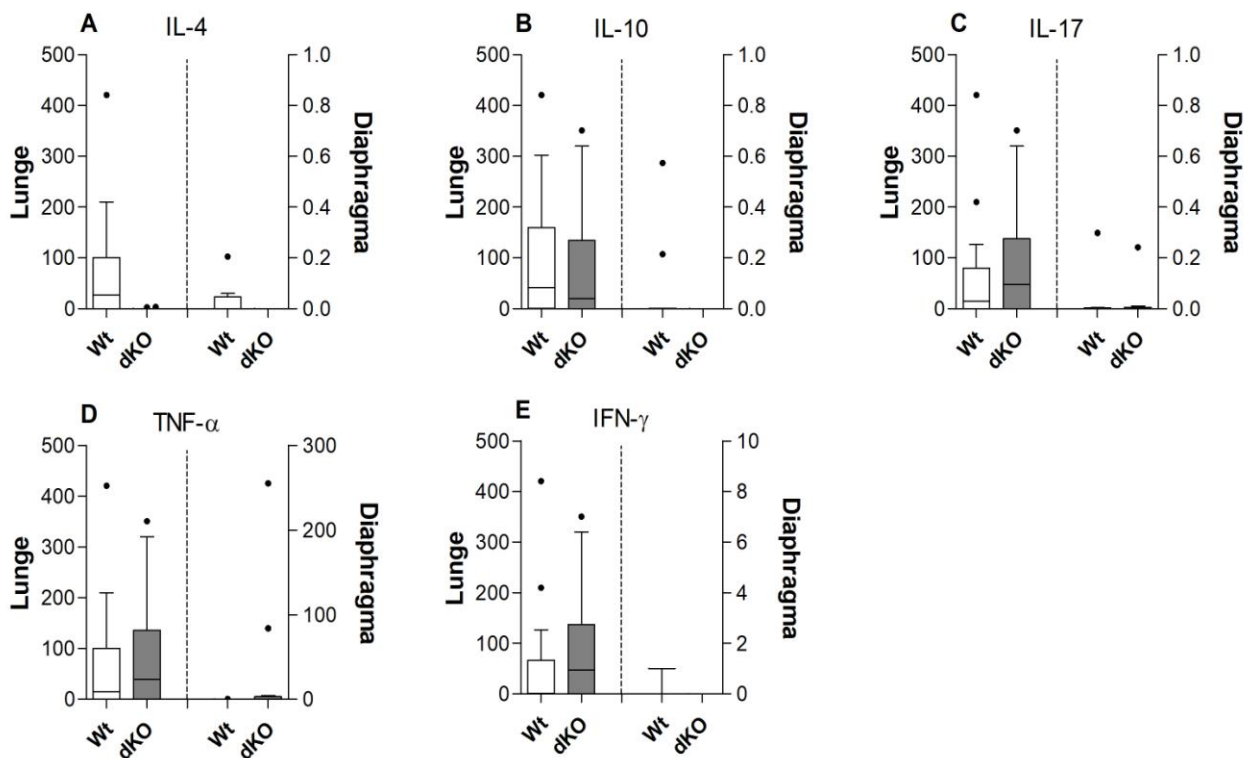


**Abb. 24:** *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c Mäuse weisen eine erhöhte Wurmlast und Mf Anzahl auf. In (A) zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Würmern in der Pleurahöhle bei IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen an Tag 72 nach der Infektion. (B) verdeutlicht die signifikant erhöhte Mf Anzahl im Blut. (C) zeigt die signifikant erhöhte Mf Anzahl im Pleurawash. (D) Die männlichen Würmer (m) der IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse sind wesentlich länger als die männlichen Würmer der Wildtypen. Bei den weiblichen Würmern (w) zeigt sich kein Unterschied. (E) stellt die Anzahl der Mf im Blut im zeitlichen Verlauf ab Tag 50 dar. Es findet sich eine deutlich erhöhte Anzahl an Mf in IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Die Signifikanz wurde entweder mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt. (verändert nach Ritter et al. 2017)

### 3.6.2 *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$ BALB/c Mäuse weisen keinen Unterschied in den Zytokinenspiegeln auf

Um die IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c Mäuse mit den anderen beiden Mausmodellen vergleichen zu können, wurden bei diesen Mäusen die Chemokinlevel im Pleurawash sowie die Zytokine in den Organproben bestimmt.

Die Ratio von IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wurden bestimmt und für Wildtyp Mäuse sowie für IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c Mäuse an Tag 72 nach der Infektion dargestellt. Bei den Zytokinen IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  konnten keine Unterschiede detektiert werden (Abb. 25 A-E).

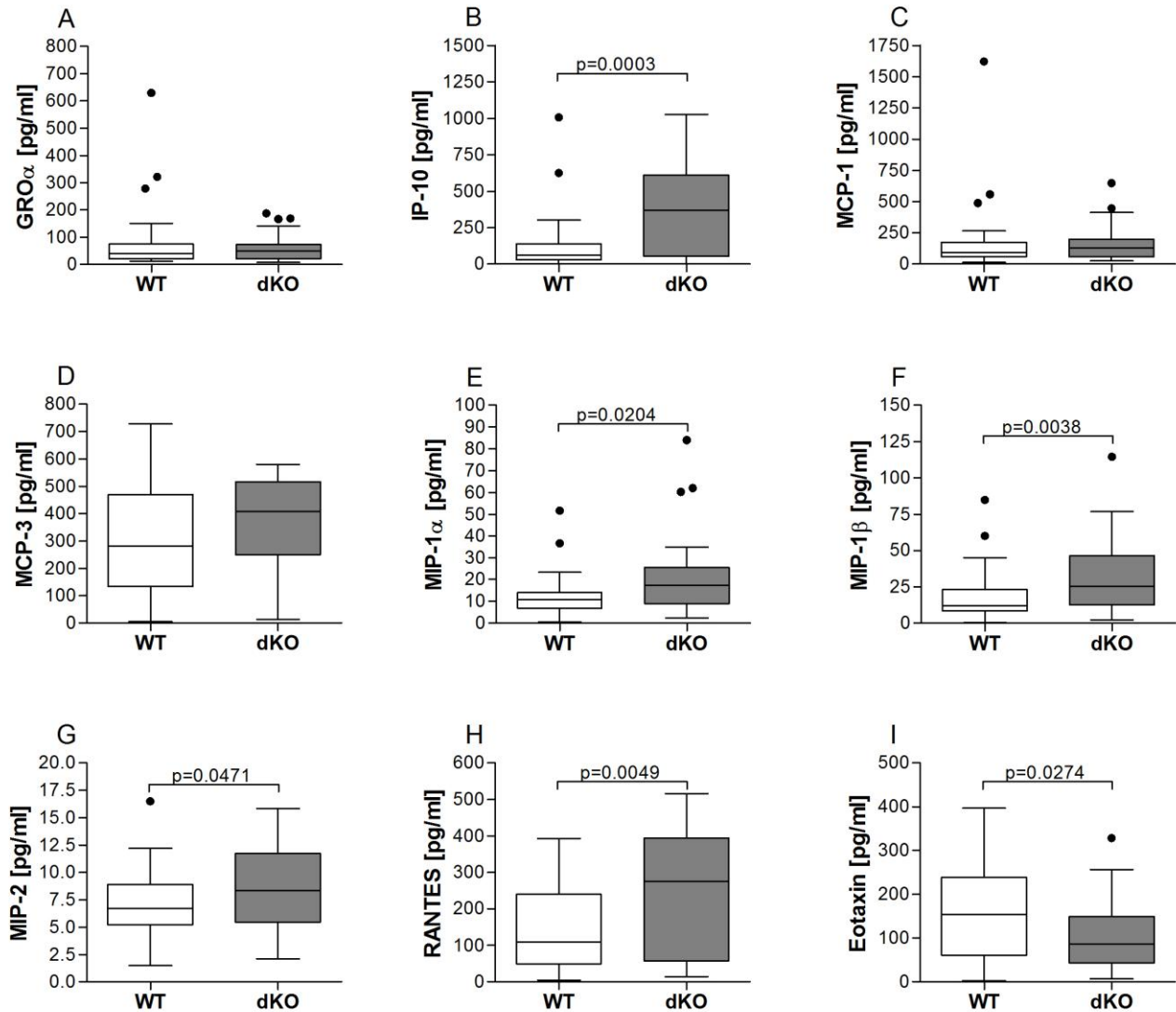


**Abb. 25:** *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c Mäuse weisen keinen Unterschied in den Zytokinspiegeln auf. Aus den Lungen- und Diaphragmenproben wurde die Ratio von (A) IL-4, (B) IL-10, (C) IL-17, (D) TNF- $\alpha$  und (E) IFN- $\gamma$  an Tag 72 der Infektion bestimmt. Es sind sowohl Wildtypen als auch die IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Proben gemessen worden und im Vergleich aufgetragen. Es konnten keine Unterschiede bei den Zytokinen IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gefunden werden. Die Daten zeigen die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten (n=24 Wt und n=28 IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse). Die Signifikanz wurde entweder mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt.

### 3.6.3 Mit *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$ BALB/c Mäuse zeigen erhöhte Chemokinlevel

Um das Immunprofil zu komplettieren, wurden auch bei den IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen die verschiedenen Chemokine gemessen. Die Bestimmung erfolgte aus der

Pleuraflüssigkeit und die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Es gibt keinen Unterschied für Gro- $\alpha$  beim Vergleich von IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  und BALB/c Mäusen (Abb. 26 A). Dahingegen sind die IP-10 Werte in IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen signifikant erhöht (Abb. 26 B). Auch bei den Werten von MCP-1 und MCP-3 (Abb. 26 C und D) fand sich keine Differenz, wobei sich wiederum signifikant höhere Werte in IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen für MIP- $\alpha$ , MIP- $\beta$  und RANTES detektieren ließen (Abb. 26 E-H). Erniedrigte Werte in den IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  im Vergleich zu den BLAB/c Mäusen fanden sich bei der Messung von Eotaxin (Abb. 26 I).

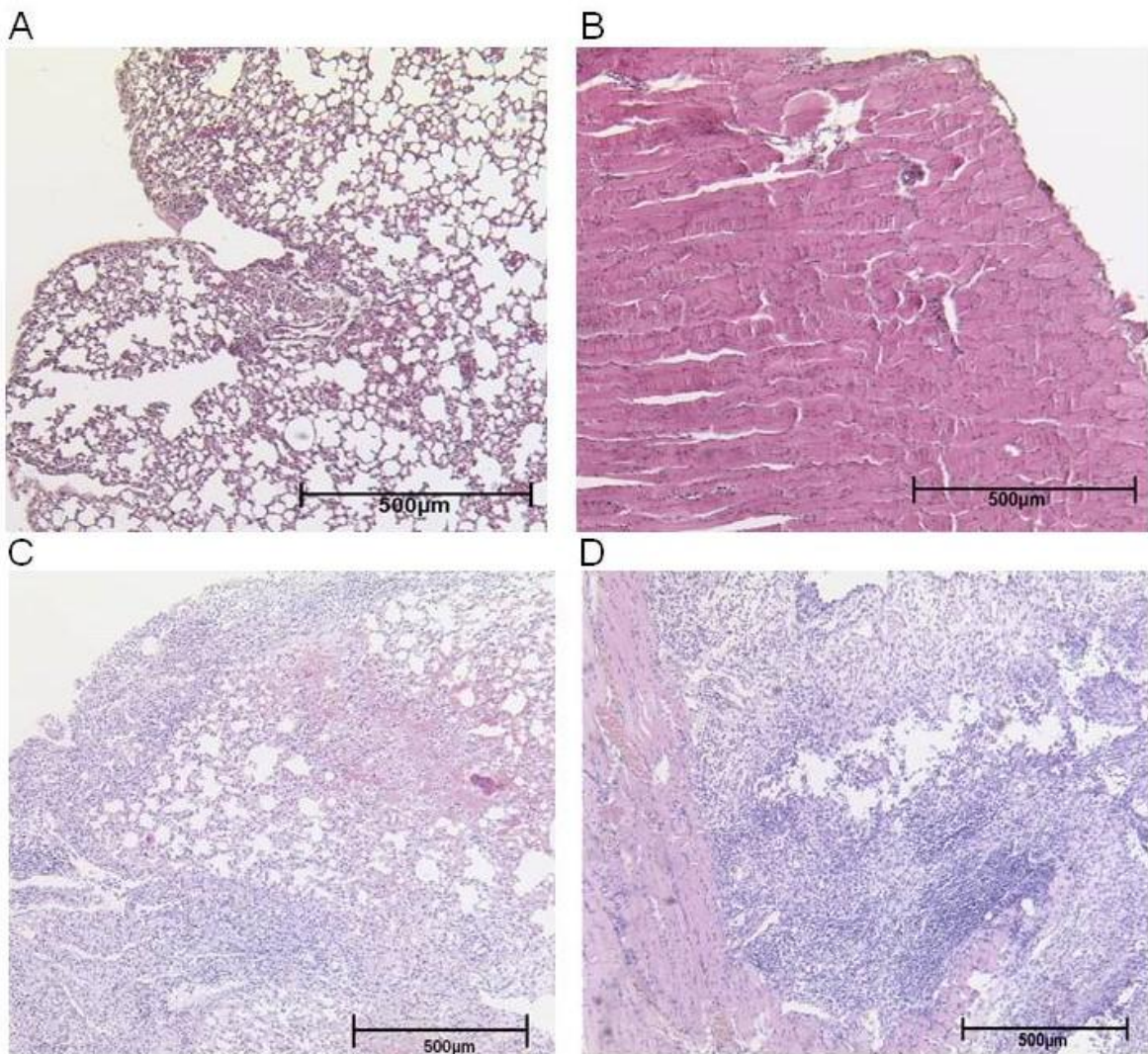


**Abb. 26:** Mit *L. sigmodontis* infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  (dKO) BALB/c Mäuse zeigen erhöhte Chemokinlevel. In der Pleuraflüssigkeit von infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c und Wildtyp BALB/c Mäusen wurden Chemokine bestimmt. Es wurde ein Luminex Maus Chemokine Panel verwendet, um die Werte für Gro- $\alpha$  (A), IP-10 (B), MCP-1 (C), MCP-3 (D), MIP-1 $\alpha$  (E), MIP-1 $\beta$  (F), MIP-2 (G), RANTES (H) und Eotaxin (I) zu bestimmen. Der Graph zeigt die Werte für einzelne Mäuse aus vier verschiedenen Infektionsexperimenten ( $n=34$  WT und  $n=34$  IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse). Die Signifikanz wurde entweder mithilfe des Student oder Mann Whitney Tests bestimmt (verändert nach Ritter et al. 2017).

### 3.6.4 Erheblich gesteigerte Entzündungsreaktion in *L. sigmodontis* infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$ Mäusen

Aufgrund der veränderten Immunantwort in infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen wurde auch bei diesem Mausstamm die Inflammation in der Lunge und im Diaphragma untersucht.

Nicht infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse zeigten keine Pathologie (Abb. 27 A und B). Bei den infizierten Tieren fanden sich sowohl in der Lunge (Abb. 27 C) als auch im Diaphragma (Abb. 27 D) massive Entzündungsreaktionen. Die Entzündungsreaktionen waren viel stärker ausgeprägt als bei Wildtypen und fanden nicht nur an den angrenzenden Strukturen der Organe statt, sondern in den Organen selbst. Dies führt zu einer erhöhten Wertung von 4 auf der Inflammationsskala. Es kam sowohl in der Lunge, im Diaphragma als auch im Pleuraspalt zur Infiltration von Immunzellen.

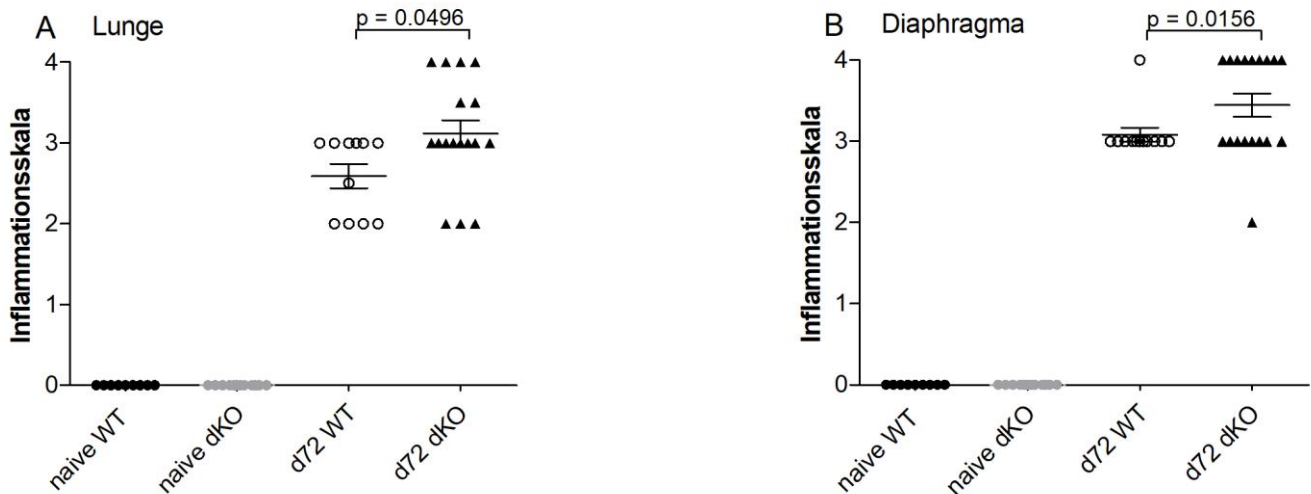


**Abb. 27:** Gesteigerte Entzündungsreaktion im Pleuraspalt, in der Lunge und im Diaphragma in *L. sigmodontis* infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen. Es wurden die Lunge und das Diaphragma von infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen entnommen und HE gefärbt. (A) zeigt eine naive Lunge. (B) zeigt ein natives Diaphragma. Es finden sich keine histologischen Veränderungen. Die Zellstruktur ist vollkommen intakt. Während der Infektion ändert sich die Pathologie. (C) zeigt eine infizierte Lunge an Tag 72 und (D) ein



Diaphragma an Tag 72. Die Organstruktur ist bei beiden nicht mehr intakt, es finden sich Infiltrate im Organ und vermehrte Zelllagen am Rande der Organe, im Pleuraspalt (verändert nach Ritter et al. 2017).

Abbildung 28 zeigt die Auswertung mithilfe der Inflammationsskala (Tab. 4) von Wt Mäusen im Vergleich zu den IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen (Ritter et al. 2017).



**Abb. 28:** Gesteigerte Entzündungsreaktion im Pleuraspalt, in der Lunge und im Diaphragma in *L. sigmodontis* infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen. Es wurden die Lunge und das Diaphragma von infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen entnommen, HE gefärbt und mithilfe der Inflammationsskala ausgewertet. (A) zeigt die Ergebnisse der Lunge von naiven und infizierten Tieren, (B) die Ergebnisse der Diaphragmen von naiven und infizierten Tieren. Naive Tiere weisen keine Inflammation auf, während die Inflammation bei IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäusen an Tag 72 stärker ausfällt als bei den Wildtypen an Tag 72. Der Graph zeigt die Werte für einzelne Mäuse aus zwei verschiedenen Infektionsexperimenten (naive Wildtyp Mäuse n=9 und IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse n=12; infizierte Wildtyp Mäuse n=12 und IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  Mäuse n=18 (Ritter et al. 2017).

## 4. Diskussion

### 4.1 *M. perstans*: Eine vernachlässigte tropische Krankheit

*Mansonella perstans* ist eine von *Culicoides* Mücken übertragene Nematode, die in 33 Ländern der Subsahara vorkommt. Eine Durchseuchung findet sich ebenfalls in Zentral- und Südamerika sowie der Karibik (Simonsen et al. 2011). Es sind über 114 Millionen Menschen infiziert (Simonsen et al. 2011). An der Westküste Afrikas ist die Mücke vom Senegal bis nach Angola zu finden, in Zentralafrika vom Nord- bis Südsudan, östlich bis Uganda, Kenia und Tansania sowie im Süden bis Simbabwe (Agbolade et al. 2006). In den meisten Ländern (Kamerun, Nigeria, Ghana, Sierra Leone, Elfenbeinküste, Sambia und Uganda) betrifft die Infektion die arme Bevölkerung (Agbolade et al. 2006; Wanji et al. 2003). Bisher fand dieser Parasit keine große Beachtung, da ihm kein eindeutiges Krankheitsbild zugeschrieben wird. Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch, wohingegen in einigen Fällen auch verschiedenste Symptome mit der *M. perstans* Infektion in Verbindung gebracht werden, wie z. B. Eosinophilie, subkutane Schwellungen und Gelenkbefall (Adolph et al. 1962; Clarke et al. 1971). Auch wenn diese Symptome nicht bei allen Betroffenen auftreten, sollte *M. perstans* nicht unterschätzt werden, da der Parasit häufig als Koinfektion auftritt und andere Infektionen wie LF, Onchozerkose, HIV oder Tuberkulose eventuell beeinflussen kann (Simonsen et al. 2011; Brown et al. 2004; George et al. 2014). Gerade bei den infizierten Jugendlichen zeigt sich eine steigende Prävalenz bezüglich Koinfektionen mit *Mycobacterium ulcerans* und *Mycobacterium tuberculosis* (Phillips et al. 2014). Interessanterweise liegen in den endemischen Gebieten Regionen nebeneinander, in denen *M. perstans* sehr deutlich ist und eine hohe Mf Last vorliegt neben Regionen die keine Mf Last aufweisen. Dies lässt vermuten, dass auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Infektion spielen. Generell ist es wichtig die Transmission von *M. perstans* zu verstehen, um diesen Parasiten bekämpfen zu können. Mithilfe der qPCR können die Vektoren untersucht und die Bedingungen für die Transmission erforscht werden und so vielleicht eine Erklärung gefunden werden, warum *M. perstans* besonders im äquatornahen Regenwäldern vorkommt (Wanji et al. 2016). Momentan scheint *M. perstans* einer der anpassungsfähigsten Parasiten zu sein. Ein Verständnis der genauen immunologischen Mechanismen hinter der Infektion könnte eine Hilfe bei neuen Therapiemöglichkeiten,

nicht nur bei parasitären Infektionen, sondern auch darüber hinaus bei Autoimmunkrankheiten spielen. Das "African-German Cooperation Projects in Infectiology" ist ein Programm der DFG, in dem Forschungsprojekte gefördert werden. Im MaP2Co Projekt (HO 2009/10-1) wurde der Fokus auf zwei Länder (Ghana und Kamerun) gelegt, um Daten als Grundlage zur Erforschung und Therapie parasitärer Erkrankungen zu erheben. Im Zuge meiner Doktorarbeit war es möglich, Material (Serum) aus Kamerun und Ghana zu erhalten, um die Diagnostik von *M. perstans* mittels PCR zu etablieren und ein Immunprofil von *M. perstans* Monoinfektionen zu untersuchen.

Um eine Infektion mit *M. perstans* zu diagnostizieren, dient bis heute die Mikroskopie von Blutausstrichen als Standardmethode. Es existieren noch keine Schnelltests oder ELISA Verfahren im Gegensatz zur LF Diagnostik, für die es sowohl einen Schnelltest gegen das lösliche *W. bancrofti* Antigen (ICT) als auch einen etablierten ELISA gibt (Weil et al. 1997). Die Mikroskopie stellt eine gewisse Herausforderung dar, da für die Diagnosesicherung gut geschultes Personal nötig ist. Es müssen sehr geringe Mengen an Mf detektiert werden und es darf zu keiner Verwechslung mit anderen Filarieninfektionen kommen, da eine falsche Therapie zu einer Verschlechterung der Erkrankung führen könnte. In der Vergangenheit wurden verschiedene Formen der qPCR zur Detektion von *M. perstans* entwickelt (Jimenez et al. 2011; Keiser et al. 2008). Diese Methoden benötigen aber zum Teil große Mengen an DNA Material (200 Kopien/ $\mu$ l) (Albers et al. 2014). Zur Optimierung wurde eine spezifische *M. perstans* qPCR mithilfe des ITS1 Gens von *M. perstans* etabliert. Diese DNA Region existiert in allen Eukaryonten, also auch in allen anderen Nematoden und bietet so die Möglichkeit eine Spezifität zu erreichen. Wir haben uns darauf konzentriert diese Methode zu verbessern um die Detektion von *M. perstans* im Vektor sowie im menschlichen Wirt zu ermöglichen. Monoinfektionen mit *M. perstans* sind bisher noch nicht bzw. nur teilweise (Ritter et al. 2018) untersucht worden, allerdings gibt es keine Analysen des Immunprofils von *M. perstans*. Es wurden Immunantworten bei Koinfektionen mit anderen Parasiten wie z.B. Malaria untersucht (Drame et al. 2016; Hillier et al. 2008). In diesem Zusammenhang wurden allerdings keine Details erforscht.

#### 4.1.1. Entwicklung einer spezifischen *M. perstans* qPCR

Die Etablierung und Erhöhung der Spezifität einer *M. perstans* qPCR gelang durch die Erhöhung der Annealingtemperatur. Dadurch ist es möglich, *W. bancrofti* und *M. perstans* Infektionen sicher zu unterscheiden. Albers et. al. erhielten eine 100 % Detektion nur ab 200 Kopien/ $\mu$ l (Albers et al. 2014). Wir schafften es, das Detektionslimit auf 0,4 pg/ $\mu$ l (0,015 Kopien/ $\mu$ l) zu optimieren. Um die Spezifität zu kontrollieren wurde, *W. bancrofti* DNA eingesetzt, da gerade hier mikroskopisch ein Verwechslungspotential besteht, und in der qPCR getestet. Da die Detektion zunächst positiv ausfiel und somit keine Spezifität gegeben war, wurde das PCR Protokoll verändert. Die positive Detektion lässt sich durch die große Ähnlichkeit der ITS1 Region erklären, da sie zu 68% übereinstimmt. Durch die Änderung der Annealingtemperatur, die für die akkurate Anlagerung der Primer besonders wichtig ist, konnte die Detektion von *W. bancrofti* DNA eliminiert werden. Die bisher gemessenen 21 Proben zeigten eine große Spezifität. Allerdings sollten noch weitere Messungen erfolgen, um diese Ergebnisse zu festigen. Da die Koinfektion mit *W. bancrofti* hoch ist, sollte die qPCR auf ihre Spezifität bei diesen Patienten untersucht werden. Es wäre auch ein Vorteil, eine triplex PCR zu entwickeln, um eine gleichzeitige Diagnostik zu ermöglichen, wie es schon für *B. malayi* und *W. bancrofti* möglich ist (Pilotte et al. 2013). Ob die qPCR auch *M. perstans* spezifisch ist, bezogen auf die Spezies *Mansonella*, ist ein weiterer Punkt, der überprüft werden muss. Vorläufige Ergebnisse zeigen momentan, dass *M. streptocerca* von dieser qPCR nicht detektiert wird. Dies gibt die Möglichkeit, unter den einzelnen *Mansonella* Spezies zu unterscheiden und die Option, neue spezifische PCR's zu entwickeln. Es könnte von Interesse sein, die unterschiedlichen Symptome und Ausprägungen der einzelnen *Mansonella*-Infektionen zu untersuchen und deren Unterschiede zu analysieren, auch im Hinblick auf unterschiedliche Immunantworten der einzelnen Spezies im Kontext diverser Koinfektionen.

#### 4.1.2 Das Immunprofil von *M. perstans*

Allgemein sind Filarieninfektionen durch  $T_H2$ - sowie regulatorische Immunantworten gekennzeichnet. So werden neben bestimmten Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 und IL-10, auch Antikörper wie IgE, IgG1 und nicht inflammatorisches IgG4 vermehrt produziert

(Babu und Nutman 2014). Bei Individuen, die mit Onchozerkose oder lymphatischer Filariose infiziert sind, zeigen sich erhöhte Level an IL-10, TGF- $\beta$  regulatorischer T-Zellen, IgG4 und eine hohe Wurmlast (Hoerauf et al. 2005; Arndts et al. 2014; Arndts et al. 2012; Adjobimey und Hoerauf 2010). An sich dient die T<sub>H</sub>2 Immunantwort nicht primär der Abwehr des Parasiten, sondern vielmehr dem Schutz des Wirts vor der Inflammation und Zellzerstörung. So ist zum Beispiel IL-4 ein Zytokin mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, das unter anderem die körpereigene Produktion von T<sub>H</sub>1-Zellen, Makrophagen sowie von IFN- $\gamma$  und IL-12 verringert. Außerdem ist IL-4 für den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE und IgG4 verantwortlich (Le Goff et al. 2002; Babu et al. 2000). *M. perstans* ist vielleicht einer der am besten angepassten Nematoden, da die Infektion mit dem Parasit bei den meisten Betroffenen asymptomatisch verläuft und ansonsten nur milde Symptome auslöst (Adolph et al. 1962). Gerade diese Tatsache macht die Erforschung des Immunprofils von *M. perstans* so interessant, da es wichtige Erkenntnisse über die Beziehung zwischen Wirt und Parasit liefern kann, welche zur Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten beitragen können (Hartmann et al. 2015). Außerdem ist eine Entschlüsselung der Immunantwort von *M. perstans* essentiell, um den Einfluss des Parasiten auf Krankheiten wie Tuberkulose, Malaria oder HIV (Brown et al. 2004; Brown et al. 2006), sowie die Wechselwirkung bei einer BCG Impfung zu erforschen (Elliott et al. 2010).

Zurzeit gibt es noch keine Untersuchungen monoinfizierter *M. perstans* Betroffener (Metenou et al. 2009; Phillips et al. 2014). Um zum ersten Mal einen Überblick über die spezifische Immunantwort zu erhalten, wurde das Serum von *M. perstans* infizierten Patienten aus Kamerun untersucht. Interessanterweise fanden sich erniedrigte Werte von IL-4 und IL-17 in den Blutproben der *M. perstans* Mf<sup>+</sup> im Vergleich zu *M. perstans* Mf<sup>-</sup>. Die verminderten Zytokinmengen spiegeln die Fähigkeit des Parasiten wider, das Immunsystem des Wirts zu modulieren. Ein Vergleich zu anderen parasitären Infektionen wäre sehr interessant. Eine Untersuchung *in vivo* bei Menschen ist nicht möglich, da der Parasit sich in den Körperhöhlen aufhält. *M. perstans* scheint die Immunantwort in großem Maße zu modulieren, sodass der Wirt keinen erheblichen Schaden nimmt und es zu keiner Abstoßung kommt. Ähnliches zeigte sich auch bei den Chemokinen (IL-8, RANTES), pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF- $\alpha$ ) und T<sub>H</sub>1 Zytokinen (IFN- $\gamma$ , IL-12p70), bei denen es erniedrigte Werte im Vergleich zu *M. perstans* Mf<sup>-</sup> gab. Einzig MIP-

1 $\beta$  zeigte interessanterweise erhöhte Werte. MIP-1 $\beta$ , auch CCL 4 genannt, ist ein wichtiges Chemokin und somit für die Chemotaxis verschiedener Immunzellen verantwortlich (Bystry et al. 2001). Es unterstützt die pro-inflammatorische T<sub>H</sub>1 Immunantwort (Schrum et al. 1996). und wird von CD8+ T-Zellen als HIV Suppressor Faktor produziert (Cocchi et al. 1995). Durch die Erhöhung von MIP-1 $\beta$  kann es auch sein, dass im Laufe der Infektion die Level von pro-inflammatorischen Zytokinen steigen. Es ist noch nicht genug über MIP-1 $\beta$  bekannt und darüber, welche Rolle es in der Immunantwort bei parasitären Infektionen spielt. Einzelne Studien an *O. volvulus* infizierten Patienten haben gezeigt, dass systemisches MIP-1 $\beta$  erniedrigte oder gleiche Werte im Vergleich zu gesunden Probanden hat. Erst 6 Monate nach der Therapie mit Ivermectin gegen *O. volvulus*, stieg der MIP-1 $\beta$  Spiegel an (Fendt et al. 2005). Die jetzt gemessenen erhöhten Werte sind noch nicht erklärbar und es sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um die Bedeutung von MIP-1 $\beta$  während einer Infektion mit *M. perstans* zu analysieren und gleichzeitig auch festzustellen, welche Rolle es bei anderen Filariosen spielt.

Im Rahmen des MaP2Co, welches von der DFG gefördert wurde (HO 2009/10-1), wurde eine neue Methode entwickelt um *M. perstans* Würmer *in vitro* zu kultivieren und aus diesen Antigen herzustellen (Njouendou et al. 2017; Ritter et al. 2018). Vorherige Untersuchungen der Würmer waren mittels Elektronenmikroskop möglich, nachdem Araujo et al. (1995) die Würmer mittels Ultraschall in den Gefäßen detektierten und im Ganzen operativ herausnahmen. So war es möglich die lebenden Würmer zu untersuchen und deren Oberflächenstruktur zu beschreiben, die sich als transversale Streifung mit periodischen Verdickungen entlang des Wurms zeigte und andere Organe (Mund, Vulva, Kloake) zu untersuchen (Araujo et al. 1995). Erste Methoden zur *in vitro* Kultivierung wurden an *Brugia* Spezies erforscht. Es gelang einen Tag alte Larven von *Brugia pahangi* und *Brugia malayi* zu gewinnen und diese, *in vitro* bis zur infektiösen L3 Larve, entwickeln zu lassen (Nayar et al. 1991). Somit stellt die im Rahmen des MaP2Co Projektes entwickelte Methode eine Weiterentwicklung der bekannten Methoden dar. Sie ermöglicht eine spezifische Analyse der Immunantwort von *M. perstans* sowie die Etablierung eines vollständigen Entwicklungszyklus. Dies ist ethisch von Vorteil, da keine Menschen mehr benötigt werden, um detaillierte Studien durchzuführen. So könnte die Wurmentwicklung und Paarung analysiert, Restimulationsimmunantworten gezeigt und Medikamententestungen durchgeführt werden.

Mithilfe des Antigens war es zum ersten Mal möglich, spezifische Immunglobuline zu messen. Dazu wurde das in Kamerun hergestellte Antigen in der Zellkultur eingesetzt und zur Stimulierung von Blutzellen  $Mf^+$  Individuen und von  $Mf^-$  Individuen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Restimulation von Blutzellen von *M. perstans* ( $Mf^+$ ) Individuen mit dem gewonnenen Antigen starke  $IFN-\gamma$ , IL-17A und IL-13 Antworten hervorruft (Ritter et al. 2018). Es konnten keine Zytokine im Zellkulturüberstand gesunder Europäer erfasst werden, die noch keinen Kontakt mit *M. perstans* hatten. Dies lässt darauf schließen, dass die Zytokinreaktion für  $Mf$  infizierte Personen spezifisch war und somit für den Wurm. Interessanterweise war die Immunantwort bei den restimulierten Blutzellen von  $Mf^+$  Individuen anders, als das zuvor untersuchte systemische Profil (Serum). Zum Beispiel waren  $IFN-\gamma$ , IL-13 und IL-17A in infizierten Personen erniedrigt im Vergleich zu  $Mf^-$  (Ritter et al. 2018). Eine starke IL-17A und IL-17A/IL-4 Immunantwort in *W. bancrofti* und *O. volvulus* infizierten Individuen wurde kürzlich mit Patienten in Zusammenhang gebracht, die unterschiedliche Formen der Pathologie zeigten (Babu et al. 2009; Babu und Nutman 2012; Katawa et al. 2015). Weitere Analysen sind nötig, um das Immunprofil von *M. perstans* infizierten Personen zu entschlüsseln. Allerdings zeigte sich in einer anderen Studie unserer Gruppe an *O. volvulus* ebenfalls eine unterschiedliche Reaktion im Vergleich von systemischer Immunantwort und Restimulation. In dieser Studie waren die Werte des systemischen IL-5 bei Infizierten signifikant höher als bei Nicht-Infizierten. Bei der Restimulation von isolierten PBMC mit *O. volvulus* Antigen zeigte sich das gegensätzliche Bild (Arndts et al. 2014). Die konträren Ergebnisse könnten die Fähigkeit der adulten Würmer widerspiegeln, das Wirtsimmunsystem zu regulieren. Eine andere Erklärung könnte die Entwicklung von *M. perstans* Würmern *in vitro* sein. Eventuell haben sich die Würmer anders entwickelt, da sie nicht im Wirtsmilieu wuchsen, welches einen protektiven oder immunregulierenden Einfluss gehabt hätte. Daher sind die Immunantworten der *in vitro* gezüchteten Würmer stärker. Diese Ergebnisse zeigen, dass noch weitere Studien durchgeführt werden müssen, um die Unterschiede zwischen systemischen Zytokinleveln und Restimulation zu zeigen.

Bei parasitären Infektionen wie der lymphatischen Filariose spielen insbesondere IgE und IgG4 eine wichtige Rolle. Gerade bei asymptomatischen Patienten mit hoher  $Mf$  Anzahl im Blut zeigen sich erhöhte spezifische IgG4 Werte und erniedrigtes IgE (Maizels et al. 1995). Unkontrollierte Entzündungsreaktionen zeigen eher eine  $T_H1$  Immunantwort

und niedrige Level an IgG4, aber hohe IgE Werte, diese finden sich bei Patienten mit ausgeprägten Klinik (Maizels und Yazdanbakhsh 2003). In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass spezifisches IgG4 mit einer patenten Infektion von *M. perstans* assoziiert ist. Auch andere Studien bestätigen, dass erhöhtes IgG4 bei der Immunantwort in *W. bancrofti* und *O. volvulus* Infektionen gemessen wurde (Kurniawan et al. 1993; Arndts et al. 2012; Arndts et al. 2014). Die erhöhten Spiegel an totalem IgE und IgG4 in *M. perstans* Mf<sup>+</sup> Patienten im Gegensatz zu den Mf<sup>-</sup> Patienten unterstützen die aktuelle Studie in Gabun, in der totales IgE ebenfalls erhöht gemessen wurde (Bouyou-Akotet et al. 2014). Obwohl sich erniedrigte *M. perstans* spezifische IgE Level fanden, komplementiert dies nur das systemische Immunprofil von *M. perstans*, welches zeigt, wie gut *M. perstans* das Wirtsimmunsystem regulieren und diesem ausweichen kann. Wegen der geringen Mengen an *M. perstans* Extrakt wurden nur die Konzentrationen an IgE und IgG4 analysiert. Weitere Studien könnten Erkenntnisse über andere Immunglobuline und Subtypen bringen. Außerdem sollte in weiteren Studien die Kreuzreaktivität von *M. perstans* Antigen mit anderen Filarienantigenen untersucht werden. In laufenden Analysen wurde bei *O. volvulus* infizierten Patienten nur eine geringfügige Änderung der Immunantwort gezeigt, wenn spezifisches *O. volvulus* Antigen hinzugefügt wurde (Arndts et al. 2014).

Bisher basierten die Erkenntnisse einer *M. perstans* Infektion auf Studien mit Patienten die mit anderen Parasiten, wie *O. volvulus*, *W. bancrofti*, *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Schistosoma mansoni/haematobium* koinfiziert waren (Soboslay et al. 2006; Metenou et al. 2009; Semnani et al. 2010; Dolo et al. 2012; Lechner et al. 2013). Durch die neue Möglichkeit adulte *M. perstans* Würmer *in vitro* zu züchten und daraus Ag herzustellen, konnten erste Schritte zur Erstellung eines Immunprofils von *M. perstans* erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Serumzytokine und Chemokine mit Ausnahme von MIP-1 $\beta$  und IL-10 in *M. perstans* infizierten Individuen erniedrigt waren. Die Kultivierung peripherer Blutzellen zeigte dagegen erhöhte Level für IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13 und IL-17A und außerdem noch antigen-spezifische IgG4 Werte für *M. perstans*. Ein weiterer Fokus für zukünftige Forschung wäre die Etablierung eines Mausmodells für *M. perstans* um eine Analyse auch bezüglich der pathologischen Veränderungen *in vivo* zu erreichen.



#### 4.2 *L. sigmodontis* Infektion als Mausmodell für lymphatische Filariose und Mansonellose

Es war möglich, systemische Immunantworten während einer Monoinfektion mit *M. perstans* zu untersuchen. Ein großes Hindernis bei der Untersuchung von *M. perstans* spezifischen Immunantworten ist das Fehlen von *Mansonella* Antigenen, da die Würmer sich in der Pleurahöhle aufhalten und dadurch nur schwer zu gewinnen sind. Daher ist es auch kaum möglich, den Infektionsverlauf und die Pathologie einer *M. perstans* Infektion *in vivo* zu untersuchen. Bislang gibt es noch kein Mausmodell um die Infektion *in vivo* zu verfolgen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit ging es um die Pathologieentwicklung während einer parasitären Infektion. Um solche Analysen durchzuführen gibt es für die lymphatische Filariose ein gut etabliertes Mausmodell. Das *Litomosoides sigmodontis* Mausmodell bietet sich für weitere Untersuchungen an, da auch hier, wie bei *M. perstans* Infektionen, die Entwicklung und Entzündungsreaktion in der Pleurahöhle stattfinden (Simonsen et al. 2011; Hoerauf 2009). Die patente Infektion in BALB/c Mäusen ermöglicht die Erstellung einer Infektionskinetik (Lawrence 1996; Hoffmann et al. 2000; Lawrence und Devaney 2001). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-4 defiziente C57BL/6 Mäuse eine patente Infektion entwickeln und eine ähnliche Anzahl an Mf und Würmern wie infizierte BALB/c Mäuse entwickeln. IL-4 scheint daher eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Parasiten zu spielen. Zusammen mit IL-5 sind die Zytokine für die Eliminierung der Würmer und der L3 Larven verantwortlich (Le Goff et al. 2000).

Während der Infektion kommt es oft zu Granulombildung (Attout et al. 2008). IL-13 stellt ein wichtiges Zytokin bei dieser Pathologie dar. Es induziert die Bildung der Granulome, außerdem wird es über einen Feedbackmechanismus reguliert. Dies stellt eine Regulation innerhalb der  $T_H2$  Antwort dar. Bei der induzierten  $T_H2$  Antwort finden sich oft hohe Werte von IL-10, die während der Infektion aufrecht erhalten werden. Diese hohen Level haben eine umgekehrte Korrelation mit der spezifischen T-Zell Proliferation. IL-10 inhibiert die B-Zellen in ihrem Klassenwechsel zu IgE und fördert den Wechsel zu IgG4 (Maizels und Yazdanbakhsh 2003).

#### 4.2.1 Pathologie und Immunantwort

Obwohl in Erwägung gezogen wird, dass immunologische Dysregulation und genetische Komponenten eine wichtige Rolle während der Filarieninfektion spielen, ist die Pathologie immer noch nicht vollends geklärt (Babu et al. 2005; Babu und Nutman 2012; Babu und Nutman 2014). Um wichtige Komponenten für die filarien-induzierte Pathologie und Immunantwort zu finden, wurden zunächst BALB/c Wildtypen mit *L. sigmodontis* infiziert, um die Inflammation und Immunmodulation am Infektionsort, der Pleurahöhle, zu untersuchen. Es zeigte sich, dass das Lungengewebe während der Infektion (bis Tag 72) frei von histologisch sichtbarer Pathologie war. Dies zeigt eine streng regulierte und kontrollierte Inflammation. Einzig am Gewebe direkt am Pleuraspalt fanden sich Entzündungsreaktionen ab dem Zeitpunkt der endgültigen Entwicklung der Larven in adulte Würmer (Tag 30). Dies lässt vermuten, dass es zu einer Umschwung in der Immunantwort gegen den Parasiten kommt, sobald sich adulte Würmer entwickelt haben. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die Immuzellinfiltration und daraus entstehende Entzündungsreaktionen sowie die Pathologieentwicklung zwischen Lunge und Diaphragma eintreten, sobald adulte Würmer den Pleuraspalt erreichen. Die infiltrierenden Zellen im Pleuraspalt, bestehen aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und sporadisch auftretenden mehrkernigen Riesenzellen. Es wurde vor Kurzem gezeigt, dass diese Zellen Bestandteil von Granulomen um adulte Würmer sind (Attout et al. 2008). In einer Studie wurde die Beziehung zwischen Leukozyten, Filarien und der Entwicklung von Granulomen untersucht und zwei verschiedene Arten von Granulomen in infizierten Mäusen beschrieben (Attout et al. 2008). Frühe Granulome bilden sich im ersten Monat nach der Infektion und bestehen hauptsächlich aus Leukozyten und eosinophilen Granulozyten. Spätere Granulome dagegen enthalten viel mehr Leukozyten und neutrophile Granulozyten (Attout et al. 2008; Al-Qaoud 2000; Volkmann et al. 2003). Weitere Studien sollten sich mit der Zellzusammensetzung am Geweberand der Pleurahöhle beschäftigen, um herauszufinden, ob sich auch hier die infiltrierenden Zellen im Laufe der Infektion verändern und ob sie den Zellveränderungen bei Granulombildung ähneln. Riesenzellen entstehen durch Zell-Zell Fusion aus Makrophagen, die durch verschiedene Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, und GM-CSF) induziert wird und finden sich besonders dort, wo große Fremdkörper oder schwer abbaubares Material zu finden ist (Helming und Gordon 2009). Riesenzellen sind in der

Lage, vermehrt Zytokine zur Modulation der Immunantwort zu produzieren (Hernandez-Pando et al. 2000). Sie entstehen oft in Verbindung mit granulomatösen Erkrankungen (z. B. Tuberkulose), finden sich allerdings auch bei anderen chronischen Entzündungen (Sakai et al. 2012; Kumar et al. 2013). In Bezug auf Filarieninfektionen gibt es auch einzelne Studien, die Riesenzellen erwähnen. In einer Studie von Case et al. (mit *Brugia malayi* infizierten Frettchen) zeigten sich Granulome aus Eosinophilen, Epitheloidzellen und Riesenzellen um die Wurmfragmente in verschiedenen Stadien (Case et al. 1991). In *Brugia malayi* infizierten Nacktmäusen (<200 Tage nach Infektion) zeigte sich, dass lymphozytäre Thromben-/Granulombildung mit der Wurmeradikation einhergeht und Makrophagen, Langerhans Riesenzellen und Eosinophile in diesen Prozess involviert waren. Diese unterschiedliche Zellzusammensetzung legt nahe, dass verschiedene Mechanismen eine Rolle bei der Entstehung von Elephantiasis spielen, je nach Entwicklungsstatus der Filarie (Vickery et al. 1991).

#### 4.2.2 Die Rolle der T<sub>regs</sub>

Es ist bekannt, dass T<sub>regs</sub> eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Pathologie während einer *L. sigmodontis* Infektion spielen (Dittrich et al. 2008; Taylor et al. 2009; Hubner et al. 2009). Sie stellen eine Subpopulation der T-Zellen dar, die in der Lage sind das Immunsystem zu modulieren. Sie wirken immunsuppressiv und spielen eine wichtige Rolle in der Toleranz von körpereigenen Antigenen und im Kontext von Autoimmunerkrankheiten (Bettelli et al. 2006). Allerdings scheint ihnen auch eine große Rolle in der Immunmodulation während einer parasitären Infektion zu zukommen. Sie produzieren anti-inflammatorische Zytokine (IL-10 und TGF- $\beta$ ), welche die Entzündungsreaktion und die protektive Immunantwort herunter regulieren (Maizels et al. 2004). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Infektionskinetik bei Dereg (Depletion of regulatory T cells) Mäusen, um einen Vergleich zu der Situation in BALB/c Wildtyp Mäusen zu bekommen. Die Depletion der T<sub>regs</sub> erfolgte an Tag 29/30 mit dem Diphtherietoxin. Diese Depletion hält ca. 6-7 Tage an, bevor neue T<sub>regs</sub> gebildet werden (Lahl et al. 2007; Christiaansen et al. 2014) Neben der Möglichkeit die T<sub>regs</sub> zu depletieren, kann auch eine Blockierung über Antikörper erfolgen. Taylor et al. (2007), die eine Depletion mit anti-CD25-Ak und anti-GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene*) er-

reichten, konnten einen Effekt zeigen (Christiaansen et al. 2014). Der Vorteil einer Depletion ist allerdings, dass der Effekt länger anhält und daher nicht täglich, wie die Ak, angewendet werden muss. Außerdem findet sich CD 25 noch auf anderen T-Zell-Populationen, womit eine spezifische Depletion nicht möglich und somit das Dereg Mausmodell das Mittel der Wahl ist. Zusätzlich besteht bei der Anwendung von Ak die Gefahr, dass sie unspezifisch binden oder durch andere Faktoren abgefangen werden. Die Depletion mit den Antikörpern an Tag 27 induziert eine verstärkte Abwehr der Würmer (Taylor et al. 2005a). In unseren Experimenten konnten wir keinen Einfluss der  $T_{regs}$  auf die Pathologie feststellen. Unter der Depletion der  $T_{regs}$  zeigte sich ebenfalls ab Tag 30 eine Entzündungsreaktion zwischen Lunge und Diaphragma, die sich im Laufe der Infektion im Pleuraspalt ausbreitete. Allerdings ist zu bedenken, dass nur eine DT Gabe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 29/30) erfolgte und die Depletion nur für 6-7 Tage anhält (Christiaansen et al. 2014). Daher könnte der Einfluss auf die Entwicklung der Pathologie zu kurz gewesen sein, um einen Effekt zu zeigen. Es lässt sich nur zeigen, dass die Depletion an Tag 29/30, also zu dem Zeitpunkt, an dem sich die L4 Larve zum adulten Wurm entwickelt, keinen Einfluss auf die Entwicklung hat und es auch zu keiner verstärkten Entzündungsreaktion kommt. Um genauere Aussagen bezüglich der  $T_{regs}$  auf die Pathologie zu treffen, sollten zukünftige Experimente mit mehreren Depletionen durchgeführt werden. Die Bestimmung der Zytokine in der Pleuraflüssigkeit brachte keine messbaren Ergebnisse. Ein anderer Versuch wäre die Bestimmung der Zytokine in der Pleuraflüssigkeit mittels PCR. Dies war im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht möglich. Ein weiterer Ansatz wäre die Restimulation der thorakalen und pulmonalen Lymphknoten durch LsAg, um dann die Zytokin- und Chemokinlevel zu messen (Taylor et al. 2005a).

#### 4.2.3 Die Rolle des IL-4/IL-5 Signalwegs während der *L. sigmodontis* Infektion

Bei der Depletion von  $T_{regs}$  wurden keine Unterschiede in der histologischen Analyse bezüglich der Pathologie im Vergleich zu den Wildtypmäusen gefunden. Eine Depletion (Tag 29/30) scheint also einen geringen Einfluss auf die Entwicklung der Pathologie an den folgenden Tagen zu haben. Einige Studien haben gezeigt, dass die patente Infektion in BALB/c IL-5<sup>-/-</sup> Mäusen höher ist (Saefel et al. 2003) und IL-5 einen Einfluss auf die

Wurm- bzw. Mikrofilarienanzahl hat (Al-Qaoud 2000; Volkmann et al. 2003). Zusätzlich ist bekannt, dass IL-4 eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Mf ins Blut spielt (Volkmann et al. 2003; Le Goff et al. 2002). Bisher wurden noch keine Analysen bei double knock-out ( $4R\alpha/IL-5^{-/-}$ ) Mäusen gezeigt.

Im  $IL-4R\alpha/IL-5^{-/-}$  BALB/c Mausstamm zeigte sich eine wesentlich stärkere Immunreaktion. Im Vergleich zum Wildtyp BALB/c Stamm zeigte sich eine Inflammation über das gesamte Gewebe (Inflammationsskala 4, siehe Tab. 3). Dies bestätigt vorherige Ergebnisse, dass die  $T_H2$ -Zytokine für die Modulierung der Immunantwort wichtig sind und sowohl den Wirt als auch den Wurm schützen. Bei den  $IL-4R\alpha/IL-5^{-/-}$  BALB/c Mäusen wurden hohe Mf Anzahlen gezählt und auch die Wurmanzahl war deutlich höher. Wie zu erwarten war die Anzahl an Eosinophilen, und somit auch der Messwert an Eotaxin in der Pleuraflüssigkeit deutlich erniedrigt an Tag 72 nach Infektion. Allerdings war die Anzahl an Neutrophilen erhöht, was vorherige Studien bestätigt die zeigten dass Granulome in späteren Stadien hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten in BALB/c Mäusen bestehen (Al-Qaoud 2000; Volkmann et al. 2003; Attout et al. 2008). Verschiedene Chemokine, wie IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 und RANTES waren signifikant erhöht in  $4R\alpha/IL-5^{-/-}$  Mäusen. Dies bestätigt Studien, in denen gezeigt wurde, dass ein Chemokingradient nötig ist, um die Immunzellen zum Ort der Infektion zu rekrutieren (Al-Qaoud 2000; Hall et al. 2001; Hise et al. 2004; Babu et al. 2005). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass diese Chemokine eine wichtige Rolle in Filarieninfektionen spielen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass MIP-1 Level in okkulten *Onchocerca volvulus* Infektionen erhöht sind (Lechner et al. 2012). Bei Restimulationsexperimenten von peripheren Blutzellen von *O. volvulus*-infizierten Kindern konnten erhöhte MIP-1 $\alpha$  Werte gemessen werden (Kocherscheidt et al. 2010). MIP-1 $\alpha$  scheint eine Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen *in vitro* (Zhang et al. 1999) und *in vivo* (Lee et al. 2000) zu spielen. Dies lässt vermuten, dass erhöhte MIP-1 Chemokine die Infiltration der Pleurahöhle für Neutrophile erleichtert und somit zur Pathologieentwicklung in  $4R\alpha/IL-5^{-/-}$  Mäusen beiträgt.

In nicht infizierten BALB/c Mäusen finden sich nur wenige Immunzellen, während sich in infizierten Tieren eine große Anzahl verschiedener Immunzellen findet. In der Initialphase zählen dazu T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Eosinophile während der ersten 30 Tagen der Infektion (Al-Qaoud et al. 1997; Martin et al. 2000; Le Goff et al. 2002; Volkmann et al. 2003; Saefel et al. 2003; Babayan et al. 2003). Im späteren Stadium

breiten sich die Immunzellen weiter aus und gerade die CD4<sup>+</sup> T-Zellen sorgen für eine starke T<sub>H</sub>2-Antwort (IL-4, IL-5 und IL-13) und Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> exprimieren GITR, CD25 und CTLA-4 (zytotoxisches T-lymphozyten assoziiertes Protein 4) (van der Werf et al. 2011; Taylor et al. 2012; Rodrigo et al. 2016). Tatsächlich führt eine Blockierung von GITR *in vivo* während einer Infektion zu einer gesteigerten IL-4 Sekretion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ohne Einfluss auf die Wurmanzahl oder Mf Anzahl zu haben. Das Immunprofil in infizierten BALB/c Mäusen ändert sich ebenfalls ab Tag 49 nach der Infektion (Zeitpunkt der Mf Freisetzung ins Blut) in Richtung des Profils einer latenten Infektion: eine reduzierte T<sub>H</sub>2 Antwort (IL-13 und IL-5) in der Pleuraflüssigkeit von Mf<sup>-</sup> Mäusen (Rodrigo et al. 2016). Auch isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Milz) von Mf<sup>-</sup> Mäusen zeigten eine reduzierte Immunantwort (TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-10, IL-5) nach Restimulierung *ex vivo* mit Wurmextrakt (Rodrigo et al. 2016). Trotz der gesteigerten Inflammation gelang es nicht erhöhte Zytokinexpression in den Gewebeproben zu detektieren. Da sich die Entzündungsreaktion nur am Rand des Gewebes zeigt, sollten weitere Gewebestücke für die Zytokinanalyse gewonnen werden, die näher am Infektionsort, also am Pleuraspalt liegen, statt von der Lungenspitze.

Es sind noch weitere Untersuchungen an verschiedenen Mausstämmen nötig um den genauen Einfluss von Zytokinen oder Depletionen auf die Entwicklung der Pathologie im Mausmodell zu erforschen. Mit dem etablierten Inflammationsscore wurde eine gute Methode entwickelt, um verschiedene Stadien der Entzündung im histologischen Material zu vergleichen und somit eine Grundlage für weitere Experimente geschaffen.

## 5. Zusammenfassung

Über 120 Millionen Menschen leiden unter einer Infektion mit Filarien, wie lymphatischer Filariose (Elephantiasis), Onchozerkose (Flussblindheit) und Loiasis. Diese Krankheiten stellen unter den „Neglected Tropical Diseases“ die verheerendsten Krankheiten in Bezug auf den sozialen und den ökonomischen Einfluss dar. Viele der Mechanismen der Wirtsimmunität und mit der Krankheit korrelierende Symptome sind bis heute nicht verstanden. Um Impfungen und Therapieoptionen zu entwickeln und zu verbessern sind weitere Studien von großem Interesse, die die Modulationsmechanismen und die Pathologie hinter den Filarieninfektionen erklären. Ein besonderes Interesse gilt in dieser Arbeit der Filarie *Mansonella perstans* (*M. perstans*), die in Afrika, Nord- und Südamerika sowie in der Karibik endemisch ist. Es ist nicht möglich, die Würmer *in vivo* aus den Patienten zu gewinnen, da sie sich in der Pleurahöhle befinden. Aufgrund dieser Limitierung fanden bis heute kaum Forschungen mit ihnen statt. Im Rahmen des DFG geförderten MaP2Co Projekts wurden humane Proben von Mikrofilarien positiver (Mf+) und Mikrofilarien negativer (Mf-) Patienten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, um eine spezifische qPCR zu entwickeln. Die qPCR sollte zur Methode der ersten Wahl werden, um den Parasiten gezielt zu detektieren und um Einflüsse von *M. perstans* auf das Wirtsimmunsystem zu analysieren. *M. perstans* verursacht nur in seltenen Fällen eine starke Pathologie. Allerdings ist genau diese Tatsache von großer Bedeutung, da der Wurm das Immunsystem anscheinend so gut moduliert, dass er ungestört überleben kann. Die Analyse dieser Fähigkeit könnte Aufschlüsse über neue Mechanismen geben und die Therapieoptionen von Wurminfektionen entscheidend verbessern. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine spezifische qPCR für die Detektion von *M. perstans* zu entwickeln. Es sind nur geringe Mengen von Patientenmaterial nötig und gleichzeitig weist die qPCR eine hohe Sensitivität auf. Dies stellt einen großen Schritt hin zu einer molekularen Methode zur Diagnostik von *M. perstans* infizierten Individuen dar. Auf lange Sicht gesehen wäre es möglich, die mikroskopische Diagnostik zu ersetzen. Desweiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit mithilfe von *M. perstans* Antigen einzelne Serumproben von Patienten hinsichtlich ihres Immunprofils analysiert. Dies stellt einen wichtigen Schritt zur Erforschung des spezifischen Immunprofils von *M. perstans* dar.

Im zweiten Teil der Arbeit rückte die Pathologie während einer Wurminfektion in den Fokus. *Litomosoides sigmodontis* (*L. sigmodontis*) ist ein etabliertes Mausmodell für die lymphatische Filariose, da sich der Parasit bis zu einer patenten Infektion (Freisetzung von Mikrofilarien, Entwicklung zu infektiösen Larven, Anreicherung in der Peripherie) entwickeln kann. Im Rahmen von Infektionsexperimenten ist es so möglich, die pathologischen Veränderungen an der Lunge und an dem Diaphragma zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zu analysieren und so die Entwicklung der Pathologie zu beobachten. In unseren Experimenten zeigte sich, dass 30 Tage nach der Infektion von BALB/c Mäusen eine Entzündungsreaktion und Pathologieentwicklung in der Pleurahöhle stattfindet. Mithilfe verschiedener Mausstämme (Depletion von  $T_{reg}$ s, IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  double Knockout Mäuse) konnten zum Teil eindeutige Unterschiede in der Entwicklung der Pathologie gefunden werden. Im IL-4R $\alpha$ /IL-5 $^{-/-}$  BALB/c Mausstamm zeigte sich eine wesentlich stärkere Immunreaktion. Im Vergleich zum Wildtyp BALB/c Stamm zeigte sich eine Inflammation über das gesamte Gewebe der Lunge und des Diaphragmas mit massiver Infiltration von Immunzellen sowie eine höhere Wurmlast. Korrespondierend mit dieser starken Entzündungsreaktion konnten signifikant höhere Levels von IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 and RANTES in der Pleuraflüssigkeit gemessen werden.



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die angeborenen Immunzellen.	13
Abbildung 2: Die Entwicklung der erworbenen Immunzellen.	14
Abbildung 3: Übersicht über humanpathogene Parasiten.	17
Abbildung 4: Krankheiten ausgelöst durch verschiedene Filarien.	19
Abbildung 5: Der Lebenszyklus von <i>Mansonella perstans</i> .	22
Abbildung 6: Der Lebenszyklus von <i>L. sigmodontis</i> .	26
Abbildung 7: Experimenteller Versuchsablauf für die BALB/c Wildtyp IL-4/5 dko und Dereg Mäuse.	50
Abbildung 8: Entwicklungsstadien von <i>L. sigmodontis</i> .	52
Abbildung 9: Detektionslimit und Standardkurve der <i>M. perstans</i> ITS1 qPCR.	59
Abbildung 10: Inhibitionskontrolle im HEX Kanal.	60
Abbildung 11: Die Ct Werte im Vergleich von 1000 Mf von <i>W. bancrofti</i> und <i>M. perstans</i> .	63
Abbildung 12: Reduzierte systemische Zytokinlevel in <i>M. perstans</i> Mf+ Probanden.	66
Abbildung 13: Erhöhte MIP-1 $\beta$ Konzentrationen in <i>M. perstans</i> (Mf+) Patienten	68
Abbildung 14: <i>M. perstans</i> Mf <sup>+</sup> Probanden zeigten erhöhte Spiegel an spezifischem IgG4 im Serum.	69
Abbildung 15: Histologische Parameter von <i>L. sigmodontis</i> -infizierten BALB/c Mäusen.	71
Abbildung 16: Prozentualer Anteil von Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion.	72
Abbildung 17: Das Immunprofil in der Pleuraflüssigkeit während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion.	73
Abbildung 18: Die beteiligten Chemokine während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der BALB/c Maus.	74
Abbildung 19: Immuninfiltration im Pleuraspalt bei einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der BALB/c Maus.	76

Abbildung 20: Immunzellen bei einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der BALB/c Maus.	77
Abbildung 21: Das Zytokinprofil im Gewebe der Lunge und des Diaphragmas während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion.	78
Abbildung 22: Die beteiligten Zytokine während einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion im Dereg Mausmodell.	80
Abbildung 23: Die Entzündungsreaktion im Pleuraspalt bei einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion in der Dereg Maus.	82
Abbildung 24: <i>L. sigmodontis</i> infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse weisen eine erhöhte Wurmlast und Mf Anzahl auf.	84
Abbildung 25: <i>L. sigmodontis</i> infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäuse weisen keinen Unterschied in den Zytokinpiegeln auf.	85
Abbildung 26: Mit <i>L. sigmodontis</i> infizierte IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> (dKO) BALB/c Mäuse zeigen erhöhte Chemokinlevel.	87
Abbildung 27: Gesteigerte Entzündungsreaktion im Pleuraspalt, in der Lunge und im Diaphragma in <i>L. sigmodontis</i> infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> Mäusen.	88
Abbildung 28: Gesteigerte Entzündungsreaktion im Pleuraspalt, in der Lunge und im Diaphragma in <i>L. sigmodontis</i> infizierten IL-4R $\alpha$ /IL-5 <sup>-/-</sup> Mäusen.	89

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>M. perstans</i> Plasmidverdünnungsreihe zur Etablierung einer Standardkurve.	44
Tabelle 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) für die histologische Differenzierung.	54
Tabelle 3: Inflammationsskala einer <i>L. sigmodontis</i> Infektion von Lunge und Diaphragma.	56
Tabelle 4: Ergebnisse der duplex PCR von mikroskopisch identifizierten <i>M. perstans</i> Patientenproben.	61
Tabelle 5: Ergebnisse der <i>M. perstans</i> ITS 1 Real-time PCR für <i>W. bancrofti</i> Mf.	62
Tabelle 6: Die Ergebnisse der <i>M. perstans</i> ITS 1 real-time PCR mit einer Annealingtemperatur von 62 °C von <i>W. bancrofti</i> Mf.	64
Tabelle 7: Die Validierung der Annealingtemperatur von 62 °C für die <i>M. perstans</i> ITS 1 Real-time PCR für <i>W. bancrofti</i> positives Blut (A) und <i>M. perstans</i> positive Blutsedimente (B).	65
Tabelle 8: Probandendaten der Proben für die Etablierung der qPCR.	65

## 8. Literaturverzeichnis

Adjobimey, T.; Hoerauf, A. (2010): Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. In: *Annals of tropical medicine and parasitology* 104 (6), S. 455–464. DOI: 10.1179/136485910X12786389891407

Adolph, P. E.; Kagan, I. G.; McQuay, R. M. (1962): Diagnosis and treatment of *Acanthocheilonema perstans* filariasis. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 11, S. 76–88

Agbolade, Olufemi Moses; Akinboye, Dora Olufunmilola; Olateju, Taiwo Monroof; Ayanbiyi, Oluwatoyin Adepeju; Kuloyo, Olukayode Olakunle; Fenuga, Oluwalolami Oluwaseun (2006): Biting of anthropophilic *Culicoides fulvithorax* (Diptera: Ceratopogonidae), a vector of *Mansonella perstans* in Nigeria. In: *The Korean journal of parasitology* 44, S. 67–72

Albers, Anna; Sartono, Erliyani; Wahyuni, Sitti; Yazdanbakhsh, Maria; Maizels, Rick M.; Klarmann-Schulz, Ute et al. (2014): Real-time PCR detection of the Hhal tandem DNA repeat in pre- and post-patent *Brugia malayi* Infections: a study in Indonesian transmigrants. In: *Parasites & vectors* 7, S. 146. DOI: 10.1186/1756-3305-7-146

Al-Qaoud, K. M. (2000): A new mechanism for IL-5-dependent helminth control. Neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. In: *International Immunology* 12, S. 899–908. DOI: 10.1093/intimm/12.6.899

Al-Qaoud, K. M.; Taubert, A.; Zahner, H.; Fleischer, B.; Hoerauf, A. (1997): Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*: role of CD4+ T cells in controlling larval development. In: *Infection and immunity* 65, S. 2457–2461

Araujo, A. C.; Figueredo-Silva, J.; Souto-Padron, T.; Dreyer, G.; Noroes, J.; Souza, W. de (1995): Scanning electron microscopy of adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). In: *The Journal of parasitology* 81, S. 468–474

Arndts, Kathrin; Deininger, Susanne; Specht, Sabine; Klarmann, Ute; Mand, Sabine; Adjobimey, Tomabu et al. (2012): Elevated adaptive immune responses are associated with latent infections of *Wuchereria bancrofti*. In: *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1611. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001611

Arndts, Kathrin; Klarmann-Schulz, Ute; Batsa, Linda; Debrah, Alexander Y.; Epp, Christian; Fimmers, Rolf et al. (2015): Reductions in microfilaridemia by repeated ivermectin treatment are associated with lower *Plasmodium*-specific Th17 immune responses in *Onchocerca volvulus*-infected individuals. In: *Parasites & vectors* 8, S. 184. DOI: 10.1186/s13071-015-0786-5

Arndts, Kathrin; Specht, Sabine; Debrah, Alexander Y.; Tamarozzi, Francesca; Klarmann Schulz, Ute; Mand, Sabine et al. (2014): Immunoepidemiological profiling of onchocerciasis patients reveals associations with microfilaria loads and ivermectin intake on both individual and community levels. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2679. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002679

Attout, Tarik; Martin, Coralie; Babayan, Simon A.; Kozek, Wieslaw J.; Bazzocchi, Chiara; Oudet, Francois et al. (2008): Pleural cellular reaction to the filarial infection *Litomosoides sigmodontis* is determined by the moulting process, the worm alteration, and the host strain. In: *Parasitology international* 57, S. 201–211. DOI: 10.1016/j.parint.2008.01.001

Babayan, Simon; Ungeheuer, Marie-Noelle; Martin, Coralie; Attout, Tarik; Belnoue, Elodie; Snounou, Georges et al. (2003): Resistance and susceptibility to filarial infection with *Litomosoides sigmodontis* are associated with early differences in parasite development and in localized immune reactions. In: *Infection and immunity* 71, S. 6820–6829

Babu, S.; Blauvelt, C. P.; Kumaraswami, V.; Nutman, T. B. (2006): Cutting Edge. Diminished T Cell TLR Expression and Function Modulates the Immune Response in Human Filarial Infection. In: *The Journal of Immunology* 176, S. 3885–3889. DOI: 10.4049/jimmunol.176.7.3885

Babu, S.; Ganley, L. M.; Klei, T. R.; Shultz, L. D.; Rajan, T. V. (2000): Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*. In: *Infection and immunity* 68, S. 3034–3035

Babu, S.; Nutman, T. B. (2014): Immunology of lymphatic filariasis. In: *Parasite immunology* 36, S. 338–346. DOI: 10.1111/pim.12081

Babu, Subash; Bhat, Sajid Q.; Pavan Kumar, N.; Lipira, Angelo B.; Kumar, Sanath; Karthik, C. et al. (2009): Filarial lymphedema is characterized by antigen-specific Th1 and th17 proinflammatory responses and a lack of regulatory T cells. In: *PLoS neglected tropical diseases* 3, e420. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000420

Babu, Subash; Blauvelt, Carla P.; Kumaraswami, V.; Nutman, Thomas B. (2005): Diminished expression and function of TLR in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, S. 1170–1176

Babu, Subash; Nutman, Thomas B. (2012): Immunopathogenesis of lymphatic filarial disease. In: *Seminars in immunopathology* 34, S. 847–861. DOI: 10.1007/s00281-012-0346-4

Betelli, Estelle; Carrier, Yijun; Gao, Wenda; Korn, Thomas; Strom, Terry B.; Oukka, Mohamed et al. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. In: *Nature* 441, S. 235–238. DOI: 10.1038/nature04753

Bettelli, Estelle; Korn, Thomas; Oukka, Mohamed; Kuchroo, Vijay K. (2008): Induction and effector functions of T(H)17 cells. In: *Nature* 453, S. 1051–1057. DOI: 10.1038/nature07036

Bouyou-Akotet, M. K.; Moussavou Boussougou, M. N.; Ovono-Abessolo, F.; Owono-Medang, M.; Kombila, M. (2014): Influence of *Mansonella perstans* microfilaraemia on total IgE levels in Gabonese patients co-infected with *Loa loa*. In: *Acta tropica*, S. 11–15. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.11.012

Brown, Michael; Kizza, Moses; Watera, Christine; Quigley, Maria A.; Rowland, Samantha; Hughes, Peter et al. (2004): Helminth infection is not associated with faster progression of HIV disease in coinfecting adults in Uganda. In: *The Journal of infectious diseases* 190, S. 1869–1879. DOI: 10.1086/425042

Brown, Michael; Miiro, George; Nkurunziza, Peter; Watera, Christine; Quigley, Maria A.; Dunne, David W. et al. (2006): *Schistosoma mansoni*, nematode infections, and progression to active tuberculosis among HIV-1-infected Ugandans. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 74, S. 819–825

Buttner, Dietrich W.; Wanji, Samuel; Bazzocchi, Chiara; Bain, Odile; Fischer, Peter (2003): Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa loa*. In: *Filaria journal* 2, S. 10. DOI: 10.1186/1475-2883-2-10

Bystry, R. S.; Aluvihare, V.; Welch, K. A.; Kallikourdis, M.; Betz, A. G. (2001): B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. In: *Nature immunology* 2, S. 1126–1132. DOI: 10.1038/ni735

Case, T.; Leis, B.; Witte, M.; Way, D.; Bernas, M.; Borgs, P. et al. (1991): Vascular abnormalities in experimental and human lymphatic filariasis. In: *Lymphology* 24, S. 174–183

Christiaansen, Allison F.; Boggiatto, Paola M.; Varga, Steven M. (2014): Limitations of Foxp3(+) Treg depletion following viral infection in DEREK mice. In: *Journal of immunological methods* 406, S. 58–65. DOI: 10.1016/j.jim.2014.03.005

Clarke, V. de V.; Harwin, R. M.; MacDonald, D. F.; Green, C. A.; Rittey, D. A. (1971): Filariasis: *Dipetalonema perstans* infections in Rhodesia. In: *The Central African journal of medicine* 17, S. 1–11

Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S. K.; Gallo, R. C.; Lusso, P. (1995): Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 270, S. 1811–1815

Combes, Claude (2001): Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. Chicago u.a.: University of Chicago Press (Interspecific interactions)

Coulibaly, Yaya I.; Dembele, Benoit; Diallo, Abdallah A.; Lipner, Ettie M.; Doumbia, Salif S.; Coulibaly, Siaka Y. et al. (2009): A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. In: *The New England journal of medicine* 361, S. 1448–1458. DOI: 10.1056/NEJMoa0900863

Denham, D. A.; McGreevy, P. B.; Suswillo, R. R.; Rogers, Rosemary (1983): The resistance to re-infection of cats repeatedly inoculated with infective larvae of *Brugia pahangi*. In: *Parasitology* 86, S. 11. DOI: 10.1017/S0031182000057127

Diagne, M.; Petit, G.; Liot, P.; Cabaret, J.; Bain, O. (1990): The filaria *Litomosoides galizai* in mites; microfilarial distribution in the host and regulation of the transmission. In: *Annales de parasitologie humaine et comparee* 65, S. 193–199

Diaz, Alvaro; Allen, Judith E. (2007): Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. In: *European journal of immunology* 37, S. 3319–3326. DOI: 10.1002/eji.200737765



Dittrich, Anna M.; Erbacher, Annika; Specht, Sabine; Diesner, Felix; Krokowski, Martin; Avagyan, Angela et al. (2008): Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, S. 1792–1799

Dolo, Housseini; Coulibaly, Yaya I.; Dembele, Benoit; Konate, Siaka; Coulibaly, Siaka Y.; Doumbia, Salif S. et al. (2012): Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults. In: *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1890. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001890

Drame, Papa M.; Montavon, Celine; Pion, Sebastien D.; Kubofcik, Joseph; Fay, Michael P.; Nutman, Thomas B. (2016): Molecular Epidemiology of Blood-Borne Human Parasites in a Loa loa-, *Mansonella perstans*-, and *Plasmodium falciparum*-Endemic Region of Cameroon. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 94, S. 1301–1308. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0746

Elliott, Alison M.; Mawa, Patrice A.; Webb, Emily L.; Nampijja, Margaret; Lyadda, Nancy; Bukusuba, Joseph et al. (2010): Effects of maternal and infant co-infections, and of maternal immunisation, on the infant response to BCG and tetanus immunisation. In: *Vaccine* 29, S. 247–255. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.10.047

Fendt, J.; Hamm, D. M.; Banla, M.; Schulz-Key, H.; Wolf, H.; Helling-Giese, G. et al. (2005): Chemokines in onchocerciasis patients after a single dose of ivermectin. In: *Clinical and experimental immunology* 142, S. 318–326. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02910.x

Fontenot, Jason D.; Gavin, Marc A.; Rudensky, Alexander Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. In: *Nature immunology* 4, S. 330–336. DOI: 10.1038/ni904

Garcia, L. S. (1995): Classification of Human Parasites, Vectors, and Similar Organisms. In: *Clinical Infectious Diseases* 21, S. 281–282. DOI: 10.1093/clinids/21.2.281

Gehring, Christian; Kreidenweiss, Andrea; Flamen, Arnaud; Antony, Justin S.; Grobusch, Martin P.; Belard, Sabine (2014): Molecular evidence of Wolbachia endosymbiosis in *Mansonella perstans* in Gabon, Central Africa. In: *The Journal of infectious diseases* 210, S. 1633–1638. DOI: 10.1093/infdis/jiu320

Gelfand, M.; Bernberg, H. (1959): Tropical eosinophilic syndrome. A clinical description of the disorder as seen in S. Rhodesia. In: *The Central African journal of medicine* 5, S. 405–411

George, Parakkal Jovvian; Anuradha, Rajamanickam; Kumar, Nathella Pavan; Sridhar, Rathinam; Banurekha, Vaithilingam V.; Nutman, Thomas B.; Babu, Subash (2014): Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit mono- and multifunctional CD4+ and CD8+ T cell responses in a process dependent on IL-10. In: *PLoS pathogens* 10, e1004375. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004375

Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. (2001): An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25, S. 386–401. DOI: 10.1006/meth.2001.1261

Graham, Andrea L.; Taylor, Matthew D.; Le Goff, Laetitia; Lamb, Tracey J.; Magennis, Marisa; Allen, Judith E. (2005): Quantitative appraisal of murine filariasis confirms host strain differences but reveals that BALB/c females are more susceptible than males to *Litomosoides sigmodontis*. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, S. 612–618. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.12.019

Grobusch, M. P.; Kombila, M.; Autenrieth, I.; Mehlhorn, H.; Kremsner, P. G. (2003): No evidence of Wolbachia endosymbiosis with *Loa loa* and *Mansonella perstans*. In: *Parasitology research* 90, S. 405–408. DOI: 10.1007/s00436-003-0872-z

Hall, L. R.; Diaconu, E.; Patel, R.; Pearlman, E. (2001): CXC chemokine receptor 2 but not C-C chemokine receptor 1 expression is essential for neutrophil recruitment to the cornea in helminth-mediated keratitis (river blindness). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166, S. 4035–4041

Harrington, Laurie E.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Turner, Henrietta; Murphy, Theresa L.; Murphy, Kenneth M.; Weaver, Casey T. (2005): Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In: *Nature immunology* 6, S. 1123–1132. DOI: 10.1038/ni1254

Hartmann, Wiebke; Schramm, Christoph; Breloer, Minka (2015): *Litomosoides sigmodontis* induces TGF- $\beta$  receptor responsive, IL-10-producing T cells that suppress bystander T-cell proliferation in mice. In: *European journal of immunology* 45, S. 2568–2581. DOI: 10.1002/eji.201545503

Helming, Laura; Gordon, Siamon (2009): Molecular mediators of macrophage fusion. In: *Trends in cell biology* 19, S. 514–522. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.07.005

Hernandez-Pando, R.; Bornstein, Q. L.; Aguilar Leon, D.; Orozco, E. H.; Madrigal, V. K.; Martinez Cordero, E. (2000): Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. In: *Immunology* 100, S. 352–358. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00025.x

Hillier, S.D., M. Booth, L. Muhangi, P. Nkurunziza, M. Khihembo, M. Kakande, M. Sewankambo, R. Kizindo, M. Kizza, M. Muwanga, A.M. Elliott (2008): *Plasmodium falciparum* and helminth coinfection in a semiurban population of pregnant women in Uganda: Oxford University Press

Hise, A. G.; Gillette-Ferguson, I.; Pearlman, E. (2004): The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. In: *Cellular microbiology* 6, S. 97–104

Hoerauf, A.; Satoguina, J.; Saefel, M.; Specht, S. (2005): Immunomodulation by filarial nematodes. In: *Parasite immunology* 27, S. 417–429. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2005.00792.x

Hoerauf, Achim (2009): *Mansonella perstans*--the importance of an endosymbiont. In: *The New England journal of medicine* 361, S. 1502–1504. DOI: 10.1056/NEJMe0905193

Hoerauf et al. (2011): Filariasis in Africa--treatment challenges and prospects

Hoffmann, W.; Petit, G.; Schulz-Key, H.; Taylor, D.; Bain, O.; Le Goff, L. (2000): *Litomosoides sigmodontis* in mice: reappraisal of an old model for filarial research. In: *Parasitology today (Personal ed.)* 16, S. 387–389

Hoffmann, W. H.; Pfaff, A. W.; Schulz-Key, H.; Soboslay, P. T. (2001): Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmodontis* filariasis. In: *Parasitology* 122, S. 641–649

Hotez, Peter J.; Brindley, Paul J.; Bethony, Jeffrey M.; King, Charles H.; Pearce, Edward J.; Jacobson, Julie (2008): Helminth infections: the great neglected tropical diseases. In: *The Journal of clinical investigation* 118, S. 1311–1321. DOI: 10.1172/JCI34261

Hotez, Peter J.; Kamath, Aruna (2009): Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. In: *PLoS neglected tropical diseases* 3, e412. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000412

Hubner, Marc P.; Torrero, Marina N.; McCall, John W.; Mitre, Edward (2009): *Litomosoides sigmodontis*: a simple method to infect mice with L3 larvae obtained from the pleural space of recently infected jirds (*Meriones unguiculatus*). In: *Experimental parasitology* 123, S. 95–98. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.05.009

Hugues E.T (1950): Some stages of *Litomosoides carinii* in *Liponyssus bacoti*. In: *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, S. 285–290

Hussain, R.; Hamilton, R. G.; Kumaraswami, V.; Adkinson, N. F., JR; Ottesen, E. A. (1981): IgE responses in human filariasis. I. Quantitation of filaria-specific IgE. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 127, S. 1623–1629

Jimenez, Maribel; Gonzalez, Luis Miguel; Carranza, Cristina; Bailo, Begona; Perez-Ayala, Ana; Muro, Antonio et al. (2011): Detection and discrimination of *Loa loa*, *Mansonella perstans* and *Wuchereria bancrofti* by PCR-RFLP and nested-PCR of ribosomal DNA ITS1 region. In: *Experimental parasitology* 127, S. 282–286. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.019

Katawa, Gnatoulma; Layland, Laura E.; Debrah, Alex Y.; Horn, Charlotte von; Batsa, Linda; Kwarteng, Alexander et al. (2015): Hyperreactive onchocerciasis is characterized by a combination of Th17-Th2 immune responses and reduced regulatory T cells. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9, e3414. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003414

Keiser, Paul B.; Coulibaly, Yaya; Kubofcik, Joseph; Diallo, Abdallah A.; Klion, Amy D.; Traore, Sekou F.; Nutman, Thomas B. (2008): Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella perstans*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 160, S. 123–128. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2008.04.012

Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan; Baumann, Rosemarie; Brenner, Bernhard et al. (Hg.) (2010): *Physiologie*. 6., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783137960065>.  
Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S: *Physiologie*: Thieme

Kocherscheidt, Lars; Agossou, Abram; Gantin, Richard G.; Hamm, David M.; Banla, Meba; Soboslay, Peter T. (2010): Cytokine and chemokine responses in adults, newborns and children exposed to *Entamoeba histolytica/dispar*, *Onchocerca volvulus* and *Plasmodium falciparum*. In: *Pediatric allergy and immunology : official publication of the*

*European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 21, e756-63. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2010.01048.x

Koyasu, Shigeo; Moro, Kazuyo; Tanabe, Masanobu; Takeuchi, Tsutomu (2010): Natural helper cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. In: *Advances in immunology* 108, S. 21–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-380995-7.00002-1

Kumar, S. Nalin; Prasad, T. Srinivasa; Narayan, P. Anantha; Muruganandhan, J. (2013): Granuloma with langhans giant cells: An overview. In: *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* 17, S. 420–423. DOI: 10.4103/0973-029X.125211

Kurniawan, A.; Yazdanbakhsh, M.; van Ree, R.; Aalberse, R.; Selkirk, M. E.; Partono, F.; Maizels, R. M. (1993): Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150, S. 3941–3950

Lahl, Katharina; Loddenkemper, Christoph; Drouin, Cathy; Freyer, Jennifer; Arnason, Jon; Eberl, Gerard et al. (2007): Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. In: *The Journal of experimental medicine* 204, S. 57–63. DOI: 10.1084/jem.20061852

Lawrence, R. A. (1996): Lymphatic filariasis: what mice can tell us. In: *Parasitology today (Personal ed.)* 12, S. 267–271

Lawrence, R. A.; Devaney, E. (2001): Lymphatic filariasis: parallels between the immunology of infection in humans and mice. In: *Parasite immunology* 23, S. 353–361

Layland, Laura E.; Ajendra, Jesuthas; ritter, manuel; Wiszniewsky, Anna; Hoerauf, Achim; Hubner, Marc P. (2015): Development of patent *Litomosoides sigmodontis* infections in semi-susceptible C57BL/6 mice in the absence of adaptive immune responses. In: *Parasites & vectors* 8, S. 396. DOI: 10.1186/s13071-015-1011-2

Layland, Laura E.; Mages, Jorg; Loddenkemper, Christoph; Hoerauf, Achim; Wagner, Hermann; Lang, Roland; da Costa, Clarissa U. Prazeres (2010): Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (2), S. 713–724. DOI: 10.4049/jimmunol.0901435

Le Goff, L.; Martin, C.; Oswald, I. P.; Vuong, P. N.; Petit, G.; Ungeheuer, M. N.; Bain, O. (2000): Parasitology and immunology of mice vaccinated with irradiated *Litomosoides sigmodontis* larvae. In: *Parasitology* 120, S. 271–280

Le Goff, Laetitia; Lamb, Tracey J.; Graham, Andrea L.; Marcus, Yvonne; Allen, Judith E. (2002): IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. In: *International Journal for Parasitology* 32, S. 1277–1284. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00125-X

Lechner, Christian J.; Gantin, Richard G.; Seeger, Tanja; Sarnecka, Alicja; Portillo, Jennifer; Schulz-Key, Hartwig et al. (2012): Chemokines and cytokines in patients with an occult *Onchocerca volvulus* infection. In: *Microbes and infection* 14, S. 438–446. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.12.002

Lechner, Christian J.; Komander, Karl; Hegewald, Jana; Huang, Xiangsheng; Gantin, Richard G.; Soboslay, Peter T. et al. (2013): Cytokine and chemokine responses to helminth and protozoan parasites and to fungus and mite allergens in neonates, children, adults, and the elderly. In: *Immunity & ageing : I & A* 10, S. 29. DOI: 10.1186/1742-4933-10-29

Lee, S. C.; Brummet, M. E.; Shahabuddin, S.; Woodworth, T. G.; Georas, S. N.; Leiferman, K. M. et al. (2000): Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164, S. 3392–3401

Maizels, R. M.; Sartono, E.; Kurniawan, A.; Partono, F.; Selkirk, M. E.; Yazdanbakhsh, M. (1995): T-cell activation and the balance of antibody isotypes in human lymphatic filariasis. In: *Parasitology today (Personal ed.)* 11, S. 50–56

Maizels, Rick M.; Balic, Adam; Gomez-Escobar, Natalia; Nair, Meera; Taylor, Matt D.; Allen, Judith E. (2004): Helminth parasites--masters of regulation. In: *Immunological reviews* 201, S. 89–116. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x

Maizels, Rick M.; Smith, Katherine A. (2011): Regulatory T cells in infection. In: *Advances in immunology* 112, S. 73–136. DOI: 10.1016/B978-0-12-387827-4.00003-6

Maizels, Rick M.; Yazdanbakhsh, Maria (2003): Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. In: *Nature reviews. Immunology* 3, S. 733–744. DOI: 10.1038/nri1183

Makepeace, B. L.; Martin, C.; Turner, J. D.; Specht, S. (2012): Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots? In: *Current medicinal chemistry* 19, S. 1567–1586

Marechal, P.; Le Goff, L.; Hoffman, W.; Rapp, J.; Oswald, I. P.; Ombrouck, C. et al. (1997): Immune response to the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and resistant mice. In: *Parasite immunology* 19, S. 273–279

Martin, C.; Al-Qaoud, K. M.; Ungeheuer, M. N.; Paehle, K.; Vuong, P. N.; Bain, O. et al. (2000): IL-5 is essential for vaccine-induced protection and for resolution of primary infection in murine filariasis. In: *Medical microbiology and immunology* 189, S. 67–74

Metenou, Simon; Dembele, Benoit; Konate, Siaka; Dolo, Housseini; Coulibaly, Siaka Y.; Coulibaly, Yaya I. et al. (2009): Patent filarial infection modulates malaria-specific type 1 cytokine responses in an IL-10-dependent manner in a filaria/malaria-coinfected population. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 18, S. 916–924. DOI: 10.4049/jimmunol.0900257



Murphy, Kenneth (2012): Janeway's immunobiology. 8. Aufl. London: Garland Science. Online verfügbar unter <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/746843971>

Murphy, Kenneth P.; Travers, Paul; Walport, Mark (2014): Janeway Immunologie. 7. Aufl., korr. Nachdr. Berlin u.a.: Springer Spektrum (Lehrbuch)

Nayar, J. K.; Crowder, C. G.; Knight, J. W. (1991): In vitro development of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* in cultured mosquito thoraces. In: *Acta tropica* 48, S. 173–184

Nieguitsila, Adelaide; Frutos, Roger; Moulia, Catherine; Lhermitte-Vallarino, Nathaly; Bain, Odile; Gavotte, Laurent; Martin, Coralie (2013): Fitness cost of *Litomosoides sigmodontis* filarial infection in mite vectors; implications of infected haematophagous arthropod excretory products in host-vector interactions. In: *BioMed research international* 2013, S. 584105. DOI: 10.1155/2013/584105

Njouendou, Abdel Jelil; ritter, manuel; Ndongmo, Winston Patrick Chounna; Kien, Chi Anizette; Narcisse, Gandjui Tchamatchoua Victor; Fombad, Fanny Fri et al. (2017): Successful long-term maintenance of *Mansonella perstans* in an in vitro culture system. In: *Parasites & vectors* 10, S. 563. DOI: 10.1186/s13071-017-2515-8

Osborne, J.; Hunter, S. J.; Devaney, E. (1996): Anti-interleukin-4 modulation of the Th2 polarized response to the parasitic nematode *Brugia pahangi*. In: *Infection and immunity* 64, S. 3461–3466

Petit, G.; Diagne, M.; Marechal, P.; Owen, D.; Taylor, D.; Bain, O. (1992): Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains. In: *Annales de parasitologie humaine et comparee* 67, S. 144–150

Pfarr, K. M.; Debrah, A. Y.; Specht, S.; Hoerauf, A. (2009): Filariasis and lymphoedema. In: *Parasite immunology* 31, S. 664–672. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01133.x

Phillips, Richard O.; Frimpong, Michael; Sarfo, Fred S.; Kretschmer, Birte; Beissner, Marcus; Debrah, Alexander et al. (2014): Infection with *Mansonella perstans* Nematodes in Buruli Ulcer Patients, Ghana. In: *Emerging infectious diseases* 20, S. 1000–1003. DOI: 10.3201/eid2006.131501

Pilotte, N.; Torres, M.; Tomaino, F. R.; Laney, S. J.; Williams, S. A. (2013): A TaqMan-based multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. In: *Molecular and biochemical parasitology* 189, S. 33–37. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.05.001

Rakita, R. M.; White, A. C.; Kielhofner, M. A. (1993): Loa loa Infection as a Cause of Migratory Angioedema. Report of Three Cases from the Texas Medical Center. In: *Clinical Infectious Diseases* 17, S. 691–694. DOI: 10.1093/clinids/17.4.691

Ramaiah, K. D.; Ottesen, Eric A. (2014): Progress and impact of 13 years of the global programme to eliminate lymphatic filariasis on reducing the burden of filarial disease. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003319

Ritter, Manuel; Ndongmo, Winston Patrick Chounna; Njouendou, Abdel Jelil; Nghochuzie, Nora Nganyewo; Nchang, Lucy Cho; Tayong, Dizzle Bitá et al. (2018): *Mansonella perstans* microfilaremic individuals are characterized by enhanced type 2 helper T and regulatory T and B cell subsets and dampened systemic innate and adaptive immune responses. In: *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006184. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006184

Ritter, Manuel; Tamadaho, Ruth S.; Feid, Judith; Vogel, Wenzel; Wiszniewsky, Katharina; Perner, Sven et al. (2017): IL-4/5 signalling plays an important role during *Litomosoides sigmodontis* infection, influencing both immune system regulation and tissue pathology in the thoracic cavity. In: *International Journal for Parasitology* 47, S. 951–960. DOI: 10.1016/j.ijpara.2017.06.009

Rodrigo, Maria B.; Schulz, Sandy; Krupp, Vanessa; ritter, manuel; Wiszniewsky, Katharina; Arndts, Kathrin et al. (2016): Patency of *Litomosoides sigmodontis* infection depends on Toll-like receptor 4 whereas Toll-like receptor 2 signalling influences filarial-specific CD4(+) T-cell responses. In: *Immunology* 147, S. 429–442. DOI: 10.1111/imm.12573

Roncarolo, Maria Grazia; Gregori, Silvia; Battaglia, Manuela; Bacchetta, Rosa; Fleischhauer, Katharina; Levings, Megan K. (2006): Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. In: *Immunological reviews* 212, S. 28–50. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x

Rychlik, W.; Spencer, W. J.; Rhoads, R. E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. In: *Nucleic acids research* 18 (21), S. 6409–6412

Saeftel, M.; Arndt, M.; Specht, S.; Volkmann, L.; Hoerauf, A. (2003): Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis. In: *Infection and immunity* 71, S. 6978–6985

Saeftel, M.; Volkmann, L.; Korten, S.; Brattig, N.; Al-Qaoud, K.; Fleischer, B.; Hoerauf, A. (2001): Lack of interferon-gamma confers impaired neutrophil granulocyte function and imparts prolonged survival of adult filarial worms in murine filariasis. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3, S. 203–213

Sakai, Hidemasa; Okafuji, Ikuo; Nishikomori, Ryuta; Abe, Junya; Izawa, Kazushi; Kambe, Naotomo et al. (2012): The CD40-CD40L axis and IFN-gamma play critical roles in Langhans giant cell formation. In: *International Immunology* 24, S. 5–15. DOI: 10.1093/intimm/dxr088

Schoenborn, Jamie R.; Wilson, Christopher B. (2007): Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. In: Frederick W. Alt (Hg.): *Advances in immunology*. Volume 96, Bd. 96. New York, N.Y: Academic Press (Advances in Immunology, S. 41–101

Schrum, S.; Probst, P.; Fleischer, B.; Zipfel, P. F. (1996): Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157, S. 3598–3604

Semnani, Roshanak Tolouei; Mahapatra, Lily; Dembele, Benoit; Konate, Siaka; Metenou, Simon; Dolo, Housseini et al. (2010): Expanded numbers of circulating myeloid dendritic cells in patent human filarial infection reflect lower CCR1 expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185, S. 6364–6372. DOI: 10.4049/jimmunol.1001605

Shamri, R.; Xenakis, J. J.; La Spencer (2011): Eosinophils in innate immunity: an evolving story. In: *Cell and tissue research* 343, S. 57–83. DOI: 10.1007/s00441-010-1049-6

Simonsen, Paul E.; Onapa, Ambrose W.; Asio, Santa Maria (2011): *Mansonella perstans* filariasis in Africa. In: *Acta tropica* 120 Suppl 1, S. 20. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.01.014

Soboslay, Peter T.; Hamm, David M.; Pfafflin, Frieder; Fendt, Julia; Banla, Meba; Schulz-Key, Hartwig (2006): Cytokine and chemokine responses in patients co-infected with *Entamoeba histolytica/dispar*, *Necator americanus* and *Mansonella perstans* and changes after anti-parasite treatment. In: *Microbes and infection* 8, S. 238–247. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.06.019

Specht, Sabine; Taylor, Matthew D.; Hoeve, Marieke A.; Allen, Judith E.; Lang, Roland; Hoerauf, Achim (2012): Over expression of IL-10 by macrophages overcomes resistance to murine filariasis. In: *Experimental parasitology* 132, S. 90–96. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.09.003

Stensgaard, Anna-Sofie; Vounatsou, Penelope; Onapa, Ambrose W.; Utzinger, Jürg; Pedersen, Erling M.; Kristensen, Thomas K. et al. (2016): Ecological Drivers of *Mansonella perstans* Infection in Uganda and Patterns of Co-endemicity with Lymphatic

Filariasis and Malaria. In: *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004319

Stone, Kelly D.; Prussin, Calman; Metcalfe, Dean D. (2010): IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S. 80. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017

Summers, Charlotte; Rankin, Sara M.; Condliffe, Alison M.; Singh, Nanak; Peters, A. Michael; Chilvers, Edwin R. (2010): Neutrophil kinetics in health and disease. In: *Trends in immunology* 31, S. 318–324. DOI: 10.1016/j.it.2010.05.006

Taylor, Alison; Verhagen, Johan; Blaser, Kurt; Akdis, Mubeccel; Akdis, Cezmi A. (2006): Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. In: *Immunology* 117, S. 433–442. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x

Taylor, M. D.; Harris, A.; Babayan, S. A.; Bain, O.; Culshaw, A.; Allen, J. E.; Maizels, R. M. (2007): CTLA-4 and CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Protective Immunity to Filarial Parasites In Vivo. In: *The Journal of Immunology* 179, S. 4626–4634. DOI: 10.4049/jimmunol.179.7.4626

Taylor, M. D.; LeGoff, L.; Harris, A.; Malone, E.; Allen, J. E.; Maizels, R. M. (2005a): Removal of Regulatory T Cell Activity Reverses Hyporesponsiveness and Leads to Filarial Parasite Clearance In Vivo. In: *The Journal of Immunology* 174, S. 4924–4933. DOI: 10.4049/jimmunol.174.8.4924

Taylor, Mark J.; Bandi, Claudio; Hoerauf, Achim (2005b): Wolbachia. Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. In: John R. Baker, Ralph Muller und D. Rollinson (Hg.): *Advances in Parasitology*, Bd. 60. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks (*Advances in Parasitology*, 60), S. 245–284

Taylor, Mark J.; Hoerauf, Achim; Bockarie, Moses (2010): Lymphatic filariasis and onchocerciasis. In: *The Lancet* 376, S. 1175–1185. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60586-7

Taylor, Matthew D.; van der Werf, Nienke; Harris, Anjanette; Graham, Andrea L.; Bain, Odile; Allen, Judith E.; Maizels, Rick M. (2009): Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. In: *European journal of immunology* 39, S. 192–206. DOI: 10.1002/eji.200838727

Taylor, Matthew D.; van der Werf, Nienke; Maizels, Rick M. (2012): T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. In: *Trends in immunology* 33, S. 181–189. DOI: 10.1016/j.it.2012.01.001

Trautmann, Axel; Schmid-Grendelmeier, Peter; Krüger, Katja; Cramer, Reto; Akdis, Mübeccel; Akkaya, Ahmet et al. (2002): T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, S. 329–337. DOI: 10.1067/mai.2002.121460

van der Werf, Nienke; Redpath, Stephen A.; Phythian-Adams, Alexander T.; Azuma, Miyuki; Allen, Judith E.; Maizels, Rick M. et al. (2011): Th2 responses to helminth parasites can be therapeutically enhanced by, but are not dependent upon, GITR-GITR ligand costimulation in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187, S. 1411–1420. DOI: 10.4049/jimmunol.1100834

van Hoegaerden, M.; Ivanoff, B.; Flocard, F.; Salle, A.; Chabaud, B. (1987): The use of mebendazole in the treatment of filariases due to *Loa loa* and *Mansonella perstans*. In: *Annals of tropical medicine and parasitology* 81, S. 275–282

Vickery, A. C.; Albertine, K. H.; Nayar, J. K.; Kwa, B. H. (1991): Histopathology of *Brugia malayi*-infected nude mice after immune-reconstitution. In: *Acta tropica* 49, S. 45–55

Volkman, Lars; Bain, Odile; Saeftel, Michael; Specht, Sabine; Fischer, Kerstin; Brombacher, Frank et al. (2003): Murine filariasis: interleukin 4 and interleukin 5 lead to containment of different worm developmental stages. In: *Medical microbiology and immunology* 192, S. 23–31. DOI: 10.1007/s00430-002-0155-9

Wanji, S.; Tendongfor, N.; Esum, M.; Ndindeng, S.; Enyong, P. (2003): Epidemiology of concomitant infections due to *Loa loa*, *Mansonella perstans*, and *Onchocerca volvulus* in rain forest villages of Cameroon. In: *Medical microbiology and immunology* 192, S. 15–21. DOI: 10.1007/s00430-002-0154-x

Wanji, Samuel; Tayong, Dizzle Bitá; Layland, Laura E.; Datchoua Poutcheu, Fabrice R.; Ndongmo, Winston Patrick Chounna; Kengne-Ouafo, Jonas Arnaud et al. (2016): Update on the distribution of *Mansonella perstans* in the southern part of Cameroon: influence of ecological factors and mass drug administration with ivermectin. In: *Parasites & vectors* 9, S. 311. DOI: 10.1186/s13071-016-1595-1

Weil, G. J.; Lammie, P. J.; Weiss, N. (1997): The ICT Filariasis Test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. In: *Parasitology today (Personal ed.)* 13, S. 401–404

World Health Organization: Soil-transmitted helminth infections. Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>

Zahner, H.; Wegerhof, P. H. (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. In: *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)* 72, S. 789–804

Zhang, S.; Youn, B. S.; Gao, J. L.; Murphy, P. M.; Kwon, B. S. (1999): Differential effects of leukotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha on neutrophils mediated by CCR1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162, S. 4938–4942

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Achim Hörauf für die Möglichkeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie meine Doktorarbeit zu absolvieren. Ebenfalls geht ein großer Dank an das Deutsche Institut für Infektionsforschung (DZIF) für den Erhalt eines Stipendiums und das Vertrauen in mein Arbeitsprojekt. Ein weiterer Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), die mir im Rahmen des MaP2Co Projektes das Probenmaterial zur Verfügung gestellt hat.

Ich möchte gerne meinen besonderen Dank an Dr. Laura Layland und Dr. Manuel Ritter richten, die mich jederzeit unstützt haben und mit Rat und Tat zur Seite standen. Für ihre kritischen Meinungen und Korrekturen dieser Arbeit danke ich Ihnen.

Dr. Sven Perner gilt ebenfalls ein großer Dank für die Etablierung eines Scoresystems und die histologische Analyse der Proben. Auch Wenzel Vogel danke ich für die Anfertigung der Schnitte. Es war eine tolle Erfahrung mit ihnen zusammen zu arbeiten.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Arbeitsgruppe ganz herzlich bedanken. Danke Kathi, Anna, Kathrin, Özlem und Ruth für die Unterstützung im Labor und für eine schöne Zeit, die ich bei der Arbeit hatte. Und Danke Kathrin für die Korrektur dieser Arbeit. Ein großer Dank geht an Anna-Lena Sander mit der ich Zusammen die Möglichkeit hatte die *M. perstans* PCR zu etablieren und danke für die Testung vor Ort in Ghana.

Auch bei den anderen Arbeitsgruppen im Institut möchte ich mich bedanken. Nicht nur für die Hilfe bei einzelnen Analysen, sondern auch für die tolle Zeit, die ich im Labor hatte und für viele lustige Stunden nicht nur während der Arbeit. Ich danke euch, Charlotte, Tine, Helene, Anna-Lena, Kirstin, Marianne, Johanna und allen anderen, die ich nicht persönlich erwähnt habe.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken für all die Möglichkeiten, die sie mir gegeben haben. Für ihre Unterstützung während all der Jahre. Stephan danke, dass du immer für mich da bist. Ich bin sehr froh, dass ich euch habe. Besonders möchte ich mich noch bei meinen Mädels bedanken. Michi, Berna, Krissi und Maiki, ich danke euch für eure jahrelange Freundschaft und für die Unterstützung im ganzen Studium. Für lustige Abende und aufbauende Worte. Und Berna, dir noch mal vielen Dank für das Korrekturlesen und Michi vielen Dank für den kritischen Blick auf die Methoden.