

Neue Antibiotika für neuartige Strategien gegen
Filarioseninfektionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Theo-Julian Hoffmann
aus Heidelberg

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Hörauf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. U. Spengler

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.06.2012

Universitätsklinikum Bonn
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP)
Direktor: Prof. Dr. med. A Hörauf

für Thi Thu und Lilly-Emilia

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Epidemiologie von humanen Filarioseninfektionen.....	9
1.2 Lebenszyklus von Filarien.....	9
1.3 Onchozerkose	9
1.4 Lymphatische Filariose	10
1.5 Behandlungskonzepte von Filariosenerkrankungen.....	11
1.6 <i>Wolbachien</i> und ihre Phylogenie.....	12
1.7 <i>Wolbachien</i> und ihre mutualistische Assoziation in Filarien	13
1.8 Depletion der <i>Wolbachien</i> als neues Therapiekonzept.....	14
1.9 Aufbau und Biosynthese der bakteriellen Zellwand	15
1.10 Die Zellwandbiosynthese als Ziel antibiotischer Therapie	17
1.11 Wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Tiere	19
2.1.2 Zelllinien	19
2.1.3 Plasmide	19
2.1.4 Primer.....	20
2.1.5 Antibiotika	20
2.1.6 Enzyme.....	21
2.1.7 Anästhetika.....	21
2.1.8 Nährmedien	22
2.1.9 Puffer und Lösungen	23
2.1.10 Chemikalien und sonstige Materialien.....	24
2.1.11 Geräte	25
2.1.12 Statistische Analyse	26
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Methoden der Molekularbiologie.....	26

2.2.2	Methoden der Zellbiologie.....	29
2.2.3	Tierversuche.....	31
3	Ergebnisse.....	35
3.1	<i>In vitro</i> Antibiotika-Assay mit <i>Wolbachien</i> -infizierten Aa23 und C6/36 Zellen.....	35
3.1.1	Die Behandlung von <i>Wolbachien</i> -infizierten Aa23 Zellen mit D-Cycloserin.....	35
3.1.2	Behandlung von C6/36 Insektenzellen mit D-Cycloserin.....	35
3.1.3	Die Behandlung von <i>Wolbachien</i> -infizierten C6/36 Zellen mit Fosfomycin.....	37
3.2	Untersuchung von Fosfomycin und D-Cycloserin behandelten C6/36 Zellen mittels Giemsa-Färbung.....	38
3.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen mit der Filarie <i>Litomosoides sigmodontis</i> im Mausmodell.....	39
3.3.1	Behandlung von <i>L. sigmodontis</i> -infizierten Balb/c-Mäusen mit Tigecyclin.....	40
3.3.2	Wirkung einer verkürzten Behandlungsdauer mit Tigecyclin auf <i>L. sigmodontis</i> -infizierte Balb/c-Mäuse.....	42
3.3.3	Behandlung von <i>L. sigmodontis</i> -infizierten Balb/c-Mäusen mit Rifampicin und Doxycyclin.....	44
3.3.4	Wirkung von D-Cycloserin und Fosfomycin auf <i>L. sigmodontis</i> -infizierte Balb/c-Mäuse.....	46
4	Diskussion.....	50
4.1	Die Bedeutung von Lipid II als neue Zielstruktur für eine antibiotische Therapie.....	51
4.2	Die Relevanz neuartiger Antibiotika in der Therapie gegen Filarien.....	54
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis.....	60
7	Danksagung.....	69
8	Lebenslauf.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ct	Threshold Cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidphosphat
FCS	fetales Kalbserum
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Technique
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
L	Larve
M	Molar
MF	Mikrofilarien
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
µg	Mikrogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepuffertes Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
v/v	Volumenanteil
WHO	World Health Organisation
WoLP	<i>Wolbachia</i> Lipoprotein
WSP	<i>Wolbachia</i> surface protein

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von humanen Filarioseninfektionen

Filariosen sind Infektionskrankheiten, welche durch Nematoden ausgelöst werden. Zu den wichtigsten humanpathogenen Arten gehören *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus* und *Loa Loa*, wobei *W. bancrofti*, *B. malayi* und *O. volvulus* für die Mehrzahl der Filarieninfektionen weltweit verantwortlich sind (Ottesen, 1992).

Als ursächlichen Erreger der Lymphatischen Filariose ist in 90 % der Fälle *W. bancrofti* mit einer Verbreitung in über 80 tropischen Ländern zu finden. Bei 10 % der Infektionen sind *B. malayi*, welcher primär in Südost- und Ostasien vorkommt, und *B. timori* in Timor verantwortlich (Melrose, 2002). *O. volvulus*, der Erreger der Onchozerkose, tritt endemisch in 28 Ländern der Subsahara, im südlichen Ägypten, im Jemen sowie in sechs lateinamerikanischen Ländern (Mexiko, Guatemala, Kolumbien, Venezuela, Brasilien, Ecuador) auf. Außerdem ist er gehäuft entlang von Flussläufen zu finden, da sich dort die Puppen seines Vektors, der Kriebelmücke (*Simulium spp.*), entwickeln (Thylefors and Alleman, 2006).

1.2 Lebenszyklus von Filarien

Die Übertragung der L1-Larven, der sogenannten Mikrofilarien (MF), ist obligat an blutsaugende Arthropodenvektoren wie Mücken, Milben und Fliegen gebunden. Die nach einem Blutmahl von den Vektoren aufgenommenen Mikrofilarien wandern dort von dem Mitteldarm in die Thoraxmuskulatur, wo sie sich nach zweimaliger Häutung innerhalb von 2 Wochen zu der für den Menschen infektiösen L3-Larve entwickeln. Durch ein erneutes Blutmahl des Vektors werden die L3-Larven auf den zukünftigen Wirt übertragen. Dort migrieren sie in das umliegende Gewebe und entwickeln sich nach zwei weiteren Häutungen zu erwachsenen Würmern (Bogitsh, 2005).

Die weiblichen Filarien produzieren Millionen von neuen Mikrofilarien, die, wie zum Beispiel bei der Lymphatischen Filariose, im peripheren Blut zirkulieren und somit erneut von ihren Vektoren aufgenommen werden können.

1.3 Onchozerkose

Die Onchozerkose, eine auch als Flussblindheit bezeichnete Filarioseninfektion, betrifft weltweit ca. 38 Millionen Menschen. Sie ist eine reine Anthroponose, bei der es kein tierisches Reservoir

gibt. Übertragen wird diese Infektionskrankheit durch den Biss der Kriebelmücke, die infektiöse L3-Larven von *O. volvulus* beherbergt. Diese wandern in das Unterhautbindegewebe des Wirtes ein, wo sie sich nach zwei weiteren Häutungen innerhalb weniger Monate in adulte weibliche und männliche Filarien entwickeln (Thomas, 1995). In einer als Onchozerkom bezeichneten subkutan liegenden bindegewebsartigen Kapsel mit einem Durchmesser von 1-5 cm können mehrere Männchen und Weibchen eingeschlossen sein. Dadurch sind sie weitgehend vor immunologischen Reaktionen des Wirtes geschützt, ohne dabei von der Versorgung mit Nährstoffen abgeschnitten zu sein. Dort können die Weibchen täglich bis zu 50.000 Mikrofilarien produzieren (Duke, 1993). *O. volvulus* hat eine Lebenserwartung von ungefähr 15 Jahren (Thylefors and Alleman, 2006).

Die am weitesten verbreitete Manifestation dieser Infektion ist die generalisierte Onchozerkose, die durch einen milden Krankheitsverlauf mit einer extrem hohen Anzahl an Mikrofilarien charakterisiert ist, wobei die Pathologien in der Haut wie Hautatrophie und Depigmentierung (WHO, 1995) durch den Tod der Mikrofilarien getriggert werden, da diese Ziel von Immunreaktionen des Wirtes werden. Eine entzündliche Reaktion der Augen, die ebenfalls durch den Tod der Mikrofilarien in der Kornea ausgelöst wird, kann weiterhin zur Blindheit führen.

Einige wenige als sogenannte „swoda“-Patienten bezeichnete Menschen zeigen Symptome wie chronische Dermatitis und Lymphadenitis, welche ihre Ursache in einer exzessiven Immunantwort gegenüber den Würmern haben. Die Menge an Mikrofilarien und Würmern ist als Konsequenz auf diese Antwort vermindert, jedoch auf Kosten der extremen Ausprägung der Symptome (Buttner and Racz, 1983).

Zur Diagnosestellung dient der direkte Nachweis der Mikrofilarien, die mit Hilfe der „skin-Snip-Methode“ gewonnen werden, die Isolierung von *Onchocerca*-DNA aus Hautproben, oder die Feststellung toter oder lebender Mikrofilarien in der vorderen Augenkammer oder der Kornea durch ophthalmologische Untersuchungen.

1.4 Lymphatische Filariose

Weltweit sind etwa 120 Millionen Menschen an der Lymphatischen Filariose erkrankt, wobei insgesamt 1,1 Milliarden einem potentiellen Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Übertragen wird diese Erkrankung durch Mücken der Gattung *Culex*, *Aedes* und *Anopheles*. Eine Besonderheit ist, dass die Mikrofilarien von *W. bancrofti* und *B. malayi* nur nachts im peripheren Blut persistieren und folglich nur dann von den blutsaugenden Mücken aufgenommen werden können.

Die Infektion durchläuft drei Hauptstadien:

Das Erste beinhaltet die Entwicklung der L3-Larve zum adulten Wurm. Diese Phase ist durch einen milden Krankheitsverlauf gekennzeichnet. In einigen Patienten werden dabei die Würmer eliminiert, ohne die Erkrankung auszulösen (Bogitsh, 2005).

Das zweite Stadium beginnt nach der Reifung der adulten Würmer mit der Produktion von Mikrofilarien. Durch den Tod der adulten Würmer wird eine entzündlich-allergische Reaktion im Lymphsystem ausgelöst, die zu Lymphangitis und zu Schwellungen an Armen, Beinen und Skrotum führen kann.

Bei 10 % der infizierten Menschen schließt sich das dritte Stadium an. Gekennzeichnet ist es durch chronisch-obstruierende Veränderungen des Lymphsystems mit Reduktion des Lymphflusses, Erweiterung der Lymphgefäße („Lymphvarizen“) und Lymphangiogenese. Durch Bindegewebszubildung werden Schwellungen von Lymphknoten und Extremitäten verursacht, die zur Elephantiasis führen. Tote Würmer können weiterhin durch lokale entzündliche Reaktionen Episoden von akuter Filarienlymphangitis (AFL) auslösen (Melrose, 2002).

Zur Diagnosesicherung wird der serologische Nachweis von IgG4-Antikörpern herangezogen. Weiterhin sind zirkulierende *Wolbachien*-Antigene nachweisbar. Als weitere Möglichkeit dient die Detektion der Mikrofilarien im Blut, wobei eine Blutentnahme möglichst nachts durchgeführt werden sollte. Nester der adulten Würmer sind mit Hilfe der Sonographie lokalisierbar, insbesondere bei Männern im Skrotalbereich (Mand et al., 2006).

1.5 Behandlungskonzepte von Filariosenerkrankungen

Medikamente, die heute zur Behandlung von Filariosenerkrankungen eingesetzt werden, sind Diethylcarbamazin (DEC) und Albendazol (Dreyer et al., 1994) bei der lymphatischen Filariose und Ivermectin (Richards et al., 1989) ebenfalls in Kombination mit Albendazol bei der Onchozerkose, sowie bei der Lymphatischen Filariose in Ländern mit coendemischem Auftreten der Onchozerkose. Diese Medikamente werden auch bei sogenannten Massenadministrationsprogrammen (MDA) in Ländern mit endemischem Auftreten von Filariosen von der WHO angewendet. Weiterhin bewirken die Medikamente in erster Linie eine drastische Reduktion der Mikrofilarienkonzentration, wobei Diethylcarbamazin auch eine makrofilarizide Wirkung zugesprochen wird. Um die Transmissionsrate signifikant zu reduzieren, müssen die genannten Medikamente über einen langen Zeitraum eingenommen werden.

Die Erkenntnis, dass Filarien Endosymbionten der Gattung *Wolbachia* beinhalten, führte zu neuen therapeutischen Ansätzen (Taylor et al., 2010; Pfarr und Hoerauf, 2006; Hoerauf, 2007; Pfarr et al., 2007).

Wolbachien in Filarien sind essentiell für die Embryogenese, die Entwicklung der Larven und das Überleben der ausgewachsenen Würmer (Hoerauf et al., 1999; Hoerauf et al., 2000; Bandi et al., 2001), wodurch sie ein interessantes Ziel für eine antibiotische Behandlung darstellen.

Durch intensive Forschung in diesem Bereich wurde Doxycyclin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline, als weitere Therapiemöglichkeit mit Antifilarienaktivität eingeführt (Hoerauf et al., 2000; Hoerauf et al., 2001; Hoerauf et al., 2003; Taylor et al., 2005; Debrah et al., 2007; Hoerauf et al., 2008) und kommt in bestimmten Situationen als Individual drug administration (IDA) zum Einsatz (Taylor et al., 2010; Hoerauf et al., 2001; Hoerauf et al., 2002; Hoerauf, 2006). So führt Doxycyclin zum Beispiel nach einer täglichen Behandlung von vier Wochen bei der Onchozerkose und zwei Wochen bei der Lymphatischen Filariose zur Inhibition der Embryogenese und in Folge zur Reduktion von Symptomen wie Lymphödem, Lymphgefäß- oder Hydrozelendilatation (Pfarr et al., 2009).

Da Doxycyclin jedoch bei Schwangeren und Kinder unter 7 Jahren kontraindiziert ist, ist man bestrebt, alternative Antibiotika mit geringerem Nebenwirkungsprofil zur Behandlung von Filarioseninfektionen zu etablieren.

Neue Therapiekonzepte sowie neue Behandlungsmöglichkeiten sind Gegenstand der Ergebnisse und Diskussion dieser Dissertation.

1.6 *Wolbachien* und ihre Phylogenie

Wolbachien wurden 1924 zum ersten Mal beschrieben (Hertig, 1924) und in Folge in vielen Arthropoden, wie z. B. Insekten, in welchen sie in 15-20 % der untersuchten Arten gefunden wurden (Werren, 1997), und Nematoden nachgewiesen. Sie zählen zu den *alpha*-Proteobakterien der Ordnung *Rickettsiales* und sind obligat intrazellulär lebende Bakterien. Phylogenetisch sind sie mit den Gattungen *Anaplasma*, *Cowdria* und *Ehrlichia* verwandt.

1975 wurden sie auch in verschiedenen Filarienarten wie z.B. *W. bancrofti*, *B. malayi* und *O. volvulus* gefunden (McLaren et al., 1975; Kozek, 1977; Franz and Buttner, 1983; Casiraghi et al., 2001; Taylor and Hoerauf, 2001).

Zur Klärung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen bediente man sich molekularbiologischer Methoden, in dem man Sequenzen des Gens der kleinen ribosomalen

Untereinheit *16srRNA* (Sironi et al., 1995; Bandi et al., 1998) oder des *ftsZ*-Gens (Werren and Jaenike, 1995), welches für ein Zellteilungsprotein kodiert, analysierte und verglich. Die Ergebnisse wurden mit Analysen von Untersuchungen des *wsp*-Gens (*wolbachia* surface protein), das für ein Oberflächenprotein kodiert, ergänzt (Bazzocchi et al., 2000; Casiraghi et al., 2001).

1.7 *Wolbachien* und ihre mutualistische Assoziation in Filarien

Wolbachien sind 3 bis 6 µm große, runde bis ovalförmige Organismen, die mit dem Zytoplasma der Eizellen vertikal von den Weibchen auf ihre Nachkommen weitergegeben werden (Werren, 1997; Bandi et al., 2001). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *O. volvulus* und *Dirofilaria immitis* zeigten, dass die Bakterien einzeln oder in kleinen Gruppen in Doppelmembran umschlossenen Kompartimenten im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisiert sind. Durch weitere Untersuchungen mit immunhistologischen Färbungen, in der Antikörper gegen die bakteriellen Proteine Katalase (Henkle-Duhrsen et al., 1998) oder *Wolbachien*-Oberflächenprotein (WSP) (Bazzocchi et al., 2000) verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die Bakterien in den Median- und Basalzonen der Lateralleisten der Hypodermis von adulten Würmern, in den Oogonien und in allen embryonalen Stadien der Gewebsmikrofilarien und intrauterinen Mikrofilarien befinden (Henkle-Duhrsen et al., 1998; Hoerauf et al., 1999; Bazzocchi et al., 2000; Hoerauf et al., 2000; Hoerauf et al., 2000; Brattig et al., 2001). In den Fortpflanzungsorganen der Männchen wurden jedoch keine *Wolbachien* nachgewiesen (Hoerauf, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass manche Filarienspezies wie *Onchocerca flexuosa* oder *Loa Loa* keine *Wolbachien* beherbergen (Hoerauf et al., 1999; Taylor and Hoerauf, 1999; Brattig et al., 2001).

Auf Grund der vertikalen Transmission und der elektromikroskopischen Untersuchungen wurde eine mutualistische Assoziation zwischen den *Wolbachien* und den Filarien vermutet (McLaren et al., 1975; Kozek, 1977; Kozek and Marroquin, 1977). *Wolbachien* übernehmen dabei eine wichtige Funktion in der Embryogenese und der Entwicklung der Filarien (Hoerauf et al., 1999; Hoerauf et al., 2000; Hoerauf et al., 2000; Hoerauf et al., 2001). Weiterhin wird angenommen, dass sie auch wichtige Funktionen im Stoffwechsel übernehmen sowie Nährstoffe für ihren Wirt synthetisieren. Die in den Bakterien nachgewiesene Katalase könnte zum Beispiel den Filarienwirt durch den Abbau von entstandenen Wasserstoffperoxiden schützen (Henkle-Duhrsen et al., 1998). Weitere Studien zeigten, dass *Wolbachien* von *B. malayi* alle nötigen Gene zur Synthese von Häm, Riboflavin, Flavin und Gluthation besitzen (Booth et al., 2003; Foster et al., 2005).

Das von den *Wolbachien* hergestellte Häm könnte notwendig für die Embryogenese der Würmer sein, da es essentiell für die Synthese von Ecdysteroid-ähnlichen Hormonen ist (Warbrick et al., 1993), welche sowohl die Häutung als auch die Reproduktion der Würmer kontrolliert. Weitere Analysen ergaben, dass alle Gene zur Synthese von Nukleotiden im *Wolbachien*-Genom vorhanden sind. Sie könnten somit als mögliche Bezugsquelle für die Würmer während der Embryogenese dienen. Der durch die Depletion der *Wolbachien* entstandene Verlust dieser Metabolite würde eine Blockade der Embryogenese und die Sterilität erklären (Pfarr and Hoerauf, 2005).

1.8 Depletion der *Wolbachien* als neues Therapiekonzept

Eine Reduktion der Ausbreitung von Filarioseninfektionen konnte trotz großflächig angelegter Massenbehandlungsstrategien der WHO mit Ivermectin und DEC kombiniert mit Albendazol leider noch nicht erzielt werden. Dies mag einerseits damit zusammenhängen, dass Ivermectin und DEC ihre Wirkung nur auf die bereits entwickelten Mikrofilarien entfalten, und andererseits der zusätzliche makrofilarizide Effekt von DEC nur sehr gering ausgeprägt ist. Weiterhin ist ein Behandlungszeitraum von mehreren Jahren erforderlich (Plaisier and Habbema., 1997), um einen adäquaten Therapieerfolg zu gewährleisten. Auf Grund dieser Begebenheiten wurde in den letzten Jahren die Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten intensiviert.

Bereits wenige Jahre nach der Entdeckung der intrazellulär lebenden Bakterien wurde die Hypothese etabliert, dass diese Gegenstand und Ziel neuartiger therapeutischer Möglichkeiten sein können (McLaren et al., 1975; Kozek, 1977; Kozek and Marroquin, 1977). Jedoch erst nach der Einführung von Tiermodellen in die Filarienforschung Anfang der 90er Jahre fand man heraus, dass die Gabe von Tetracyclin als therapeutische Maßnahme bei infizierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Wurmlast führte (Bosshardt et al., 1993).

Hinweise darauf, dass dieser Effekt auf der Depletion der Endobakterien beruht, ergaben sich erst nach der Identifizierung der Bakterien als *Wolbachien* (Sironi et al., 1995) und der Sequenzierung und Klonierung einzelner bakterieller Gene (Bandi et al., 1998; Henkle-Duhrsen et al., 1998). Eine Depletion von *Wolbachien* in den nagetierpathogenen *D. immitis* und *B. pahangi* konnte durch die kontinuierliche Gabe von Antibiotika erzielt werden (Bandi et al., 1999). Weitere Versuche mit *Litomosoides sigmodontis* im Nagetiermodell (Hoerauf et al., 1999; Hoerauf et al., 2000) zeigten, dass auf Grund der *Wolbachien*-Depletion die Entwicklung der Würmer von der infektiösen L3-Larve zu adulten Würmern inhibiert wurde. Weiterhin wurde die Fertilität der

erwachsenen Würmer und damit verbunden ihre Fähigkeit zur Produktion von Mikrofilarien aufgehoben. Ähnliche Resultate wie die Hemmung der Embryogenese und der Nachweis der Wurmsterilität wurden auch im Nagetiermodell mit Rifampicin erzielt (Townson et al., 2000; Volkmann et al., 2003).

Bei einer sechswöchigen Behandlung von mit *O. volvulus* infizierten Patienten mit 100 mg Doxycyclin pro Tag konnten diese Effekte ebenfalls im Menschen verifiziert werden (Hoerauf et al., 2003). Durch eine Dosiserhöhung auf 200 mg pro Tag bei einer Therapiedauer von vier bis sechs Wochen konnte weiterhin eine makrofilarizide Wirkung von 50 bis 60 % verzeichnet werden (Hoerauf et al., 2008). Die Behandlung von Patienten mit Lymphatischer Filariose über einen Zeitraum von vier und sechs Wochen führte zu einer Reduktion der adulten Würmer um 80 bis 90 % (Hoerauf, 2006). Außerdem konnte eine Abnahme der Lymphgefäß- und der Hydrozelendilatation gezeigt und der Progress der bestehenden Lymphödeme blockiert werden (Hoerauf et al., 2008; Debrah et al., 2009).

Neuste Studien mit *O. volvulus* infizierten Patienten zeigten, dass eine vier Wochen andauernde Therapie mit einer Gabe von 10 mg/kg Rifampicin pro Tag ebenfalls die Wurmentwicklung und die Mikrofilarienproduktion signifikant hemmt, wobei der Effekt im Vergleich zu der Wirkung von Doxycyclin weniger ausgeprägt ist (Specht et al., 2008).

1.9 Aufbau und Biosynthese der bakteriellen Zellwand

Zum Schutz gegen den inneren osmotischen Druck werden fast alle Bakterien durch ein spezielles Stützgerüst, das Peptidoglykan, stabilisiert. Dieses Stützgerüst, das auch als Murein bezeichnet wird, ist ein Polymer von Lipid II, welches sich auf der Außenseite der Zytoplasmamembran befindet. Es besteht aus geraden, unverzweigten Ketten mit alternierend β -1,4-glykosidisch verknüpften Untereinheiten von N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Diese Glykanketten werden über Peptidbrücken quervernetzt.

Die Biosynthese des Peptidoglykans ist ein komplexer Prozess, der sowohl im Zytoplasma als auch im Periplasma stattfindet und sich in mehrere Abschnitte gliedert. Zunächst wird im Zytoplasm durch die Aktivität der sechs Enzyme MurA bis MurF das Vorläufermolekül UDP-N-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid gebildet (*Grafik 1*), welches, katalysiert durch das Enzym MraY, mit dem Trägermolekül Undecaprenylpyrophosphat verbunden wird. Das entstandene Molekül wird als Lipid I bezeichnet.

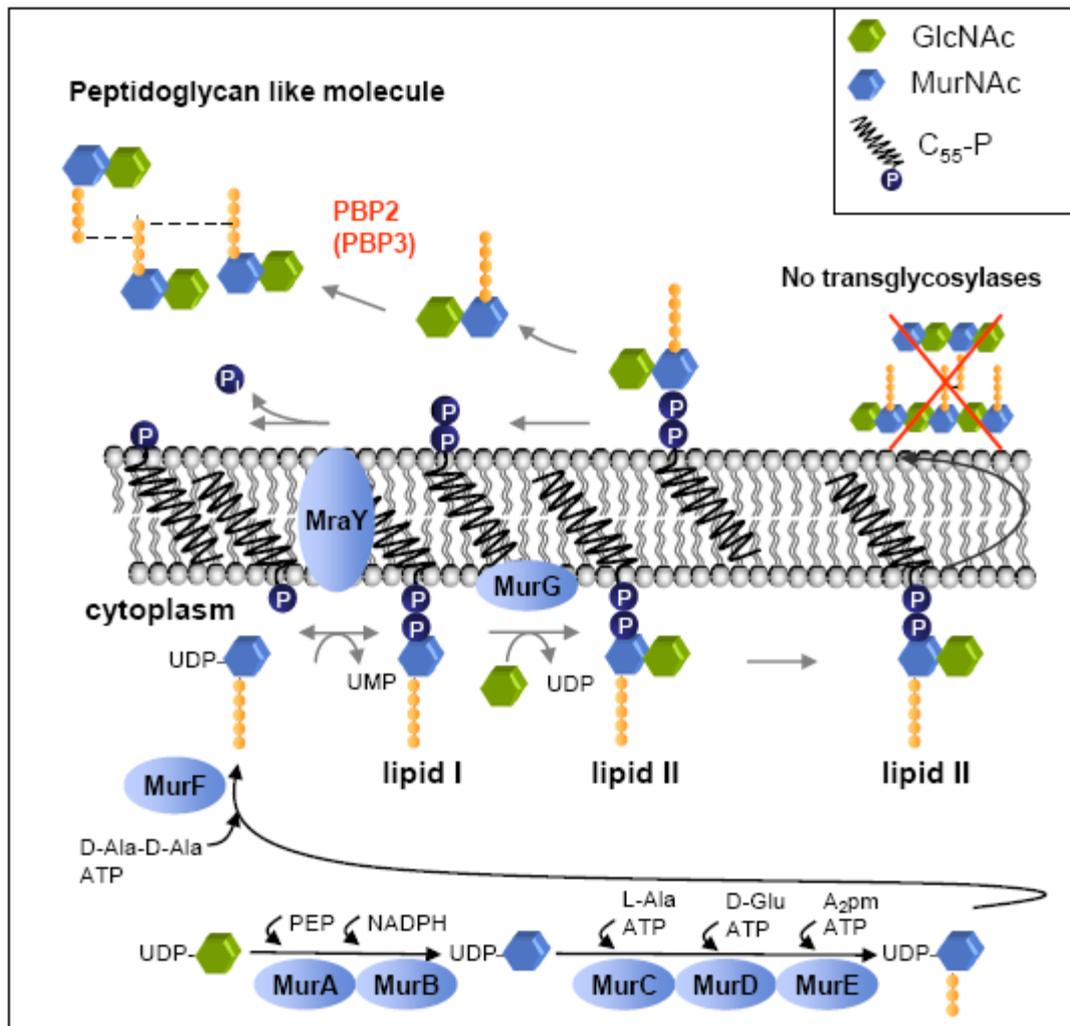
Der nächste durch das Enzym MurG katalysierte Schritt beinhaltet die Verknüpfung von Lipid I mit UDP-N-Acetylglukosamin, wodurch das Disaccharid-Pentapeptid Lipid II gebildet wird. Nach dem Transport über die Zytoplasmamembran wird das Disaccharid-Pentapeptid durch die Aktivität von Transglykosylase- und Transpeptidasereaktionen in die wachsende Peptidoglykankette aufgenommen (van Heijenoort, 2001) (*siehe Grafik 1*).

Analysen des Genoms von *Wolbachien* in *B. malayi* zeigten, dass alle Gene zur Bildung von Lipid II vorhanden sind, jedoch jene für die Alanin- und Glutamatracemase fehlen. Diese zwei Enzyme katalysieren die Reaktionen zur Synthese von D-Alanin und D-Glutamat, welche Bestandteile des Peptidendes von Lipid II sind (Foster et al., 2005).

Da die einzige im Genom von *Wolbachien* vorhandene Aminosäureracemase die Mesodiaminopimelate Epimerase ist, ist anzunehmen, dass entweder das Peptidoglykan der *Wolbachien* L-Isomere beinhaltet, oder dass die Konversion von Alanin und Glutamat von der Epimerase selbst katalysiert wird (Foster et al., 2005).

Weiterhin ist zu erwähnen, dass weder *Wolbachien* von *D. melanogaster* (*wMel*) noch *Wolbachien* von *B. malayi* (*wBm*) Gene für bifunktionale Transpeptidasen/ Transglykosylasen besitzen, die für die Quervernetzung der Glykanuntereinheiten im Mureinsacculus verantwortlich sind. Es sind jedoch Gene zu finden, die für die zwei monofunktionalen Transpeptidasen PBP2 und PBP3 kodieren. Diese Transpeptidasen sind Penicillin-Bindende-Proteine (PBPs), die normalerweise die Verbindung von zwei Pentapeptiden über Peptidbrücken katalysieren. Orthologe Gene zu PBP2 sind sowohl in dem Genom von *wMel* und *wBm* zu finden, wohingegen PBP3 nur bei *wMel* zu finden ist.

Auf Grund dieser Informationen ist anzunehmen, dass *Wolbachien* eine Zellwandstruktur ohne Glykan, ähnlich der Chlamydienzellwand, aufweisen (Ghuysen and Goffin, 1999), wobei das Peptidoglykan vermutlich über Peptidbrücken quervernetzt ist.



Grafik 1: Bakterielle Zellwandbiosynthese (modifiziert nach einer Grafik von Dr. Tanja Schneider, Universität Bonn)

1.10 Die Zellwandbiosynthese als Ziel antibiotischer Therapie

Wolbachien spielen eine herausragende Rolle in der Pathogenese von Filarieninfektionen (Debrah et al., 2006; Turner et al., 2006; Debrah et al., 2009). Tiefgreifendere Erkenntnisse über ihre mutualistische Lebensweise in Filarien und ihren molekularbiologischen Aufbau würden den Boden für neue Behandlungsmöglichkeiten ebnet.

Im Zuge dessen stellt die Zellwandbiosynthese von *Wolbachien* mit einem Fokus auf die Synthese von Lipid II ein sehr interessantes und vielversprechendes Ziel für neuartige antibiotische Therapien dar. Das bakterizid wirkende Antibiotikum Fosfomycin, hemmt das

Enzym MurA, welches eine frühe Reaktion zur Synthese von Lipid II katalysiert. D-Cycloserin, ein Antibiotikum, das unter anderem bei der Zweitlinientherapie von Tuberkulose eingesetzt wird, ist ein Inhibitor der D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase, und somit ebenfalls ein Enzym, das an der Synthese von Lipid II beteiligt ist. Die Analyse des Einflusses dieser Antibiotika auf die Zellwandbiosynthese und die *Wolbachien*-Depletion sind unter anderem Gegenstand dieser Dissertation.

1.11 Wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte an Hand eines *in vitro* Antibiotika-Assays mit *Wolbachien*-infizierten Insektenzelllinien von *Aedes albopictus* (Aa23 und C6/36) der Effekt verschiedener Antibiotika auf die mutmaßliche Zellwandbiosynthese von *Wolbachien* untersucht werden. Dadurch sollten einerseits neue Erkenntnisse über die Wichtigkeit von Lipid II im Prozess der Zellwandbiosynthese gewonnen und andererseits der Einfluss dieser Antibiotika auf eine *Wolbachien*-Depletion analysiert werden.

Des Weiteren sollten die *in vitro* als aktiv befundenen Antibiotika *in vivo* im *L. sigmodontis* Mausmodell auf ihre Antifilarienwirkung weiterführend untersucht werden.

Auf diese Weise sollte eine Grundlage für weitere alternative Behandlungsmöglichkeiten gegen Filarieninfektionen geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

In dieser Arbeit wurden für die Experimente *Sigmodon hispidus* Ratten, Balb/c Mäuse und *Ornithonyssus bacoti* Milben verwendet, die in der Tierzuchteinrichtung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie der Universität Bonn gezüchtet wurden.

2.1.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit Zelllinien von *Aedes albopictus* gearbeitet, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. C6/36 Zellen stammen von den Larven von *Aedes albopictus* ab und sind naturgemäß nicht mit *Wolbachien* infiziert. Die Infektion dieser Zellen kann jedoch auf einfache Art und Weise mit *Wolbachien* der Zelllinie Aa23 erzielt werden, die naturgemäß *Wolbachia pipientis* enthalten (O'Neill et al., 1997). Diese Zelllinie leitet sich ursprünglich von Eiern von Aa23 ab.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Aa23	natürlich infiziert mit <i>Wolbachia pipientis</i>	M. Taylor, Liverpool School of Tropical Medicine, UK
C6/36	infiziert mit <i>W. pipientis</i>	M. Taylor, Liverpool School of Tropical Medicine, UK
C6/36	nicht infiziert mit <i>W. pipientis</i>	M. Taylor, Liverpool School of Tropical Medicine, UK

Tab. 1: In dieser Tabelle sind die für die Versuche verwendeten Zelllinien von *A. albopictus* gezeigt.

2.1.3 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Gebrauch von verschiedenen Plasmiden gemacht. Angegeben sind sie in Tabelle 2.

Rekombinantes Plasmid	Vektor	Größe	Marker	Insert	Herkunft
pBP AS 5	TopoTA	4047 bp	Amp ^R	WAa23-FtsZ	Dr. Schiefer
pBP AS 6	TopoTA	4051 bp	Amp ^R	Aa23-Actin	Dr. Schiefer

Tab. 2: Zu sehen ist die genotypische Darstellung der Vektoren und der rekombinanten Plasmide

2.1.4 Primer

In dieser Arbeit wurden verschiedene Primer (Tab. 3) zur Amplifikation und Quantifizierung von Genen mittels Real-Time PCR verwendet. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Operon.

Gen	Forward	Reverse
<i>Ls-FtsZ</i>	5'-CGATGAGATTATGGAACATATAA-3'	5'-TTGCAATTACTGGTGCTGC-3'
<i>β-actin</i>	5'-ACGAACTGGGACGATATGGA-3'	5'-GCCTCTGTCAGGAGAACTGG-3'
<i>wPip-16srRNA</i>	5'-TTGCTATTAGATGAGCCTATATT-3'	5'-GTGTGGCTGATCATCCTCT-3'
<i>wPip-FtsZ</i>	5'-ACTAAGGGACTTGGTGCTGGT-3'	5'-ACTCTATTCGCCGCAGCAT-3'

Tab. 3: Dargestellt sind die für die Real-Time PCR verwendeten Primer

2.1.5 Antibiotika

In Tabelle 4 sind die Antibiotika unter Angabe der Hersteller angegeben, von denen in dieser Arbeit für die *in vitro* und *in vivo* Experimente Gebrauch gemacht wurde.

Antibiotikum	Hersteller
D-Cycloserin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Fosfomycin	Infectopharm, Heppenheim, Germany
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany

Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Tigecyclin	Wyeth Pharmaceuticals, Hampshire, UK

Tab. 4: Die für die Experimente benötigten Antibiotika sind in Tabelle 4 angegeben.

2.1.6 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
HotStar Taq polymerase	Qiagen, Hilden, Germany
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Tab. 5: In dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 5 dargestellten Enzymen gearbeitet.

2.1.7 Anästhetika

2.1.7.1 Langzeitanästhetika

Für die Durchführung einer Langzeitnarkose zur Infektion der Balb/c Mäuse mit *L. sigmodontis* wurde von den in Tabelle 6 genannten Anästhetika Gebrauch gemacht. Pro Maus wurde dabei eine Injektionsdosis von 50 μ l bestehend aus 40 μ l Rompun und 10 μ l Ketanest gewählt, die intramuskulär injiziert wurde.

Komponenten	Konzentration	Hersteller
<u>Rompun</u> Kylazinhydrochlorid Methyl-4-hydroxybenzoat	23,32 mg/ml 1,5 mg/ml	Bayer, Leverkusen, Deutschland
<u>Ketanest</u> Esketaminhydrochlorid	25 mg/ml	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 6: Die in dieser Arbeit verwendeten Langzeitanästhetika sind in der oben dargestellten Tabelle gezeigt.

2.1.7.2 Kurzzeitanästhetika

Zur Tötung der Tiere für die nachfolgende Extraktion der *L. sigmodontis* Würmer wurde das Kurzzeitanästhetikum Isofluran verwendet.

2.1.8 Nährmedien

In den Tabellen 7 und 8 sind die Nährmedien für Aa23 und C6/36 Zellen angegeben. Diese Angaben beziehen sich auf ein Volumen von einem Liter.

Komponenten	Konzentration	Hersteller
Schneider´s Drosophila Medium	45 % (v/v)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Mitsubishi-Marmorosch Medium	45 % (v/v)	PromoCell, bioscience alive, Heidelberg
Fetales Kalbserum (FCS)	10 % (v/v)	PAA laboratories, Pasching, Österreich
L-Glutamin	0,18 % (v/v)	PAA laboratories,
Penicillin	100 IU/ml	PAA laboratories,
Streptomycin	100 µl/ml	PAA laboratories,

Tab. 7: Die zur Kultivierung der Aa23-Zellen verwendeten Komponenten sind in Tabelle 7 angegeben.

Komponenten	Konzentration	Hersteller
Leibovitz´s L15 Medium mit 2 mM L-Glutamin	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kalbserum (FCS)	5 %	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Tryptose Phosphat	2 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Nicht-essentielle Aminosäuren	1 %	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin	100 IU/ml	PAA laboratories,
Streptomycin	100 µl/ml	PAA laboratories,

Tab. 8: Die zur Kultivierung der C6/36-Zellen verwendeten Komponenten sind in Tabelle 8 gezeigt.

2.1.9 Puffer und Lösungen

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Blockpuffer: 5 % Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Giemsalösung: Azur-Eosin-Blau Puffertabletten pH 7,2 Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (0,63 g/l) KH ₂ PO ₄ (0,31 g/l)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit:	Qiagen, Hilden, Germany HotStar Taq DNA Polymerase 5 mM MgCl ₂ dNTPMix ROX QuantiTect SYBR Green PCR Puffer
Paraformaldehyd (2 %) (Verdünnt bei 56 °C mit 1xPBS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphat buffered saline (PBS) 20x: NaCl (160 g/l) Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (23,6 g/l) KH ₂ PO ₄ (4 g/l) KCl (4 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Waschpuffer: 0,05 % Tween 20 in Tris-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Permeabilisierungspuffer: 0,25 % Triton-X Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit: Puffer AW1 (Waschpuffer) Puffer AW2 (Waschpuffer) Puffer AL (Lysispuffer) Puffer ATL (Lysispuffer) Puffer AE (Elutionspuffer) Proteinkinase K	Qiagen, Hilden, Germany (ohne Angaben) (ohne Angaben) (ohne Angaben) (ohne Angaben) (ohne Angaben) Qiagen, Hilden, Germany

Tab. 9: In Tabelle 9 sind die eingesetzten Puffer und Lösungen angegeben.

2.1.10 Chemikalien und sonstige Materialien

Chemikalien	Hersteller
1-Bromo-3-chloropropan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Evan's Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	Dako Corporation, CA, USA
Hepes (1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat (0,1 M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (0,8 mM)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SYBR Green	Roche, Mannheim, Deutschland
TRIzol reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
24-Well-Platten	Greiner, Bio-One cellstar, Deutschland
Spritzen	B. Braun Melsungen, Deutschland
Zellschaber	Costar, Corning inc., USA

Tab. 10: Die für die Durchführung der Experimente benötigten Chemikalien und sonstigen Materialien sind in Tabelle 10 angegeben.

2.1.11 Geräte

Geräte	Hersteller
RG-3000, Real time-Thermocycler	Corbett Research, Sydney, Australien
Eppendorf biophotometer, Photometer	Eppendorf, Deutschland
HLC HBT-1 131, Blockthermostat	Progen Scientific Ltd, Mexborough, England
Heraeus Multifuge 4 KR, Multifugezentrifuge	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Universal 32 R, Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Diavert, Lichtmikroskop	Leitz, Deutschland
Hera Cell 240, Brutschrank	Haereus Instruments, Deutschland
Herasafe, Sterilbank	Haereus Instruments, Deutschland

Tab. 11: In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit benutzten Geräte unter Angabe der Hersteller aufgelistet.

2.1.12 Statistische Analyse

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede wurde der Student's t-Test für normal verteilte und der Mann-Whitney U Test für nicht normal verteilte Parameter angewendet. Ein Unterschied galt als signifikant bei einem $P < 0,05$.

Durchgeführt wurden diese Analysen mit GraphPad Prism version 4.03 für Windows, GraphPad Software, San Diego Kalifornien, USA.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1.1 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist im Wesentlichen eine Weiterentwicklung der PCR zur Amplifikation und Quantifizierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen. Durch Zugabe eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes kann dabei die Amplifikation während der PCR sichtbar gemacht werden. Weiterhin ist die Menge der Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR Produkts. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit kommt das Fluorophor SYBR-Green zum Einsatz, das sein Exzitations- und Emissionsmaximum bei 494 nm und 521 nm hat.

Durch die Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes Ct (Threshold-Cycle) können die Produkte quantifiziert werden. Der Ct-Wert gibt hierbei den Zyklus in der PCR an, bei dem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant übersteigt.

Die Quantifizierung erfolgte nach dem Prinzip der absoluten Quantifizierung. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass bekannte DNA/RNA-Konzentrationen in die PCR eingesetzt werden und mit den daraus resultierenden Ct-Werten eine Standardkurve erstellt wird. Die Template-Konzentration der unbekannt Probe lässt sich dann anhand ihres Ct-Wertes absolut quantifizieren.

Real-Time PCR zum Nachweis von LsFtsZ

Die Real-Time PCR wurde mit einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, welches die in Tabelle 12 angegebenen Komponenten enthielt. Die Reaktionsbedingungen waren festgesetzt auf 15 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen von 15 s bei 94 °C und 30 s bei 58 °C. Die Fluoreszenz wurde in Schritt 2 bei einer Temperatur von 58 °C gemessen.

Komponente	LsFtsZ
10x Puffer	1
MgCl ₂ (25 mM)	1,2
dNTPs (40 mM)	0,05
Primer-Fw (10 pmol/µl)	0,3
Primer-Rev (10 pmol/µl)	0,3
HybeProbe (5 µM)	0,1
Taq (Hotstar)	0,05
DNA	2
Water	5

Tab. 12: Für die Real-Time PCR wurde der oben gezeigte Ansatz verwendet (Angaben in µl).

Real-Time PCR zum Nachweis von Actin und 16srRNA bei C6/36-Zellen

Die Real-Time PCR wurde mit einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, welches die in Tabelle 13 angegebenen Komponenten enthielt. Die Reaktionsbedingungen waren festgesetzt auf 15 min bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 10 s bei 95 °C, 15 s bei 55 °C und 20 s bei 72 °C. Die Fluoreszenz wurde in Schritt 3 bei einer Temperatur von 72 °C gemessen.

Komponente	TopoTA-WAa23-Actin	TopoTA-WAa23-16srRNA
10x Puffer	2	2
MgCl ₂ (25 mM)	0,4	1,2
dNTPs (40 mM)	0,1	0,1
Primer-Fw (10 pmol/µl)	0,6	1
Primer-Rev (10 pmol/µl)	0,6	1
Sybr Green	0,2	0,2

Taq (Hotstar)	0,1	0,1
DNA	2	2
Water	14	12,4

Tab. 13: Für die Real-Time PCR wurde der oben gezeigte Ansatz verwendet (Angaben in μl).

Real-Time PCR zum Nachweis von Actin und FtsZ bei Aa23-Zellen

Die Real-Time PCR wurde mit einem 10 μl Reaktionsvolumen durchgeführt, welches die in Tabelle 14 angegebenen Komponenten enthielt. Die Reaktionsbedingungen für TopoTA-WAa23-FtsZ waren festgesetzt auf 15 min bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 10 s bei 95 °C, 15 s bei 58 °C und 20 s bei 72 °C. Für TopoTA-WAa23-Actin waren die Reaktionsbedingungen festgesetzt auf 15 min bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen von 10 s bei 95 °C, 15 s bei 58 °C und 20 s bei 72°C. Die Fluoreszenz wurde in Schritt 3 bei einer Temperatur von 72°C gemessen.

Komponente	TopoTA-WAa23-Actin	TopoTA-WAa23-FtsZ
10x Puffer	1	1
MgCl ₂ (25 mM)	0,2	0,6
dNTPs (40 mM)	0,05	0,05
Primer-Fw (10 pmol/ μl)	0,3	0,5
Primer-Rev (10 pmol/ μl)	0,3	0,5
Sybr Green	0,1	0,1
Taq (Hotstar)	0,05	0,05
DNA	2	2
Water	6	5,2

Tab. 14: Für die Real-Time PCR wurde der oben gezeigte Ansatz verwendet (Angaben in μl).

2.2.1.2 DNA-Extraktion von *L. sigmodontis*

Die DNA-Extraktion aus *L. sigmodontis* wurde gemäß dem Tissue Protokoll des QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 02/2003 durchgeführt. Als

Änderung zum Protokoll wurden die Würmer bei 56 °C über Nacht inkubiert und die DNA eines Wurmes in 200 ml AE-Puffer gelöst.

2.2.1.3 DNA-Extraktion von Aa23 und C6/36-Zellen

Die im Folgenden angeführten Angaben beziehen sich auf eine abgenommene Probe (0,5 ml) eines Wells mit Aa23 oder C6/36-Zellen.

Die Präparation genomischer DNA wurde wie folgt durchgeführt: Nach dem Auftauen wurde zu den in 1 ml TRIzol gelösten Aa23 oder C6/36 Zellen 0,1 ml 1-Bromo-3-chloropropan gegeben, 15 s invertiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde bei 4 °C 15 min zur Trennung der einzelnen Phasen zentrifugiert (12.000 g). Die obere der drei entstandenen Phasen, welche die RNA enthielt, wurde zur späteren Präparation abgenommen und bei -20 °C tiefgefroren.

Zur mittleren und unteren Phase, in welcher sowohl Proteine als auch die DNA gelöst waren, wurden zur Präzipitation der DNA 0,3 ml Ethanol (100 %) gegeben. Nach Invertieren, einer Inkubation von 3 min und erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C und 2000 g wurde der Überstand verworfen. Schließlich wurde 1 ml in 10 %igem Ethanol gelösten 0,1 M Natriumcitrat hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt. Zu den Proben wurde dann 1,5 ml Ethanol (75 %) hinzugegeben und nach einer erneuten Inkubation von 15 min abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nachdem die DNA für 15 min getrocknet wurde, wurde sie in 200 µl 8 mM NaOH resuspendiert und mit 6,4 µl 1 M HEPES vermengt. Im Anschluss folgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur.

Das sich anschließende Vorgehen zur DNA-Präparation richtete sich nach den Angaben im QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Mini Kit 02/2003 („Protocol for crude cell lysates“).

2.2.2 Methoden der Zellbiologie

2.2.2.1 Giemsa-Färbung

Mehrere Tropfen der Aa23 oder C6/36 Zellsuspension eines Wells aus dem Antibiotika-Assay wurden auf einem acht-kammrigen Objektträger gegeben und über Nacht bei 26 °C inkubiert. Nachdem der Überstand am nächsten Tag abgenommen und verworfen wurde, wurden die adhärennten Zellen getrocknet und mit Methanol (100 %) fünf Minuten lang fixiert. Die Giemsa-

lösung wurde hergestellt aus 1 ml Giemsa-Azur-Eosin-Blau und 20 ml Pufferlösung, pH: 7.2 (siehe Tab. 9). Die Objektträger wurden 10 min in die Giemsalösung gegeben, mit Leitungswasser gewaschen und an der Luft getrocknet und eingedeckelt. Daraufhin wurden die Zellen mit einem 100x Immersionsobjektiv auf eventuelle Veränderungen oder Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe hin untersucht.

2.2.2.2 Aa23 und C6/36-Zellkultur

Die Aa23 und C6/36-Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen mit 15 ml des entsprechenden Mediums (siehe Tab. 7 und 8) bei 26 °C inkubiert. Zur Herstellung von Subkulturen wurden die adhärennten Zellen alle fünf bis sieben Tage mit einem Zellschaber entfernt und im Verhältnis 1:6 geteilt. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden auf 15 ml mit frisch angesetztem Medium aufgefüllt und jeweils in neue 75 cm²-Kulturflaschen gegeben und bebrütet.

2.2.2.3 Antibiotika-Assay für Aa23 und C6/36 Zellen

Mit der Anwesenheit von *W. pipientis* in den Zelllinien von Aa23 und C6/36 und der Möglichkeit der einfachen Kultivierung stellen diese ein adäquates *in vitro* Modell zur Erforschung der Wirkung von Antibiotika auf *W. pipientis* dar (Hermans et al., 2001; Townson et al., 2006; Fallon, 2008). In verschiedenen Studien zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass eine sieben und vierzehn Tage andauernde Behandlung der Zellen mit Doxycyclin zu einer signifikanten Reduktion der *Wolbachien* führte.

Zur Analyse des *Wolbachien* Gehalts wurden die Änderungen der bakteriellen 16srRNA und des Actins des Wirtes durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) gemessen (Makepeace et al., 2006).

Nachdem die Zellen mit einem Zellschaber geerntet wurden, wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer Zellzählkammer gegeben, gezählt und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. 0.5 ml dieser Zellsuspension wurde nun in jedes Well einer 24-Well-Mikrotiter-Platte gegeben (2×10^5 Zellen/Well). Nach zwei weiteren Tagen der Inkubation bei 26°C waren die Zellen adhärennt, und das Experiment konnte mit Tag 0 begonnen werden. In dem Antibiotika-Assay sollten verschiedene Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber *Wolbachien* über einen Zeitraum von 21 Tagen untersucht werden.

Am Tag 0 wurde das Medium der Proben durch 0,5 ml frisch angesetztes Medium, Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) als Positivkontrolle und der Medium-Antibiotikamischung erneuert. Dabei wurden die Konzentrationen 1, 8, 32, 64 und 128 µg/ml für die Antibiotika D-Cycloserin und Fosfomycin verwendet. Danach wurden die Proben für Tag 0 durch langsames auf- und abpipetieren geerntet und in 1.5 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Im Anschluss daran wurde jedes Well mikroskopisch auf vollständige Entfernung der Zellen überprüft. Die einzelnen Proben wurden bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml TRIzol resuspendiert und zur späteren DNA-Extraktion bei -80 °C eingefroren.

Über die gesamte Dauer des Antibiotika-Assays wurde das Medium täglich durch frisch angesetztes Medium oder entsprechender Medium-Antibiotikamischung in den jeweiligen Konzentrationen erneuert. An den Tagen 7, 14 und 21 wurden nach der bereits für Tag 0 beschriebenen Methode Proben gewonnen.

Während der gesamten Dauer des Experiments wurden die 24-Well-Mikrotiter-Platten mit Parafilm verschlossen bei 26 °C inkubiert. Für die unterschiedlichen Konzentrationen wurde für die einzelnen Tage 0, 7, 14, 21 jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 *L. sigmodontis* Infektion im Mausmodell

Als Nagetierfilarie gehört *L. sigmodontis* zur Familie der *Onchocercidae* und weist daher viele Gemeinsamkeiten mit humanpathogenen Filarien auf, wie z.B. Genomstruktur und Larvenmigration (Xie et al., 1994). Sie ist die einzige Filarie, die sich in Balb/c-Mäusen von der infektiösen L3-Larve zu einem adulten Wurm entwickelt, der Mikrofilarien produzieren kann (Petit et al., 1992). Daher können alle Entwicklungsstadien der Filarien im *L. sigmodontis* Mausmodell untersucht werden. Verbunden mit der Tatsache, dass *L. sigmodontis* Endobakterien der Gattung *Wolbachia* beherbergt, bildet dies die Grundlage zur Erforschung des Einflusses bestimmter Antibiotika auf die unterschiedlichen Larvenstadien bzw. deren Endobakterien.

Als natürlicher Endwirt fungiert für *L. sigmodontis* die Baumwollratte (*Sigmodon hispidis*), in welcher bei bestehender Infektion bis zu 10.000 Mikrofilarien pro Milliliter Blut gefunden werden können. Milben (*Ornithonyssus bacoti*), die als obligater Zwischenwirt dienen, können während eines Blutmahls von einer infizierten Ratte Mikrofilarien aufnehmen.

Diese durchdringen die Darmwand der Milbe und migrieren von dort in die Thoraxmuskulatur, wo sie sich innerhalb von etwa zehn Tagen in die L3-Larve entwickeln. Dabei durchlaufen sie zwei Häutungen. Während einer darauf folgenden Blutmahlzeit wandert die für die Endwirte infektiöse L3-Larve aktiv über die Mundwerkzeuge in den Stichkanal. Im Endwirt migrieren sie über das lymphatische Gewebe zum Herzen und von dort weiter über das Blutgefäßsystem und die Lunge in die Pleurahöhle (Marechal et al., 1996). Nach einer Zeitspanne von ungefähr zehn Tagen befinden sich etwa 90 % der Larven in der Pleurahöhle, wo sie sich zu der intermediären L4-Larve weiterentwickelt haben. Das adulte Stadium haben die Würmer nach 25 bis 33 Tagen erreicht.

Die weiblichen erwachsenen Würmer produzieren nun unzählige Mikrofilarien, die ab Tag 50 nach der Infektion im peripheren Blut zirkulieren und detektiert werden können. Mit der durch inflammatorische Zellen induzierten Einkapselung der Würmer endet die Infektion.

Für die Neuinfektion von Baumwollratten wurden *O. bacoti* Milben durch ein Blutmahl an einer infizierten Ratte mit *L. sigmodontis* infiziert und daraufhin bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit für 14 Tage in mit Streu gefüllten Glasstutzen inkubiert.

Die für die *in vivo* Experimente zu infizierenden Mäuse konnten in Folge den Milben ausgesetzt werden, die durch das Blutmahl L3-Larven übertrugen.

2.2.3.2 *In vivo*-Screening im *L. sigmodontis* Modell

Verschiedene Antibiotika sollten *in vivo* auf ihre Wirksamkeit gegenüber *L. sigmodontis* und den *Wolbachien* nach dem folgenden Schema getestet werden:

5-6 Mäuse Kontrollgruppe, unbehandelt

5-6 Mäuse Goldstandard, 50 mg/kg/Tag Doxycyclin über 2 Wochen

4-10 Mäuse mit Antibiotikum X, über 1, 2 Wochen

4-10 Mäuse mit Antibiotikum Y, über 1, 2, 4 Wochen bzw. 10 Tage

Die Balb/c-Mäuse wurden auf natürlichem Weg mit Hilfe von infizierten Milben mit Mikrofilarien infiziert. Die Milbeninfektion wurde standardisiert überprüft, indem zehn Milben auf ihre L3-Larvenanzahl pro Milbe, auf die Gesamtmenge der infizierten Milben und auf die L3-Larvenmotilität (gute, langsame und keine Motilität) überprüft wurden.

Zur Infektion der Balb/c-Mäuse wurden entsprechend nur Milben verwendet, die eine Infektionsrate von mindestens 60 % mit zwei oder mehr gut beweglichen Larven aufweisen. Die Mäuse wurden mit einer Mischung aus Ketamin und Rompun narkotisiert und über Nacht zu den Milben gegeben.

Am darauf folgenden Tag wurden die Mäuse von den Milben, die sich nach dem Blutmahl von den Mäusen abgelöst hatten, separiert und die Behandlung mit den Antibiotika entsprechend den Vorgaben zur Dosierung begonnen. Die Injektionen erfolgten dabei täglich je nach Antibiotikum intraperitoneal oder mit Hilfe einer Sonde oral.

An Tag 35 nach der Infektion wurden die Mäuse getötet, und die Würmer mit 1 ml PBS aus der Pleurahöhle gespült. Daraufhin wurden die Würmer gezählt und auf ihre Motilität hin überprüft (beweglich, nicht beweglich).

Zur Auswertung wurden verschiedene Parameter untersucht. So wurde zum einen die Länge der Würmer getrennt nach ihrem Geschlecht ermittelt. Zum anderen wurde überprüft, ob die behandelten Würmer sich gehäutet hatten oder nicht. Im Anschluss an die morphologische Auswertung wurden zehn Würmer pro Maus zur späteren DNA-Extraktion und Quantifizierung ihres *Wolbachien* Gehalts tiefgefroren. Die verbleibenden Würmer wurden in Formalin aufbewahrt.

Untersuchungsschwerpunkte dieser Testreihen waren signifikante Unterschiede der Wurmlänge im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe sowie signifikante Mengenunterschiede des Gehalts an *Wolbachien*-DNA.

In den *in vivo* Experimenten eins bis drei wurde der hemmende Effekt einer intraperitonealen und oralen D-Cycloserin Behandlung bzw. der Einfluss Tigecyclins auf die Inhibierung der *Wolbachien*-Proliferation ermittelt.

Spezieller Aufbau *in vivo* Experiment 1:

6 Mäuse Kontrollgruppe, unbehandelt

6 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.

10 Mäuse D-Cycloserin (300 mg/kg/Tag) über 2 Wochen oral

Spezieller Aufbau *in vivo* Experiment 2:

- 6 Mäuse Kontrollgruppe, unbehandelt
- 6 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 6 Mäuse Tigecyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 6 Mäuse D-Cycloserin (300 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 6 Mäuse D-Cycloserin (300 mg/kg/Tag) über 4 Wochen oral

Spezieller Aufbau *in vivo* Experiment 3:

- 5 Mäuse Kontrollgruppe, unbehandelt
- 5 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 5 Mäuse Tigecyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 5 Mäuse D-Cycloserin (300 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 5 Mäuse D-Cycloserin (300 mg/kg/Tag) über 4 Wochen i.p.

Im vierten *in vivo* Experiment wurde die Wirkung einer verkürzten Behandlungsdauer von Tigecyclin bzw. Doxycyclin/Rifampicin auf die Depletion der *Wolbachien* überprüft.

Spezieller Aufbau *in vivo* Experiment 4:

- 5 Mäuse Kontrollgruppe, unbehandelt
- 5 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 1 Woche i.p.
- 5 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 10 Tage i.p.
- 5 Mäuse Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) über 2 Wochen i.p.
- 5 Mäuse Tigecyclin (50 mg/kg/Tag) über 1 Woche i.p.
- 5 Mäuse Tigecyclin (50 mg/kg/Tag) über 10 Tage i.p.
- 4 Mäuse Doxycyclin/Rifampicin (40mg/kg/Tag Rifampicin,
50 mg/kg/Tag Doxycyclin) über 7 Tage i.p.
- 4 Mäuse Fosfomycin (500 mg/kg/Tag) über 2 Wochen oral
- 4 Mäuse Fosfomycin (500 mg/kg/Tag) über 4 Wochen oral

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Antibiotika-Assay mit *Wolbachien*-infizierten Aa23 und C6/36 Zellen

In dieser Arbeit wurde der Effekt verschiedener Antibiotika, die Schlüsselenzyme der Biosynthese von Lipid II inhibieren, auf die *Wolbachien* in den Insektenzelllinien Aa23 und C6/36 untersucht. Das Ausmaß der Reduktion der *Wolbachien* wurde dabei durch Real-Time PCR-Untersuchungen (qPCR) quantifiziert. Durchgeführt wurden die Experimente in Form eines Antibiotika-Assays.

3.1.1 Die Behandlung von *Wolbachien*-infizierten Aa23 Zellen mit D-Cycloserin

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die natürlich mit *Wolbachien* infizierte Insektenzelllinie Aa23 verwendet. Die Zellen wurden dabei für insgesamt 21 Tage *in vitro* mit dem Antibiotikum D-Cycloserin behandelt, wobei unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden (1, 8, 32 und 128 mg/l). D-Cycloserin hemmt dabei das Enzym D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase, ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von Lipid II.

Die Versuche ergaben, dass tendenziell bei einigen Experimenten eine leichte, jedoch nicht signifikante Hemmung des *Wolbachien*-Wachstums durch D-Cycloserin beobachtet werden konnte. Weiterführende Analysen der Aa23 Zellreihe ergaben aber, dass die Infektionsrate innerhalb dieser Zelllinie zu uneinheitlich war um auswertbare Ergebnisse zu generieren. Daher bediente man sich für weitere Experimente der Zelllinie C6/36, die nach intensiver Prüfung eine konstante Infektionsrate aufwies.

3.1.2 Behandlung von C6/36 Insektenzellen mit D-Cycloserin

Wie zuvor die Aa23 Zellen wurden die *Wolbachien*-infizierten C6/36 Zellen ebenfalls über einen Zeitraum von 21 Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen D-Cycloserin (1, 8, 32 und 128 mg/l) behandelt, wobei Tetracyclin 10 mg/l erneut als Positivkontrolle verwendet wurde.

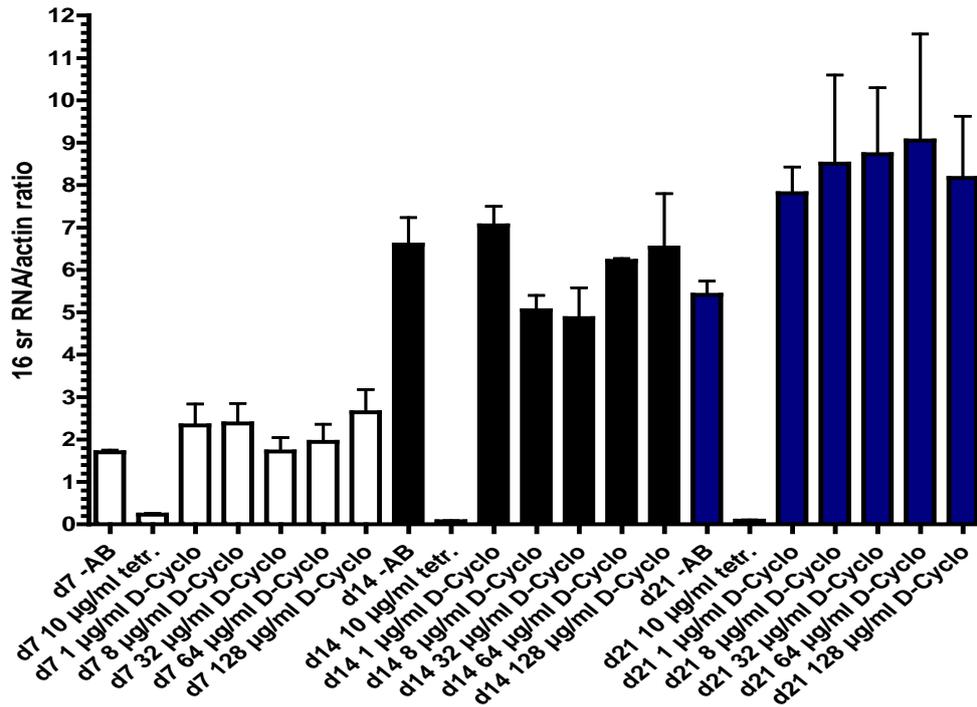


Abb. 1: Effekt von D-Cycloserin auf das *Wolbachien*-Wachstum *in vitro*. Die C6/36 Zellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen mit dem Antibiotikum in den Konzentrationen 1, 8, 32 und 128 mg/l behandelt. Als Postitivkontrolle wurden mit 10 mg/l Tetracyclin behandelte Zellen, als Negativkontrolle unbehandelte Zellen verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der *Wolbachien* in den C6/36 Insektenzellen durch D-Cycloserin nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 21 Tagen nicht gehemmt wurde (Abb. 1). Dieser Effekt zeichnete sich sowohl in den niedrigen (1 und 8 mg/l) als auch in den höheren Konzentrationen (32 und 128 mg/l) ab.

Der dabei zuvor auf Grund der Ergebnisse in der Aa23 Zelllinie angenommene hemmende Effekt des D-Cycloserins auf das *Wolbachien*-Wachstum konnte dabei nicht bestätigt werden.

3.1.3 Die Behandlung von *Wolbachien*-infizierten C6/36 Zellen mit Fosfomycin

Um herauszufinden, ob die Biosynthese von Lipid II essentiell für *Wolbachien* ist, wurde die Wirksamkeit von Fosfomycin, welches das Enzym MurA hemmt, analysiert. MurA katalysiert den ersten Schritt in der Synthese des UDP-MurNAc-Pentapeptids (*Grafik 1*).

Die *Wolbachien*-infizierten C6/36 Zellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen Fosfomycin (1, 8, 32 und 128 mg/l) behandelt, wobei Tetracyclin 10 mg/l als Positivkontrolle verwendet wurde.

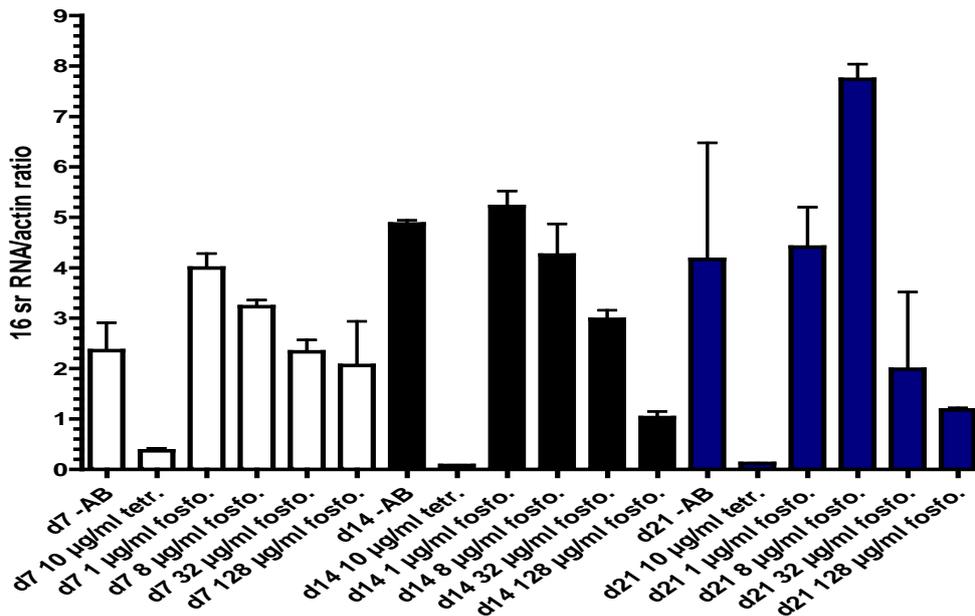


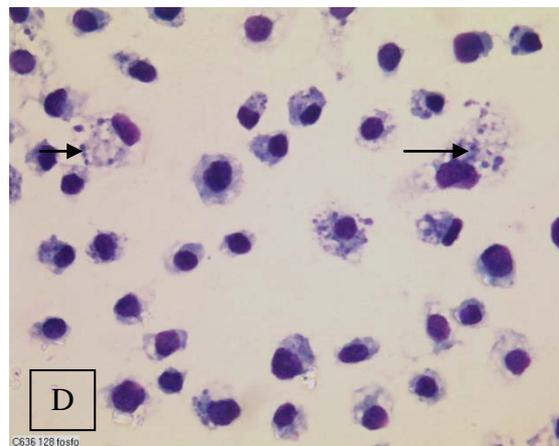
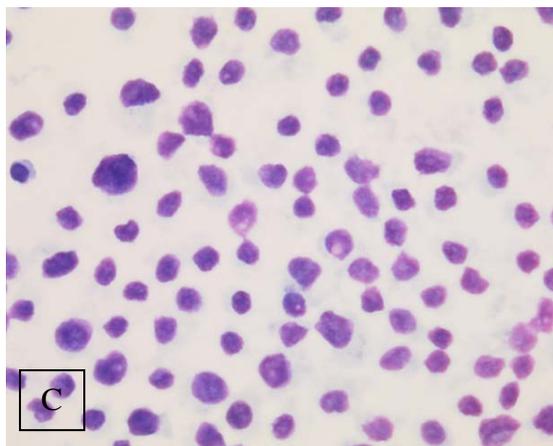
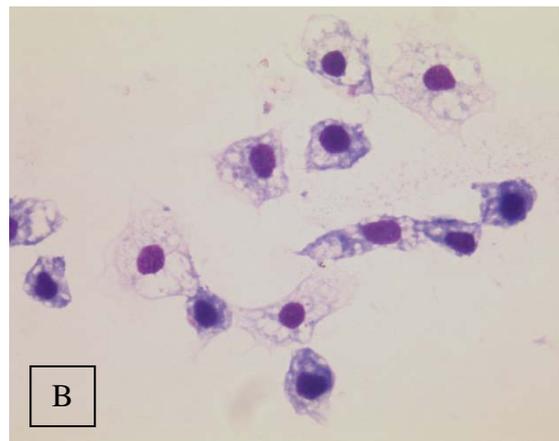
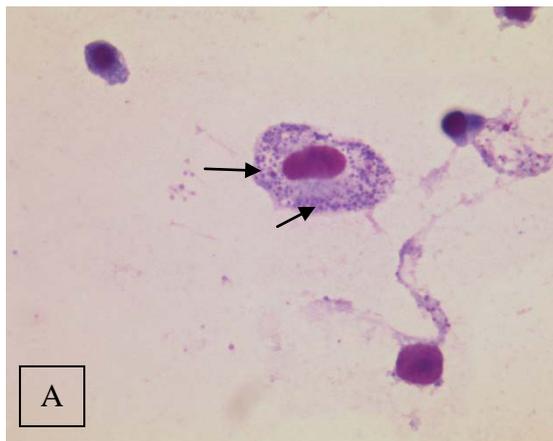
Abb. 2: Empfindlichkeit von *Wolbachien* gegenüber Fosfomycin *in vitro*. Die C6/36 Zellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen mit dem Antibiotikum in den Konzentrationen 1, 8, 32 und 128 mg/l behandelt. Als Positivkontrolle wurden mit 10 mg/l Tetracyclin behandelte Zellen, als Negativkontrolle unbehandelte Zellen verwendet.

Es zeigte sich, dass in den höheren Konzentrationen (32 und 128 mg/l) das *Wolbachien*-Wachstum inhibiert wurde, während sich in den niedrigen (1 und 8 mg/l) kein hemmender Effekt einstellte (Abb. 2). Diese Tendenz konnte bereits an Tag 14 der Behandlung verzeichnet werden. Insgesamt konnte an Tag 21 der Behandlung bei einer Konzentration von 128 mg/l eine Reduktion der medianen 16srRNA/actin ratio von 4,16 in der unbehandelten Kontrollgruppe auf 1,18 gesehen werden. Verglichen mit der *Wolbachien*-Depletion durch die Positivkontrolle mit

Tetracyclin ist diese Wirkung jedoch geringer ausgeprägt (mediane 16srRNA/actin ratio 0,11). Auf Grund dieses Ergebnisses, dass Fosfomycin aktiv das Wachstum der *Wolbachien in vitro* hemmt, ist davon auszugehen, dass die Synthese von Lipid II essentiell für die Endobakterien ist.

3.2 Untersuchung von Fosfomycin und D-Cycloserin behandelten C6/36 Zellen mittels Giemsa-Färbung

Um die Reduktion der *Wolbachien*-Menge in C6/36 Zellen durch Fosfomycin auch visuell darstellen zu können, wurde die Giemsa-Färbung verwendet. Als Kontrollgruppe wurden erneut mit 10 mg/l Tetracyclin behandelte Zellen herangezogen (Abb. 3C).



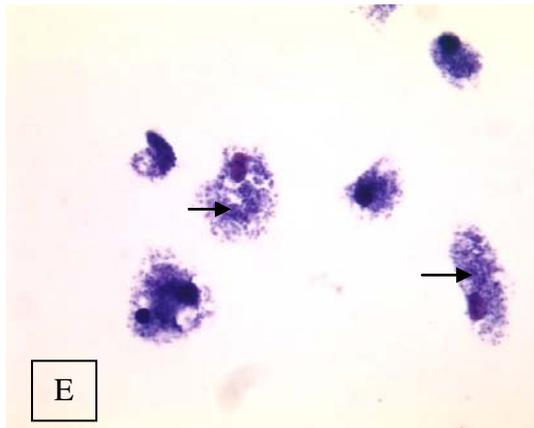


Abb. 3: C6/36-Zellen angefärbt mit der Giemsa-Färbung; A: *Wolbachien*-positive C6/36 Zellen; B: *Wolbachien*-negative C6/36 Zellen; C: C6/36 Zellen behandelt mit 10 µg/ml Tetracyclin (d21); D: C6/36 Zellen nach Behandlung mit 128 µg/ml Fosfomycin (d21); E: C6/36 Zellen behandelt mit 32 µg/ml D-Cycloserin (d21), (—→ *Wolbachien*)

In Abbildung 3A sind zum Vergleich unbehandelte *Wolbachien*-positive C6/36 Zellen dargestellt, in Abbildung 3B *Wolbachien*-negative Zellen. Abbildung 3D zeigt *Wolbachien*-depletierte C6/36 Zellen nach einer 21-tägigen Behandlung mit 128 µg/ml Fosfomycin, wodurch auch die bereits in der qPCR erzielten Ergebnisse bestätigt werden (vergleiche Abb. 2). Die in der Abbildung 3E dargestellten C6/36 Zellen, die über einen Zeitraum von 21 Tagen mit 32 µg/ml D-Cycloserin behandelt wurden, zeigen hingegen keine Verminderung des *Wolbachien*-Gehalts. Auch dieses Ergebnis unterstreicht die in der qPCR erzielten Resultate (vergleiche Abb. 1).

3.3 *In vivo* Untersuchungen mit der Filarie *Litomosoides sigmodontis* im Mausmodell

In den folgenden Untersuchungen wurde die Wirksamkeit unterschiedlicher Antibiotika auf die *Wolbachien* in den Filarien der Spezies *Litomosoides sigmodontis* in infizierten Balb/c Mäusen *in vivo* analysiert. Da sich in den Balb/c-Mäusen die Filarien von *L. sigmodontis* von der infektiösen L3-Larve zum adulten Wurm entwickeln (Petit et al., 1992), bietet dieses Tiermodell die Möglichkeit, den Einfluss der Antibiotika auf die Wurmentwicklung zu untersuchen (Hoerauf et al., 1999; Hoerauf et al., 2000). Zur Überprüfung des Erfolges der Antibiotikatherapie wurde die quantitative Bestimmung des *Wolbachien* LsFtsZ Gens pro Wurm mittels qPCR herangezogen. Neben D-Cycloserin und Fosfomycin wurden zum einen Tigecyclin und Doxycyclin getestet,

welche beide zur Gruppe der Tetracycline gehören. Daher besitzen sie grundsätzlich denselben Wirkmechanismus. Ein Unterschied liegt jedoch darin, dass Tigecyclin mit einer fünffach höheren Affinität an den Ribosomen bindet als Doxycyclin. Zum anderen wurde die Wirksamkeit von Rifampicin in Kombination mit Doxycyclin untersucht, um eventuelle Vorteile dieser Zweifachtherapie, wie zum Beispiel eine Verkürzung der Behandlungsdauer gegenüber einer Doxycyclin-Monotherapie, zu spezifizieren.

3.3.1 Behandlung von *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen mit Tigecyclin

Zunächst wurden die *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäuse mit dem Antibiotikum Tigecyclin über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt, wobei Tigecyclin täglich in einer Konzentration von 50 mg/kg/Tag intraperitoneal appliziert wurde. Die nach diesem Zeitraum aus den Mäusen entnommenen weiblichen Filarien wurden vermessen und nach der DNA-Isolation mittels qPCR untersucht.

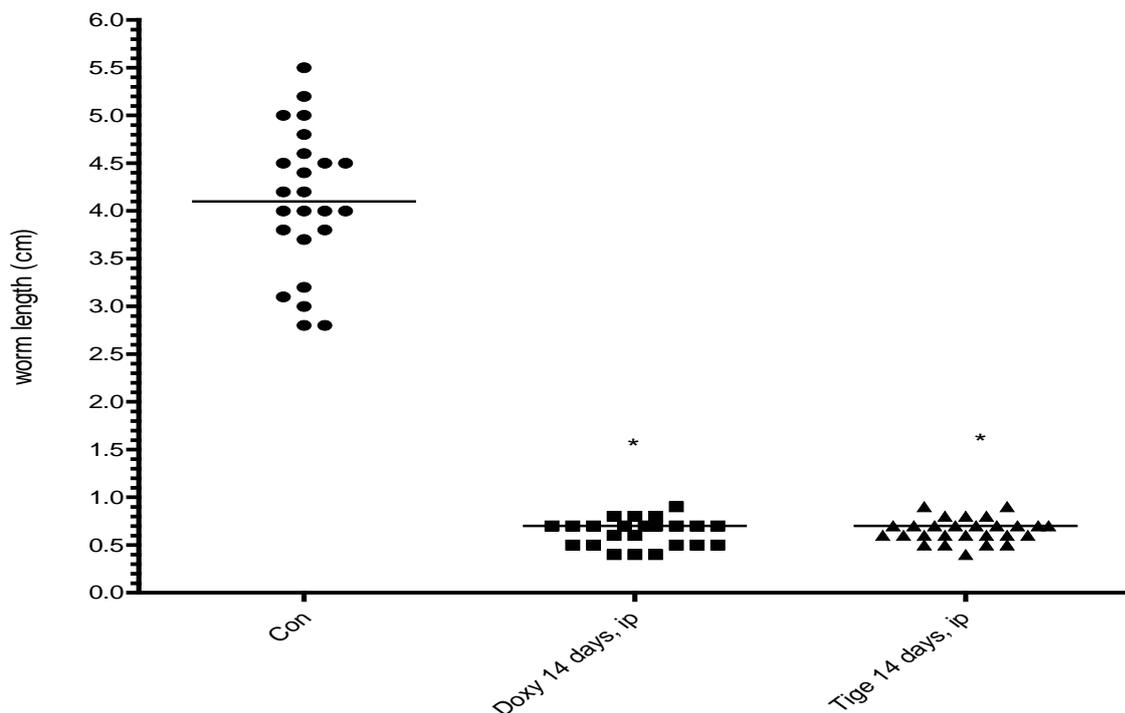


Abb. 4: Wurmlänge nach intraperitonealer Behandlung mit 50 mg/kg/Tag Tigecyclin in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. *= $P < 0.05$

In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Tigecyclin zu einer Einschränkung der Filarienentwicklung und zu einer signifikanten Reduktion des Längenwachstums führt. Die Kontrollgruppe zeigte hierbei eine mediane Wurmlänge von 4,1 cm, die Tigecyclingruppe eine Länge von 0,7 cm. Die erzielten Werte waren darüber hinaus vergleichbar mit den Kontrollwerten der Doxycyclin-Gruppe (mediane Wurmlänge 0,7cm) (Abb. 4).

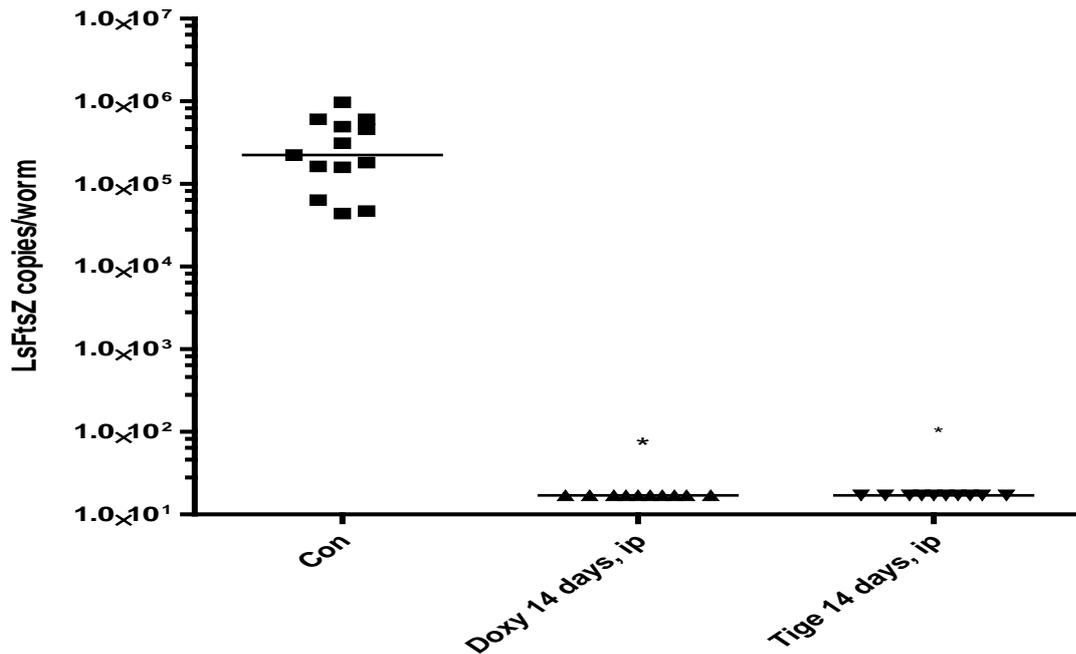


Abb. 5: LsFtsZ-Konzentration nach intraperitonealer Behandlung mit 50 mg/kg/Tag Tigecyclin in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. $^* = P < 0.05$

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die 14-tägige Behandlung der Balb/c-Mäuse mit Tigecyclin zu einer signifikanten Reduktion der LsFtsZ-Konzentration in den weiblichen Filarien führte. Dabei kam es zu einer Abnahme der *Wolbachien*-Menge um bis zu 4 Log-Stufen. Die erzielten Ergebnisse waren hierbei ebenfalls vergleichbar mit der Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 5).

3.3.2 Wirkung einer verkürzten Behandlungsdauer mit Tigecyclin auf *L. sigmodontis*-infizierte Balb/c-Mäuse

Bei den nachfolgend dargestellten Experimenten wurde die Wirkung eines auf 7 bzw. 10 Tagen verkürzten Behandlungszeitraumes mit 50 mg/kg/Tag Tigecyclin auf das Längenwachstum von *L. sigmodontis* und die *Wolbachien*-Menge überprüft.

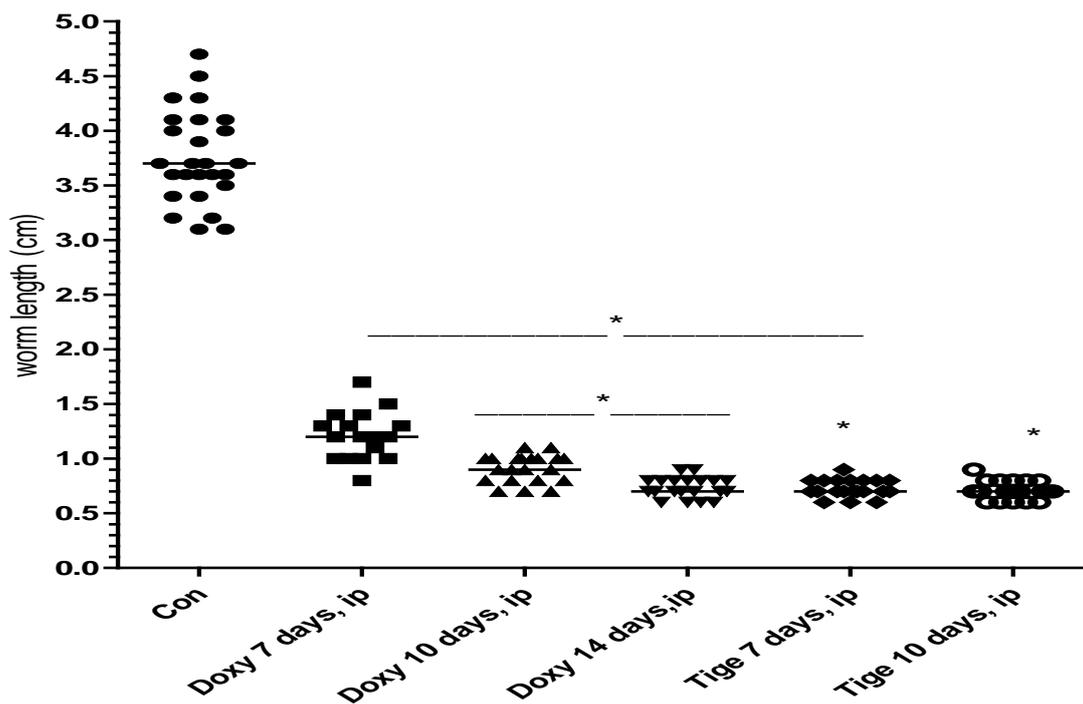


Abb. 6: Längenwachstums nach intraperitonealer Tigecyclinbehandlung (50 mg/kg/Tag) und Doxycyclinbehandlung (50 mg/kg/Tag) in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 7, 10 bzw. 14 Tagen. Als Negativkontrolle (Con) wurden unbehandelte Mäuse verwendet. *= $P < 0.05$

Es konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung der Behandlungsdauer mit Tigecyclin von 14 auf 7 bzw. 10 Tage zu einer signifikanten Verminderung des medianen Längenwachstums in den weiblichen Filarien von in der Kontrollgruppe erreichten 3,7 cm auf 0,7 cm führte. Diese Unterschiede waren ebenfalls signifikant zu den erzielten Ergebnissen der Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe d7 (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass sich der hemmende Effekt des Tigecyclins bereits 7 Tage früher abzeichnet verglichen zu Doxycyclin. Ab

Tag 10 der Behandlung zeigt sich dann eine Reduktion der *Wolbachien*-Konzentration auf ein vergleichbares Niveau zur Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe.

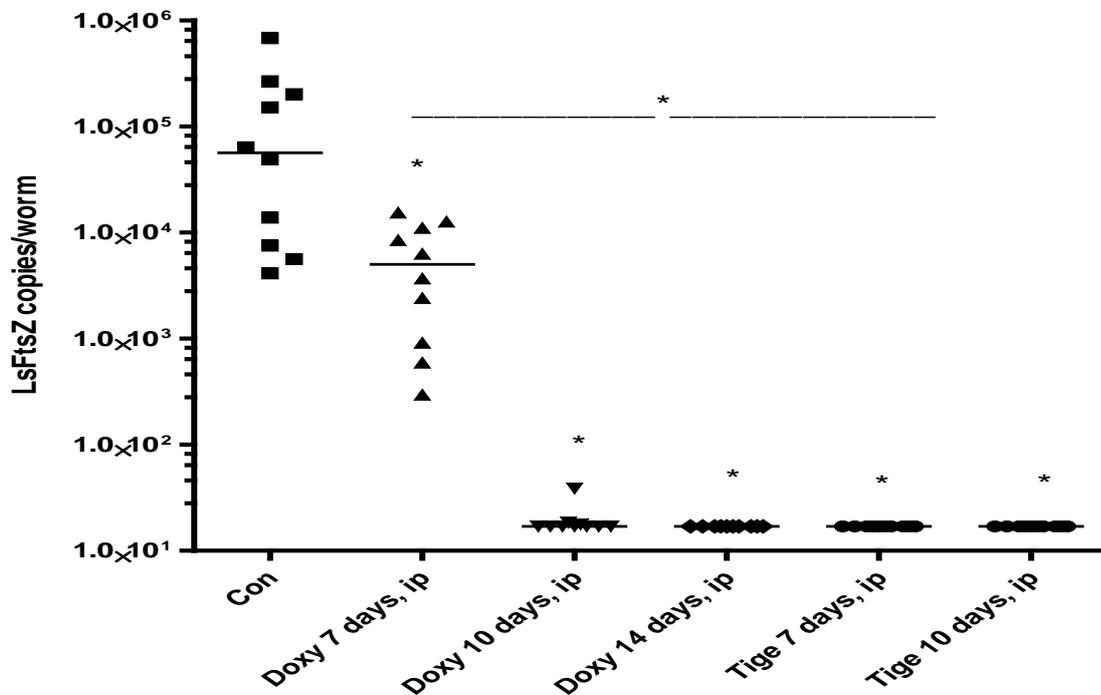


Abb. 7: LsFtsZ-Konzentration nach intraperitonealer Behandlung mit 50 mg/kg/Tag Tigecyclin bzw. 50 mg/kg/Tag Doxycyclin in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über eine Dauer von 7, 10 bzw. 14 Tagen. Als Negativkontrolle (Con) wurden unbehandelte Mäuse verwendet. *= $P < 0.05$

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch diese Verkürzung der Behandlungsdauer ebenfalls eine signifikante Hemmung der *Wolbachien*-Proliferation um bis zu 3 Log-Stufen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erzielt werden kann. Darüber hinaus konnte weiterhin eine signifikante Reduktion der LsFtsZ-Konzentration der Tigecyclin-behandelten Gruppen d7 und d10 um bis zu 2 Log-Stufen verglichen zur Doxycyclin-behandelten Gruppe d7 nachgewiesen werden (Abb. 7).

3.3.3 Behandlung von *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen mit Rifampicin und Doxycyclin

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Antibiotikakombination Doxycyclin und Rifampicin auf die Hemmung des *Wolbachien*-Wachstums untersucht. Die *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäuse wurden dabei täglich intraperitoneal mit 50 mg/kg/Tag Doxycyclin und 40 mg/kg/Tag Rifampicin über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt.

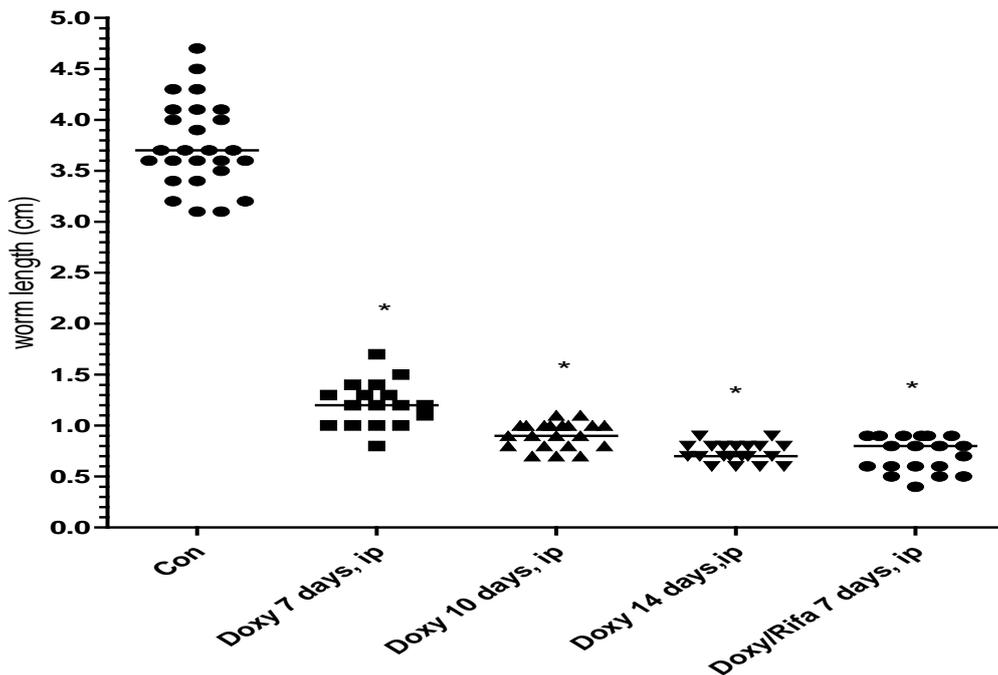


Abb. 8: Längenwachstum nach intraperitonealer Doxycyclin/Rifampicinbehandlung (50 mg/kg/Tag Doxycyclin, 40 mg/kg/Tag Rifampicin) bzw. Doxycyclin-Monotherapie (50 mg/kg/Tag) über einen Zeitraum von 7, 10, bzw. 14 Tagen in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. *=P<0.05

Die Ergebnisse der Messungen ergaben hierbei, dass diese Kombinationstherapie zu einer signifikanten Reduktion des medianen Längenwachstums der weiblichen Filarien führte. Dabei konnte eine Verminderung auf 0,8 cm von 3,7 cm in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Hemmung des medianen Längenwachstums erreichte ferner ein vergleichbares Niveau wie das der Versuchsgruppen Doxycyclin d14 (0,7 cm), Doxycyclin d10 (0,9 cm) und Doxycyclin d7 (1,2 cm) (Abb. 8).

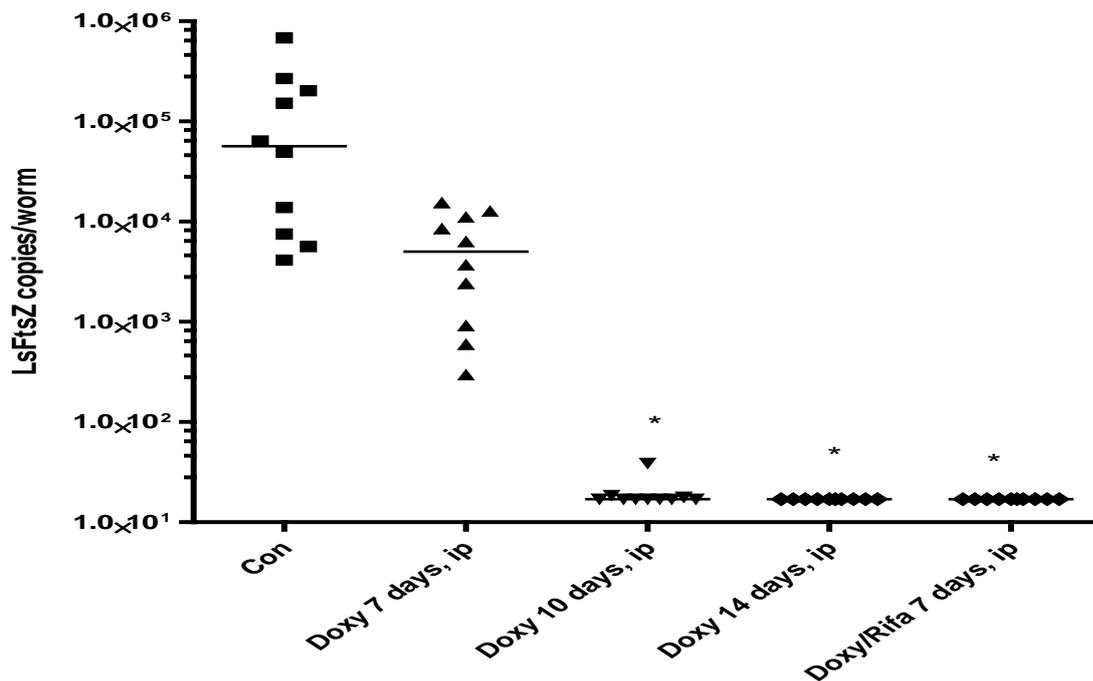


Abb. 9: LsFtsZ-Konzentration nach intraperitonealer Doxycyclin/Rifampicinbehandlung (40 mg/kg/Tag Rifampicin, 50 mg/kg/Tag Doxycyclin) bzw. Doxycyclin-Monotherapie (50 mg/kg/Tag) über einen Zeitraum von 7, 10, bzw. 14 Tagen in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Mäuse verwendet. $*=P<0.05$

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch diese Kombinationsbehandlung auch eine Reduktion der LsFtsZ-Konzentration erzielt werden konnte. Dabei konnte eine Abnahme der *Wolbachien*-Menge um bis zu 4 Log-Stufen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verzeichnet werden. Die erzielten Werte waren darüber hinaus ebenfalls zur Doxycyclin-Gruppe d7 signifikant vermindert (Abb. 9).

3.3.4 Wirkung von D-Cycloserin und Fosfomycin auf *L. sigmodontis*-infizierte Balb/c-Mäuse

Um die Wirksamkeit der bereits *in vitro* getesteten Antibiotika D-Cycloserin und Fosfomycin auch *in vivo* zu überprüfen (vergleiche Abb. 1 und 2), wurden *L. sigmodontis*-infizierte Balb/c-Mäuse mit diesen Medikamenten über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen oral bzw. intraperitoneal behandelt. Für D-Cycloserin wurde dabei eine Konzentration von 300 mg/kg/Tag und für Fosfomycin 500 mg/kg/Tag gewählt.

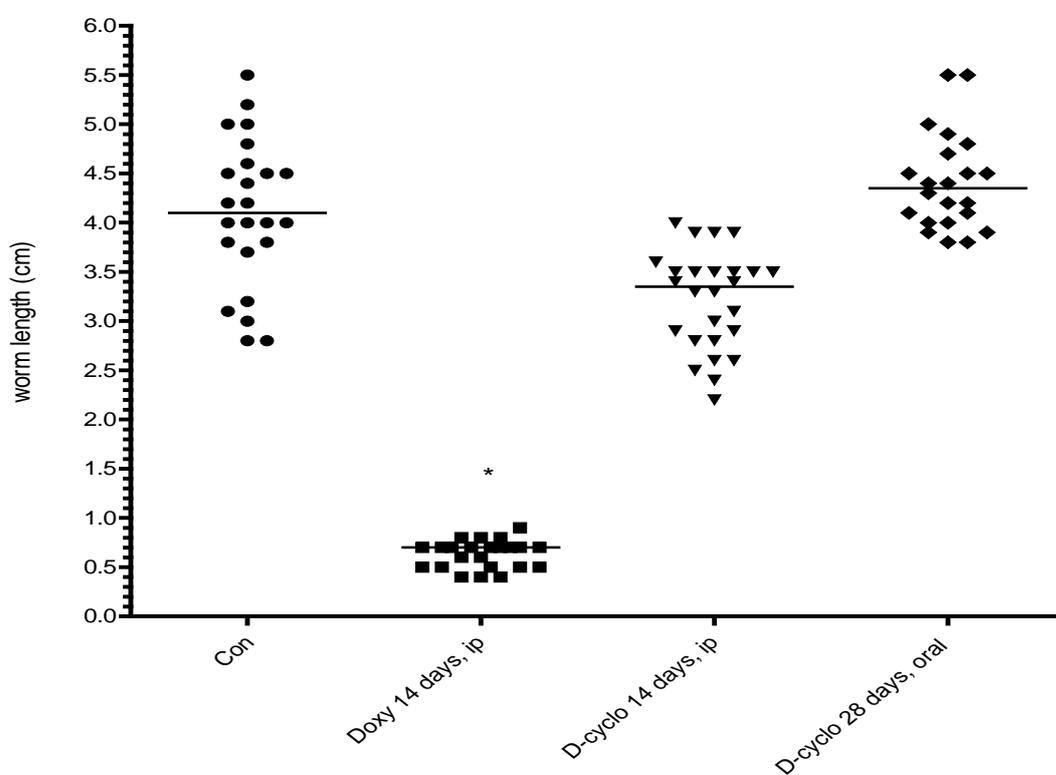


Abb. 10: Wurmlänge nach einer intraperitonealen bzw. oralen Behandlung mit 300 mg/kg/Tag D-Cycloserin in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. *=P<0.05

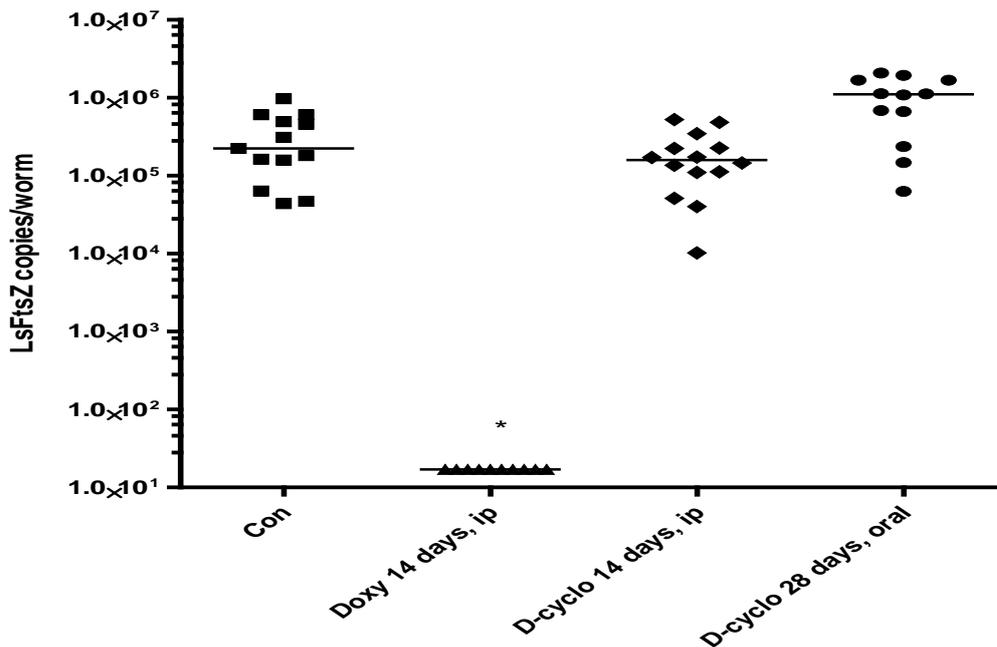


Abb. 11: LsFtsZ-Konzentration nach einer intraperitonealen bzw. oralen Behandlung mit 300 mg/kg/Tag D-Cycloserin in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. *=P<0.05

Die durchgeführten Experimente konnten den auf Grund der *in vitro* Ergebnisse angenommenen hemmenden Effekt des D-Cycloserins bei den *in vivo* nicht bestätigen. Sowohl bei der intraperitonealen Behandlung von 14 Tagen als auch bei der Verlängerung der Therapiedauer auf 28 Tage konnte kein inhibierender Einfluss auf die LsFtsZ-Konzentration oder das Längenwachstum der Würmer beobachtet werden. Auch eine orale Applikation des Medikaments für 28 Tage ergab keine signifikanten Unterschiede verglichen zur Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe (Abb. 10 und 11).

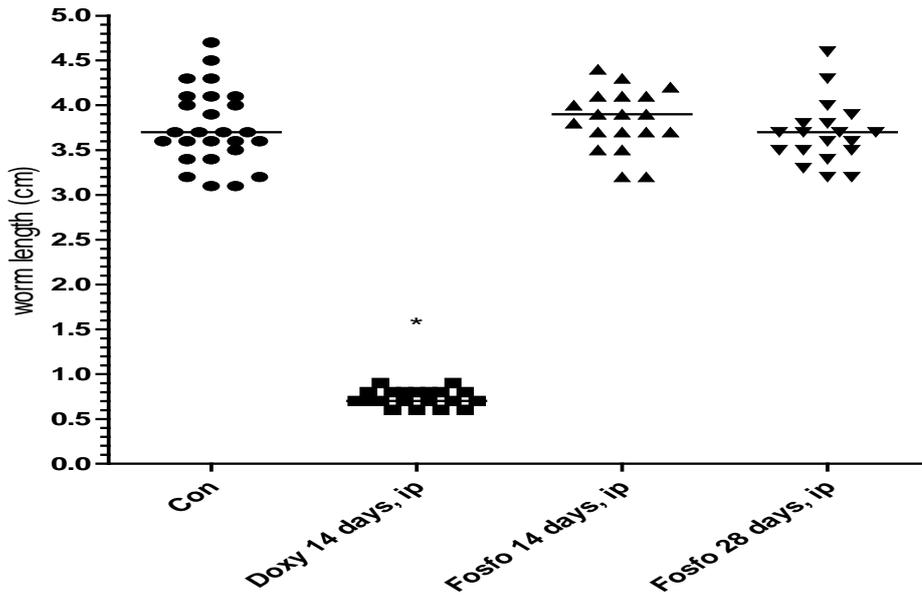


Abb. 12: Wurmlänge nach intraperitonealer Fosfomycinbehandlung (500 mg/kg/Tag) in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über eine Gesamtdauer von 14 bzw 28 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. *= $P < 0.05$

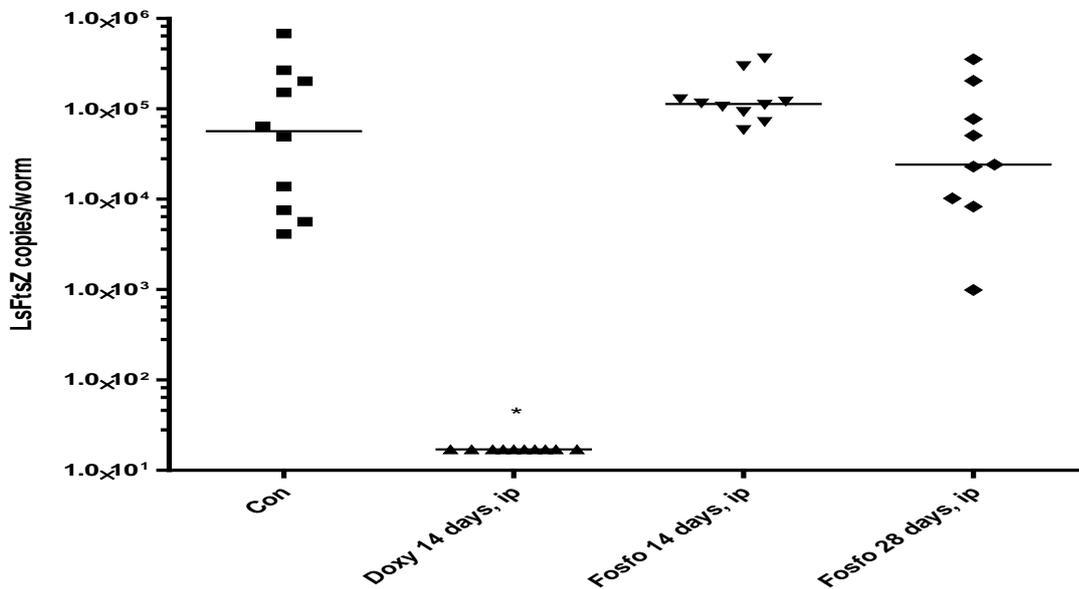


Abb. 13: LsFtsZ-Konzentration nach intraperitonealer Fosfomycinbehandlung (500 mg/kg/Tag) in *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen. Als Positivkontrolle wurden mit Doxycyclin (50 mg/kg/Tag) behandelte, als Negativkontrolle (Con) unbehandelte Mäuse verwendet. *= $P < 0.05$

Der in der Insektenzelllinie C6/36 *in vitro* erzielte hemmende Effekt des Fosfomycins konnte bei den *in vivo* durchgeführten Experimenten ebenfalls nicht wiederholt werden. Es zeigte sich, dass die intraperitoneale Behandlung mit Fosfomycin über einen Zeitraum von 14 bzw. 28 Tagen weder zu einer Verminderung der LsFtsZ-Konzentration noch zu einer Verkürzung des Längenwachstums im Vergleich zur Doxycyclin-behandelten Gruppe führte. Die Werte waren dabei alle vergleichbar mit der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 12 und 13).

4 Diskussion

Filarieninfektionen sind auch heute noch eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in den Tropen (Volkman et al., 2003). Da die zurzeit für die Behandlung zugelassenen Medikamente Ivermectin und Diethylcarbamazin primär mikrofilarizide Wirkung aufweisen und über einen langen Zeitraum gegeben werden müssen, wachsen die Bestrebungen, neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von Infektionen mit Filarien zu finden. Mit der Erkenntnis, dass Filarien Endobakterien der Gattung *Wolbachia* beinhalten, wurde der Weg für eine neuartige Therapiealternative mit Antibiotika geebnet (Taylor et al. 2010). Doxycyclin ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum, das die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt, da es die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstellen der ribosomalen 30 S-Untereinheit verhindert und damit die Verlängerung der Peptidkette unterbindet.

Da es die Proliferation der *Wolbachien* inhibiert, führt es zu einer Blockierung der Embryogenese, Sterilität der weiblichen Filarien und zu Wachstumsdefekten der Larven (Bandi et al., 1999; Hoerauf et al., 1999; Taylor and Hoerauf, 1999). Auf Grund bekannter Kontraindikationen ist es jedoch nicht möglich, die Behandlung mit Doxycyclin auf alle Patientengruppen auszuweiten. Ideale Voraussetzungen für ein neues Antibiotikum, das *Wolbachien* depletiert, wären eine bereits bestehende Registrierung und Zulassung, ein schnellerer Wirkungseintritt als bei Doxycyclin und die Anwendungsmöglichkeit bei Schwangeren und Kindern. Aufgrund des wachsenden Interesses, derartige neue Antibiotika zu finden, ist es notwendig, ein einfaches *in vitro* Modell zur Testung der Medikamente zu etablieren. Da durch phylogenetische Analysen die Verwandtschaft der Filarienendosymbionten und der Arthropoden-*Wolbachien* bewiesen wurde und es bisher noch nicht möglich ist diese zu kultivieren, wurden für die beschriebenen Experimente die *Wolbachien*-infizierten Insektzelllinien Aa23 und C6/36 verwendet. Analysen der mit der Insektzelllinie Aa23 durchgeführten Experimente ergaben jedoch, dass die Infektionsrate mit *Wolbachien* innerhalb dieser Zelllinie zu uneinheitlich war, um verlässliche Resultate zu generieren. Daher wurde für die weiteren Versuchsreihen die Zelllinie C6/36 verwendet, die eine konstante Infektionsrate aufwies.

Die in diesen Antibiotika-Assays gewonnenen Ergebnisse über die Wirksamkeit der Antibiotika D-Cycloserin und Fosfomycin ebneten den Weg für weitere *in vivo* Experimente mit *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen. Außerdem sollten weitere Erkenntnisse über die Zellwandbiosynthese der *Wolbachien* gewonnen werden, um neue Strukturen als Angriffspunkte

für antibiotische Therapien zu definieren. Hierbei war die Biosynthese des Zellwandvorläufermoleküls Lipid II im Fokus, welches vermutlich in *Wolbachien* gebildet wird.

4.1 Die Bedeutung von Lipid II als neue Zielstruktur für eine antibiotische Therapie

Die Adaption pathogenetischer Mikroorganismen an ihren spezifischen Wirt führt zu einer Reduktion der Genomgröße. So können viele für frei lebende Bakterien essentielle Gene in bestimmten Endobakterien nicht detektiert werden (Feldhaar and Gross, 2009). *Wolbachien* zum Beispiel haben die Fähigkeit verloren, bestimmte Aminosäuren, Vitamine und Cofaktoren zu produzieren (Wu et al., 2004; Foster et al., 2005), dieser Verlust macht sie abhängig von ihrem Wirt.

Im Gegensatz dazu wurden Hinweise gefunden, dass *Wolbachien* wichtige Stoffwechselfunktionen ihres Wirtes übernehmen. *Wolbachien* von *B. malayi* besitzen alle zur Synthese von Flavin, Riboflavin und Nukleotiden notwendigen Gene, während im Genom von *B. malayi* die zur Synthese notwendigen Gene fehlen. Somit könnten sie als mögliche Bezugsquelle für ihren Wirt fungieren (Foster et al., 2005). Ein weiteres interessantes Beispiel für die gegenseitige Abhängigkeit von Wirt und Parasit ist das von *Wolbachien* synthetisierte Häm. Da es essentiell für die Synthese von Ecdysteroid-ähnlichen Hormonen ist, die sowohl die Reproduktion als auch die Häutung der Würmer kontrollieren, könnte es eine tragende Rolle in der Embryogenese der Würmer spielen (Warbrick et al., 1993) und somit ebenso wie die Synthese von Lipid II ein potentielles Ziel für eine neue antibiotische Therapie darstellen.

Eine von Wu et al. durchgeführte Studie, welche den hemmenden Einfluss bestimmter Substanzen auf Schlüsselenzyme der Hämbiosynthese von *B. malayi* *Wolbachien* untersuchte, zeigte, dass die Inhibition dieser Enzyme zu einer Reduktion der Wurmmobilität und zu einer Degeneration der Zellstruktur der Würmer führte (Wu et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mitochondriale Gene der häm-abhängigen Atmungskette in *L. sigmodontis* nach Depletion der *Wolbachien* durch Tetracyclin vermehrt exprimiert wurden, wohingegen die *Wolbachien*-freien *Acanthocheilonema viteae* Filarien keine Änderung des Expressionsmusters nach Tetracyclinbehandlung aufwiesen. Dies belegt, dass ohne die Endosymbionten keine häm-abhängigen Enzyme synthetisiert werden, wodurch eine Störung des Energiestoffwechsels bewirkt wird (Strübing et al., 2010). Auch diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit bestimmter für den Stoffwechsel der Würmer essentieller Enzyme als potentielle Ziele für eine Antibiotikatherapie.

Hinsichtlich der Synthese des Zellwandvorläufermoleküls Lipid II weiß man, dass im Genom der *Wolbachien* alle Gene zu dessen Produktion enthalten sind (Foster et al., 2005). Es fehlen jedoch die für bifunktionale Transpeptidasen/Transglykosylasen kodierenden Gene, die die Quervernetzung der Glykanuntereinheiten im Mureinsacculus katalysieren. Des Weiteren besitzen sie Gene für zwei monofunktionale Transpeptidasen PBP2 und PBP3, welche für die Verbindung zweier Pentapeptide mittels Peptidbrücken verantwortlich sind. Weiterhin ist das Gen für die D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase im Genom zu finden. Durch die Aktivität dieses Enzyms kommt es zur Abspaltung des terminalen D-Alanins des Pentapeptids.

Daher ist anzunehmen, dass *Wolbachien* über eine rudimentäre glycanlose Zellwand verfügen (Ghuysen and Goffin, 1999).

Um die Theorie zu festigen, dass Lipid II essentiell für *Wolbachien* ist und somit dessen Synthese als potentielles Ziel neuartiger antibiotischer Therapien dienen kann, wurde das Antibiotikum Fosfomycin verwendet. Es ist ein spezifischer Inhibitor des Enzyms MurA, welches einen frühen Schritt in der Biosynthese des Lipid II katalysiert. Die hierbei erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung *Wolbachien*-infizierter C6/36 Zellen *in vitro* mit Fosfomycin in höheren Konzentrationen (32 mg/l und 128 mg/l) signifikant das *Wolbachien*-Wachstum hemmt. Dies konnte ebenfalls mittels Giemsa-Färbung visuell dargestellt werden. Vorteile des bakterizid wirkenden Fosfomycins sind unter anderem seine gute Gewebegängigkeit und Wasserlöslichkeit, sowie seine geringe Größe, weshalb die Annahme nahe liegt, dass es problemlos die Zellmembranen passieren und dadurch leicht an seinen Wirkungsort gelangen kann. Obwohl die Depletion der *Wolbachien* bei der höchsten Fosfomycinkonzentration nicht die Level der Tetracyclin behandelten Zellen erreicht, ist anzunehmen, dass der Lipid II Syntheseweg substantiell wichtig für die Endobakterien ist.

Die *in vitro* erzielte Hemmung des *Wolbachien*-Wachstums durch Fosfomycin konnte jedoch im Mausmodell nicht verifiziert werden. Dabei zeigte sich weder eine Inhibierung des Längenwachstums der Würmer noch eine Reduktion der LsFtsZ-Konzentration. Dies ist vermutlich damit zu begründen, dass, wie aus der Humanmedizin bekannt ist, eine kontinuierliche intravenöse Gabe aufrecht erhalten muss, um therapeutisch wirksame Serumspiegel zu erhalten. Fosfomycin weist nämlich mit zwei Stunden auch im Vergleich zu Doxycyclin, welches eine mittlere Halbwertszeit von 16 h besitzt, eine recht kurze Halbwertszeit auf. Für zukünftige weiterführende Experimente wäre es daher sinnvoll, zum einen höhere

Fosfomycinkonzentrationen zu testen und zum anderen diese auf zwei bis vier Gaben pro Tag zu verteilen, um konstante Wirkspiegel zu erhalten.

Weiterhin könnte die Wirkungslosigkeit des Fosfomycins damit zusammenhängen, dass trotz der bereits erwähnten guten Gewebegängigkeit und Wasserlöslichkeit eventuell auf Grund der negativen Ladung des Antibiotikums das Eindringen in die *Wolbachien* erschwert ist.

Um weitere Belege für die Theorie zu finden, dass Lipid II essentiell für *Wolbachien* ist, verwendeten wir weiterhin das Antibiotikum D-Cycloserin, welches das Enzym D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase inhibiert. Somit stellt es ebenfalls ein entscheidendes Enzym in der Biosynthese des Lipid II dar. Die in unseren Versuchen erzielten Resultate belegen allerdings, dass D-Cycloserin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keinen signifikanten hemmenden Einfluss auf die *Wolbachien*-Proliferation besitzt. Außerdem konnte keine Reduktion des Längenwachstums der Würmer im Mausmodell erzielt werden. Da kaum verlässliche Daten über die Bioverfügbarkeit D-Cycloserins in den *Wolbachien* existieren, könnte dies darin begründet sein, dass trotz seiner geringen Größe und guten Gewebegängigkeit die in den Mäusen erzielte Antibiotikumkonzentration zu niedrig ist. Dies wiederum kann damit zusammenhängen, dass das Antibiotikum, um zu seinem Wirkungsort zu gelangen, erst in den Wurm, im Anschluss durch eine die *Wolbachien* umgebende Vesikelmembran und zuletzt durch die *Wolbachien*-Membran selbst gelangen muss. Im Gegensatz dazu kann Doxycyclin jedoch, obwohl es auf demselben Weg zu seinem Wirkort gelangen muss, seine Wirkung nachweislich entfalten. Daher könnte als weitere Ursache für die Wirkungslosigkeit des D-Cycloserins angesehen werden, dass es als Aminosäureanalogon von den Würmern oder den *Wolbachien* für Synthesezwecke verwendet werden könnte und daher nicht in ausreichender Menge zur Entfaltung seiner vollständigen Wirkung zur Verfügung steht. Bekannt ist zum Beispiel, dass D-Cycloserin von den Zellen schnell resorbiert wird und als partieller Agonist an der Glycin-regulierenden Seite des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NDMA) in Nervenzellen von Mäusen bindet (Henderson et al., 1990).

Als weiterer Grund für die ineffektive Wirkung des D-Cycloserins könnte angesehen werden, dass das Genom der *Wolbachien* keine für die Racemasen *alr* und *murl* kodierenden Gene aufweist (Foster et al., 2005; Henrichfreise et al., 2009), die L-Alanin in D-Alanin konvertieren. Daher kann man vermuten, dass *Wolbachien* zur Synthese des Lipid II L-Alanyl-L-Alanin anstelle von D-Alanyl-D-Alanin verwenden. In diesem Fall hätte D-Cycloserin keinen hemmenden Einfluss auf die D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase Aktivität.

Henrichfreise et al. konnten außerdem zeigen, dass isolierte Zellmembranen von *Wolbachien* aus *Aedes albopictus*, die mit C55-P, UDP-MurNAc-Pentapeptid und UDP-GlcNAc inkubiert wurden, Lipid II synthetisieren. In weiteren Versuchsreihen konnte außerdem belegt werden, dass rekombinantes MraY von *Wolbachien* aus *B. malayi*, ein integrales Membranprotein mit vermutlich 10 Transmembranproteinen, welches den Transfer des Phospho-N-Acetylmuramoylpentapeptids von UDP-MurNAc-pentapeptid auf C55-P und somit die Synthese von Lipid I katalysiert, eine Aktivität *in vitro* aufweist. Dasselbe Ergebnis konnte auch für das membranassoziierte MurG erzielt werden. Dieses Enzym katalysiert mit dem Transfer von GlcNAc auf Lipid I den letzten Schritt zur Lipid II-Synthese. Auch diese Resultate stützen die Theorie, dass Lipid II essentiell für *Wolbachien* ist.

Ein weiteres potentiell Antibiotikum, das Lipid II als Zielstruktur aufweist, ist das zu der Subgruppe der Lantibiotika gehörende Nisin. Durch spezifische Erkennung und Bindung an Lipid II führt es zur Ausbildung von Poren, wodurch es zur Blockierung der Zellwandbiosynthese kommt (Schneider and Sahl, 2010). Weiterhin bewirkt es in hohen Konzentrationen auf Grund seiner ausgeprägten Amphiphilie die Schädigung der Integrität der Lipid-Doppelschicht in Staphylokokken. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Hemmung der zur Synthese von Lipid II nötigen Enzyme die Zellwandbiosynthese und daher auch den Zellteilungskomplex demontiert (Henrichfreise et al., 2009).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stützen somit die Hypothese, dass die Synthese von Lipid II ein potentiell Ziel einer antibiotischen Therapie darstellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Antibiotika-Assay mit *Wolbachien*-infizierten C6/36 Zellen eine effektive und schnelle Methode zum Screening von potentiellen Antibiotika mit mutmaßlicher anti-*Wolbachien* Aktivität darstellt.

4.2 Die Relevanz neuartiger Antibiotika in der Therapie gegen Filarien

Durch die Depletion der *Wolbachien* mit Antibiotika konnte das symbiontische Zusammenleben zwischen ihnen und ihrem spezifischen Wirt im Tiermodell sowie bei der humanen Onchozerkose bewiesen werden. Eine tägliche Gabe von Doxycyclin über 6 Wochen führt zu einer Depletion der *Wolbachien* in den Würmern und weiterhin zu einer Degeneration ihrer Embryos. Bei infizierten Patienten kann außerdem durch Doxycyclin eine signifikante Reduktion der Mikrofilarien verzeichnet werden. (Hoerauf et al., 2000). Auch die Kombination von Doxycyclin mit Ivermectin zeigt vergleichbare Ergebnisse (Hoerauf et al., 2001; Hoerauf et al.,

2003). Weitere Resultate einer gegen *Wolbachien* gerichteten Therapie mit Doxycyclin sind eine Reduktion proinflammatorischer Stimuli, welche die Bildung von VEGF induzieren, sowie eine erhöhte Expression von VE-Cadherin, welches den Zusammenhalt der Zellen untereinander verbessert und somit die Permeabilität der Zellverbindungen verringert. Aus diesen genannten Effekten kann die Verbesserung von Symptomen bei Lymph-, bzw. Lungenödemen erklärt werden (Pfarr et al., 2009).

Auf der Suche nach alternativen Antibiotika wurden unter anderem Makrolide, Ciprofloxacin und Chloramphenicol auf ihre anti-*Wolbachien*-Aktivität getestet. Keines dieser Antiinfektiva zeigte jedoch einen zu Tetracyclin vergleichbaren hemmenden Effekt. Weiterhin stellten sich Penicilline und Aminoglykoside als ineffektiv heraus, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, ob dies mit zu geringen Konzentrationen der Medikamente in den intrazellulären Kompartimenten zusammenhängt (Hoerauf et al., 2000).

Die in dieser Arbeit erzielten Resultate zeigen, dass die intraperitoneale Behandlung von *L. sigmodonis*-infizierten Balb/c Mäusen mit Tigecyclin über einen Zeitraum von 14 Tagen sowohl zu einer signifikanten Reduktion der Länge der weiblichen Würmer als auch zu einer Reduktion der LsFtsZ-Konzentration um bis zu 4 Log-Stufen führt. Auch mit der Verkürzung der Behandlungsdauer auf 10 bzw. 7 Tage konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden. In diesem Fall waren die erreichten LsFtsZ Konzentrationen sogar im Vergleich zu der über diesen Zeitraum behandelten Doxycyclin Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Da Tigecyclin wie Doxycyclin zu der Gruppe der Tetracycline gehört, besitzt es mit der Hemmung der Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle der ribosomalen 30 S-Untereinheit grundsätzlich den selben Wirkungsmechanismus. Ein Unterschied liegt jedoch darin, dass Tigecyclin mit einer fünffach höheren Affinität als Doxycyclin an den Ribosomen bindet und somit viele spezifische Protektionsproteine unwirksam werden lässt. Ein weiterer Vorteil ist, dass es durch bakterielle Effluxpumpen nicht aus der Zelle heraus transportiert wird. Diese entscheidenden Unterschiede dienen als Erklärungsansatz für die effektivere Wirkung Tigecyclins im Vergleich zu Doxycyclin.

Eine Studie von Townson et al. zeigte, dass das Tetracyclinderivat Minocyclin einen im Vergleich zu Doxycyclin überlegenen Effekt auf die Hemmung der *Wolbachien*-Proliferation in *O. lienalis* Mikrofilarien *in vitro* besitzt. In diesem Zusammenhang scheint die Lipophilie eines Antibiotikums und damit verbunden die erzielten intrazellulären Antibiotikumkonzentrationen

ein weiterer entscheidender Faktor zu sein. Wie eine Studie von Hermans et al. zeigte, hat das mit einem Verteilungskoeffizienten von 0,6 wesentlich lipophilere Doxycyclin eine ausgeprägter hemmende Wirkung auf die *Wolbachien*-Proliferation als Oxytetracyclin, das einen Verteilungskoeffizienten von 0,03 aufweist (Hermans et al., 2001). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den von uns erzielten Resultaten, dass das sehr lipophile Tigecyclin die *Wolbachien*-Proliferation *in vivo* im Vergleich zur Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Der nächste Schritt in Bezug auf die Bewertung von Tigecyclin wären weiterführende vergleichende Experimente, unter anderem mit Minocyclin *in vivo* im *L. sigmodontis*-Mausmodell.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Tigecyclin bezüglich der Wirksamkeit eine effektive Alternative zu Doxycyclin darstellt und damit sogar eine Verkürzung der Behandlungsdauer auf 7 Tage erzielt werden kann. Daher könnte es bei der sog. Individual Drug Administration (IDA) als Therapiealternative Anwendung finden. Da es jedoch dieselben Kontraindikationen wie Doxycyclin aufweist und darüber hinaus intravenös verabreicht werden muss, ist es zur breitgefächerten Anwendung in den MDA-Programmen der WHO ungeeignet.

Anhand der Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Kombination von Rifampicin und Doxycyclin nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 7 Tagen zu einer signifikanten Verminderung des Längenwachstums der weiblichen Filarien, sowie zu einer Reduktion der LsFtsZ-Konzentration im Vergleich zur 7 Tage behandelten Doxycyclinkontrollgruppe führt. Interessant ist hierbei, dass die erreichte Reduktion vergleichbar mit den Werten der 14 Tage Doxycyclinkontrollgruppe und der 7 bzw. 10 Tage Tigecyclingruppe war.

Die erzielten Ergebnisse sind konsistent mit einer Studie von Volkmann et al., die ebenfalls zeigte, dass eine 14-tägige Behandlung *L. sigmodontis*-infizierter Balb/c-Mäuse mit der Antibiotikakombination Doxycyclin/Rifampicin zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums der weiblichen Filarien führte (Volkmann et al., 2003). Eine Verlängerung der Therapiedauer auf 17 bzw. 21 Tage erbrachte jedoch keine zusätzliche Verbesserung der Ergebnisse. Der hemmende Effekt der Antibiotikakombination scheint sich daher schon zu einem frühen Zeitpunkt der Behandlung zu manifestieren.

Um herauszufinden zu welchem Zeitpunkt die Inhibition einsetzt, müssten weiterführende Experimente mit einer Verkürzung des Behandlungszeitraumes auf 3 bzw. 5 Tage durchgeführt werden.

Der im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Doxycyclin ausgeprägtere hemmende Effekt auf die *Wolbachien*-Proliferation ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die sich synergistisch ergänzenden Wirkmechanismen der Antibiotika zurückzuführen. Doxycyclin ist ein bakteriostatisch wirksames Antibiotikum, das selektiv die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt. Rifampicin ist ein bakterizides Antiinfektivum, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase inhibiert und somit die Transkription der Bakterien spezifisch unterbindet. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der Effekt von Doxycyclin und Rifampicin ausschließlich auf die Reduktion der *Wolbachien*-Proliferation zurückzuführen ist, sondern auch auf eine Wirkung auf die Nematoden selbst (Volkman et al., 2003).

Eine Studie von Hörauf et al. konnte allerdings belegen, dass die *Wolbachien*-freie Filarie *Acanthocheilonema viteae* von einer antibiotischen Therapie mit Tetracyclin nicht beeinflusst wurden (Hoerauf et al., 1999). Um den genauen Einfluss der Antibiotika Doxycyclin und Rifampicin auf die Nematoden selbst zu überprüfen, müssten daher weiterführende Experimente mit der Kombinationstherapie in der Filarie *Acanthocheilonema viteae* durchgeführt werden.

Aus den vorstehenden Erläuterungen ist zu schließen, dass eine Verkürzung der Behandlungsdauer, wie von der WHO für die MDA-Programme vorgeschlagen wird, mit der Kombinationstherapie erreicht werden kann. Jedoch bestehen auch hier wie bei Tigecyclin dieselben Kontraindikationen für Patientengruppen wie Kinder und Schwangere, weshalb es für die Anwendung in breiter angelegten MDA-Programmen nicht geeignet erscheint. Es könnte jedoch für ausgewählte Personengruppen in Form der Individual Drug Administration als Therapieoption zu Doxycyclin zum Einsatz kommen, zum Beispiel wenn sie eine persistierende Mikrofilariämie auf Grund einer fehlenden Empfindlichkeit gegenüber den gegenwärtigen Medikamenten aufweisen. Weiterhin könnte die Kombinationstherapie in Ländern Zentralafrikas und Sudan als Alternative zu Ivermectin verwendet werden, da es dort zu einem coendemischen Auftreten von Loiasis kommt, wodurch das Risiko für Ivermectin-vermittelte Nebenwirkungen erhöht ist (Gardon et al., 1997).

Doxycyclin und Rifampicin hätten zum einen den Vorteil eine makrofilarizide Wirkung bei der Onchozerkose aufzuweisen und zum anderen ineffektiv gegen *L. Loa* zu sein, da diese keine *Wolbachien* beinhalten.

5 Zusammenfassung

Infektionen durch Filarien stellen noch immer eines der Hauptprobleme für Morbidität in den Tropen dar. Mehr als eine Milliarde Menschen in 87 Ländern sind gefährdet daran zu erkranken, während 150 Millionen Menschen bereits infiziert sind. Das klinische Erscheinungsbild der Lymphatischen Filariose ist gekennzeichnet durch akute Lymphangitis, Hydrozele, Lymphödem und Elephantiasis. Bei der Onchozerkose zeigen sich Symptome wie chronische Dermatitis, die zu Hautatrophie und Fibrose der Lymphknoten führt, und Visusverlust bis hin zur Erblindung. Zur Behandlung werden heute Medikamente wie Diethylcarbamazin (DEC) bei der Lymphatischen Filariose und Albendazol in Kombination mit Ivermectin bei der Onchozerkose eingesetzt (Richards et al., 1989; Dreyer et al., 1994).

Die Tatsache, dass diese Medikamente über einen sehr langen Zeitraum gegeben werden müssen, spiegelt die Notwendigkeit für die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten wieder. Verbunden mit den Erkenntnissen über die intrazellulär lebenden Bakterien der Gattung *Wolbachia* wurde ein neuartiges Konzept der antibiotischen Therapie gegen Filarieninfektionen mit Doxycyclin etabliert.

Der Idee folgend diese neuartige Therapieoption auch Patientengruppen, die einer Doxycyclintherapie nicht zugänglich sind, anbieten zu können, wurde die Suche nach neuen antibakteriellen Zielstrukturen, wie zum Beispiel der Zellwandbiosynthese der *Wolbachien*, für weitere Behandlungsmöglichkeiten intensiviert.

Als Angriffspunkte wurden hierbei in dieser Arbeit die Enzyme D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase, welches durch das Antibiotikum D-Cycloserin gehemmt wird, und MurA, das durch Fosfomycin inhibiert wird, herangezogen. Beide Enzyme sind maßgeblich an der Synthese von Lipid II beteiligt, das dadurch als neue Zielstruktur für eine *Wolbachien*-Depletion definiert werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *Wolbachien*-infizierten C6/36 Zellen mit Fosfomycin zu einer Hemmung des *Wolbachien*-Wachstums führt. Dieser Effekt konnte mit Hilfe der Giemsa-Färbung auch visualisiert werden. Auf Grund dieses Ergebnisses ist davon auszugehen, dass die Biosynthese von Lipid II essentiell für *Wolbachien* ist und somit als eine neue potentielle Zielstruktur zur *Wolbachien*-Depletion angesehen werden kann. Die Behandlung mit D-Cycloserin hingegen zeigte keine dem Fosfomycin vergleichbare Wirkung.

Die *in vivo* durchgeführten Versuchsreihen mit *L. sigmodontis*-infizierten Balb/c-Mäusen zeigten, dass eine 14-tägige antibiotische Therapie sowohl mit Fosfomycin als auch mit D-Cycloserin zu

keiner signifikanten Reduktion der *Wolbachien*-Proliferation führt. Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringe Antibiotikakonzentration in den Mäusen zurückzuführen, da diese, um zu ihrem Wirkungsort zu gelangen, erst die Wurmoberfläche, dann eine die *Wolbachien* umgebende Vesikelmembran und als letztes die *Wolbachien*-Membran selbst durchdringen müssen.

Des Weiteren wurde *in vivo* die filarizide Wirkung des neuen Glycylycyclins Tigecyclin sowie der Kombinationstherapie Doxycyclin und Rifampicin untersucht um deren Anwendung für einen verkürzten Behandlungszeitraum zu prüfen.

Die Versuche im Mausmodell mit Tigecyclin führten zu einer signifikanten Reduktion der *Wolbachien*-Proliferation und Hemmung des Längenwachstums der weiblichen Filarien. Auch eine Verkürzung der Behandlungsdauer auf 10 bzw. 7 Tage führte zu einer vergleichbaren Wirkung. Weiterhin war der erzielte Effekt signifikant zu der Doxycyclin-behandelten Kontrollgruppe. Ein vergleichbares Ergebnis konnten für die Kombinationstherapie Doxycyclin/Rifampicin beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Antibiotika eine effektive Therapiealternative zur Doxycyclin-Monotherapie darstellen und damit sogar eine Verkürzung der Behandlungsdauer auf 7 Tage erreicht werden kann. Auf Grund der bekannten Kontraindikationen sind sie für die Anwendung in MDA-Programmen jedoch ungeeignet. Sie könnten daher bei ausgewählten Personengruppen in Form der Individual Drug Administration zum Einsatz kommen.

6 Literaturverzeichnis

Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci.* 1998; 265: 2407-2413

Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 357-364

Bandi C, Dunn AM, Hurst GD, Rigaud T. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends Parasitol.* 2001; 17: 88-94

Bazzocchi C, Jamnongluk W, O'Neill SL, Anderson TJ, Genchi C, Bandi C. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. *Curr Microbiol.* 2000; 41: 96-100

Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann NT. *Human Parasitology*, 3rd Edition. London: Elsevier Academic Press, 2005

Booth IR, Ferguson GP, Miller S, Li C, Gunasekera B, Kinghorn S. Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 1406-1408

Bosshardt SC, McCall JW, Coleman SU, Jones KL, Petit TA, Klei TR. Prophylactic activity of tetracycline against *Brugia pahangi* infection in jirds (*Meriones unguiculatus*). *J Parasitol.* 1993; 79: 775-777

Brattig NW, Buttner DW, Hoerauf A. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes Infect.* 2001; 3: 439-446

Büttner DW, Racz P. Macro- and microfilariae in nodules from onchocerciasis patients in the Yemen Arab Republic. *Tropenmed Parasitol.* 1983; 34: 113-121

Casiraghi M, Favia G, Cancrini G, Bartoloni A, Bandi C. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. *Parasitol Res.* 2001; 87: 417-420

Debrah AY, Mand S, Specht S, Marfo-Debrekeyei Y, Batsa L, Pfarr K, Larbi J, Lawson B, Taylor M, Adjei O, Hoerauf A. Doxycycline reduces plasma VEGF-C/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *PLoS Pathog.* 2006; 2: e92

Debrah AY, Mand S, Marfo-Debrekeyei Y, Batsa L, Pfarr K, Buttner M, Adjei O, Buttner D, Hoerauf A. Macrofilaricidal effect of 4 weeks of treatment with doxycycline on *Wuchereria bancrofti*. *Trop Med Int Health.* 2007; 12: 1433-1441

Debrah AY, Mand S, Marfo-Debrekeyei Y, Batsa L, Pfarr K, Lawson B, Taylor M, Adjei O, Hoerauf A. Reduction in levels of plasma vascular endothelial growth factor-A and improvement in hydrocele patients by targeting endosymbiotic *Wolbachia* sp. in *Wuchereria bancrofti* with doxycycline. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80: 956-963

Dreyer G, Pires ML, de Andrade LD, Lopes E, Medeiros Z, Tenorio J, Coutinho A, Noroes J, Figueredo-Silva J. Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and amicrofilaraemic individuals in an endemic area of Bancroftian filariasis, Recife, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88: 232-236

Duke BO. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop Med Parasitol.* 1993; 44: 61-68

Fallon AM. Cytological properties of an *Aedes albopictus* mosquito cell line infected with *Wolbachia* strain wAlbB. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008; 44: 154-161

Feldhaar H, Gross R. Genome degeneration affects both extracellular and intracellular bacterial endosymbionts. *J Biol.* 2009; 8: 31

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, et al. The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol.* 2005; 3: e121

Franz M, Buttner DW. The fine structure of adult *Onchocerca volvulus* IV. The hypodermal chords of the female worm. *Tropenmed Parasitol.* 1983; 34: 122-128

Gardon J, Gardon-Wendel N, Demanga N, Kamgno J, Chippaux JP, Boussinesq M. Serious reactions after mass treatment of onchocerciasis with ivermectin in an area endemic for *Loa loa* infection. *Lancet.* 1997; 350: 18-22

Ghuysen JM, Goffin C. Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2339-2344

van Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan *Glycobiology.* 2001; 11: 25-36

Henderson G, Johnson JW, Ascher P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J Physiol.* 1990; 430: 189-212

Henkle-Duhrsen K, Eckelt VH, Wildenburg G, Blaxter M, Walter RD. Gene structure, activity and localization of a catalase from intracellular bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 96: 69-81

Henrichfreise B, Schiefer A, Schneider T, Nzukou E, Poellinger C, Hoffmann TJ, Johnston KL, Moelleken K, Wiedemann I, Pfarr K, Hoerauf A, Sahl HG. Functional conservation of the lipid II biosynthesis pathway in the cell wall-less bacteria *Chlamydia* and *Wolbachia*: why is lipid II needed? *Mol Microbiol.* 2009; 73: 913-923

Hermans PG, Hart CA, Trees AJ. In vitro activity of antimicrobial agents against the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 659-663

Hertig M, Wolbach SB. Studies on rickettsia-like organisms in insects. *J Med Res.* 1924; 44: 329-374

Hoerauf A, Nissen-Pahle K, Schmetz C, Henkle-Duhrsen K, Blaxter ML, Buttner DW, Gallin MY, Al-Qaoud KM, Lucius R, Fleischer B. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest.* 1999; 103: 11-18

Hoerauf A. Intrazelluläre Bakterien der Gattung *Wolbachia* in Würmern – Ziel therapeutischer Intervention? *Nova Acta Leopold NF*, 2000

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

Hoerauf A, Volkmann L, Nissen-Paehle K, Schmetz C, Autenrieth I, Buttner DW, Fleischer B. Targeting of *Wolbachia* endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Trop Med Int Health.* 2000; 5: 275-279

Hoerauf A, Fleischer B, Walter RD. Of filariasis, mice and men. *Trends Parasitol.* 2001; 17: 4-5

Hoerauf A, Mand S, Adjei O, Fleischer B, Buttner DW. Depletion of *wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet.* 2001; 357: 1415-1416

Hoerauf A, Adjei O, Buttner DW. Antibiotics for the treatment of onchocerciasis and other filarial infections. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3: 533-537

Hoerauf A, Mand S, Fischer K, Kruppa T, Marfo-Debrekyei Y, Debrah AY, Pfarr KM, Adjei O, Buttner DW. Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Med Microbiol Immunol.* 2003; 192: 211-216

Hoerauf A, Mand S, Volkmann L, Buttner M, Marfo-Debrekyei Y, Taylor M, Adjei O, Buttner DW. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: Kinetics of Wolbachia endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect.* 2003; 5: 261-273

Hoerauf A. New strategies to combat filariasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006; 4: 211-222

Hoerauf A. *Wolbachia endosymbionts: An Achilles' Heel of filarial nematodes.* Basel: Karger, 2007

Hoerauf A, Specht S, Buttner M, Pfarr K, Mand S, Fimmers R, Marfo-Debrekyei Y, Konadu P, Debrah AY, Bandi C, Brattig N, Albers A, Larbi J, Batsa L, Taylor MJ, Adjei O, Buttner DW. Wolbachia endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. *Med Microbiol Immunol.* 2008; 197: 295-311

Kozek WJ. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol.* 1977; 63: 992-1000

Kozek WJ, Marroquin HF. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1977; 26: 663-678

Makepeace BL, Rodgers L, Trees AJ. Rate of elimination of *Wolbachia pipientis* by doxycycline in vitro increases following drug withdrawal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 922-927

Mand S, Specht S, Zahner H, Hoerauf A. Ultrasonography in filaria-infected rodents: detection of adult *Litomosoides sigmodontis* and *Brugia malayi filariae*. *Trop Med Int Health.* 2006; 11: 1382-1387

Marechal P, Le Goff L, Petit G, Diagne M, Taylor DW, Bain O. The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice. *Parasite (Paris, France).* 1996; 3: 25-31

McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG. Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1975; 69: 509-514

Melrose WD. Lymphatic filariasis: new insights into an old disease. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 947-960

O'Neill SL, Pettigrew MM, Sinkins SP, Braig HR, Andreadis TG, Tesh RB. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol.* 1997; 6: 33-39

Ottesen EA. The Wellcome Trust Lecture. Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective. *Parasitology.* 1992; 104: 71-79

Petit G, Diagne M, Marechal P, Owen D, Taylor D, Bain O. Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1992; 67: 144-150

Plaisier AP, Alley ES, van Oortmarssen GJ, Boatman BA, Habbema JD. Required duration of combined annual ivermectin treatment and vector control in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Bull World Health Organ.* 1997; 75: 237-45

Pfarr K, Hoerauf A. The annotated genome of *Wolbachia* from the filarial nematode *Brugia malayi*: what it means for progress in antifilarial medicine. *PLoS Med.* 2005; 2: e110

Pfarr KM, Hoerauf AM. Antibiotics which target the *Wolbachia* endosymbionts of filarial parasites: a new strategy for control of filariasis and amelioration of pathology. *Mini Rev Med Chem.* 2006; 6: 203-210

Pfarr K, Foster J, Slatko B, Hoerauf A, Eisen JA. On the taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*: should this species name include the intracellular bacteria of filarial nematodes? *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57: 1677-1678

Pfarr KM, Debrah AY, Specht S, Hoerauf A. Filariasis and lymphoedema. *Parasite Immunol.* 2009; 31: 664-672

Richards FO, Zea Flores R, Duke BO. Dynamics of microfilariae of *Onchocerca volvulus* over the first 72 hours after treatment with ivermectin. *Trop Med Parasitol.* 1989;40: 299-303

Schneider T, Sahl HG. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300: 161-169

Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 74: 223-227

Specht S, Mand S, Marfo-Debrekyei Y, Debrah AY, Konadu P, Adjei O, Buttner DW, Hoerauf A. Efficacy of 2- and 4-week rifampicin treatment on the *Wolbachia* of *Onchocerca volvulus*. *Parasitol Res.* 2008; 103: 1303-1309

Strübing U, Lucius R, Hoerauf A, Pfarr KM. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of *Wolbachia* from filarial nematodes. *Int J Parasitol.* 2010; 40: 1193-202

Tatar LD, Marolda CL, Polischuk AN, van Leeuwen D, Valvano MA. An *Escherichia coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology.* 2007; 153: 2518-2529

Taylor MJ, Hoerauf A. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today.* 1999; 15: 437-442

Taylor MJ, Hoerauf A. A new approach to the treatment of filariasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14: 727-731

Taylor MJ, Makunde WH, McGarry HF, Turner JD, Mand S, Hoerauf A. Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005; 365: 2116-2121

Taylor MJ, Hoerauf A, Bockarie M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Lancet*. 2010; 376: 1175-1185

Thomas OC, Lawrence R. *Parasites in human tissues*, 1st Edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathologists, 1995

Thylefors B, Alleman M. Towards the elimination of onchocerciasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006; 100: 733-746

Townson S, Hutton D, Siemienicka J, Hollick L, Scanlon T, Tagboto SK, Taylor MJ. Antibiotics and *Wolbachia* in filarial nematodes: antifilarial activity of rifampicin, oxytetracycline and chloramphenicol against *Onchocerca gutturosa*, *Onchocerca lienalis* and *Brugia pahangi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94: 801-816

Townson S, Tagboto S, McGarry HF, Egerton GL, Taylor MJ. *Onchocerca* parasites and *Wolbachia* endosymbionts: evaluation of a spectrum of antibiotic types for activity against *Onchocerca gutturosa* in vitro. *Filaria J*. 2006; 5: 4

Turner JD, Mand S, Debrah AY, Muehlfeld J, Pfarr K, McGarry HF, Adjei O, Taylor MJ, Hoerauf A. A randomized, double-blind clinical trial of a 3-week course of doxycycline plus albendazole and ivermectin for the treatment of *Wuchereria bancrofti* infection. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 1081-1089

Volkman L, Fischer K, Taylor M, Hoerauf A. Antibiotic therapy in murine filariasis (*Litomosoides sigmodontis*): comparative effects of doxycycline and rifampicin on *Wolbachia* and filarial viability. *Trop Med Int Health*. 2003; 8: 392-401

Warbrick EV, Barker GC, Rees HH, Howells RE. The effect of invertebrate hormones and potential hormone inhibitors on the third larval moult of the filarial nematode, *Dirofilaria immitis*, in vitro. *Parasitology*. 1993; 107: 459-463

Werren JH, Jaenike J. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity*. 1995; 75: 320-326

Werren JH, O'Neill SL. *The evolution of heritable symbionts*. Oxford: Oxford University Press, 1997

WHO. *Lymphatic filariasis*. 1995

Williams SA, Lizotte-Waniewski MR, Foster J, Guiliano D, Daub J, Scott AL, Slatko B, Blaxter ML. The filarial genome project: analysis of the nuclear, mitochondrial and endosymbiont genomes of *Brugia malayi*. *Int J Parasitol*. 2000; 30: 411-419

Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol*. 2004; 2: E69

Wu B, Novelli J, Foster J, Vaisvila R, Conway L, Ingram J, Ganatra M, Rao AU, Hamza I, Slatko B. The heme biosynthetic pathway of the obligate *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* as a potential anti-filarial drug target. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e475

Xie H, Bain O, Williams SA. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite*. 1994; 1: 141-151

7 Danksagung

Mein Dank gilt vor allen Dingen Prof. Dr. Achim Hörauf, Frau Dr. Andrea Schiefer und Dr. Kenneth Parr für ihr beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, ihre fachlichen Ratschläge sowie ihre Diskussionsbereitschaft.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Spengler für die Übernahme des Dissertationsgutachtens recht herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Specht, Frau Dr. Sabine Mand, Anna Albers, Jutta Frank, Sebastian Ziewer, Katrin Arndts, Bettina Dubben und Sandra Arriens für die tolle Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Auch möchte ich meinen Eltern Karin und Theo Hoffmann sowie meiner Schwester Katherina Hoffmann für ihre Unterstützung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt abschließend meiner Frau Thi Thu Hoffmann, die mir diesen Weg ermöglicht hat und zu allen Zeiten zur Seite stand.

8 Lebenslauf

Publikation:

Henrichfreise B, Schiefer A, Schneider T, Nzukou E, Poellinger C, Hoffmann TJ, Johnston KL, Moelleken K, Wiedemann I, Pfarr K, Hoerauf A, Sahl HG. Functional conservation of the lipid II biosynthesis pathway in the cell wall-less bacteria Chlamydia and Wolbachia: why is lipid II needed? Mol Microbiol. 2009; 73: 913-923